

TESIS DOCTORAL

**ANÁLISIS DE GENES SITUADOS EN EL HAPLOTIPO H1
DE LA REGIÓN 17q21 Y DE GENES INVOLUCRADOS EN
LA FOSFORILACIÓN DE TAU EN LA PARÁLISIS
SUPRANUCLEAR PROGRESIVA**

Jaume Campdelacreu i Fumadó

Trabajo dirigido por los Dres. Esteban Muñoz García y Eduardo Tolosa Sarró

Servicio de Neurología. Hospital Clínic Universitari, Barcelona

Barcelona, septiembre de 2007

Departament de Medicina, Universitat de Barcelona

Programa Biopatología en Medicina, Bienio 2002-2004

VII. CONCLUSIONES

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis ha sido posible gracias a:

Los Dres Esteban Muñoz y Eduardo Tolosa, que han dirigido el proyecto y supervisado todos los trabajos.

El Dr Mario Ezquerro, de quien he aprendido las técnicas de laboratorio y con quien he trabajado conjuntamente para la realización de todos los estudios.

Los Dres Francesc Valldeoriola, Fina Martí, Pau Pastor y neurólogos de otros centros que han aportado las muestras de DNA de los pacientes que han hecho posibles los estudios genéticos.

El Dr Carles Gaig por colaborar en el estudio de expresión génica.

La Dra Adriana Cardozo y el Dr Pau Pastor por la aportación de las muestras del Banco de Tejidos Neurológicos de la Universitat de Barcelona y de la Universidad de Navarra.

Los técnicos de laboratorio Eva Caballero y Manel Fernández por su soporte técnico.

El Servicio de Neurología del Hospital Clínic que ha hecho posible mi formación como neurólogo con interés en la investigación.

Y especialmente a mi familia.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	7
1. Epidemiología de la PSP	7
2. Clínica	8
3. Diagnóstico y diagnóstico diferencial	9
4. La proteína tau en la PSP y otras taupatías	12
4.1. La proteína tau	13
4.2. Patología tau en la PSP	15
4.3. Otras taupatías	16
5. Etiología de la PSP	17
5.1. Factores ambientales	17
5.2. Factores genéticos	18
5.2.1. Región del haplotipo H1	19
a. Tau y región 3'-UTR	19
b. Saitohin	21
c. NIK	21
d. CRHR1	22
5.2.2. Protein-kinasa GSK-3 β	23
II. HIPÓTESIS	25
III. OBJETIVOS	27
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	29

1. Pacientes	30
2. Métodos	30
2.1. Técnicas generales	30
2.1.1. Extracción de DNA	30
2.1.2. Amplificación genómica mediante PCR	31
2.1.3. Genotipado de polimorfismos	31
2.1.4. Cribado de mutaciones	32
2.1.5. Secuenciación	32
2.1.6. Análisis estadístico	33
2.2. Secuenciación del gen <i>saitohin</i> y región tau-3'UTR	33
2.3. Genotipado de los SNPs Q7R de <i>saitohin</i> y promotor de tau	34
2.4. Secuenciación del gen NIK y genotipado del SNP del exón 15	34
2.5. Secuenciación y estudio de expresión del gen CRHR1	35
2.5.1. Secuenciación del gen CRHR1	35
2.5.2. Genotipado del SNP -16T/C de CRHR1	37
2.5.3. Muestras de cerebro	37
2.5.4. Cuantificación de RNA	37
2.5.5. Análisis de datos	38
2.6. Genotipado de los polimorfismos de <i>GSK-3β</i>	38
V. RESULTADOS	40
1. Artículos publicados	41
2. Resultados no publicados: análisis de <i>GSK-3beta</i>	52

VI. DISCUSIÓN	62
1. Delimitación de la extensión del haplotipo H1 y búsqueda de mutaciones en esta región en pacientes con PSP	63
1.1. <i>Saitohin</i> y <i>tau-3'UTR</i>	63
1.2. <i>NIK</i>	65
1.3. <i>CRHR1</i>	65
2. Análisis de los polimorfismos de <i>GSK-3beta</i>	67
VII. CONCLUSIONES	69
VIII. BIBLIOGRAFÍA	71
IX. ANEXO: Abreviaturas	95

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

La parálisis supranuclear progresiva es una enfermedad neurodegenerativa de curso rápidamente progresivo que se caracteriza por el depósito anormal de proteína tau en ganglios basales y tronco cerebral. Descrita por primera vez en 1964 por Steele, Richardson y Olszewsky, desde entonces se han realizado numerosos estudios dirigidos a investigar su etiología. El hallazgo del haplotipo de riesgo H1 en la región del gen *tau* ha sido el descubrimiento más relevante, pero siguen sin conocerse las causas que en los pacientes con predisposición genética conducen a esta severa enfermedad.

1. Epidemiología de la parálisis supranuclear progresiva

La parálisis supranuclear progresiva (PSP) es la segunda causa más frecuente de parkinsonismo primario y la forma más frecuente de parkinsonismo atípico, con una incidencia que representa hasta un 10% de la de la enfermedad de Parkinson. Estudios epidemiológicos en la población norteamericana muestran una incidencia cruda de 1.1/100000/año, que aumenta exponencialmente en función de la edad, desde 1.7/100000/año en personas entre 50-59 años a 14.7/100000/año entre los 80-99 años (Bower JH *et al.*, 1997; Bower *et al.*, 1999; Schrag A *et al.*, 1999). La prevalencia reportada en el Reino Unido oscila entre 4.9-6.5/100000 (Schrag A *et al.*, 1999; Nath U *et al.*, 2001). La enfermedad es algo más frecuente en hombres (Santacruz P *et al.*, 1998). La edad media de inicio es de unos 63 años y la evolución de la enfermedad es hacia un rápido estado de discapacidad, con una supervivencia media de 5.7 años desde el inicio de los síntomas (Litvan I *et al.*, 1996a).

2. Clínica

El cuadro clínico típico de la PSP se caracteriza por parálisis supranuclear de la mirada, parkinsonismo, distonía axial, disartria y disfagia precoces, inestabilidad postural con frecuentes caídas en el primer año y un deterioro cognitivo de tipo frontal. Los primeros casos de PSP descritos por Steele, Richardson y Olszewski correspondían a 9 pacientes con un cuadro de oftalmoplejia supranuclear, parálisis pseudobulbar, disartria y rigidez axial. Estos pacientes presentaban una neuropatología común caracterizada por degeneración neurofibrilar, pérdida neuronal y gliosis en núcleos subcorticales y tronco (Steele J *et al.*, 1964).

La parálisis supranuclear de la mirada vertical es el signo característico de la PSP (Litvan I, 1998). Este signo puede no estar presente al inicio, pero raramente está ausente después de los 3-4 años de evolución (Daniel SE *et al.*, 1995). Los movimientos de seguimiento ocular pueden estar relativamente preservados, sobretodo al inicio (Rivaud-Péchoux S *et al.*, 2000). Se ha descrito además la presencia de intrusiones sacádicas horizontales (“square wave-jerks”) al fijar la mirada (Rascol O *et al.*, 1991). La parálisis de la mirada vertical puede evolucionar hacia oftalmoparesia completa, mientras que el signo de Bell y los reflejos oculovestibulares suelen preservarse (Litvan I *et al.*, 1996b; Rampello L *et al.*, 2005).

Los trastornos conductuales y emocionales (depresión), cognitivos (disfunción frontal) y del sueño (despertar nocturno, insomnio inicial) pueden seguir a los trastornos motores y oculares. La demencia es de tipo subcortical con marcado enlentecimiento del procesamiento de la información y ejecución motora, dificultad en planear y cambiar de concepto, y déficits de atención y memoria (Grafman J *et al.*, 1995). También puede haber ecolalia, ecopraxia e inercia psíquica (Litvan I, 1998). Los trastornos

neurovegetativos (polaquiuria, nicturia e incontinencia) son relativamente frecuentes en fases tardías, pero los signos cerebelosos son raros (Daniel SE *et al.*, 1995; Litvan I and Hutton M, 1998).

3. Diagnóstico y diagnóstico diferencial

El diagnóstico se basa en los rasgos clínicos mencionados. Se han propuesto diversos criterios diagnósticos, siendo los más utilizados los de Litvan (Litvan I *et al.*, 1996b; Litvan I *et al.*, 1996c) y Tolosa (Tolosa E *et al.*, 1994). Los criterios de Litvan han sido validados mostrando una sensibilidad de 83% para PSP posible, y una especificidad del 100% para la PSP probable (**TABLA 1**).

En la primera visita el diagnóstico es más difícil, y sólo un 17% de los casos se diagnostica correctamente al inicio del cuadro. La aplicación de los criterios clínicos mejora ligeramente la precisión diagnóstica. Cuando el cuadro clínico está muy evolucionado, la sensibilidad y el valor predictivo positivo del diagnóstico clínico ya son elevados y la aplicación de los criterios no aporta mayor precisión en el diagnóstico (Osaki Y *et al.*, 2004).

Diversas enfermedades pueden simular un cuadro de PSP. En una serie autóptica de 180 casos con diagnóstico clínico de PSP, 43 (24%) correspondieron a otras entidades: degeneración corticobasal en 12, atrofia multisistémica en 7, demencia con cuerpos de Lewy en 6, enfermedad de Alzheimer en 5, demencia vascular en 4, esclerosis lateral amiotrófica en 3, Creutzfeldt-Jakob en 2, mielinolisis central pontina en 1, esclerosis hipocampal en 1, degeneración palidonígrica en 1 y leucoencefalopatía

multifocal progresiva en 1 (Josephs KA *et al.*, 2003). En la **TABLA 2** se muestran las diversas enfermedades que pueden dar lugar a un síndrome PSP.

TABLA 1. Criterios diagnósticos de PSP (Litvan I *et al.*, 1996b).

<p>1.- <u>CRITERIOS OBLIGATORIOS DE INCLUSIÓN:</u></p> <p>PSP posible:</p> <ul style="list-style-type: none">• Enfermedad gradualmente progresiva.• Edad de inicio igual o superior a 40 años.• Alguno de los siguientes:<ul style="list-style-type: none">a) Parálisis supranuclear de la mirada vertical ob) Sacadas verticales lentas e inestabilidad postural prominente con caídas en el primer año.• No evidencia de otras enfermedades que puedan explicar los anteriores rasgos, como se indica en los criterios de exclusión. <p>PSP probable:</p> <ul style="list-style-type: none">• Enfermedad gradualmente progresiva.• Edad de inicio igual o superior a 40 años.• Parálisis supranuclear de la mirada vertical + inestabilidad postural prominente con caídas en el primer año de la enfermedad.• No evidencia de otras enfermedades que puedan explicar los anteriores rasgos, como se indica en los criterios de exclusión. <p>PSP definida:</p> <ul style="list-style-type: none">• PSP probable o posible clínicamente y evidencia histopatológica de PSP típica. <p>2.- <u>CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:</u></p> <ul style="list-style-type: none">• Antecedentes de encefalitis.• Síndrome del <i>alien limb</i>, déficits corticales sensoriales, atrofia focal frontal o frontotemporal.• Alucinaciones o delirios no relacionados con la terapia dopaminérgica.• Demencia cortical tipo Alzheimer.• Síntomas cerebelosos precoces y prominentes, disautonomía precoz inexplicable.• Signos de parkinsonismo asimétrico y severo.• Evidencia neuroradiológica de anomalías estructurales.• Enfermedad de Whipple. <p>3.- <u>CRITERIOS DE APOYO:</u></p> <ul style="list-style-type: none">• Acinesia simétrica o rigidez, proximal más que distal.• Postura anormal del cuello, especialmente retrocollis.• Respuesta pobre o ausente del parkinsonismo al tratamiento con levodopa.• Disfagia y disartria precoz.• Comienzo precoz de deterioro cognitivo incluyendo al menos dos de las siguientes: apatía, daño del pensamiento abstracto, decremento de la fluencia verbal, conductas de imitación o utilización o signos de liberación frontal.
--

TABLA 2. Enfermedades que pueden producir un cuadro clínico similar a PSP.

Enfermedad vascular cerebral (Winikates J <i>et al.</i> , 1994; Josephs KA <i>et al.</i> , 2002)
Enfermedad de Alzheimer (Daniel SE <i>et al.</i> , 1995, Josephs KA <i>et al.</i> , 2003)
Enfermedad de Parkinson (Daniel SE <i>et al.</i> , 1995)
Enfermedad de Whipple (Averbuch-Heller L <i>et al.</i> , 1999)
Neurosífilis (Murialdo A <i>et al.</i> , 2000)
Gliososis subcortical progresiva (Will RG <i>et al.</i> , 1988; Foster NL <i>et al.</i> , 1992)
Demencia con cuerpos de Lewy (Fearnley NL <i>et al.</i> , 1991; De Bruin VM <i>et al.</i> , 1992)
Enfermedad de Parkinson con granos argirofílicos (Seno H <i>et al.</i> , 2000)
Demencia frontotemporal con parkinsonismo (Miyamoto K <i>et al.</i> , 2001a)
Leucoencefalopatía multifocal progresiva (Alafuzoff I <i>et al.</i> , 1999)
Degeneración corticobasal (Shiozawa M <i>et al.</i> , 2000)
Parkinsonismo postencefalítico (Pramstaller PP <i>et al.</i> , 1996)
Hidrocefalia normotensiva (Morariu MA, 1979)
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (Shimamura M <i>et al.</i> , 2003)
Parkinsonismo farmacológico (Campdelacreu <i>et al.</i> , 2004)

Algunas pruebas complementarias pueden apoyar el diagnóstico de la PSP, aunque no se consideran criterios diagnósticos *per se*. En el examen neurofisiológico, el reflejo de parpadeo suele estar ausente ante un estímulo de sobresalto acústico, pero no ante un estímulo eléctrico del nervio supraorbitario; también son características la denervación esfínter anal y la ausencia del reflejo palmo-oculo-mentoniano (Valls-Solé J *et al.*, 1999). Las alteraciones en RMN aparecen en fases moderadas-avanzadas, siendo características la atrofia mesencefálica y del pedúnculo cerebeloso superior (Paviour DC *et al.*, 2006). En cortes sagitales puede observarse atrofia del mesencéfalo, del tronco del cuerpo caloso y del córtex cingulado anterior, hallazgos que probablemente se relacionen con la parálisis supranuclear, disfunción de los programas motores y disfunción emocional (Arai K, 2006). En RMN seriadas se ha documentado una atrofia cerebral global progresiva, especialmente del mesencéfalo, correlacionándose con el deterioro motor, y del córtex frontal, correlacionándose con el deterioro de la función

ejecutiva (Paviour DC *et al.*, 2006). Para el diagnóstico definitivo de PSP se requiere el estudio autopsico, existiendo unos criterios histopatológicos diagnósticos (Hauw JJ *et al.*, 1994). No existe tratamiento que modifique la evolución natural de la enfermedad.

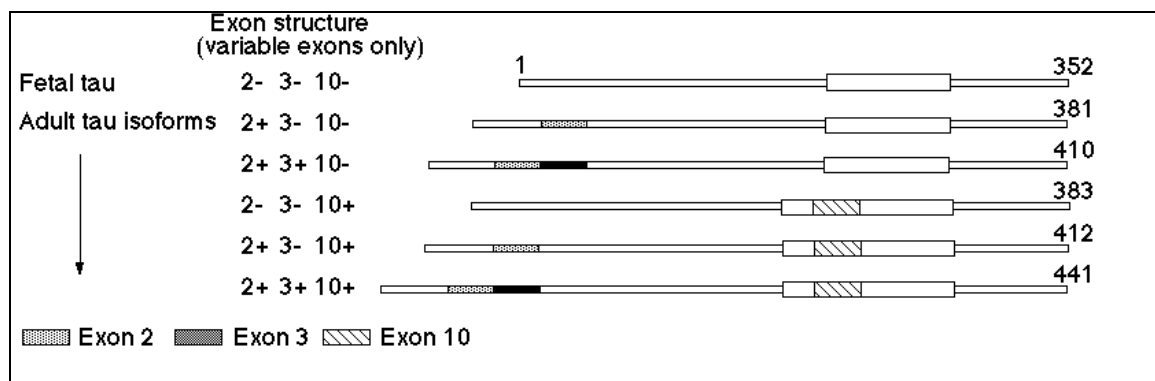
4. La proteína tau en la PSP y otras taupatías

El término taupatía se utiliza para englobar a un grupo de enfermedades neurodegenerativas que cursan con demencia y, en muchos casos, con trastornos del movimiento, y que se caracterizan por la presencia de depósitos filamentosos de proteína tau hiperfosforilada en neuronas y glía asociados a cambios neurodegenerativos en determinadas regiones cerebrales. Las más conocidas son la PSP, la degeneración corticobasal (DCB) y la demencia frontotemporal (DFT), aunque existen otras enfermedades asociadas a depósito anormal de tau (Lee VM *et al.*, 2001). El descubrimiento de diversas mutaciones del gen tau en familias con demencia frontotemporal con parkinsonismo ligada al cromosoma 17 (FTDP-17) (Hutton M *et al.*, 1998) indujo el estudio exhaustivo de dicho gen en otras patologías asociadas al depósito de tau. La morfología y distribución de las inclusiones tau+ permite distinguir las distintas taupatías desde el punto de vista neuropatológico. Sin embargo, ningún tipo de inclusión neuronal es patognomónico de un trastorno, y son frecuentes los casos atípicos que combinan rasgos clínicos y neuropatológicos de diversas taupatías.

4.1. La proteína tau

La proteína tau asociada a microtúbulos (MAPT, MIM 157140) es una proteína abundante en el sistema nervioso central, aunque también se encuentra en otros tejidos, y se expresa predominantemente en los axones. Se une a los microtúbulos (MT), los estabiliza y promueve su ensamblaje, por lo que juega un papel importante en el mantenimiento de la estructura de la neurona y en el transporte axonal (Ebner *et al.*, 1994; Hirokawa N, 1994; Lee VM *et al.*, 2001). Está codificada por un gen de 16 exones localizado en el cromosoma 17q21.31. El procesamiento de este gen mediante el *splicing* alternativo de los exones 2, 3 y 10 da lugar a 6 isoformas distintas en el cerebro humano adulto, de longitud entre 352 y 441 aminoácidos (**FIGURA 1**).

FIGURA 1: isoformas de la proteína tau (Goedert M *et al.*, 1989).



Estas isoformas se expresan de forma variable según la especie, el grado de crecimiento y la localización en el sistema nervioso. Por ejemplo, el exón 4 sólo se expresa en el sistema nervioso periférico y da lugar a la isoforma más larga (*big tau*). La inclusión alternativa de los exones 2 y 3 da lugar a isoformas con 0, 1 ó 2 insertos de 29 aminoácidos en la región N-terminal. La unión de tau a los MT está mediada por repeticiones imperfectas de 31-32 residuos aminoácidos codificados en la región que

comprende los exones 9 al 12 del gen tau. El *splicing* alternativo del exón 10 da lugar a dos grandes grupos de isoformas: las isoformas 3R, que contienen 3 repeticiones de la secuencia de 31-32 aminoácidos en la región de unión a MT, y las isoformas 4R, que contienen 4 repeticiones debido a la inclusión de la zona codificante del exón 10. Las isoformas 4R tienen mayor afinidad para la unión a MT (Gustke N *et al.*, 1994; Goode BL *et al.*, 2000) y son más eficientes para promover su ensamblaje *in vitro* (Goedert M and Jakes R, 1990) y para regular su dinámica (Panda D *et al.*, 2003; Bunker JM *et al.*, 2004). La actividad *in vitro* de los dos grupos de isoformas sobre los MT se ha estudiado por videomicroscopía. Parece ser que existen dos subpoblaciones de MT con diferente tasa de crecimiento, y que la dinámica de crecimiento se altera en función de la concentración de tau y de la isoforma predominante. Estas diferencias cualitativas y cuantitativas entre 3R y 4R apoyan que la expresión anormal de tau altera la regulación de la dinámica de los MT (Levy SF *et al.*, 2005). En la PSP se observa depósito selectivo de isoformas 4R (Chambers CB *et al.*, 1999, Takanashi H *et al.*, 2002).

También se ha observado que niveles elevados de tau inhiben el transporte intracelular en neuronas, especialmente el transporte por kinesinas hacia los procesos axonales, con lo cual los peroxisomas, mitocondrias y vesículas con nutrientes no llegan a las neuritas, dando lugar a alteraciones en el crecimiento neuronal, susceptibilidad al estrés oxidativo y agregación patológica de proteínas (Stamer K *et al.*, 2002).

La proteína tau está sometida a numerosas modificaciones postranscripcionales (Chen F *et al.*, 2004). De éstas, la fosforilación es probablemente la más implicada en procesos patológicos. Tau contiene numerosos residuos susceptibles de fosforilación, que se concentran en las regiones flanqueantes a la región de unión a MT. Una mayor fosforilación de tau implica menor capacidad de unión a los MT. En las neuronas inmaduras del cerebro en desarrollo predominan las isoformas 3R, más flexibles y con

menor afinidad para unirse a MT, y existe un mayor grado de fosforilación, mientras que en el adulto, el ratio de isoformas 3R/4R es alrededor de 1, y tau está moderadamente fosforilada. Numerosas protein-kinasas y protein-fosfatasas pueden regular la fosforilación de tau, y entre ellas, GSK-3 β y CDK5 parece jugar un papel importante (Lee VM *et al.*, 2001). Es posible que una alteración del balance kinasas/fosfatasas pueda estar implicada en el depósito de tau en algunas taupatías.

4.2. Patología tau en la PSP

La neuropatología de la PSP se caracteriza por pérdida neuronal y gliosis en los ganglios basales, subtálamo, tronco, y médula espinal (Kikuchi H *et al.*, 1999), incluyendo el núcleo de Onuf (Scaravilli T *et al.*, 2000), con presencia de abundantes depósitos de tau fibrilar en forma de hilos neurópilos y ovillos neurofibrilares (ONF) redondos o globosos (Hauw JJ *et al.*, 1994; Daniel SE *et al.*, 1995; Dickson DW *et al.*, 1999) en el citoplasma de neuronas y glía. Estos depósitos están formados principalmente por filamentos rectos compuestos casi exclusivamente por isoformas 4R de proteína tau insoluble hiperfosforilada, y que se ponen de manifiesto mediante tinción con plata o mediante técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos anti-tau (Sergeant N *et al.*, 1999).

Los ONF globosos son muy característicos y ayudan a confirmar el diagnóstico de la PSP (Chin SS *et al.*, 1996), aunque también se han hallado en la DCB. Es frecuente en la PSP la presencia de ONF en astrocitos, donde se acumulan en los procesos proximales dando lugar a los denominados “tufted astrocytes”, y en oligodendrocitos, donde se denominan “coiled bodies”. (Komori T *et al.*, 1999). En los

astrocitos, las inclusiones tau+ están formadas tanto por filamentos rectos como por filamentos apareados helicoidales como los de la enfermedad de Alzheimer. La electroforesis de esta tau revela dos bandas de 69 y 64 kDa, que corresponden a las isoformas 4R (Sergeant N *et al.*, 1999; Dickson DW *et al.*, 1999). Los agregados de isoformas 4R también son característicos de la DCB y se encuentran también en algunos casos de FTDP-17.

4.3. Otras taupatías

Otras enfermedades caracterizadas por el depósito anormal de tau comparten rasgos clínicos, genéticos y patológicos con la PSP. Las más importantes se resumen en la **TABLA 3**:

TABLA 3: características de las principales taupatías.

	Isoforma	Clínica	Genética	Patología
PSP	4R	parálisis supranuclear de la mirada, inestabilidad con caídas, disfagia y disartria, distonía axial, parkinsonismo y deterioro frontal	Haplotipo H1	pérdida neuronal y gliosis ganglios basales, tau fibrilar (ovillos neurofibrilares e hilos neurófilos)
DCB	4R	cuadro simétrico y progresivo de rigidez, apraxia, signos de disfunción cortical y de los ganglios basales, demencia frontal	Haplotipo H1	despigmentación de la sustancia negra, atrofia frontoparietal asimétrica, pérdida neuronal con espongirosis y gliosis. Tau fibrilar en neuronas (neuronas balonadas), astrocitos (placas astrocíticas) y oligodendrocitos (coiled bodies).
DFT	Pick: 3R No-Pick: pérdida muy marcada de todas	marcada alteración de la conducta, apatía, desinhibición y pérdida del lenguaje, con relativa preservación de la orientación y del cálculo. Frecuente parkinsonismo en fases tardías y formas familiares.	43% son familiares 10% mutaciones tau (FTDP-17)	- Con cambios inespecíficos Pick: atrofia lobar frontotemporal y límbica, con pérdida neuronal, espongirosis y gliosis, neuronas balonadas y cuerpos de Pick - Ubiquitin+ - Con enfermedad de motoneurona asociada
FTDP-17 (subtipo de DFT)	variable	variable, con demencia frontotemporal y parkinsonismo	Mutaciones tau (herencia AD)	variable: atrofia de predominio frontotemporal y abundantes filamentos de tau hiperfosforilada en neuronas y glía, asociado a pérdida neuronal
AGD	4R	no está clara la correlación clinicopatológica. Se hallan en pacientes con demencia y en controles	H1 similar a controles	abundantes granos argirófilos tau+ en estructuras límbicas y coiled bodies en la sustancia blanca adyacente, en ausencia de otros diagnósticos neuropatológicos. Pueden coexistir con otras enfermedades
Guadalupe	4R	parkinsonismo rigidoacínético, inestabilidad postural, parálisis pseudobulbar, demencia	H1	similar a la PSP

DCB: degeneración corticobasal. DFT: demencia frontotemporal. FTDP-17: demencia frontotemporal con parkinsonismo ligada al cromosoma 17. AGD: enfermedad de granos argirófilos. AD: autosómica dominante. Guadalupe: parkinsonismo atípico de la isla de Guadalupe.

En muchos casos se han identificado mutaciones del gen tau causantes de demencia frontotemporal. Se han descrito ya más de 40 mutaciones patogénicas en un total de unas 115 familias, en regiones codificantes de los exones 1, 9, 11, 12 y 13, en el exón 10 o en su sitio de *splicing* (www.molgen.ua.ac.be/FTDmutations, Rademakers R *et al.*, 2004;). La mutación más frecuente, P301L en el exón 10, con frecuencia muestra un fenotipo de DFT, y la patología subyacente puede ser enfermedad de Pick o DCB. El fenotipo clínico y neuropatológico de las mutaciones del gen tau es muy variable (Lee VM *et al.*, 2001), incluso en pacientes con la misma mutación o en la misma familia. Por ello, se cree que existen otros factores genéticos o ambientales que modifican el efecto de la mutación y determinan el fenotipo.

5. Etiología de la PSP

5.1. Factores ambientales

Se ha sugerido que factores ambientales podrían participar, interactuando con un sustrato genético favorable, en el desarrollo de PSP (Litvan I *et al.*, 2000; Golbe LI, 2000; Litvan I *et al.*, 2003). Por ejemplo, se encontró asociación del consumo de frutos tropicales (*Annonaceae*) y tés herbales en pacientes con PSP y parkinsonismo atípico en Guadalupe, donde la prevalencia de PSP es muy alta (Caparros-Lefebvre D *et al.*, 1999). Se cree que la exposición crónica a las tetrahydroquinolonas contenidas en estas sustancias, que son neurotóxicas para las neuronas dopaminérgicas, es la causa de la elevada prevalencia de parkinsonismo en Guadalupe.

En algunos casos, otras causas distintas a la enfermedad neurodegenerativa pueden causar o contribuir al desarrollo del síndrome PSP, como la patología vascular cerebral (Winikates J *et al.*, 1994) o algunos fármacos con propiedades antidopaminérgicas, habiéndose descrito casos de síndrome PSP reversible inducido por neurolépticos y por clebopride (Campdelacreu J *et al.*, 2004). Es dudoso el papel de la hipertensión arterial (Ghika J *et al.*, 1997; Fabbrini G *et al.*, 1998) y de los traumatismos craneales de repetición, que inducen la formación de ONF (Geddes JF *et al.*, 1999).

5.2. Aspectos genéticos

Aunque la mayoría de los casos de PSP son esporádicos, existen evidencias de que los factores genéticos juegan un papel en la PSP. Así, se han descrito varias familias con diferentes miembros afectados (de Yébenes JG *et al.*, 1995; Tetrud JW *et al.*, 1996; Rojo A *et al.*, 1999). Un estudio multicéntrico describió 12 familias en Europa y USA, 8 de ellas con miembros afectados en al menos 2 generaciones (Rojo A *et al.*, 1999). Estos datos y la ausencia de consanguinidad sugieren transmisión autosómica dominante con penetrancia incompleta. Además, mediante estudios con PET en familiares de pacientes con PSP se ha demostrado la presencia de alteraciones metabólicas en estructuras cerebrales involucradas en la PSP, lo que apoyaría la presencia de un sustrato genético para la PSP (Piccini P *et al.*, 2001). Por otro lado, numerosos estudios confirman la asociación de la PSP a un conjunto de polimorfismos en la región 17q21, incluyendo el gen tau y genes flanqueantes, que constituyen el haplotipo H1 (Baker M *et al.*, 1999; Pastor P *et al.*, 2002).

5.2.1. Región del haplotipo H1

a) Tau y región 3'UTR

La primera evidencia de asociación de la PSP con el gen tau fue el descubrimiento de un polimorfismo intrónico de repetición en el gen tau (Conrad C *et al.*, 1997), en que el genotipo a0/a0 estaba sobrerrepresentado en PSP. Esta asociación se extendió después a otra serie de polimorfismos en el mismo gen, abarcando unas 62kb, que están en desequilibrio de ligamiento completo formando dos haplotipos, H1 y H2. La frecuencia del haplotipo H1/H1 estaba incrementada en la PSP (Baker M *et al.*, 1999; Ezquerro *et al.*, 1999; de Silva R *et al.*, 2001). Posteriormente, estos haplotipos se extendieron hasta abarcar una región de unas 2 Mb (Pastor P *et al.*, 2002), que incluye varios genes de interés. Además, se han descrito recientemente subhaplotipos de riesgo dentro del haplotipo H1 (Pastor P *et al.*, 2002; Pastor *et al.*, 2004, Rademakers R *et al.*, 2005).

La asociación del haplotipo H1 con el riesgo de PSP se ha confirmado consistentemente en distintas poblaciones caucásicas (Conrad C *et al.*, 1997; Bennet P *et al.*, 1998; Higgins JJ *et al.*, 1998; Oliva R *et al.*, 1998; Baker M *et al.*, 1999; Bonifati V *et al.*, 1999; Morris HR *et al.*, 1999; Higgins JJ *et al.*, 1999; Higgins JJ *et al.*, 2000). El haplotipo H1 también se ha asociado con la DCB (Di Maria E *et al.*, 2000; Houlden H *et al.*, 2001), y en menor grado con la enfermedad de Parkinson de inicio tardío (Pastor P *et al.*, 2000; Farrer M *et al.*, 2002) y la demencia frontotemporal (Verpillat P *et al.*, 2002).

El mecanismo por el que este haplotipo incrementaría el riesgo de padecer PSP no se conoce. Algunos datos indican que podría actuar modulando la expresión o el

splicing de tau (Rademakers R *et al.*, 2004; Takanashi M *et al.*, 2002; Myers AJ *et al.*, 2007), aunque el haplotipo no parece influir en los niveles de tau insoluble en los ganglios basales en la PSP (Liu WK *et al.*, 2001). Datos recientes indican que el subhaplotipo H1c aumenta transcripción de proteína tau y especialmente la proporción de isoformas 4R (Myers AJ *et al.*, 2007).

Dado que el genotipo H1/H1 está presente en aproximadamente el 90% de los pacientes con PSP pero también en casi el 60% de la población caucásica (Houlden H *et al.*, 2001), probablemente son necesarios otros factores genéticos o ambientales para causar esta patología. Cálculos de riesgo sugieren que sólo alrededor del 68% del riesgo de PSP sería atribuible al haplotipo H1 (Melquist S *et al.*, 2007).

Mutaciones del gen tau son suficientes por sí solas para causar FTDP-17, e incluso algunos pacientes presentan rasgos clínicos y patológicos de PSP y DCB (Rosso SM *et al.*, 2002). Sin embargo, la gran mayoría de pacientes con PSP no tienen mutaciones en el gen tau. Varios estudios han excluido mutaciones en la región promotora y codificante de *tau* en casos de PSP típica (Hoenicka J *et al.*, 1999; Ezquerra M *et al.*, 1999; Higgins JJ *et al.*, 1999; de Silva R *et al.*, 2001; Morris HR *et al.*, 2002), y sólo 5 mutaciones de *tau* han sido descritas en familias con síndrome PSP atípico: la mutación *missense* R406W y R5L (Hutton M *et al.*, 1998; Poorkaj P *et al.*, 2002), la silente S305S (Stanford PM *et al.*, 2000; Wszolek ZK *et al.*, 2001), la homocigota delN296 (Pastor P *et al.*, 2001), y recientemente G303V en el exón 10 en una familia con PSP autosómica dominante de inicio precoz (Ros R *et al.*, 2005).

En la región del haplotipo H1 existen genes importantes para la función neuronal o incluso relacionados con la función de tau. Sin embargo, *tau* sigue siendo el principal candidato como gen primariamente relacionado con el desarrollo de la enfermedad, ya sea a través de defectos que influyan en la expresión, *splicing* o estabilidad del

tránsito. Por ello, la investigación de variaciones o mutaciones en genes candidatos dentro de la región del haplotipo, que puedan interactuar con tau, continúa siendo un tema de actualidad en la genética de la PSP.

b) *Saitohin*

El gen denominado *saitohin* (*STH*) se identificó dentro de un intrón del gen tau, situado entre los exones 9 y 10 (Conrad C *et al.*, 2002). *STH* codifica un péptido de 128 aminoácidos que no se parece a ninguna otra proteína conocida. Su patrón de expresión en el cerebro y otros tejidos humanos es muy similar al de tau. Se ha reportado asociación del genotipo RR del polimorfismo Q7R de este gen con enfermedad de Alzheimer (EA) de inicio tardío (Conrad C *et al.*, 2002; Combarros O *et al.*, 2003), aunque otros estudios no han confirmado estos resultados (Verpillat P *et al.*, 2002b; Cook L *et al.*, 2002; Clark LN *et al.*, 2003; Oliveira SA *et al.*, 2003; Streffer JR *et al.*, 2003). Un estudio reciente mostró que el alelo R aumenta el riesgo de EA en presencia del alelo E4 de la ApoE (Seripa D *et al.*, 2004).

c) *NIK*

El gen *NIK* (*Nuclear Factor Kappa-B Inducing Kinase*) o *MAP3K14* (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14*) se ha mapeado en la región asociada a FTDP17, entre los marcadores D17S800–D17S791 (Foster NL *et al.*, 1997), y codifica una proteína que interactúa con el homólogo humano de la cadena ligera 1 de la

dineína, implicada en la dinámica de los microtúbulos (Hiscott J *et al.*, 1997). Este gen podría participar en procesos neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson (EP) y la enfermedad de Alzheimer (EA) (Akama KT *et al.*, 2000; Hunot S *et al.*, 1997). NIK es una serina-treonina protein-kinasa que participa en la cascada de señalización que activa el factor nuclear kappa B (NF-kB) (Malinin NL *et al.*, 1997), además de ser un factor de transcripción que controla la expresión de numerosos genes de respuesta inmune, inflamatoria y de supervivencia y proliferación celular, y está implicado en procesos apoptóticos a través de la activación de la vía *stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase* (Akiba H *et al.*, 1998). NF-kB participa en procesos apoptóticos de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas de los pacientes con EP (Hunot S *et al.*, 1997) y está implicado en la neurodegeneración de la EA a través de la activación de la óxido nítrico-sintasa inducida por beta-amiloide (Akama KT *et al.*, 1998; Kaltschmidt B *et al.*, 1997). Por su localización y función, *NIK* es uno de los genes de la región 17q21 que podría estar involucrado en la PSP.

d) *CRHRI*

El gen *corticotropin releasing hormone receptor 1* (CRHR1) está situado en la región cromosómica adyacente a *tau* y forma parte de la región del haplotipo H1. Es uno de los genes candidatos que podrían contribuir la patogénesis de la PSP, debido a su localización. Este gen codifica un receptor que media un efecto neuroprotector de la hormona CRH, y es capaz de inactivar la kinasa GSK3-beta (Pedersen WA *et al.*, 2002; Bayatti N *et al.*, 2003), la cual es importante en la fosforilación de tau (Ferrer I *et al.*, 2002). Asimismo, es capaz de activar la *mitogen activated protein kinase* (MAPK), una

kinasa también implicada en la fosforilación de tau, en cultivos neuronales (Bayatti *et al.*, 2005). El efecto neuroprotector descrito de CRHR1 puede deberse a la inducción de la expresión de factores neurotróficos o de supervivencia por parte de la hormona CRH, o bien inhibiendo la apoptosis, ya sea a través de la activación o inhibición de vías de señalización intracelular o a través de la inactivación de GSK-3 β (Lezoualc'h F *et al.*, 2000; Bayatti N *et al.*, 2005). La inmunoreactividad de CRH está disminuída en el córtex de pacientes con enfermedades neurodegenerativas incluída la PSP (Whitehouse PJ *et al.*, 1987). Todo ello sugiere que potenciales mutaciones, polimorfismos o alteraciones en la expresión génica de *CRHR1* podrían tener un papel patogénico en la PSP.

5.2.2. Genes candidatos fuera de la región del haplotipo H1: protein-kinasa GSK-3 β .

La proteína tau está altamente fosforilada en las taupatías, por lo que alteraciones de las protein-quinasas podrían representar un factor de riesgo adicional para la PSP. La proteína tau contiene sitios de fosforilación para diversas protein-quinasas: PKA, PKC, CDK5, GSK3, MAPK/ERK, SAPK/JNK, p38, CaM kinase II, MARK y casein-quinasas. La mayoría de ellas y sus formas activas fosforiladas se expresan junto con los depósitos anormales de tau en la enfermedad de Alzheimer (EA) y otras taupatías (Ferrer I *et al.*, 2002). La posibilidad de que alteraciones funcionales en estas proteínas puedan estar implicadas en la PSP es una hipótesis razonable.

GSK-3 y CDK5 son tau-quinasas implicadas en la fosforilación fisiológica y patológica de tau en el cerebro humano. GSK-3 es una serina-treonina-kinasa dirigida a prolinas que se expresa principalmente en el sistema nervioso central. Se identificó

originalmente como una reguladora del metabolismo del glucógeno, pero después se vio que actuaba en la ordenación del citoesqueleto, expresión génica y diferenciación celular. En mamíferos GSK3 tiene dos isoformas, alfa y beta, codificadas por distintos genes y reguladas por fosforilación. La isoforma beta abunda en cerebro.

La sobreexpresión de GSK-3 β en neuronas induce hiperfosforilación de tau y alteración en la formación de los microtúbulos (Lucas JJ *et al.*, 2001). GSK-3 β se acumula en el citoplasma de las neuronas *pre-tangle*, y su expresión está aumentada, junto con los ovillos neurofibrilares, en la EA (Pei JJ *et al.*, 1997; Pei JJ *et al.*, 1999). Ferrer *et al.* (Ferrer I *et al.*, 2002) han demostrado que en la EA, enfermedad de Pick, PSP y CBD, GSK3 se asocia a hiperfosforilación neuronal y glial de tau y que la forma inactiva GSK3 S9 colocaliza con tau anormal. La sobreexpresión de la forma inactiva de GSK3 puede representar una reacción de protección celular frente a la hiperfosforilación de tau, o bien ser inducida por productos de peroxidación lipídica que se acumulan en el cerebro de pacientes con PSP (Odetti P *et al.*, 2000). Hasta el momento se han descrito 5 polimorfismos en la región promotora de GSK-3 β , aunque ninguno de ellos mostró inicialmente asociación con EA (Russ C *et al.*, 2001).

II. HIPÓTESIS

El haplotipo H1 está sobrerrepresentado en PSP. Sin embargo, este haplotipo por sí solo no explica el desarrollo de la enfermedad, ya que también está presente en la mayoría de los sujetos sanos. Por tanto, otros factores genéticos y/o ambientales podrían estar involucrados.

II. HIPÓTESIS

1. Polimorfismos o mutaciones funcionales en genes situados dentro o cerca de la región 17q21 o que codifican proteínas implicadas en la fosforilación de tau constituyen un factor de riesgo para la PSP en sujetos con el haplotipo H1.
2. La alteración en la expresión cerebral de determinados genes relacionados con tau puede condicionar el desarrollo de la PSP.

III. OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

1. Investigar si polimorfismos y mutaciones de los genes *saitohin*, *CRHR1* y la región 3'-UTR de *tau*, situados en la región 17q21, constituyen un factor de riesgo o son determinantes en el desarrollo de la PSP.
2. Analizar si variaciones génicas de *GSK-3 β* incrementan la susceptibilidad para el desarrollo de PSP.
3. Analizar la expresión de *CRHR1* en el cerebro de pacientes fallecidos con PSP.

IV. METODOLOGÍA

IV. METODOLOGÍA

1. Pacientes

Se seleccionaron pacientes con criterios de PSP probable (Tolosa E *et al.*, 1994; Litvan I *et al.*, 1996b) y controles sanos sin historia familiar ni personal de parkinsonismo. Los sujetos fueron reclutados entre los pacientes y acompañantes que acudieron o se visitaron en la Unidad de Trastornos del Movimiento del Hospital Clínic Provincial. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los sujetos participantes para la obtención de las muestras de sangre para extracción de DNA y la realización de los estudios genéticos. Todos los estudios realizados contaron con la aprobación del Comité Ético y de Investigación Científica (CEIC) del Hospital Clínic.

2. Métodos

2.1. Técnicas generales

2.1.1. Extracción de DNA

La extracción de DNA genómico se realizó a partir de sangre periférica utilizando el kit *Qiagen DNA MiniKit* (QIAGEN, Hilden, Germany).

2.1.2. Amplificación genómica mediante PCR

La amplificación de productos génicos se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el termociclador PTC-100 (MJ Research, Watertown, MA). Se utilizaron *primers* previamente descritos, o bien diseñados mediante el programa informático DNASTar (DNASTar Inc, Madison, WI) a partir de las secuencias obtenidas de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer>). Los *primers* fueron sintetizados en la Unidad de DNA del Hospital Clínic o manufacturados por la empresa Operon (Qiagen, Hilden, Germany). Se utilizaron condiciones de amplificación descritas previamente, y en el caso de los *primers* diseñados por nosotros se ensayaron distintas condiciones hasta optimizar el resultado.

2.1.3. Genotipado de polimorfismos

Para el genotipado de polimorfismos genéticos se usaron las técnicas de amplificación génica mediante PCR seguida de digestión enzimática con endonucleasas de restricción. Los productos génicos fueron sometidos a electroforesis en geles de acrilamida/bisacrilamida o de agarosa y visualizados mediante tinción argéntica o con bromuro de etidio al 4% respectivamente.

2.1.4. Cribado de mutaciones

El cribado de mutaciones se realizó mediante la técnica de polimorfismo de conformación de cadena sencilla (*single strand conformation polymorphism*, SSCP) en distintas condiciones, o bien mediante secuenciación directa. La electroforesis de los productos de PCR se realizó en geles de acrilamida/bisacrilamida 29:1 a concentraciones de 7-12% y tampón TBE x0.5 ó x1, en distintas condiciones de temperatura y voltaje.

2.1.5. Secuenciación

La secuenciación de productos génicos se realizó mediante purificación del producto de PCR amplificado usando el *DNA Blood and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), la reacción *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA) y posterior electroforesis en un secuenciador automático *ABI-prism* (Perkin Elmer).

2.1.6. Análisis estadístico

La distribución genotípica y alélica de los diferentes polimorfismos estudiados en pacientes y controles se comparó mediante tablas 2x2 y el test chi-cuadrado. Para el análisis de las diferencias de frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo -50T/C de *GSK-3 β* se comprobó la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg con el

programa Finetti disponible en <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>. Se realizó análisis de regresión logística para evaluar la posible interacción entre el estado de portador del haplotipo H1/H1 y el genotipo TT de *GSK-3β* en los pacientes con PSP. Se comparó la edad media de inicio de los pacientes con PSP para los distintos genotipos de *GSK-3β* mediante el análisis ANOVA. Para los cálculos estadísticos se usó el programa SPSS 11.5 para Windows (SPSS, Chicago, IL).

Los niveles de expresión génica de mRNA de *CRHR1* en pacientes y controles se compararon con los tests no-paramétricos de Kruskal-Wallis o U de Mann-Whitney con corrección de Bonferroni, usando el programa SPSS 11.5.

2.2. Secuenciación del gen saitojin y de la región tau-3'UTR

La amplificación del gen saitojin se realizó según métodos previamente descritos (Conrad C *et al.*, 2002). Se diseñaron 4 pares de *primers* para amplificar fragmentos solapados de toda la región 3'UTR:

Fragmento 1 (annealing 57°C):

Forward: 5'-ATCTCAGCAATGTCTCCTCCAC-3'

Reverse: 5'-GGCTTCCTCTCCCACTCC-3';

Fragmento 2 (annealing 62°C):

Forward: 5'-CAGTGGCAGTGGCAGCAACAAAG-3'

Reverse: 5'-CCAGCGCTCTCAAGACATCAAG-3';

Fragmento 3 (annealing 57°C):

Forward: 5'-TCGATGATGACCTCCTTAGAAA-3'

Reverse: 5'-GTACCTCCTGCAACCAACC-3';

LOC147077 (annealing 56°C):

Forward: 5'-GGTGTCTTCTGCCTTGTTG-3'

Reverse: 5'-AGTCCTAATCCTGTGCTTCA-3'.

La mezcla de PCR consistió en un volumen total de 25 µl formado por: 1 µl de cada oligonucleótido (30 pmol/µl); 4 µl de 1.25 mM dNTPs; 0.1 unidades de Taq

Expand polimerasa (Boehringer, Mannheim, Germany); 2.5 µl de 10x Taq buffer; 1.5 mM de Cl₂Mg; 1 µl de DNA a 100 ng/µl; y 15.4 µl de agua bidestilada. Los productos de PCR se secuenciaron tal y como se describe en el punto 2.1.5.

2.3. Genotipado del polimorfismo Q7R y del polimorfismo del promotor de tau

El genotipado del polimorfismo Q7R del gen *saitohin* y del promotor de tau se realizó según métodos previamente descritos (Conrad C *et al.*, 2002; Ezquerra M *et al.*, 1999).

2.4. Secuenciación del gen NIK y genotipado del polimorfismo del exón 15

Se amplificaron por PCR los diferentes exones del gen NIK usando *primers* y condiciones previamente descritos (Aronsson FC *et al.*, 1998). Se diseñaron dos nuevos pares de *primers* para los exones más largos (10 y 11):

Exón 10 (annealing 59 °C, fragmento 330 bp):

Forward: 5'-TAACAGCCGGGTATCAGGA-3'

Reverse: 5'-CCAGAGGGGGAAACTAAG-3';

Exón 11 (annealing 57 °C, fragmento 481 bp):

Forward: 5'-ATCTAGGAGGCAAAGGGTCAC-3'

Reverse: 5'-CTGCCAGGGGTTATTCATTCT-3'.

La mezcla de PCR se hizo en un volumen total de 25 µl y consistió en 11 µl de agua bidestilada, 4 µl de 1.25mM dNTPs, 2.5 µl de 10×Taq buffer (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 0.1% gelatina, 1.5mM MgCl₂), 2.5 µl de dimetilsulfóxido, 10 pmol de cada oligonucleótido, 1 U de Taq polimerasa y 3 µl de DNA genómico a 100 ng/l. Se

realizó análisis por SSCP de los productos de PCR para todos los exones, en gel de poliacrilamida en distintas condiciones (concentración 6%, 9% y 12%, voltaje 200–450V, TBE x0.5 y x1). Los productos de PCR de los exones más largos (4, 5, 6, 8, 10 y 12) fueron digeridos previamente con diferentes enzimas para obtener fragmentos más pequeños para análisis SSCP. Las bandas se visualizaron tras tinción argéntica. Ello permitió detectar un polimorfismo en el exón 15, consistente en una variación G/C (SNP rs1047833 de la base de datos del NCBI) en la posición 2839, que no da lugar a cambio de aminoácido. Para analizar si este polimorfismo está incluido en el haplotipo H1 y se comporta como factor de riesgo genético para PSP, se realizó un estudio de asociación comparando con controles. Se amplificó el exón 15 y se digirió mediante el enzima de restricción *HphI*. Los productos se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% a 350V durante 2 horas, dando lugar a diferentes patrones de bandas para cada genotipo. La secuenciación de los exones del gen NIK se realizó tal como se describe en el apartado 2.1.5.

2.5. Secuenciación y estudio de expresión del gen CRHR1

2.5.1. Secuenciación del gen CRHR1

Se usaron muestras congeladas de DNA genómico extraído a partir de sangre periférica. Se diseñaron *primers* específicos para cada exón de CRHR1 (**TABLA 4**):

TABLA 4: primers diseñados para la amplificación de los exones de CRHR1.

Primers	Exón	T ^a annealing (°C)	longitud producto PCR (bp)
Forward: 5'-CGCCCCGCGGTCCCTCTG-3'	1	65	198
Reverse: 5'-CGCCCCCGCCCCATCAC-3'			
Forward: 5'-ATGAGGGGCGGCTGTCTGG-3'	2	61	307
Reverse: 5'-CTGGGGTAGGGGGCATTGTG-3'			
Forward: 5'-GTGGGGAGGTGGGCAGAACT -3'	3	60	336
Reverse: 5'-GGCGATCCCCACAAGAGGTAT -3'			
Forward: 5'-CCCCAGCTTCACTACACAACC -3'	4	59	323
Reverse: 5'-CCTCTGGCTCCCTGACTCC-3'			
Forward: 5'-CCACCCCTAGGCGATGTCC -3'	6	60	290
Reverse: 5'-CCACCCTCTCCCAGCAACC-3'			
Forward: 5'-TGGTGGGGAGGGACAAAATT -3'	7	60	290
Reverse: 5'-CCTGGGGGTGCCTTCTACT-3'			
Forward: 5'-TCTGGGCTGGGGTGATGG-3'	8	60	302
Reverse: 5'-ACTCCTGTTCTGTGGGCTCCTC-3'			
Forward: 5'-GGAGGAGCCCACAGAACAGGAG -3'	9	62	438
Reverse: 5'-CCCACCCCAAGAGGAGCAGAG-3'			
Forward: 5'-GGGTGGGCGGCAGTAGAAGC -3'	10	61	298
Reverse: 5'-CAATGCCCGTGGGGAGTGTC-3'			
Forward: 5'-CTGTCCTGGCCAAGCACTGTCC-3'	11	60	196
Reverse: 5'-CCACTGGGCCCTGTCTCCTG-3'			
Forward: 5'-AAGAGGGGGCATGGGTCAGAGA -3'	12	60	277
Reverse: 5'-TGGGGAGCAGGGGTTTCAT-3'			
Forward: 5'-CCACTCCCTCCCCGACCTG-3'	13	62	332
Reverse: 5'-GGCTGCCCTTGCTTCTCC -3'			
Forward: 5'-GCAGGAGGCCAGGGAGAA -3'	14	60	221
Reverse: 5'-CTGGGAGGGGAGGAGAAGG -3'			
Forward: 5'-TCCCAGGACATTTGAGAA -3'	15	58	545
Reverse: 5'-GAGTGGGCATGAGACCTAACAG -			

La PCR para cada exón se realizó con un volumen total de 25µl, que contenía 50ng de DNA genómico, 1.5 µl de cada oligonucleótido a 10pmol/µl, 4µl de 1.25mM dNTPs, 2.5µl de 10x Taq buffer (100mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 0.1% gelatina, 1.5mM MgCl₂), 14.4µl de agua bidestilada y 1U de TaqExpand HiFi polimerasa (Roche/Boehringer, Mannheim, Alemania). Se usaron diferentes condiciones de termociclado para la amplificación según la temperatura de *annealing* óptima de cada par de *primers*. Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados con las técnicas anteriormente mencionadas.

2.5.2. Genotipado del polimorfismo –16T/C de CRHR1

El SNP –16T/C de CRHR1 se genotipó mediante SSCP.

2.5.3. Muestras de cerebro

Se obtuvieron muestras congeladas de globus pallidus de 12 pacientes con PSP diagnosticada neuropatológicamente, 10 pacientes con enfermedad de Alzheimer en estadio V-VI de Braak, 5 pacientes con enfermedad cerebrovascular difusa de pequeño vaso tipo Binswanger y 6 controles libres de enfermedad neurológica. Los cerebros se obtuvieron de los bancos de cerebros de las Universidades de Barcelona y Navarra.

2.5.4. Cuantificación de RNA

El aislamiento de RNA total de tejido congelado se realizó mediante el *RNeasy lipid tissue mini kit DNase free* (Qiagen). La integridad del RNA se confirmó con electroforesis en gel de formaldehído-agarosa y valorando la presencia de RNA ribosómico 18S y 28S. Se sintetizó cDNA usando los reactivos de transcripción inversa Taq Man (Applied Biosystems, Foster City, CA). La expresión génica se cuantificó con PCR a tiempo real usando el servicio *Assay-on Demand* (Applied Biosystems) para CRHR1 (assay Hs00366363_m1). Se cuantificaron también la expresión génica de beta-actina (assay Hs99999903_m1), ciclofilina A (assay Hs99999904_m1) y GAPDH (assay Hs99999905_m1) como controles endógenos. Los ensayos de PCR TaqMan a

tiempo real para cada gen se realizaron con cDNA por triplicado de cada muestra en placas ópticas de 96 pocillos en un sistema *ABI Prism 7900 Sequence Detection* (Applied Biosystems).

2.5.5. Análisis de datos

Se calculó la cantidad relativa de mRNA de *CRHR1* con el programa qBase versión 1.1 (Center for Medical Genetics, Ghent University Hospital, Belgium; <http://medgen.ugent.be/qbase/>). El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 11.5. Los datos se expresaron como media+/-SD. Dado que las distribuciones de los niveles de expresión génica eran muy dispersos, se compararon grupos usando los tests no-paramétricos de Kruskal-Wallis o U de Mann-Whitney con corrección de Bonferroni. Se consideró como valor significativo una $p < 0.05$.

2.6. Genotipado de los polimorfismos de *GSK-3β*

El genotipado del polimorfismo -50T/C, localizado en la región promotora del gen *GSK-3beta*, se realizó usando *primers* y condiciones de PCR previamente descritos (Russ C *et al.*, 2001). El producto de PCR se sometió a digestión enzimática (*AluI*) y posterior electroforesis en gel de poliacrilamida (concentración 7%, TBEx1) a 350V durante 3 horas. El polimorfismo -1727A/T, también en la región del promotor, se analizó según el método previamente descrito (Russ C *et al.*, 2001).

La mezcla de PCR se hizo para un volumen total de 25 μ l, consistente en 50ng de DNA genómico, 1 μ l de cada oligonucleótido a 30pmol/ μ l, 4 μ l de 1.25mM dNTPs, 2.5 μ l de 10x Taq buffer (100mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 0.1% gelatina, 1.5mM MgCl₂), 2 μ l dimetilsulfóxido, 13.5 μ l de agua bidestilada y 1U de Taq Expand polimerasa (Boehringer, Mannheim, Germany). La PCR consistió en 5 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de 45s a 94°C, 45s a 50-60°C y 45s a 72°C, y finalmente 10 min a 72°C. El genotipado se realizó mediante digestión con *PvuII* y electroforesis en gel de poliacrilamida (concentración 7%, TBEx1) a 350V durante 3 horas.

V. RESULTADOS

V. RESULTADOS

1. Artículos publicados: análisis de polimorfismos y mutaciones en los genes *saitohin*, *NIK*, *CRHR1* y la región 3'-UTR de *tau*, y estudio de expresión de *CRHR1*.

Artículo 1:

Ezquerria M, **Campdelacreu J**, Muñoz E, Tolosa E. Sequence analysis of tau 3'-untranslated region and *saitohin* gene in progressive supranuclear palsy. *Journal Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;75:158-160.

Artículo 2:

Campdelacreu J, Ezquerria M, Muñoz E, Oliva R, Tolosa E. Mutational study of the nuclear factor kappa B inducing kinase gene in patients with progressive supranuclear palsy. *Neurosci Lett* 2003;340:158-160.

Artículo 3:

Campdelacreu J, Gaig C, Ezquerria M, Muñoz E, Martí MJ, Valdeoriola F, Tolosa E. No evidence of *CRHR1* gene involvement in progressive supranuclear palsy. *Neurosci Lett* 2006;409:61-64.

SHORT REPORT

Sequence analysis of *tau* 3' untranslated region and *saitohin* gene in sporadic progressive supranuclear palsy

M Ezquerro, J Campdelacreu, E Muñoz, R Oliva, E Tolosa

J Neurol Neurosurg Psychiatry 2004;**75**:155–157

Background: The extended *tau* H1 haplotype has previously been described in association with progressive supranuclear palsy (PSP). Recently, a new gene called *saitohin* (*STH*), nested within an intron of *tau*, has been discovered. The Q7R polymorphism of *STH* appears to be related to late onset Alzheimer's disease.

Objectives: To search for genetic changes in the 3' untranslated region (3'UTR) of *tau* and adjacent sequence LOC147077, and in the coding region of *STH* in PSP patients.

Methods: The study included 57 PSP patients and 83 healthy controls. The genetic analysis of each region was performed through sequencing. The Q7R polymorphism was studied through restriction enzyme and electrophoresis analysis.

Results: No mutations were found in the regions analysed. The QQ genotype of the *STH* polymorphism was over-represented in participants with PSP (91.5%) compared with control subjects (47%) ($p \leq 0.00001$). This genotype co-segregated with the H1/H1 haplotype in our PSP cases.

Conclusions: Our results do not support a major role for the *tau* 3'UTR in PSP genetics. The QQ genotype of *STH* confers susceptibility for PSP and is in linkage disequilibrium with the H1/H1 haplotype.

Progressive supranuclear palsy (PSP) is a parkinsonian syndrome accompanied by supranuclear gaze palsy, pseudobulbar signs, axial dystonia, postural instability, frontal dementia, and a poor response to levodopa.¹ In typical cases of PSP, aberrant forms of the microtubule associated protein tau precipitate in subcortical neurons and glial cells, leading to neurofibrillary tangles (NFTs). The NFTs and other abnormal filaments, found in many neurodegenerative diseases such as frontotemporal dementia (FTD), Alzheimer's disease, or corticobasal ganglionic degeneration, are produced by hyperphosphorylated tau species.² The *tau* gene is organised into 16 exons expanding among 100 kilobases of DNA on chromosome 17q21. In CNS neurons, exons 2, 3, and 10 are alternatively spliced allowing the expression of six different tau isoforms.^{2,3} In particular, the isoform carrying the alternatively spliced exon 10 has been found to be increased in PSP and FTD.⁴ *Tau* mutations in the 5' splice site and missense mutations in exons 9, 10, 12, and 13 have been described in many cases of familial frontotemporal dementia.^{5,6} Additionally, the allele A0 of a dinucleotide repeat polymorphism in the *tau* intron located between exons 9 and 10 has been found to be statistically associated with PSP.^{7–10} This association extends to other polymorphisms in *tau* which are in linkage disequilibrium leading to a 100 kilobases haplotype called H1,¹¹ and an extended H1E haplotype that includes some neighbour genes covering 360 kilobases.¹²

So far only four mutations in *tau* have been described in cases of atypical PSP: the R406W missense mutation,⁵ the S305S silent mutation,¹³ the homozygous delN296 mutation,¹⁴ and the missense R5L mutation.¹⁵ Many studies have failed to identify a causative mutation after analysing the entire coding and promoter regions of *tau* in typical PSP patients.^{9,16,19} Thus, these data suggest that a separate gene or other non-coding regions of *tau* could be responsible for PSP.

Recently, a gene called *saitohin* (*STH*) was discovered in the intron between exons 9 and 10 of *tau*. *STH* expression is similar to *tau*, and a polymorphism in this gene appears to be associated with late onset Alzheimer's disease.²⁰ In this work, we have analysed the *tau* 3' untranslated region (3'UTR), the adjacent locus LOC147077 (NEDO human cDNA sequencing project, unpublished), and *STH* in order to search for mutations or new polymorphisms in typical PSP patients.

METHODS

Subjects

From the neurology service of our hospital we recruited 57 unrelated subjects (26 male, 31 female), who met the clinical diagnostic criteria for probable PSP^{21,22}; 83 healthy controls (34 male, 49 female) were recruited from among patients' spouses, and healthy volunteers. Informed consent was previously obtained from all participants. The mean age of patients at the onset of PSP was 70 (5.5) years, and the mean age of the controls was 68.9 (7.5) years.

Genetic analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood using standard procedures. *STH* amplification, sequencing assay, and Q7R polymorphism detection were performed as previously described.²⁰ The *tau* promoter polymorphism was also genotyped as previously described.¹⁶

Three pairs of primers were designed in order to amplify different overlapping fragments of the whole *tau* 3'UTR using the DNAsar software. The sequences of the designed forward and reverse *tau* primers were: 5'-ATCTCAGCAATGTCTCCTCCAC-3' and 5'-GGCTTCTCTCCCACTCC-3' for fragment 1 (annealing 57°C); 5'-CAGTGGCAGTGGCAGCAACAAAG-3' and 5'-CCAGCGCTCTCAAGACATCAAG-3' for fragment 2 (annealing 62°C); and 5'-TCGATGATGACCTCCTTAGAAA-3' and 5'-GTACCTCTGCAACCAACC-3' for fragment 3 (annealing 57°C). For the amplification of the LOC147077 sequence the primers were 5'-GGTGTCTGCTTGTG-3' and 5'-AGTCCTAATCCTGTGCTTCA-3' (annealing 56°C).

The PCR mix was constituted in a total volume of 25 μ l and consisted of: 1 μ l of each primer (30 pmol/ μ l); 4 μ l of

Abbreviations: PSP, progressive supranuclear palsy; UTR, untranslated region; NFT, neurofibrillary tangle; FTD, frontotemporal dementia

1.25 mM dNTPs; 0.1 units of Taq Expand polymerase (Boehringer, Mannheim, Germany); 2.5 μ l of 10 \times Taq buffer; 1.5 mM of Cl₂Mg; 1 μ l of DNA at 100 ng/ μ l; and 15.4 μ l of distilled water. The purified sample was sequenced by cycle sequencing, using the Dye Terminator Cycle sequencing Ready Reaction (Perkin Elmer, Foster City, USA), and run on an ABI-prism automatic DNA sequencer (Perkin Elmer).

Statistical analysis

The genotypic and allelic distribution of the *STH* polymorphism was analysed with a χ^2 test. All analyses were performed using computer software SPSS 10.0 for Windows (SPSS, Chicago, USA).

RESULTS

Sequencing of the *tau* 3'UTR, the adjacent locus LOC147077, and the *STH* coding region showed no mutations in three subjects with sporadic PSP. Analysis of the *STH* Q7R polymorphism allowed us to identify three different genotypes in patients and controls (fig 1). The frequencies revealed that the QQ genotype was present in 91.2% of patients and in only 47% of controls ($p \leq 0.000001$).

The analysis of the *tau* promoter G(-221)C polymorphism in participants with PSP¹⁶ showed that the CC genotype cosegregated completely with the QQ genotype.

DISCUSSION

Many polymorphisms, in or near *tau*, have been described as associated with PSP and leading to an extended H1 haplotype.^{11,12} This association might be due to linkage disequilibrium between these polymorphisms and a hypothetical adjacent functional mutation responsible for the disease. The half-lives and subcellular localisation of specific mRNAs may depend on specific sequences in 3'UTR.²³ Therefore, alterations in this region could potentially be responsible for some pathological processes. However, we did not find any genetic changes after sequencing this region and adjacent locus LOC147077 in three typical cases of PSP.

We found that the QQ genotype of the *STH* polymorphism was over-represented in our patients with PSP. This genotype is segregated with the H1 haplotype because it is in complete

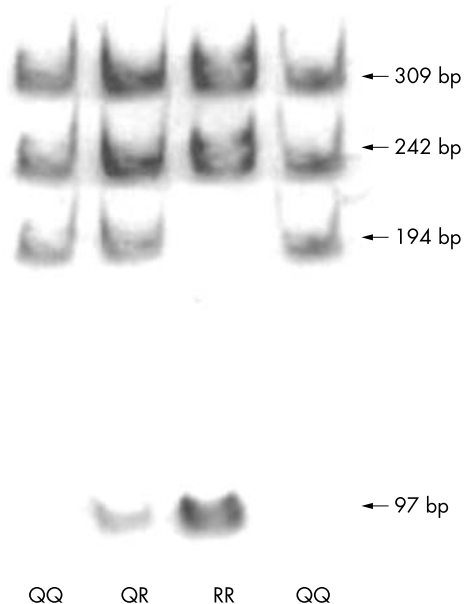


Figure 1 Genotypes of the *saitohin* Q7R polymorphism. The different patterns were visualised after digestion of the PCR products with HinFI followed by electrophoresis in a 7% acrylamide gel and silver staining.

Table 1 *Saitohin* polymorphism analysis in subjects with progressive supranuclear palsy (PSP) and healthy controls

Subjects	Genotypes			Alleles	
	QQ (%)	QR (%)	RR (%)	Q (%)	R (%)
PSP (n = 57)	52 (91.2)*	5 (8.8)	0	109 (95.6)*	5 (4.4)
Controls (n = 83)	39 (47)	40 (48.2)	4 (4.8%)	118 (71.1)	48 (28.9)

n, number. * $p \leq 0.00001$ (χ^2 test).

disequilibrium with the CC genotype of tau promoter G(-221)C polymorphism, which in turn segregates with this haplotype as we previously described.¹² After sequencing the entire coding region of *STH*, we could not demonstrate additional mutations. Therefore, the *STH* polymorphism, which gives rise to an amino acid change, could behave as a risk factor for PSP. The exact function of *STH* is still unknown; however, the fact that *STH* and *tau* have very similar expression patterns suggests that these two proteins could function together in physiological or pathological processes.²⁰ Interestingly, the QQ genotype is the opposite of the genotype associated with Alzheimer's disease (RR).²⁰ As *STH* nests in the intron between exons 9 and 10 of *tau*, we cannot rule out the possibility that *STH* polymorphism, through the regulation of exon 10 alternative splicing, may explain the different expression of tau isoforms in PSP and Alzheimer's disease.

In conclusion, our results do not support a major pathogenic role of the *tau* 3'UTR in PSP genetics. The QQ genotype of the *STH* polymorphism may be considered a risk factor for PSP. Functional studies of *STH* could be very important in disclosing whether it plays a role in *tau* splicing or *tau* phosphorylation.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge technical support provided by Ms Eva Caballero.

Authors' affiliations

M Ezquerria, J Campdelacreu, E Muñoz, E Tolosa, Institut Clínic de Malalties del Sistema Nerviós (ICMSN), Hospital Clínic Universitari, Barcelona, Spain

R Oliva, Genetics Service, Hospital Clínic Universitari, Barcelona, Spain

This study was supported by grants from the Society for PSP to E Tolosa and from the Hospital Clínic to J Campdelacreu.

Competing interest: none declared

Correspondence to: Dr Mario Ezquerria, Laboratorio de Neurología Experimental (IDIBAPS), Hospital Clínic Universitari, Villarroel, 170, 08036 Barcelona, Spain; ezquerria@clinic.ub.es

Received 25 December 2002

In revised form 20 May 2003

Accepted 23 July 2003

REFERENCES

- Daniel SE, de Bruin VMS, Lees AJ. The clinical and pathological spectrum of Steele-Richardson-Olszewski syndrome (progressive supranuclear palsy): a reappraisal. *Brain* 1995;118:759-70.
- Delacourte A, Buée L. Normal and pathological tau proteins as factors for microtubule assembly. *Int Rev Cytol* 1997;171:167-224.
- Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, et al. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 1989;3:519-26.
- Sergeant N, Wattez A, Delacourte A, et al. Neurofibrillary degeneration in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration: tau pathologies with exclusively 'exon 10' isoforms. *J Neurochem* 1999;72:1243-9.
- Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 1998;393:702-5.

- 6 **Poorkaj P**, Bird TD, Wijmsman E, *et al.* Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 1998;**43**:815–25.
- 7 **Conrad C**, Andreadis A, Trojanowski JQ, *et al.* Genetic evidence for the involvement of tau in progressive supranuclear palsy. *Ann Neurol* 1997;**41**:277–81.
- 8 **Higgins JJ**, Litvan I, Pho LT, *et al.* Progressive supranuclear gaze palsy is in linkage disequilibrium with the tau and not the alpha-synuclein gene. *Neurology* 1998;**50**:270–3.
- 9 **Hoenicka J**, Perez M, Perez-Tur J, *et al.* The tau gene A0 allele and progressive supranuclear palsy. *Neurology* 1999;**53**:1219–25.
- 10 **Oliva R**, Tolosa E, Ezquerria M, *et al.* Significant changes in the tau A0 and A3 alleles in progressive supranuclear palsy and improved genotyping by silver detection. *Arch Neurol* 1998;**55**:1122–4.
- 11 **Baker M**, Litvan I, Houlden H, *et al.* Association of an extended haplotype in the tau gene with progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet* 1999;**8**:711–15.
- 12 **Pastor P**, Ezquerria E, Tolosa E, *et al.* Further extension of the H1 haplotype associated with progressive supranuclear palsy. *Mov Disord* 2002;**17**:550–6.
- 13 **Stanford PM**, Halliday GM, Brooks WS, *et al.* 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**:880–93.
- 14 **Pastor P**, Pastor E, Carnero C, *et al.* Familial atypical progressive supranuclear palsy associated with homozygosity for the delN296 mutation in the tau gene. *Ann Neurol* 2001;**49**:263–7.
- 15 **Poorkaj P**, Muma NA, Zhukareva V, *et al.* An R5L mutation in a subject with a progressive supranuclear palsy phenotype. *Ann Neurol* 2002;**52**:511–16.
- 16 **Ezquerria M**, Pastor P, Valdeoriola F, *et al.* 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**:183–6.
- 17 **Higgins JJ**, Adler RL, Loveless JM, *et al.* Mutational analysis of the tau gene in progressive supranuclear palsy. *Neurology* 1999;**53**:1421–4.
- 18 **de Silva R**, Weiler M, Morris HR, *et al.* Strong association of a novel Tau promoter haplotype in progressive supranuclear palsy. *Neurosci Lett* 2001;**311**:145–8.
- 19 **Morris HR**, Katzenschlager R, Janssen JC, *et al.* Sequence analysis of tau in familial and sporadic progressive supranuclear palsy. *J Neural Neurosurg Psychiatry* 2002;**72**:388–90.
- 20 **Conrad C**, Vianna C, Freeman M, *et al.* A polymorphic gene nested within an intron of the tau gene: implications for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;**99**:7751–6.
- 21 **Tolosa E**, Valdeoriola F, Cruz-Sánchez F. Progressive supranuclear palsy: clinical and pathological diagnosis. *Eur J Neurol* 1995;**2**:259–73.
- 22 **Litvan I**, Agid Y, Calne D, *et al.* Clinical research criteria for the diagnosis of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome): report of the NINDS-SPSP international workshop. *Neurology* 1996;**47**:1–9.
- 23 **Aronov S**, Marx R, Ginzburg I. Identification of 3'UTR region implicated in tau mRNA stabilization in neuronal cells. *J Mol Neurosci* 1999;**12**:31–45.

Mutational study of the nuclear factor kappa B inducing kinase gene in patients with progressive supranuclear palsy

Jaume Campdelacreu^a, Mario Ezquerra^a, Esteban Muñoz^{a,*}, Rafael Oliva^b, Eduardo Tolosa^a

^a*Parkinson's Disease and Movement Disorders Unit, Neurology Service, Institut Clínic de Malalties del Sistema Nerviós, Hospital Clínic Universitari, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain*

^b*Genetics Service, Hospital Clínic Universitari, IDIBAPS, and University of Barcelona, Barcelona, Spain*

Received 6 December 2002; received in revised form 7 January 2003; accepted 15 January 2003

Abstract

The nuclear factor kappa B inducing kinase gene (NIK) is located near the region of the haplotype associated with progressive supranuclear palsy (PSP) in chromosome 17q. We have analysed the coding region of the NIK gene in PSP patients through single strand conformation polymorphism and direct sequencing, in order to investigate the possible existence of pathogenic mutations. A change in exon 15 consisting of a G/C variation in position 2839 was found. This change was then analysed through restriction endonuclease HphI in 40 PSP samples and 35 control samples, but no differences in allelic frequency were found between the PSP and control groups. Our results do not support a pathogenic role of the NIK gene in PSP.

© 2003 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Nuclear factor kappa B inducing kinase gene; Progressive supranuclear palsy; Tau; Genetics

Progressive supranuclear palsy (PSP) is a neurodegenerative disease characterised by supranuclear gaze palsy, parkinsonism, pseudobulbar signs, postural instability and frontal dementia. The cause of the disease is not known, but different studies have recently confirmed the association of PSP to several polymorphisms in the 17q21 region, including the tau gene and several flanking genes, which constitute the haplotype H1 [14]. A lesser degree of association has been found between this haplotype and corticobasal ganglionic degeneration [6], Parkinson's disease [4,13] and frontotemporal dementia [22]. Mutations of the tau gene have been found to be responsible for some cases of familial frontotemporal dementia and parkinsonism with linkage to the 17q21 region (FTDP17), as well as a few cases of atypical PSP and multisystem tauopathy with dementia [8,12,15–20]. However, the majority of patients with tauopathies, including PSP, do not have mutations in the tau gene. Therefore, it is possible that other genes in or near the 17q21 region are involved in PSP. One of these candidate genes could be the nuclear factor kappa B inducing kinase gene (NIK), which could participate in

some neurodegenerative processes such as Parkinson's and Alzheimer's diseases [1,7].

We have analysed the coding region of NIK gene in patients with PSP in order to investigate its role in PSP genetics. Five patients who met the clinical diagnostic criteria for probable PSP [10,21] were recruited from the Neurology Service of the Hospital Clinic of Barcelona. Blood samples were drawn after informed consent was obtained. The different exons of the NIK gene were amplified from genomic DNA through polymerase chain reaction (PCR) using primer sequences and conditions previously described [3]. Two new primers were designed for the longest exons (10 and 11), with the *DNAStar* software: 5'-TAACAGCCGGGTATCAGGA-3' (forward) and 5'-CCAGAGGGGAACTAAG-3' (reverse) as primers for exon 10 (annealing 59 °C, fragment size 330 bp), and 5'-ATCTAGGAGGCAAAGGGTCAC-3' (forward) and 5'-CTGCCAGGGGTATTATTCT-3' (reverse) as primers for exon 11 (annealing = 57 °C, fragment size 481 bp). The PCR mix was made in a total volume of 25 µl and consisted of 11 µl distilled water, 4 µl of 1.25mM dNTPs, 2.5 µl of 10 × Taq buffer (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 0.1% gelatin, 1.5mM MgCl₂), 2.5 µl of dimethylsulphoxide, 10 pmol of each primer, 1 U of Taq polymerase and 3 µl of

* Corresponding author. Tel.: +34-93-227-5414; fax: +34-93-227-5783.
E-mail address: jemunoz@clinic.ub.es (E. Muñoz).

genomic DNA at 100 ng/ μ l. A single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of the PCR products was carried out for all exons in a polyacrylamide gel using different conditions (concentration 6%, 9% and 12%, voltage 200–450V, TBE concentration 0.5 \times and 1 \times). The PCR products of the longest exons (4, 5, 6, 8, 10 and 12) were previously digested with different enzymes in order to obtain smaller fragments to be analysed by SSCP. The bands were visualised after silver staining. Additionally, in order to search for potentially pathogenic mutations, not detected by SSCP, all exons were sequenced in three unrelated patients using the Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin Elmer) and run on an ABI-prism automatic DNA sequencer (Perkin Elmer). We did not find pathogenic mutations, but sequencing of exon 15 showed a polymorphism, consisting of a single nucleotide variation G/C (SNP rs1047833 of the NCBI database) in the position 2839, which does not produce an aminoacid change.

To investigate whether this polymorphism is included in the haplotype H1 and behaves as a genetic risk factor for PSP, we performed an association study in 40 additional PSP patients (18 males, 22 females) and 35 healthy control subjects (14 males, 21 females). Controls were recruited from spouses and volunteers without family history of parkinsonism. The mean age of disease onset was 70 ± 5.5 years and the mean age of controls was 68.9 ± 7.5 years.

Exon 15 was amplified by PCR and digested with the restriction endonuclease HphI. The PCR products were run in a 7% polyacrylamide gel at 350 V for 2 h, giving rise to different gel band patterns for each genotype. Genotype frequencies were analysed using SPSS 10.0 for Windows (SPSS Inc. Chicago) and chi-square was calculated. The genotype and allele frequencies were not different between patients and controls ($P = 0.51$, Table 1).

The NIK gene has been mapped, together with another widely expressed gene, C17orf1 (formin-like factor or FMNL), to the region associated to FTDP17, between markers D17S800–D17S791 [5]. Aronsson et al. searched for mutations in these genes in two siblings with FTDP17, but no mutations were found [3]. NIK is a serine-threonine protein kinase that participates in the signalling cascade leading to the activation of nuclear factor kappa B (NF- κ B) [11]. NF- κ B is a transcription factor that controls the

expression of multiple genes related to immune or inflammatory responses and cell survival and proliferation, and is also involved in apoptotic processes through the activation of stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase pathway [2]. NF- κ B participates in apoptotic processes of mesencephalic dopaminergic neurons of patients with Parkinson's disease [7] and is involved in Alzheimer's disease neurodegeneration through beta-amyloid-induced nitric-oxide synthase activation [1,9]. However, there is not biological evidence that NIK participates in tau deposition, and our results do not support a role of the NIK gene in PSP genetics.

Acknowledgements

This work was supported by grants of the Society for PSP to E.T. and Hospital Clínic of Barcelona to J.C. We acknowledge technical support provided by Eva Caballero.

References

- [1] K.T. Akama, L.J. van Eldik, Beta-amyloid stimulation of inducible nitric-oxide synthase in astrocytes is interleukin-1 β - and tumor necrosis factor- α (TNF α)-dependent, and involves a TNF α receptor-associated factor- and NF κ B-inducing kinase-dependent signaling mechanism, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 7918–7924.
- [2] H. Akiba, H. Nakano, S. Nishinaka, M. Shindo, T. Kobata, M. Atsuta, C. Morimoto, C.F. Ware, N.L. Malinin, D. Wallach, H. Yagita, K. Okumura, CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, activates NF- κ B and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase via TRAF2, TRAF5, and NF- κ B-inducing kinase, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 13353–13358.
- [3] F.C. Aronsson, P. Magnusson, B. Andersson, S.L. Karsten, Y. Shibasaki, C.L. Lendon, A.M. Goate, A.J. Brookes, The NIK protein kinase and C17orf1 genes: chromosomal mapping, gene structures and mutational screening in frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17, *Hum. Genet.* 103 (1998) 340–345.
- [4] M. Farrer, L. Skipper, M. Berg, G. Bisceglia, M. Hanson, J. Hardy, A. Adam, K. Gwinn-Hardy, J. Aasly, The tau H1 haplotype is associated with Parkinson's disease in the Norwegian population, *Neurosci. Lett.* 322 (2002) 83–86.
- [5] N.L. Foster, K. Wilhelmsen, A.A. Sima, M.Z. Jones, C.J. D'Amato, S. Gilman, Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17: a consensus conference, *Conference Participants, Ann. Neurol.* 41 (1997) 706–715.
- [6] H. Houlden, M. Baker, H.R. Morris, N. MacDonald, S. Pickering-Brown, J. Adamson, A.J. Lees, M.N. Rossor, N.P. Quinn, A. Kertesz, M.N. Khan, J. Hardy, P.L. Lantos, P. StGeorge-Hyslop, D.G. Munoz, D. Mann, A.E. Lang, C. Bergeron, E.H. Bigio, I. Litvan, K.P. Bhatia, D. Dickson, N.W. Wood, M. Hutton, Corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy share a common tau haplotype, *Neurology* 56 (2001) 1702–1706.
- [7] S. Hunot, B. Brugg, D. Ricard, P.P. Michel, M-P. Muriel, M. Ruberg, B.A. Faucheux, Y. Agid, E.C. Hirsch, Nuclear translocation of NF- κ B is increased in dopaminergic neurons of patients with Parkinson disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 7531–7536.
- [8] M. Hutton, C.L. Lendon, P. Rizzu, M. Baker, S. Froelich, H. Houlden, S. Pickering-Brown, S. Chakraverty, A. Isaacs, A. Grover, J. Hackett, J. Adamson, S. Lincoln, D. Dickson, P. Davies, R.C. Petersen, M.

Table 1

Genotype and allele frequency of the NIK polymorphism in exon 15 in PSP patients and controls^a

	n	Genotype, n (%)			Allele frequency, n (%)	
		CC	CG	GG	C	G
PSP	40	18 (45)	22 (55)	–	58 (72.5)	22 (27.5)
Controls	35	17 (48.6)	17 (48.6)	1 (2.9)	51 (72.9)	19 (27.1)

^a ($P = 0.51$).

- Stevens, E. de Graaff, E. Wauters, J. van Baren, M. Hillebrand, M. Joosse, J.M. Kwon, P. Nowotny, L. Kuei-Che, J. Norton, J.C. Morris, L.A. Reed, J. Trojanowski, H. Basun, L. Lannfelt, M. Neystat, S. Fahn, F. Dark, T. Tannenberg, P.R. Dodd, N. Hayward, J.B.J. Kwok, P.R. Schofield, A. Andreadis, J. Snowden, D. Crayford, D. Neary, F. Owen, B.A. Oostra, J. Hardy, A. Goate, J. van Swieten, D. Mann, T. Lynch, P. Heutink, Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17, *Nature* 393 (1998) 702–705.
- [9] B. Kaltschmidt, M. Uherek, B. Volk, P.A. Baeuerle, C. Kaltschmidt, Transcription factor NF-kappaB is activated in primary neurons by amyloid beta peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 2642–2647.
- [10] I. Litvan, Y. Agid, D. Calne, G. Campbell, B. Dubois, R.C. Duvoisin, C.G. Goetz, L.I. Golbe, J. Grafman, J.H. Growdon, M. Hallett, J. Jankovic, N.P. Quinn, E. Tolosa, D.S. Zee, Clinical research criteria for the diagnosis of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome): report of the NINDS-SPSP international workshop, *Neurology* 47 (1996) 1–9.
- [11] N.L. Malinin, M.P. Boldin, A.V. Kovalenko, D. Wallach, MAP3K-related kinase involved in NF-kB induction by TNF, CD95 and IL-1, *Nature* 385 (1997) 540–544.
- [12] K. Miyamoto, A. Kowalska, M. Hasegawa, T. Tabira, K. Takahashi, W. Araki, I. Akiguchi, A. Ikemoto, Familial frontotemporal dementia and parkinsonism with a novel mutation at an intron 10 + 11-splice site in the tau gene, *Ann. Neurol.* 50 (2001) 117–120.
- [13] P. Pastor, M. Ezquerro, E. Muñoz, M.J. Martí, R. Blesa, E. Tolosa, R. Oliva, Significant association between the tau gene A0/A0 genotype and Parkinson's disease, *Ann. Neurol.* 47 (2000) 242–245.
- [14] P. Pastor, M. Ezquerro, E. Tolosa, E. Muñoz, M.J. Martí, F. Valldeoriola, J.L. Molinuevo, M. Calopa, R. Oliva, Further extension of the H1 haplotype associated with progressive supranuclear palsy, *Mov. Disord.* 17 (2002) 550–556.
- [15] P. Pastor, E. Pastor, C. Carnero, R. Vela, T. García, G. Amer, E. Tolosa, R. Oliva, Familial atypical progressive supranuclear palsy associated with homozygosity for the delN296 mutation in the tau gene, *Ann. Neurol.* 49 (2001) 263–267.
- [16] P. Poorkaj, N.A. Muma, V. Zhukareva, E.J. Cochran, K.M. Shannon, H. Hurtig, W.C. Koller, T.D. Bird, J.Q. Trojanowski, V.M. Lee, G.D. Schellenberg, An R5L tau mutation in a subject with a progressive supranuclear palsy phenotype, *Ann. Neurol.* 52 (2002) 511–516.
- [17] L.A. Reed, Z.K. Wszolek, M. Hutton, Phenotypic correlations in FTDP-17, *Neurobiol. Aging* 22 (2001) 89–107.
- [18] P. Rizzo, J.C. van Swieten, M. Joosse, M. Hasegawa, M. Stevens, A. Tibben, M.F. Niermeijer, M. Hillebrand, R. Ravid, B.A. Oostra, M. Goedert, C.M. van Duijn, P. Heutink, High prevalence of mutations in the microtubule-associated protein tau in a population study of frontotemporal dementia in the Netherlands, *Am. J. Hum. Genet.* 64 (1999) 414–421.
- [19] M.G. Spillantini, J.R. Murrell, M. Goedert, M.R. Farlow, A. Klug, B. Ghetti, Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 7737–7741.
- [20] P.M. Stanford, G.M. Halliday, W.S. Brooks, J.B. Kwok, C.E. Storey, H. Creasey, J.G. Morris, M.J. Fulham, P.R. Schofield, 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* 123 (2000) 880–893.
- [21] E. Tolosa, F. Valldeoriola, F. Cruz-Sánchez, Progressive supranuclear palsy: clinical and pathological diagnosis, *Eur. J. Neurol.* 2 (1995) 259–273.
- [22] P. Verpillat, A. Camuzat, D. Hannequin, C. Thomas-Anterion, M. Puel, S. Belliard, B. Dubois, M. Didic, B.-F. Michel, L. Lacomblez, O. Moreaud, F. Sellal, V. Golfier, D. Campion, F. Clerget-Darpoux, A. Brice, Association between the extended tau haplotype and frontotemporal dementia, *Arch. Neurol.* 59 (2002) 935–939.

No evidence of CRHR1 gene involvement in progressive supranuclear palsy

Jaume Campdelacreu¹, Carles Gaig¹, Mario Ezquerra, Esteban Muñoz,
Maria Jose Martí, Francesc Valldeoriola, Eduardo Tolosa*

Parkinson's Disease and Movement Disorders Unit, Neurology Service, Institut Clínic de Neurociències, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clínic Universitari, Barcelona, Spain

Received 3 July 2006; received in revised form 6 September 2006; accepted 7 September 2006

Abstract

Several genes have been located in the chromosomal region 17q21 genetically associated with progressive supranuclear palsy (PSP). Corticotropin releasing hormone receptor 1 (CRHR1) is a gene included in this region. In order to investigate the possible involvement of CRHR1 in PSP pathogenesis, we measured the globus pallidus mRNA expression of this gene using real-time PCR in 12 PSP comparing with several control groups composed by 10 Alzheimer's disease, 5 cerebrovascular disease and 6 healthy controls subjects. We furthermore sequenced directly the entire coding region of CRHR1 of two histopathologically confirmed PSP patients. Expression pattern of CRHR1 in globus pallidus was similar in all groups. We did not find any coding non-synonymous mutation in the patients analysed. Our results do not support an involvement of CRHR1 gene in PSP pathogenesis.

© 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Progressive supranuclear palsy; Genetics; Haplotype; Corticotropin releasing hormone receptor 1; Gene; Expression

The H1/H1 haplotype is associated with a higher risk of progressive supranuclear palsy (PSP). This haplotype represents a 1.14Mb region that includes several polymorphisms in the 17q21 chromosomal region, extending between polymorphic markers rs393152 and rs70602 [13]. The pathogenic effect of this haplotype is not known, and it could act by modulating the function of tau protein or be in linkage disequilibrium with a potential causative neighbouring mutation in this region. Several studies have excluded specific mutations in the promoter, coding regions and 3' untranslated region of tau in typical PSP cases [3,4,6,7]. Mutations in the tau gene can cause FTDP-17 and multisystem tauopathy with dementia [8,18,20]. So far, only five mutations of tau have been described in families with PSP syndrome: R406W, R5L [8,17], S305S [21], homozygous delN296 [12], and recently G303V [19]. It is possible that other genes located in the haplotype region could play a pathogenic role in typical PSP cases. One of these genes is the

corticotropin releasing hormone receptor 1 (CRHR1) gene that it is located next to tau, and encodes a receptor that mediates a neuroprotective effect of CRH. CRH is able to regulate several kinases like GSK3-beta and MAPK [14,1,2]. Both kinases have been involved in tau phosphorylation in PSP and Alzheimer's disease (AD) [5]. This makes this gene a candidate one in this 17q21 chromosomal region worth investigating for the involvement in PSP pathogenesis.

In order to search for a risk polymorphism for PSP in the context of the haplotype H1, we sequenced the coding region of CRHR1 in two pathologically confirmed PSP and two healthy controls. Additionally CRHR1 mRNA was quantified in the globus pallidus in PSP brains. Similar studies were performed, as controls, in globus pallidus of brains diagnosed as AD, cerebrovascular disease (diffuse small vessel disease or Bingswanger type) and from those without evident pathological changes. The globus pallidus is a region severely affected by tau pathology in PSP. In AD, the globus pallidus has been shown to have only minor tau histopathology changes but present a significant cell loss [10], and in patients with CVD no specific alterations are described in the globus pallidus [9].

The frozen samples of globus pallidus were collected from 12 cases with neuropathologically proved PSP, 10 with AD in

* Corresponding author at: Neurology Service, Hospital Clínic Universitari, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 2275785; fax: +34 93 2275783.

E-mail address: etolosa@clinic.ub.es (E. Tolosa).

¹ The two authors contributed equally to this work.

Table 1
Clinical data of PSP patients and controls

	Sex (male/female)	Age at disease onset (years) mean \pm S.D. (range)	Disease duration (years) mean \pm S.D. (range)	Age at death (years) mean \pm S.D. (range)	Postmortem interval (h) mean \pm S.D. (range)
PSP <i>n</i> = 12	8/4	67.4 \pm 4.8 (57–75)	5.8 \pm 1.5 (3–7)	73 \pm 5.4 (65–81)	8.1 \pm 4.2 (4–15.2)
AD <i>n</i> = 10	3/7	61.4 \pm 11.6 (46–81)	10.6 \pm 3.8 (6–17)	71.6 \pm 10.9 (55–90)	9.3 \pm 5.5 (3.5–18.5)
CVD <i>n</i> = 5	0/5	79 \pm 6.9 (70–86)	1.8 \pm 1 (0–3)	80.5 \pm 5.5 (73–88)	7.7 \pm 3.7 (4–13.5)
Controls <i>n</i> = 6	2/4	–	–	78.4 \pm 8.1 (71–92)	2.85 \pm 1.35 (1–5)

stages V–VI of Braak, 5 with diffuse CVD type and 6 controls free of neurological pathology (Table 1). Brains tissues were obtained from the University of Barcelona – Hospital Clinic and University of Navarra Brain Banks.

Forty unrelated subjects (17 male, 23 female), who met clinical diagnostic criteria for probable PSP [11], and 51 healthy controls (24 male, 27 female) were enrolled from the outpatients clinics of Neurology Service at our hospital. The study was approved by the hospital Ethics Committee. Informed consent was obtained from all participating subjects.

Total RNA isolation from frozen brain tissue was performed using the RNeasy lipid tissue mini kit DNase free (Qiagen). RNA integrity was confirmed using formaldehyde-agarose gel electrophoresis and assessing the presence of ribosomal RNA 18S and 28S. cDNA was synthesized using TaqMan reverse transcription reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA). Gene expression was quantified with the real-time PCR method using the Assay-on Demand Service (Applied Biosystems) for CRHR1 gene (assay Hs00366363_m1). Beta-actin (assay Hs99999903_m1), cyclophilin A (assay Hs99999904_m1) and GAPDH (Hs99999905_m1) gene expression was quantified as endogenous controls. The real-time TaqMan-PCR assays for each gene were performed with triplicates of cDNA of each sample in 96-well optical plates on an ABI Prism 7900 Sequence Detection system (Applied Biosystems).

Genomic DNA extracted from peripheral blood using the QIAamp DNA Blood MiniKit (Qiagen, Hilden, Germany), belonging from two patients with pathologically confirmed PSP and two control subjects were used for the analysis. Specific primers were designed for each CRHR1 exon using the DNASTAR software (DNASTAR Inc., Madison, WI) (Table 2). PCR was performed in a total volume of 25 μ l, containing 50 ng of genomic DNA, 1.5 μ l for of each primer at 10 pmol/ μ l, 4 μ l of 1.25 mM dNTPs, 2.5 μ l of 10 \times Taq buffer (100 mM Tris–HCl, 500 mM KCl, 0.1% gelatin, 1.5 mM MgCl₂), 14.4 μ l of double-distilled water and 1 U of TaqExpand HiFi polymerase (Roche/Boehringer, Mannheim, Germany). Different thermocycling conditions were used for PCR amplification, depending on optimal annealing temperature of each primer pair. The CRHR1 exons were purified using the DNA Blood and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Sequencing was performed using the Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin Elmer, Foster City, CA)

and electrophoresis on an ABI-prism automatic DNA Sequencer (Perkin Elmer). The –16C/T exon 6 polymorphism was genotyped in 40 PSP and 51 controls by single chain conformational polymorphism (SCCP).

The relative amount of CRHR1 mRNA was calculated by using the qBase version 1.1 software (Center for Medical Genetics, Ghent University Hospital, Belgium; <http://medgen.ugent.be/qbase/>). SPSS 11.5 software was used for statistical analysis. Data were expressed as mean \pm S.D. Because the distributions of the levels of gene expression were highly skewed, groups were compared using the non-parametric test of Kruskal–Wallis and Mann–Whitney *U*-test. We considered a significant value at *P* < 0.05.

No differences were found in mRNA levels in globus pallidus among PSP, AD, CVD or control brains without neuropathological lesions (Kruskal–Wallis; *P* = 0.62) (Fig. 1).

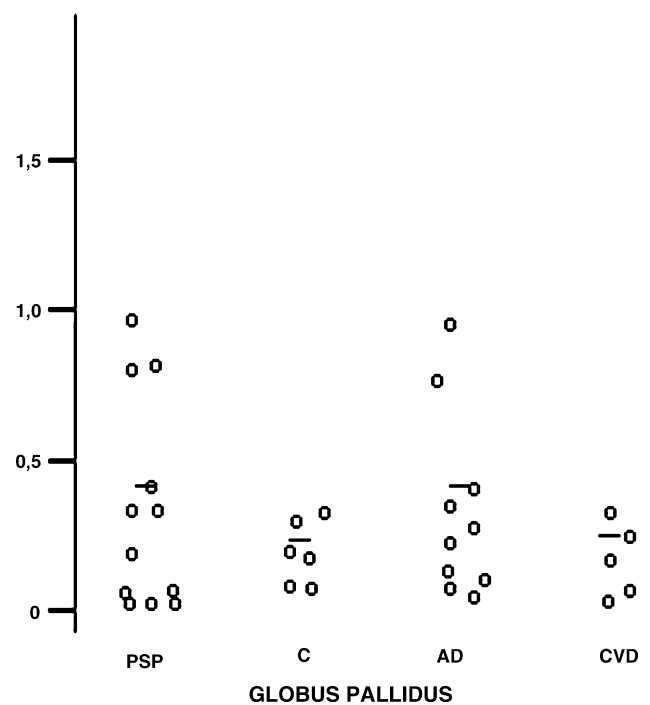


Fig. 1. Comparison of the relative levels of mRNAs encoding for CRHR1. Real-time PCR, levels normalized to cyclophilin, GAPDH and β -actin genes, Kruskal–Wallis test; *P* = 0.62.

Table 2

Primers sequences, annealing temperature and relative product size used for PCR and sequencing reactions

Primers	Exon	T Annealing (°C)	PCR product length (bp)
Forward: 5'-CGCCC GCCGTCCCTCTG-3' Reverse: 5'-CGCCCCCGCCCCATCAC-3'	1	65	198
Forward: 5'-ATGAGGGGCGGCTGTCTGG-3' Reverse: 5'-CTGGGGTAGGGGGCATTGTG-3'	2	61	307
Forward: 5'-GTGGGGAGGTGGGCAGAACT-3' Reverse: 5'-GGCGATCCCCACAAGAGGTAT-3'	3	60	336
Forward: 5'-CCCCAGCTTCACTACACAACC-3' Reverse: 5'-CCTCTGGCTCCCTGACTCC-3'	4	59	323
Forward: 5'-CCACCCTAGGCGATGTCC-3' Reverse: 5'-CCACCCTCTCCAGCAACC-3'	6	60	290
Forward: 5'-TGGTGGGGAGGGACAAAATT-3' Reverse: 5'-CCTGGGGGTGCCTTCTACT-3'	7	60	290
Forward: 5'-TCTGGGCTGGGGTGATGG-3' Reverse: 5'-ACTCCTGTCTGTGGGCTCCTC-3'	8	60	302
Forward: 5'-GGAGGAGCCACAGAACAGGAG-3' Reverse: 5'-CCCACCCCAAGAGGAGCAGAG-3'	9	62	438
Forward: 5'-GGGTGGGCGGCAGTAGAAGC-3' Reverse: 5'-CAATGCCCGTGGGGAGTGTCA-3'	10	61	298
Forward: 5'-CTGTCCTGGCCAAGCACTGTCC-3' Reverse: 5'-CCACTGGGCCCTGTCTCCTG-3'	11	60	196
Forward: 5'-AAGAGGGGGCATGGGTCAGAGA-3' Reverse: 5'-TGGGGAGCAGGGGTTTCAT-3'	12	60	277
Forward: 5'-CCACTCCCTCCCCGACCTG-3' Reverse: 5'-GGCTGCCCTTGCTTCTCC-3'	13	62	332
Forward: 5'-GCAGGAGGCCAGGGAGAA-3' Reverse: 5'-CTGGGAGGGGAGGAGAAGG-3'	14	60	221
Forward: 5'-TCCCAGGACATTTGAGAA-3' Reverse: 5'-GAGTGGGCATGAGACCTAACAG-3'	15	58	545

Direct sequencing did not show non-synonymous mutations in the coding region of CRHR1 in two PSP patients. We found only one synonymous mutation (Pro20Pro) and the -16 C/T polymorphism in the cryptic exon 6 [16], which was further analysed in 40 PSP and 51 controls. The CC genotype was significantly higher in PSP than controls (80% vs. 53%; Fisher's Exact test, $P=0.007$).

CRHR1 gene is located next to tau, included in the H1 haplotype region, which others and we have previously found to be associated with an increased risk for PSP [13,15]. Therefore, it would be possible that abnormalities in the gene expression pattern or a codifying CRHR1 polymorphism in the context of H1 haplotype could be implicated in the PSP pathogenesis. We have determined that the CC genotype (-16 C/T polymorphism), in the cryptic exon 6 of CRHR1 gene, is significantly increased in PSP compared to controls. However, this association and genotype frequencies are similar to other markers in the 17q21 chromosomal region linked to H1 haplotype [13], and do not provide additional relevant knowledge about which is the functional polymorphism included in this haplotype, that directly confers an increased risk for PSP.

The globus pallidus suffers severe neuronal loss and tau positive inclusions in PSP. The CRHR1 gene expression profile in this brain area in PSP cases is, however, similar to those observed in healthy controls, AD, and CVD cases, although we can not definitely rule out the possible involvement of other alternative splicing CRHR1 transcripts or the presence of codifying mutations in a subset of PSP patients.

In summary, our results do not support a direct and primary role of CRHR1 gene in the pathogenesis of PSP.

Acknowledgements

This project was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) U-2004-FS041184-O, Red CIEN IDIBAPS-ISCIII RTIC C03/06 to Dr. Tolosa and Distinció de la Generalitat de Catalunya to Dr. Tolosa. C. Gaig was supported by a grant from the Instituto de Salud Carlos III. We thank statistical support provided by Dr. Carlos Ascaso. We thank the patients and their families for their participation in this study. We acknowledge support provided by the technician Mr. Manel Fernandez and Dra Adriana Cardozo from the University of Barcelona – Hospital Clinic Brain Bank.

References

- [1] N. Bayatti, J. Zschocke, C. Behl, Brain region-specific neuroprotective action and signaling of corticotropin-releasing hormone in primary neurons, *Endocrinology* 144 (2003) 4051–4060.
- [2] N. Bayatti, C. Behl, The neuroprotective actions of corticotropin releasing hormone, *Ageing Res.* 4 (2005) 258–270.
- [3] M. Ezquerra, P. Pastor, F. Valldeoriola, J. Molinuevo, R. Blesa, E. Tolosa, R. Oliva, Identification of a novel polymorphism in the promoter region of the tau gene highly associated to progressive supranuclear palsy in humans, *Neurosci. Lett.* 275 (1999) 183–186.
- [4] M. Ezquerra, J. Campdelacreu, E. Munoz, R. Oliva, E. Tolosa, Sequence analysis of tau 3' untranslated region and saitoihin gene in sporadic progressive supranuclear palsy, *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 75 (2004) 155–157.
- [5] Ferrer, M. Barrachina, B. Puig, Glycogen synthase kinase-3 is associated with neuronal and glial hyperphosphorylated tau deposits in Alzheimer's disease, Pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration, *Acta Neuropathol.* 104 (2002) 583–591.
- [6] J. Higgins, R. Adler, J. Loveless, Mutational analysis of the tau gene in progressive supranuclear palsy, *Neurology* 53 (1999) 1421–1424.
- [7] J. Hoenicka, M. Perez, J. Perez-Tur, A. Barabash, M. Godoy, L. Vidal, R. Astarloa, J. Avila, T. Nygaard, J. de Yebenes, The tau gene A0 allele and progressive supranuclear palsy, *Neurology* 53 (1999) 1219–1225.
- [8] M. Hutton, C. Lendon, P. Rizzu, M. Baker, S. Froelich, H. Houlden, S. Pickering-Brown, S. Chakraverty, A. Isaacs, A. Grover, J. Hackett, J. Adamson, S. Lincoln, D. Dickson, P. Davies, R. Petersen, M. Stevens, E. de Graaff, E. Wauters, J. van Baren, M. Hillebrand, M. Joosse, J. Kwon, P. Nowotny, L. Che, J. Norton, J. Morris, L. Reed, J. Trojanowski, H. Basun, L. Lannfelt, M. Neystat, S. Fahn, F. Dark, T. Tannenberg, P. Dodd, N. Hayward, J. Kwok, P. Schofield, A. Andreadis, D. Snowden, D. Craufurd, D. Neary, F. Owen, B. Oostra, J. Hardy, A. Goate, J. van Swieten, D. Mann, T. Lynch, P. Heutink, Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17, *Nature* 393 (1998) 702–705.
- [9] K.A. Jellinger, The pathology of ischemic-vascular dementia: an update, *J. Neurol. Sci.* 203–204 (2002, Nov. 15) 153–157.
- [10] O. Kazuyuki, M. Koho, T. Shigeru, K. Masahiro, N. Takaya, M. Yoshio, A morphometric study of subcortical changes in Alzheimer's disease, *Neuropathology* 19 (1999) 161–172.
- [11] Litvan, Y. Agid, D. Calne, G. Campbell, B. Dubois, R. Duvoisin, C. Goetz, L. Golbe, J. Grafman, J. Growdon, M. Hallett, J. Jankovic, N. Quinn, E. Tolosa, D. Zee, Clinical research criteria for the diagnosis of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome): report of the NINDS-SPSP international workshop, *Neurology* 47 (1996) 1–9.
- [12] P. Pastor, E. Pastor, C. Carnero, R. Vela, T. Garcia, G. Amer, E. Tolosa, R. Oliva, Familial atypical progressive supranuclear palsy associated with homozygosity for the delN296 mutation in the tau gene, *Ann. Neurol.* 49 (2001) 263–267.
- [13] P. Pastor, M. Ezquerra, C. Perez, S. Chakraverty, J. Norton, B. Racette, D. McKeel, J. Perlmutter, E. Tolosa, A. Goate, Novel haplotypes in 17q21 are associated with progressive supranuclear palsy, *Ann. Neurol.* 56 (2004) 249–258.
- [14] W. Pedersen, R. Wan, P. Zhang, M. Mattson, Urocortin, but not urocortin II, protects cultured hippocampal neurons from oxidative and excitotoxic cell death via corticotropin-releasing hormone receptor type I, *J. Neurosci.* 22 (2002) 404–412.
- [15] Pittman, A. Myers, J. Duckworth, L. Bryden, M. Hanson, P. Abou-Sleiman, N. Wood, J. Hardy, A. Lees, R. de Silva, The structure of the tau haplotype in controls and in progressive supranuclear palsy, *Hum. Mol. Genet.* 13 (2004) 1267–1274.
- [16] Pisarchik, A.T. Slominski, Alternative splicing of CRH-R1 receptors in human and mouse skin: identification of new variants and their differential expression, *FASEB J.* 15 (2001) 2754–2756.
- [17] P. Poorkaj, N. Muma, V. Zhukareva, E.J. Cochran, K. Shannon, H. Hurtig, W. Koller, T. Bird, J. Trojanowski, V. Lee, G. Schellenberg, An R5L tau mutation in a subject with a progressive supranuclear palsy phenotype, *Ann. Neurol.* 52 (2002) 511–516.
- [18] P. Rizzu, J. van Swieten, M. Joosse, M. Hasegawa, M. Stevens, A. Tibben, M. Niermeijer, M. Hillebrand, R. Ravid, B. Oostra, M. Goedert, C. van Duijn, P. Heutink, High prevalence of mutations in the microtubule-associated protein tau in a population study of frontotemporal dementia in the Netherlands, *Am. J. Hum. Genet.* 64 (1999) 414–421.
- [19] R. Ros, S. Thobois, N. Streichenberger, N. Kopp, M. Sanchez, M. Perez, J. Hoenicka, J. Avila, J. Honnorat, J. de Yebenes, A new mutation of the tau gene, G303V, in early-onset familial progressive supranuclear palsy, *Arch. Neurol.* 62 (2005) 1444–1450.
- [20] M. Spillantini, J. Murrell, M. Goedert, M. Farlow, A. Klug, B. Ghetti, Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 7737–7741.
- [21] P. Stanford, G. Halliday, W. Brooks, J. Kwok, C. Storey, H. Creasey, J. Morris, M. Fulham, P. Schofield, 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* 123 (2000) 880–893.

2. Resultados no publicados: análisis del gen GSK-3beta

Artículo 4 (en preparación):

Ezquerria M, **Campdelacreu J**, Muñoz E, Martí MJ, Valdeoriola F, Tolosa E.

Glycogen synthase kinase-3 beta polymorphisms in progressive supranuclear palsy. Dement Geriatr Cogn Disord (en preparación).

Glycogen synthase kinase-3 beta polymorphism in progressive supranuclear palsy.

M. Ezquerra*, Campdelacreu*, E. Muñoz, M.J. Martí, F. Valldeoriola, E. Tolosa.

Parkinson's disease and Movement Disorders Unit, Neurology Service, Institut Clínic de Malalties del Sistema Nerviós (ICMSN), Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clínic Universitari, Barcelona, Spain

Correspondence to: Dr. Eduardo Tolosa Neurology Service, Hospital Clínic Universitari, Villarroel 170, 08036 Barcelona (Spain) (tel.: +34 93 2275785; fax: +34 93 2275783; e-mail: etolosa@clinic.ub.es).

Keywords: progressive supranuclear palsy; genetics; glycogen synthase kinase-3 beta; cyclin-dependent kinase-5; polymorphisms

*The two authors collaborated equally to this work.

Abstract

The -50 T/C glycogen synthase kinase 3- β (GSK-3 β) promoter polymorphism is associated with Parkinson's disease and late-onset and Alzheimer's disease. We analysed the genotype frequencies of this polymorphism in 93 PSP patients and 125 healthy controls. We found no significant differences in the genotype distributions and no interaction with the H1/H1 haplotype defined by the saitojin Q7R polymorphism. However, the CC genotype was slightly decreased ($p=0.048$), and the T allele was significantly more frequent in PSP ($p=0.033$). This polymorphism could be an unspecific risk factor for neurodegenerative diseases.

Introduction

Some neurodegenerative diseases, named tauopathies, such as progressive supranuclear palsy (PSP), frontotemporal dementia, corticobasal ganglionic degeneration and Alzheimer's disease (AD) are characterised by abnormal deposition of highly phosphorylated tau protein in the cytoplasm of neurons and glial cells. PSP and Parkinson's disease (PD) are associated with the H1 haplotype in the tau gene region [1,2]. However, this haplotype is not enough by itself to cause PSP and PD as it is also present in a high proportion of healthy control subjects. Since tau protein is highly phosphorylated in tauopathies, changes in protein kinases could represent an additional

genetic risk factor for PSP. Tau protein contains phosphorylation sites for several protein kinases, and most of them and their phosphorylated active forms are expressed together with abnormal tau deposits in AD and other tauopathies [3]. Russ *et al* [4] sequenced the promoter and coding region of the tau kinase GSK-3 β gene in Alzheimer's disease (AD). They found five polymorphisms in the promoter region, but none of them showed a significant association with AD. However, a recent study has found that the TT genotype of the GSK-3 β -50 T/C polymorphism (rs334558), located in the promoter region of the GSK-3 β gene, is more frequent in late onset AD than in controls in a Spanish population, and did not show an interaction with the *tau* H1 haplotype [5]. Moreover, the GSK-3 β -50 T/C polymorphism interacts with *tau* haplotypes to modify disease risk in PD, and its different genotypes have differential functional effects in GSK-3 β expression in *in vitro* studies [6]. Under the hypothesis that this polymorphism could represent a nonspecific risk factor for neurodegenerative diseases, and specifically for PSP, we tested the -50T/C GSK-3 β genotype and allelic frequencies in PSP patients and controls.

Patients and methods

Ninety-three patients with sporadic PSP meeting the clinical criteria for probable PSP [7,8] (49.4% men, 50.6% women; mean age 69.6 \pm 7.5; mean age at onset 65.4 \pm 6.7) and 125 control subjects without neurodegenerative disorders (35% men, 65% women; mean age 66.4 \pm 9.8) were recruited from the Neurology Service of the Hospital Clínic of Barcelona. Some patients were provided by the Hospital Universitari de Bellvitge. All patients were Caucasian of Spanish origin. Blood samples for genetic analysis were drawn after written informed consent, and the study was approved by the ethical

committee of the Hospital Clínic. Genomic DNA was extracted from leukocytes (QIAGEN, Hilden, Germany). The *GSK-3 β* SNP -50T/C was analyzed in PSP patients and controls, using primers and PCR conditions previously described [6]. Genotyping was carried out through restriction endonuclease *AluI* and *TruII*. The *tau* H1/H2 haplotype was defined by the presence of the *saitohin (STH)* Q7R polymorphism [9], and genotyping was performed as previously described [10]. The digestion products were run on a polyacrylamide gel (concentration 7%, TBEx1) at 350V for 3 hours and the bands were visualized by silver staining.

Tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium and differences in allelic and genotype frequencies (χ^2 -test) were performed using the FINETTI program online at <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>. We used logistic regression analysis to test the possible effect of an interaction between the carriage of H1H1 *tau* and TT *GSK-3 β* genotype on disease state. ANOVA analysis was used to compare the mean age at onset of PSP patients with the different *GSK-3 β* genotypes. Statistical analysis was carried out with the SPSS 11.5 software for Windows (SPSS Inc., Chicago).

Results

The distributions of the *GSK-3 β* -50 T/C and *STH* Q7R genotypes were in Hardy-Weinberg equilibrium in controls and cases, and genotypic frequencies in controls were similar to those reported in the Spanish population [5]. There were no significant differences in the *GSK-3 β* -50 T/C genotype frequencies between PSP patients and controls ($\chi^{2 \times 3}$, $p=0.078$). We did not find a significant association when comparing TT versus TC and CC genotypes with a $\chi^{2 \times 2}$ table ($p=0.12$). However, when comparing CC versus TT and TC genotypes, the CC genotype was significantly

decreased in PSP patients ($p=0.038$). The allelic frequency of the T allele was also significantly increased in PSP patients (Table, $p=0.022$). We have not been able to detect interaction between the presence of H1H1 *tau* haplotype and the TT genotype of *GSK-3 β* gene ($p=0.62$). The mean age at onset of PSP was not related with the *GSK-3 β* genotype.

Discussion

GSK-3 β is involved in both physiological and abnormal tau phosphorylation in the human brain, being a protein potentially implicated in the pathological process underlying tauopathies, and a candidate gene to investigate possible risk polymorphisms in neurodegenerative diseases. Recent reports have found an association of the TT genotype with AD and PD, suggesting that this functional SNP has an effect on the risk in both diseases [5,6]. In our study, we did not detect an increased risk for the TT *GSK-3 β* carriers, but a protective effect in the CC genotype carriers. When we analyzed allelic frequencies between controls and patients the differences were more significant. As previously described in AD, this *GSK-3 β* polymorphism was independent of tau H1 status and thus does not seem to act synergistically [5]. The functional effect of this polymorphism is not known, but its location in the promoter region suggests a possible influence on gene expression. Future studies using a larger sample of PSP patients and controls should be performed in order to confirm these results. The possibility is also open to investigate whether other polymorphisms in the *GSK-3 β* gene are involved in PSP, as described for PD [6], and whether *GSK-3 β* genotypes alter mRNA expression in PSP brains.

Acknowledgements: This work was supported by grants provided by the Society for PSP to Eduardo Tolosa, and Hospital Clínic Universitari and Mutual Mèdica de Catalunya i Balears to Jaume Campdelacreu.

We acknowledge the collaboration of Ana Cámara on sample collection and technical support provided by the technician Manel Fernández. We thank Dr. Calopa from the Hospital Universitari de Bellvitge for providing some PSP patients.

References

1. 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.
2. Pastor P, Ezquerro M, Tolosa E, Muñoz E, Martí MJ, Valdeoriola F, Molinuevo JL, Calopa M, Oliva R. Further extension of the H1 haplotype associated with progressive supranuclear palsy. *Mov Disord* 2002;17:550-556.
3. Ferrer I, Barrachina M, Puig B. Glycogen synthase kinase-3 is associated with neuronal and glial hyperphosphorylated tau deposits in Alzheimer's disease, Pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Acta Neuropathol* 2002;104:583-591.
4. Russ C, Lovestone S, Powell JF. Identification of sequence variants and analysis of the role of the glycogen synthase kinase 3 beta gene and promoter in late onset Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* 2001;6:320-324.
5. Mateo I, Infante J, Llorca J, Rodriguez E, Berciano J, Combarros O. Association between glycogen synthase kinase-3beta genetic polymorphism and late-onset Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2006;21:228-232.

6. Kwok JBJ, Hallupp M, Loy CT, Chan DKY, Woo J, Mellick GD, Buchanan DD, Silburn PA, Halliday GM, Schofield PR. GSK3B polymorphisms alter transcription and splicing in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2005;58:829-839.
7. Litvan I, Agid Y, Calne D. Clinical research criteria for the diagnosis of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome): report of the NINDS-SPSP International Workshop. *Neurology* 1996;47:1-9.
8. Tolosa E, Valldeoriola F, Martí MJ. Clinical diagnosis and diagnostic criteria of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome). *J Neural Transm Suppl* 1994;42:15-31.
9. de Silva R, Hope A, Pittman A, Weale ME, Morris C, Wood NW, Lees AJ. Strong association of the Saitohin gene Q7 variant with progressive supranuclear palsy. *Neurology* 2003;61:407-409.
10. 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 USA* 2002;99:7751-7756.

Table. Genotype and allele frequencies of the *GSK-3 β* -50T/C polymorphism in PSP and controls.

	Genotype, n (%) [*]			Alleles, n (%) ^{**}	
	CC	CT	TT	C	T
PSP (n=93)	9 (9.6)	38 (40.4)	47 (50)	56 (29.8)	132 (70.2)
Controls (n=125)	21 (16.8)	59 (47.2)	45 (36)	101 (40.4)	149 (59.6)

*p=0.078

**p=0.022

Adicionalmente, se realizó un estudio de asociación con otro polimorfismo previamente descrito (Russ C *et al.*, 2001) del promotor de *GSK-3β* en 50 PSP y 50 controles, sin hallar diferencias significativas (**TABLA 5**):

TABLA 5. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo de *GSK-3β* -1727A/T en PSP y controles.

-1727A/T	Genotipos, n (%)			Alelos, n (%)	
	AA	AT	TT	A	T
PSP (n=50)	37 (74)	12 (24)	1 (2)	86 (86)	14 (14)
Controles (n=50)	34 (68)	13 (26)	3 (6)	81 (81)	19 (19)

VI. DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

1. Delimitación de la extensión del haplotipo H1 y búsqueda de mutaciones en esta región en pacientes con PSP, analizando la región -3'-UTR del gen tau y los genes *saitohin*, *NIK* y *CRHR1*.

Saitohin y tau 3'UTR

Las frecuencias de los diversos polimorfismos que configuran el haplotipo H1 están significativamente incrementadas en la PSP (Baker M *et al.*, 1999; Pastor P *et al.*, 2002). El mecanismo patogénico por el cual este haplotipo causa un incremento del riesgo se desconoce. Una de las posibilidades es que esta asociación se deba a un desequilibrio de ligamiento entre estos polimorfismos y una hipotética mutación funcional adyacente que sea la responsable del trastorno. La vida media y la localización subcelular de los mRNA puede depender de la región 3'UTR de los genes (Aronov S *et al.*, 1999), y alteraciones en esta región podrían ser responsables de algunos procesos patológicos. Nosotros no encontramos cambios tras secuenciar la región 3'UTR de *tau* y el locus LOC147077 en tres casos típicos de PSP, con confirmación histológica. El locus LOC147077 era un gen hipotético adyacente a *tau* en el mapa genómico publicado en la base de datos del NCBI en 2001. El mapa genómico humano está todavía en construcción y muchos de los resultados son provisionales. Posteriormente, la secuencia correspondiente a este locus hipotético pasó a formar parte de la región 3'UTR de *tau*.

El genotipo QQ de *saitohin* está sobrerrepresentado en nuestra población de pacientes con PSP (91.2%) comparado con controles (47%). Tras secuenciar la región

codificante de *saitohin* no hemos hallado otras mutaciones o variantes génicas asociadas al riesgo de PSP. Este genotipo QQ cosegrega con el haplotipo H1, pues está en completo desequilibrio de ligamiento con el genotipo CC del polimorfismo del promotor de tau G(-221)C, de forma que el alelo Q se asocia al haplotipo H1 y el alelo R al haplotipo H2 (Conrad C *et al.*, 2004; Verpillat P *et al.*, 2002). De forma simultánea, otros autores han confirmado la asociación reportada por nosotros (Peplonska B *et al.*, 2003; de Silva R *et al.*, 2003). Asimismo, otro estudio de asociación también mostró asociación del haplotipo H1 y del alelo Q y completo desequilibrio de ligamiento de ambos en pacientes con enfermedad de Parkinson (Levecque C *et al.*, 2004).

El papel fisiopatológico de STH sigue siendo poco conocido. Estudios *in vitro* han determinado que la proteína STH interacciona con peroxiredoxina 6 (Prdx6) (Gao L *et al.*, 2005). La Prdx6 tiene función antioxidante y fosfolipasa A2 (Fisher AB *et al.*, 1999; Chen JW *et al.*, 2000). Prdx6 se expresa ampliamente en muchos tejidos, especialmente en tejido neuronal. Alteraciones en los niveles de Prdx6 se asocian a enfermedad de Pick, demencia con cuerpos de Lewy y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica (Power JH *et al.*, 2002; Krapfenbauer K *et al.*, 2002; Krapfenbauer K *et al.*, 2003). La interacción de STH con Prdx6 activa la inclusión del exón 10 del mRNA de *tau* en estos estudios *in vitro* (Gao L *et al.*, 2005). En este contexto, la expresión diferencial de STH, y de cada alelo individual de STH, podría influir en la alteración del *splicing* del mRNA de tau en la PSP.

NIK

El gen *NIK* se había mapeado entre los marcadores D17S810 y D17S791 por lo que se incluyó inicialmente en la región del haplotipo asociado a PSP (Pastor P *et al.*, 2002). La ausencia de mutaciones de *NIK* en pacientes con PSP no apoya que este gen represente algún papel en la genética de esta enfermedad. Además, el polimorfismo hallado que analizamos no está sobrerrepresentado en la PSP, ni está incluido en el haplotipo H1. Este resultados son compatibles con estudios posteriores en los cuales se determinó con más exactitud la región genómica asociada a la PSP (Pastor P *et al.*, 2004) (**FIGURA 2**).

CRHR1

Hemos hallado que el genotipo CC del polimorfismo -16C/T en el exón crítico 6 del gen *CRHR1* está sobrerrepresentado en PSP. Esta asociación y las frecuencias genotípicas son sin embargo similares a otros marcadores en la región 17q21 ligada al haplotipo H1 (Pastor P *et al.*, 2004), por lo que no aporta nuevos datos sobre cuál es la variación responsable del riesgo de PSP en este haplotipo. Por otro lado, el patrón de expresión de *CRHR1* en el globus pallidus, núcleo que muestra severa pérdida neuronal e inclusiones tau-positivas en la PSP, no difiere de los controles ni de los casos con enfermedad de Alzheimer o enfermedad cerebrovascular, aunque no podemos descartar con este trabajo la posibilidad de la implicación de transcritos alternativos de *CRHR1* por diferente *splicing*. En resumen, a pesar de que *CRHR1* es un gen próximo a *tau* y se ha descrito que tiene un papel neuroprotector, la ausencia de mutaciones en *CRHR1*

junto con la ausencia de alteración de la expresión génica en globus pallidus no apoya un papel del gen CRHR1 en la patogenia de esta enfermedad.

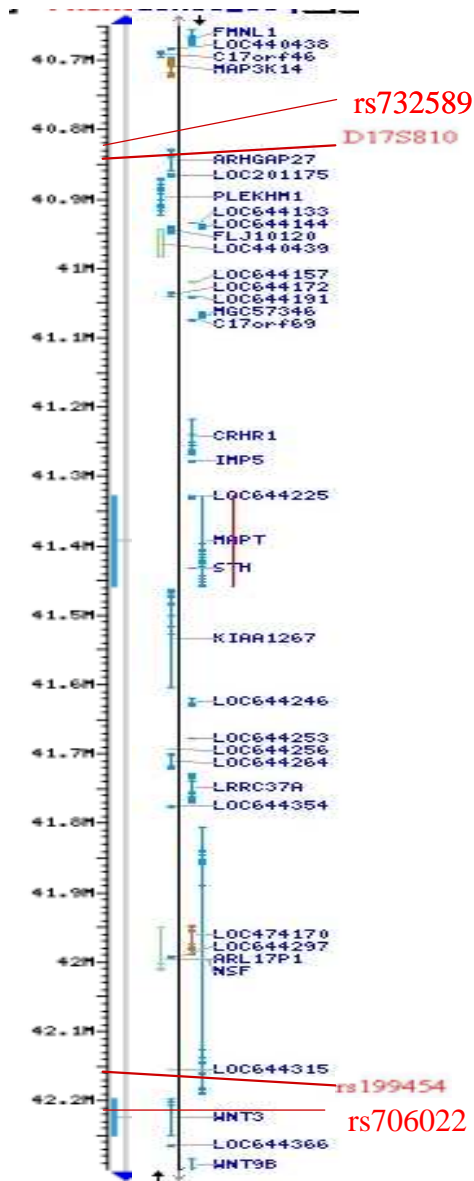


FIGURA 2: mapa actual de la región del haplotipo H1.

2. Análisis de la protein-kinasa GSK-3 β .

GSK-3 β está implicada en la fosforilación fisiológica y patológica de tau en el cerebro humano, y es una proteína potencialmente implicada en el proceso patológico subyacente a las taupatías y un gen candidato a investigar para posibles polimorfismos de riesgo en enfermedades neurodegenerativas. Un estudio reciente ha encontrado que el genotipo TT del polimorfismo del promotor -50T/C (rs334558) de *GSK-3 β* se asocia a un mayor riesgo (OR 1.99, p = 0.003) para la enfermedad de Alzheimer (EA) de inicio tardío (Mateo I *et al.*, 2006). También se ha descrito que la interacción de este polimorfismo con el haplotipo H1 modifica el riesgo para enfermedad de Parkinson (EP) (Kwok JBJ *et al.*, 2005). Los mismos autores demostraron que -50T/C es un polimorfismo funcional, pues el alelo T de -50T/C aumenta la eficacia transcripcional *in vitro* (Kwok JBJ *et al.*, 2005). En nuestro estudio no detectamos un riesgo aumentado para los portadores del genotipo TT, pero sí un efecto protector en los portadores del genotipo CC. Al analizar las frecuencias alélicas, las diferencias entre pacientes y controles fueron aún más significativas. Tal como ya se describió para la EA, este polimorfismo es independiente del haplotipo H1 y no parece actuar sinérgicamente (Mateo I *et al.*, 2006). Deberían realizarse futuros estudios con una muestra mayor para confirmar estos resultados. Sigue abierta la posibilidad de investigar si otros polimorfismos de *GSK-3 β* están implicados en PSP y si los diferentes genotipos alteran la expresión cerebral de la proteína en cerebros con PSP.

El reconocido papel de las tau-quinasas en los mecanismos de neurodegeneración invita a investigar el papel de sus variantes génicas en la PSP. A parte de *GSK-3 β* , sería interesante el estudio de la *cyclin-dependent kinase 5 (CDK5)*, que participa de forma importante en la fosforilación y agregación de tau en la EA (Borghi L *et al.*, 2002), y

cuya inmunoreactividad está aumentada en neuronas con acúmulo de tau y en las regiones del cerebro afectadas por PSP (Borghi R *et al.*, 2002), datos que sugieren su posible participación en la patogenia de esta enfermedad.

Además, trabajos recientes indican la existencia de otras regiones de interés, como sugiere el hallazgo de una familia con PSP con ligamiento al cromosoma 1 (Ros R *et al.*, 2005) y últimamente la detección de un nuevo locus de riesgo mediante *genomewide scan* en el cromosoma 11 (Melquist S *et al.*, 2007), lo que proporciona una nueva ampliación de las vías de investigación sobre el complejo sustrato genético de esta enfermedad.

VII. CONCLUSIONES

1. Nuestros resultados no apoyan que la región 3'UTR de *tau* presente mutaciones o variantes génicas que puedan explicar el riesgo proporcionado por el haplotipo H1 para sufrir PSP.
2. El genotipo QQ de *saitohin* está asociado a PSP en nuestra población y forma parte del haplotipo H1.
3. El gen *NIK* no está incluido en el haplotipo H1 y no incrementa el riesgo genético para desarrollar PSP.
4. La ausencia de mutaciones y de alteración en la expresión génica en ganglios basales no apoya un papel funcional del gen *CRHR1* en la PSP. El genotipo CC del polimorfismo -16C/T de este gen se asocia a PSP en el contexto del haplotipo H1.
5. El alelo T del polimorfismo -50T/C *GSK-3β* está sobrerrepresentado en PSP y podría ser un factor de riesgo adicional independiente del haplotipo H1. Alternativamente, el genotipo CC de dicho polimorfismo podría ser un factor protector.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Akama KT and van Eldik LJ. Beta-amyloid stimulation of inducible nitric-oxide synthase in astrocytes is interleukin-1beta- and tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha)-dependent, and involves a TNFalpha receptor-associated factor- and NFkappaB-inducing kinase-dependent signaling mechanism. *J Biol Chem* 2000;275:7918–7924.

Akiba H, Nakano H, Nishinaka S, Shindo M, Kobata T, Atsuta M, *et al.* CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, activates NF-kB and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase via TRAF2, TRAF5, and NF-kB-inducing kinase. *J Biol Chem* 1998;273:13353–13358.

Alafuzoff I, Hartikainen P, Hanninen T, Partanen K, Kuikka J, Syrjanen K, *et al.* Rapidly progressive multifocal leukoencephalopathy with substantial cell-mediated inflammatory response and with cognitive decline of non-Alzheimer type in a 75-year-old female patient. *Clin Neuropathol* 1999;18:113-123.

Arai K. MRI of progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration and multiple system atrophy. *J Neurol* 2006;253(S3):25-29.

Aronov S, Marx R, Ginzburg I. Identification of 3'UTR region implicated in tau mRNA stabilization in neuronal cells. *J Mol Neurosci* 1999;12:31–45.

Aronsson FC, Magnusson P, Andersson B, Karsten SL, Shibasaki Y, Lendon CL, Goate AM, Brookes AJ. The NIK protein kinase and C17orf1 genes: chromosomal mapping,

gene structures and mutational screening in frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17. *Hum Genet* 1998;103:340–345.

Averbuch-Heller L, Paulson GW, Daroff RB, Leigh RJ. Whipple's disease mimicking progressive supranuclear palsy: the diagnostic value of eye movement recording. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999;66:532-535.

Baker M, Litvan I, Houlden H, Adamson J, Dickson D, Perez-Tur J, *et al.* Association of an extended haplotype in the tau gene with progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet* 1999;8:711–15.

Bayatti N, Zschocke J, Behl C. Brain region-specific neuroprotective action and signaling of corticotropin-releasing hormone in primary neurons. *Endocrinology* 2003;144:4051-4060.

Bayatti N and Behl C. The neuroprotective actions of corticotropin releasing hormone. *Ageing Res Rev* 2005;4:258-270.

Bennett P, Bonifati V, Bonuccelli U, Colosimo C, De Mari M, Fabbrini G, *et al.* Direct genetic evidence for involvement of tau in progressive supranuclear palsy. *Ann Neurol* 1998;51:982-985.

Bonifati V, Joosse M, Nicholl DJ, Vanacore N, Bennett P, Rizzu P, *et al.* The tau gene in progressive supranuclear palsy: exclusion of mutations in coding exons and exon 10

splice sites, and identification of a new intronic variant of the disease-associated H1 haplotype in Italian cases. *Neurosci Letters* 1999;274:61-65.

Borghi R, Giliberto L, Assini A, Delacourte A, Perry G, Smith MA, *et al.* Increase of cdk5 is related to neurofibrillary pathology in progressive supranuclear palsy. *Neurology* 2002;58:589-592.

Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Rocca WA. Incidence of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy in Olmsted County, Minnesota, 1976 to 1990. *Neurology* 1997;49:1284-1288.

Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Rocca WA. Incidence and distribution of parkinsonism in Olmsted County, Minnesota, 1976-1990. *Neurology* 1999;52:1214-1220.

Bunker JM, Wilson L, Jordan MA, Feinstein SC. Modulation of microtubule dynamics by tau in living cells: implications for development and neurodegeneration. *Mol Biol Cell* 2004;15:2720-2728.

Campdelacreu J, Kumru H, Tolosa E, Valls-Sole J, Benabarre A. Progressive supranuclear palsy syndrome induced by clebopride. *Mov Disord* 2004;19:482-484.

Caparros-Lefebvre D, Elbaz A. Possible relation of atypical parkinsonism in the French West Indies with consumption of tropical plants: a case-control study. *Caribbean Parkinsonism Study Group. Lancet* 1999;354:281-286.

Chambers CB, Lee JM, Troncoso JC, Reich S, Muma NA. Overexpression of four-repeat tau mRNA isoforms in progressive supranuclear palsy but not in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1999;46:325-332.

Chen F, David D, Ferrari A, Gotz J. Posttranslational modifications of tau--role in human tauopathies and modeling in transgenic animals. *Curr Drug Targets* 2004;5:503-515.

Chen JW, Dodia C, Feinstein SI, Jain MK, Fisher AB. 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *J Biol Chem* 2000;275:28421-28427.

Chin SS, Goldman JE. Glial inclusions in CNS degenerative diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55:499-508.

Clark LN, Levy G, Tang MX, Mejia-Santana H, Ciappa A, Tycko B, *et al.* The Saitohin 'Q7R' polymorphism and tau haplotype in multi-ethnic Alzheimer disease and Parkinson's disease cohorts. *Neurosci Lett* 2003;347:17-20.

Combarros O, Rodero L, Infante J, Palacio E, Llorca J, Fernandez-Viadero C, *et al.* Age-dependent association between the Q7R polymorphism in the Saitohin gene and sporadic Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2003;16:132-5.

Conrad C, Andreadis A, Trojanowski JQ, Dickson DW, Kang D, Chen X, *et al.* Genetic evidence for the involvement of tau in progressive supranuclear palsy. *Ann Neurol* 1997;41:277-281.

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 USA* 2002;99:7751-7756.

Conrad C, Vianna C, Schultz C, Thal DR, Ghebremedhin E, Lenz J, *et al.* 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.

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.

Daniel SE, de Bruin VMS, Lees AJ. The clinical and pathological spectrum of Steele-Richardson-Olszewski syndrome (progressive supranuclear palsy): a reappraisal. *Brain* 1995;118:759-770.

de Bruin VM, Lees AJ, Daniel SE. Diffuse Lewy body disease presenting with supranuclear gaze palsy, parkinsonism, and dementia: a case report. *Mov Disord* 1992;7:355-358.

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;311:145–8.

de Silva R, Hope A, Pittman A, Weale ME, Morris HR, Wood NW, Lees AJ. Strong association of the Saitohin gene Q7 variant with progressive supranuclear palsy. *Neurology* 2003;61:407-409.

de Yébenes JG, Sarasa JL, Daniel SE, Lees AJ. Familial Progressive supranuclear palsy. Description of a pedigree and review of the literature. *Brain* 1995;118:1095-1103.

Di Maria E, Tabaton M, Vigo T, Abbruzzese G, Bellone E, Donati C, *et al.* Corticobasal degeneration shares a common genetic background with progressive supranuclear palsy. *Ann Neurol* 2000;47:374-7.

Dickson DW. Neuropathologic differentiation of progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *J Neurol* 1999;246:6–15.

Ebneth 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.

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.

Fabbrini G, Vanacore N, Bonifati V, Colosimo C, Meco G. Presymptomatic hypertension in progressive supranuclear palsy. Study Group on Atypical Parkinsonisms. *Arch Neurol* 1998;55:1153-1155.

Farrer M, Skipper L, Berg M, Bisceglia G, Hanson M, Hardy J, *et al.* The tau H1 haplotype is associated with Parkinson's disease in the Norwegian population. *Neurosci Lett* 2002;322:83–86.

Fearnley NL, Revesz T, Brooks DJ, Frackowiak RS, Lees AJ. Diffuse Lewy body disease presenting with a supranuclear gaze palsy, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1991;54:159–161.

Ferrer I, Barrachina M, Puig B. Glycogen synthase kinase-3 is associated with neuronal and glial hyperphosphorylated tau deposits in Alzheimer's disease, Pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Acta Neuropathol (Berl)* 2002;104:583-591.

Fisher AB, Dodia C, Manevich Y, Chen JW, Feinstein S. Phospholipid hydroperoxides are substrates for non-selenium glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1999;274:21326-21334.

Foster NL, Wilhelmsen K, Sima AA, Jones MZ, D'Amato CJ, Gilman S.

Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17: a consensus conference, Conference Participants. *Ann Neurol* 1997;41:706–715.

Foster NL, Gilman S, Berent S, Sima AA, D'Amato C, Koeppe RA, Hicks SP.

Progressive subcortical gliosis and progressive supranuclear palsy can have similar clinical and PET abnormalities. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55:707–713.

Gao L, Tse SW, Conrad C, Andreadis A. Saitohin, which is nested in the tau locus and confers allele-specific susceptibility to several neurodegenerative diseases, interacts with peroxiredoxin 6. *J Biol Chem* 2005;280:39268-39272.

Geddes JF, Vowles GH, Nicoll JA, Revesz T. Neuronal cytoskeletal changes are an early consequence of repetitive head injury. *Acta Neuropathol* 1999;98:171-178.

Ghika J, Bogousslavsky J. Presymptomatic hypertension is a major feature in the diagnosis of progressive supranuclear palsy. *Arch Neurol* 1997;54:1104-1108.

Goedert M, Jakes R. Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J* 1990;9:4225-4230.

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* 1989;3:519–526.

Golbe LI. Progressive supranuclear palsy in the molecular age. *Lancet* 2000; 356: 870-871.

Goode BL, Chau M, Denis PE, Feinstein SC. Structural and functional differences between 3-repeat and 4-repeat tau isoforms. Implications for normal tau function and the onset of neurodegenerative disease. *J Biol Chem* 2000;275:38182–38189.

Grafman J, Litvan I, Stark M. Neuropsychological features of progressive supranuclear palsy. *Brain Cogn* 1995;28:311–320.

Gustke N, Trinczek B, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E. Domains of tau protein and interactions with microtubules. *Biochemistry* 1994;33:9511-9595.

Hauw JJ, Daniel SE, Dickson D, Horoupian DS, Jellinger K, Lantos PL, *et al.* Preliminary NINDS neuropathologic criteria for Steele-Richardson-Olszewski syndrome (progressive supranuclear palsy). *Neurology* 1994;44:2015-2019.

Higgins JJ, Adler RL, Loveless JM. Mutational analysis of the tau gene in progressive supranuclear palsy. *Neurology* 1999;53:1421–1424.

Higgins JJ, Golbe LI, De Biase BS, Jankovic J, Factor SA, Adler RL. An extended 5'-tau susceptibility haplotype in progressive supranuclear palsy. *Neurology* 2000;55:1364-1367.

Higgins JJ, Litvan I, Pho LT, Li W, Nee LE. Progressive supranuclear gaze palsy is in linkage disequilibrium with the tau and not with the alpha-synuclein gene. *Neurology* 1998;50:270-273.

Hirokawa N. Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6:74-81.

Hiscott J, Beauparlant P, Crepieux P, DeLuca C, Kwon H, Lin R, Petropoulos L. Cellular and viral protein interactions regulating I kappa B alpha activity during human retrovirus infection. *J Leukoc Biol* 1997;62:82-92.

Hoenicke J, Perez M, Perez-Tur J, Barabash A, Godoy M, Vidal L, *et al.* The tau gene A0 allele and progressive supranuclear palsy. *Neurology* 1999;53:1219-1225.

Houlden H, Baker M, Morris HR, MacDonald N, Pickering-Brown S, Adamson J, *et al.* Corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy share a common tau haplotype. *Neurology* 2001;56:1702-1706.

Hunot S, Brugg B, Ricard D, Michel PP, Muriel MP, Ruberg M, *et al.* Nuclear translocation of NF-kB is increased in dopaminergic neurons of patients with Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997), pp. 7531-7536.

Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, *et al.* Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17.

Nature 1998;393:702–705.

Josephs KA, Dickson DW. Diagnostic accuracy of progressive supranuclear palsy in the Society for Progressive Supranuclear Palsy brain bank. *Mov Disord* 2003;18:1018-

1026.

Josephs KA, Ishizawa T, Tsuboi Y, Cookson N, Dickson DW. A clinicopathological study of vascular progressive supranuclear palsy: a multi-infarct disorder presenting as progressive supranuclear palsy. *Arch Neurol* 2002;59:1597-1601.

Kaltschmidt B, Uherek M, Volk B, Baeuerle PA, Kaltschmidt C. Transcription factor NF-kappaB is activated in primary neurons by amyloid beta peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2642–2647.

Kikuchi H, Doh-ura K, Kira J, Iwaki T. Preferential neurodegeneration in the cervical spinal cord of progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol (Berl)* 1999;97:577–584.

Komori T. Tau-positive glial inclusions in progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration and Pick's disease. *Brain Pathol* 1999;9:663-679.

Krapfenbauer K, Engidawork E, Cairns N, Fountoulakis M, Lubec G. Aberrant expression of peroxiredoxin subtypes in neurodegenerative disorders. *Brain Res* 2003;967:152-160.

Krapfenbauer K, Yoo BC, Fountoulakis M, Mitrova E, Lubec G. Expression patterns of antioxidant proteins in brains of patients with sporadic Creutzfeldt-Jacob disease. *Electrophoresis* 2002;23:2541-2547.

Kwok JBJ, Hallupp M, Loy CT, Chan DKY, Woo J, Mellick GD, *et al.* GSK3B polymorphisms alter transcription and *splicing* in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2005;58:829-839.

Lee VM, Goedert M and Trojanowski JQ. Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci* 2001;24:1121-1159.

Levecque C, Elbaz A, Clavel J, Vidal JS, Amouyel P, Alperovitch A, *et al.* Association of polymorphisms in the Tau and Saitohin genes with Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75:478-480.

Levy SF, Leboeuf AC, Massie MR, Jordan MA, Wilson L, Feinstein SC. Three- and four-repeat tau regulate the dynamic instability of two distinct microtubule subpopulations in qualitatively different manners. Implications for neurodegeneration. *J Biol Chem* 2005;280:13520-13528.

Lezoualc'h F, Engert S, Berning B, Behl C. Corticotropin-releasing hormone-mediated neuroprotection against oxidative stress is associated with the increased release of non-amyloidogenic amyloid β precursor protein and with the suppression of nuclear factor- κ B. *Mol Endocrinol* 2000;14:147–159.

Litvan I, Mangone CA, McKee A, Verny A, Parsa A, Jellinger K, *et al.* Natural history of progressive supranuclear palsy (Steele–Richardson–Olszewski syndrome) and clinical predictors of survival: a clinicopathological study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996a;60:615–620.

Litvan I, Agid Y, Calne D, Campbell G, Dubois B, Duvoisin RC, *et al.* Clinical research criteria for the diagnosis of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome): report of the NINDS-SPSP international workshop. *Neurology* 1996b;47:1-9.

Litvan I, Jankovic J, Goetz CG, Wenning GK, Sastry N, Jellinger K, *et al.* Accuracy of clinical criteria for the diagnosis of progressive supranuclear palsy (Steele–Richardson–Olszewski syndrome). *Neurology* 1996c;46: 922–930.

Litvan I. Progressive supranuclear palsy revisited. *Acta Neurol Scand* 1998;98:73–84.

Litvan I and Hutton M. Clinical and genetic aspects of progressive supranuclear palsy. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 1998;11:107–114.

Litvan I, Dickson DW, Buttner-Ennever JA, Delacourte A, Hutton M, Dubois B, *et al.* Research goals in progressive supranuclear palsy: a brainstorming conference. *Mov Disord* 2000;15:446-458.

Litvan I. Update on epidemiological aspects of progressive supranuclear palsy. *Mov Disord* 2003;18 Suppl 6:S43-50.

Liu WK, Le TV, Adamson J, Baker M, Cookson N, Hardy J, *et al.* Relationship of the extended tau haplotype to tau biochemistry and neuropathology in progressive supranuclear palsy. *Ann Neurol* 2001;50:494-502.

Lucas JJ, Hernandez F, Gomez-Ramos P, Moran MA, Hen R, Avila J. Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *EMBO J* 2001;20:27-39.

Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV, Wallach D. MAP3K-related kinase involved in NF-kB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 1997;385:540-544.

Mateo I, Infante J, Llorca J, Rodriguez E, Berciano J, Combarros O. Association between Glycogen Synthase Kinase-3beta Genetic Polymorphism and Late-Onset Alzheimer's Disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2006;21:228-232.

Melquist S, Craig DW, Huentelman MJ, Crook R, Pearson JV, Baker M, *et al.* Identification of a novel risk locus for progressive supranuclear palsy by a pooled

genomewide scan of 500,288 single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet* 2007;80:769-778.

Miyamoto K, Ikemoto A, Akiguchi I, Kohno R, Imura T, Fujita Y. A case of frontotemporal dementia and parkinsonism of early onset with progressive supranuclear palsy-like features. *Clin Neuropathol* 2001;20: 8-12.

Morariu MA. PSP and normal-pressure hydrocephalus. *Neurology* 1979;29:1544-1546.

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* 1999;66:665–667.

Morris HR, Katzenschlager R, Janssen JC, *et al.* Sequence analysis of tau in familial and sporadic progressive supranuclear palsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;72:388–390.

Murialdo A, Marchese R, Abbruzzese G, Massimo T, Michelozzi G, Schiavoni S. Neurosyphilis presenting as progressive supranuclear palsy. *Mov Disord* 2000;15:730-731.

Myers AJ, Pittman AM, Zhao AS, Rohrer K, Kaleem M, Marlowe L, *et al.* The MAPT H1c risk haplotype is associated with increased expression of tau and especially of 4 repeat containing transcripts. *Neurobiol Dis* 2007;25:561-570.

Nath U, Ben-Shlomo Y, Thomson RG, Morris HR, Wood NW, Lees AJ, Burn DJ. The prevalence of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome) in the UK. *Brain* 2001;124:1438-1449.

Odetti P, Garibaldi S, Norese R, Angelini G, Marinelli L, Valentín S, *et al.*
Lipoperoxidation is selectively involved in progressive supranuclear palsy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000;59:393–397.

Oliva R, Tolosa E, Ezquerra M, *et al.* Significant changes in the t A0 and A3 alleles in progressive supranuclear palsy and improved genotyping by silver detection. *Arch Neurol* 1998;55:1122-1124.

Oliveira SA, Martin ER, Scott WK, Nicodemus KK, Small GW, Schmechel DE, *et al.*
The Q7R Saitohin gene polymorphism is not associated with Alzheimer disease. *Neurosci Lett* 2003;347:143-146.

Osaki Y, Ben-Shlomo Y, Lees AJ, Daniel SE, Colosimo C, Wenning G, Quinn N.
Accuracy of clinical diagnosis of progressive supranuclear palsy. *Mov Disord* 2004;19:181-189.

Panda D, Samuel JC, Massie M, Feinstein SC, Wilson L. Differential regulation of microtubule dynamics by three- and four-repeat tau: implications for the onset of neurodegenerative disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:9548-9553.

Pastor P, Ezquerra M, Muñoz E, Martí 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.

Pastor P, Ezquerra M, Christian Perez J, Chakraverty S, Norton J, Racette BA, *et al.* Novel haplotypes in 17q21 are associated with progressive supranuclear palsy. *Ann Neurol* 2004;56:249-258.

Pastor P, Ezquerra M, Tolosa E, Muñoz E, Martí MJ, Valldeoriola F, *et al.* Further extension of the H1 haplotype associated with progressive supranuclear palsy. *Mov Disord* 2002;17:550-556.

Pastor P, Pastor E, Carnero C, Vela R, García T, Amer G, *et al.* Familial atypical progressive supranuclear palsy associated with homozygosity for the delN296 mutation in the tau gene. *Ann Neurol* 2001;49:263-267.

Paviour DC, Price SL, Jahanshahi M, Lees AJ, Fox NC. *Brain* 2006;129:1040-1049.

Pedersen WA, Wan R, Zhang P, Mattson MP. Urocortin, but not urocortin II, protects cultured hippocampal neurons from oxidative and excitotoxic cell death via corticotropin-releasing hormone receptor type I. *J Neurosci* 2002;22:404-412.

Pei JJ, Tanaka T, Tung YC, Braak E, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997;56:70–78.

Pei JJ, Braak E, Braak H, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Winblad B, Cowburn RF.

Distribution of active glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999;58:1010–1019.

Peplonska B, Zekanowski C, Religa D, Czyzewski K, Styczynska M, Pfeffer A, *et al.* Strong association between Saitohin gene polymorphism and tau haplotype in the Polish population. *Neurosci Lett* 2003;348:163-166.

Piccini P, de Yébenes J, Lees AJ, Ceravolo R, Turjanski N, Pramstaller P, Brooks DJ. Familial progressive supranuclear palsy: detection of subclinical cases using (18)F-dopa and (18)fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Arch Neurol* 2001;58:1846-1851.

Poorkaj P, Muma NA, Zhukareva V, Cochran EJ, Shannon KM, Hurtig H, *et al.* An R5L tau mutation in a subject with a progressive supranuclear palsy phenotype. *Ann. Neurol* 2002;52:511–516.

Power JH, Shannon JM, Blumbergs PC, Gai WP. Nonselenium glutathione peroxidase in human brain : elevated levels in Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Am J Pathol* 2002;161:885-894.

Pramstaller PP, Lees AJ, Luxon LM. Possible overlap between postencephalitic parkinsonism and progressive supranuclear palsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996;60:589-590.

Rademakers R, Cruts M, Van Broeckhoven C. The role of tau (MAPT) in frontotemporal dementia and related tauopathies. *Hum Mutat* 2004;24:277–295.

Rademakers R, Melquist S, Cruts M, Theuns J, Del-Favero J, Poorkaj P, *et al.* High-density SNP haplotyping suggests altered regulation of tau gene expression in progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet* 2005;14:3281-3292.

Rampello L, Butta V, Raffaele R, Vecchio I, Battaglia G, Cormaci G *et al.* Progressive supranuclear palsy: A systematic review. *Neurobiol Disease* 2005;20:179-186.

Rascol O, Sabatini U, Simonetta-Moreau M, Montastruc JL, Rascol A, Clanet M. Square-wave jerks in parkinsonian syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1991;54:599–602.

Rivaud-Péchoux S, Vidailhet M, Gallouedec G, Litvan I, Gaymard B, Pierrot-Deseilligny C. Longitudinal ocular motor study in corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy. *Neurology* 2000;54:1029–1032.

Rojo A, Pernaute RS, Fontan A, Ruiz PG, Honnorat J, Lynch T, *et al.* Clinical genetics of familial progressive supranuclear palsy. *Brain* 1999;122:1233-1245.

Ros R, Thobois S, Streichenberger N, Kopp N, Sanchez MP, Perez M, *et al.* A new mutation of the tau gene, G303V, in early-onset familial progressive supranuclear palsy. *Arch Neurol* 2005;62:1444-1450.

Rosso SM, Van Swieten JC. New developments in frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17. *Curr Opin Neurol* 2002; 15: 423-4284

Russ C, Lovestone S, Powell JF. Identification of sequence variants and analysis of the role of the glycogen synthase kinase 3 beta gene and promoter in late onset *alzheimer's* disease. *Mol Psychiatry* 2001;6:320-324.

Santacruz P, Uttl B, Litvan I, Grafman J. Progressive supranuclear palsy: a survey of the disease course. *Neurology* 1998;50:1637–1647.

Savoiaro M, Girotti F, Strada L, Ciceri E. Magnetic resonance imaging in progressive supranuclear palsy and other parkinsonian disorders. *J Neural Transm. Suppl* 1994;42:93–110.

Scaravilli T, Pramstaller PP, Salerno A. Neuronal loss in Onuf's nucleus in three patients with progressive supranuclear palsy. *Ann Neurol* 2000;48: 97–101.

Schrag A, Ben-Shlomo Y, Quinn NP. Prevalence of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy: a cross sectional study. *Lancet* 1999;354:1771-1775.

Seno H, Kobayashi S, Inagaki T, Yamamori C, Miyaoka T, Horiguchi J, *et al.*

Parkinson's disease associated with argyrophilic grains clinically resembling progressive supranuclear palsy: an autopsy case. *J Neurol Sci* 2000;178:70-74.

Sergeant N, Wattez A, Delacourte A. Neurofibrillary degeneration in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration: tau pathology with exclusively “exon 10” isoforms. *J Neurochem* 1999;72:1243-1249.

Seripa D, Matera MG, D'Andrea RP, Gravina C, Masullo C, Daniele A, *et al.* Alzheimer disease risk associated with APOE4 is modified by STH gene polymorphism. *Neurology* 2004;62:1631-1633.

Shimamura M, Uyama E, Hirano T, Murakami T, Mita S, Kitamoto T, Uchino M. A unique case of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease presenting as progressive supranuclear palsy. *Intern Med* 2003;42:195-198.

Shiozawa M, Fukutani Y, Sasaki K, Isaki K, Hamano T, Hirayama M, *et al.* Corticobasal degeneration: an autopsy case clinically diagnosed as progressive supranuclear palsy. *Clin Neuropathol* 2000;19:192-199.

Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow EM. Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol* 2002;156:1051-1063

- Stanford PM, Halliday GM, Brooks WS, Kwok JB, Storey CE, Creasey H, *et al.*
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.
- Steele JC, Richardson JC, Olszewski J. Progressive supranuclear palsy: a heterogeneous
degeneration involving the brain stem, basal ganglia and cerebellum with vertical gaze
and pseudobulbar palsy, nuchal dystonia and dementia. *Arch Neurol* 1964;10:333-359.
- Streffer JR, Papassotiropoulos A, Kurosinski P, Signorell A, Wollmer MA, Tsolaki M,
et al. Saitohin gene is not associated with Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg*
Psychiatry 2003;74:362-363.
- Takanashi M, Mori H, Arima K, Mizuno Y, Hattori N. Expression patterns of tau
mRNA isoforms correlate with susceptible lesions in progressive supranuclear palsy
and corticobasal degeneration. *Brain Res Mol Brain Res* 2002;104:210-219.
- Tetrud JW, Golbe LI, Farmer PM. Autopsy-proven progressive supranuclear palsy in
two siblings. *Neurology* 1996;46:931-934.
- Tolosa E, Valldeoriola F, Marti MJ. Clinical diagnosis and diagnostic criteria of
progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome). *J Neural*
Transm Suppl 1994;42:15-31.

Valls-Solé J, Valldeoriola F, Cossu G. Exámenes neurofisiológicos en el síndrome parkinsoniano. *Neurologia* 1999;14:289-305.

Verpillat P, Ricard S, Hannequin D, Dubois B, Bou J, Camuzat A, *et al.* French Study Group on Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia. Is the *saitohin* gene involved in neurodegenerative diseases? *Ann Neurol* 2002;52:829-32.

Whitehouse PJ, Vale WW, Zweig RM, Singer HS, Mayeux R, Kuhar MJ, *et al.* Reductions in corticotropin releasing factor-like immunoreactivity in cerebral cortex in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and progressive supranuclear palsy. *Neurology* 1987;37:905-909.

Will RG, Lees AJ, Gibb W, Barnard RO. A case of progressive subcortical gliosis presenting clinically as Steele-Richardson-Olszewski syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988;51:1224-1227.

Winikates J, Jankovic J. Vascular progressive supranuclear palsy. *J Neural Transm Suppl* 1994;42:189-201.

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.

IX. Anexo: ABREVIATURAS

3'UTR: *3' untranslated region*

CaMkinase II: *calmodulin kinase II*

CDK5: *cyclin dependent kinase 5*

cDNA: DNA complementario

CEIC: Comitè Ètic i d'Investigació Científica

CRH: *corticotropin releasing hormone*

CRHR1: *corticotropin releasing hormone receptor 1*

dNTP: dinucleótidos trifosfato

EA: enfermedad de Alzheimer

EP: enfermedad de Parkinson

FTDP-17: demencia frontotemporal con parkinsonismo ligada al cromosoma 17

GAPDH: gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

GSK-3beta: *glycogen synthase kinase 3 beta*

LD: *linkage disequilibrium*

MAP3K14: *mitogen activated protein kinase kinase kinase 14*

MAPK/ERK: *mitogen activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase*

MAPK: mitogen activated protein kinase

MAPT: *microtubule associated protein tau*

MARK: *microtubule affinity regulating kinases*

mRNA: RNA mensajero

MT: microtúbulos

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

NF-κB: *nuclear factor kappa B*

NIK: *NF- κ B inducing kinase*

NSF: *N-ethylmaleimide sensitive factor*

ONF: ovillos neurofibrilares

OR: *odds ratio*

PCR: *polymerase chain reaction*

PET: *positron emission tomography*

PKA: protein kinasa A

PKC: protein kinasa C

Prdx6: peroxiredoxina 6

PSP: parálisis supranuclear progresiva

RMN: resonancia magnética nuclear

SAPK/JNK: *stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase*

SNP: *single nucleotide polymorphism*

SPECT: *single photon emission computed tomography*

SSCP: *single strand conformation polymorphism*

STH: saitojin

TBE: Tris-borato-EDTA