



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**INFLUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS, EXPRESSÃO TOTAL E  
*SPLICING* ALTERNATIVO DO GENE MAPT NO  
PARKINSONISMO EM IDOSOS**

**Tese de Doutorado**

**Guilherme Teixeira Valença**

**Salvador (Bahia)  
2015**

Valença, Guilherme Teixeira

V152 Influência dos haplótipos, expressão total e *splicing* alternativo do gene MAPT no parkinsonismo em idosos / Guilherme Teixeira Valença. Salvador: GT, Valença, 2015.  
xv: 80fls. : il. [tab. , fig.].

Orientador: Prof. Dr. Jamary Oliveira-Filho.

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina da Bahia, 2015.

1. Parkinsonismo. 2. Idade. 3. Haplótipo. 4. MAPT. 5. Isoforma. I. Oliveira-Filho, Jamary. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina da Bahia. III. Título.

CDU – 616.858-053.9



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**INFLUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS, EXPRESSÃO TOTAL E  
*SPLICING* ALTERNATIVO DO GENE MAPT NO  
PARKINSONISMO EM IDOSOS**

**Guilherme Teixeira Valença**

**Professor-orientador: Jamary Oliveira Filho**

Tese apresentada ao Colegiado do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, da Faculdade de Medicina da Universidade da Bahia, com pré-requisito obrigatório para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde, da área de concentração em Pesquisa Clínica

**Salvador (Bahia)  
2015**

**COMISSÃO EXAMINADORA****Membros Titulares**

Francisco Eduardo Costa Cardoso - Professor Titular do Departamento de Clínica Médica - Neurologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Chefe do Serviço de Neurologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Henrique Ballalai Ferraz - Professor Afiliado Livre Docente da Universidade Federal de São Paulo. Chefe do Serviço de Neurologia da Universidade Federal de São Paulo.

Léa Castelucci - pesquisador associado do Serviço de Imunologia da Universidade Federal da Bahia, Bióloga da Universidade Federal da Bahia e Professora do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Albert Schriefer - Professor adjunto de Parasitologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia e Professor do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Pedro Antônio Pereira de Jesus - Professor adjunto de Neuroanatomia da Universidade Federal da Bahia.

**Membros Suplentes**

Jamary Oliveira Filho (Professor-orientador), Professor adjunto de Neuroanatomia da Universidade Federal da Bahia.

*À minha esposa e filho*

## **INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES**

Faculdade de Medicina da Bahia – Universidade Federal da Bahia

Ambulatório de Transtornos do Movimento e Doença de Parkinson - Hospital Geral Roberto Santos, Secretaria de Saúde do Estado da Bahia (SESAB).

Program in Translational Neuropsychiatric Genomics, Departments of Neurology & Psychiatry, Brigham and Women's Hospital - Harvard Medical School

Program in Medical and Population Genetics, Broad Institute of MIT and Harvard

Rush Alzheimer's Disease Center, Rush University Medical Center

**FONTE DE FINANCIAMENTO**

- Bolsa para doutorado sanduíche em instituição estrangeira – CAPES, processo nº:  
BEX 7281/13-7.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família pelo apoio e torcida, principalmente Dan e Lô pela paciência.

Ao meu orientador, Jamary.

Ao Professor Philip L. De Jager e toda equipe de seu laboratório (Harvard University e Broad Institute) em especial Dr. Gyan Srivastava e Dr. Charles White.

À equipe da Rush University, liderada por Dr. David Bennett.

À fisioterapeuta Lorena Almeida e à enfermeira Nadja Negreiros.

Aos membros da banca por terem aberto mão de seus afazeres profissionais e família para examinar este trabalho.



## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas -----	10
Lista de tabelas e figuras -----	11
Resumo -----	12
Objetivos -----	13
Introdução -----	13
Revisão da literatura -----	14
Parkinsonismo e idade avançada -----	14
Aspectos genéticos do parkinsonismo – região <i>MAPT</i> -----	17
Gene <i>MAPT</i> e proteína tau -----	18
Splicing alternativo do gene <i>MAPT</i> -----	19
Arquitetura haplotípica do locus <i>MAPT</i> -----	20
Métodos -----	24
Seleção da coorte -----	24
Dados clínicos e patológicos -----	25
Genotipagem -----	26
Expressão total e expressão das isoformas do gene <i>MAPT</i> -----	26
Análise estatística -----	27
Modelos -----	28
Resultados -----	29
Associação de haplótipos <i>MAPT</i> com parkinsonismo global e seus quatro domínios motores -----	30
Associação de idade, achados motores e dos haplótipos H1 e H2 com expressão total do gene <i>MAPT</i> em tecido cerebral -----	33
Associação do haplótipo <i>MAPT</i> H2 e de sinais motores com os níveis de expressão das isoformas <i>MAPT</i> -----	36
Discussão -----	39
Projetos em andamento -----	43
Conclusões -----	44
Summary -----	45
Referências -----	47
Artigo -----	53
Abstract -----	54
Introduction -----	56
Methods -----	57
Results -----	59
Discussion -----	63
References -----	67
Tables and Figures -----	70
Online-only Supplement -----	74
Anexos -----	79

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AMS	Atrofia de múltiplos sistemas
DCB	Degeneração corticobasal
DNA	Deoxyribonucleic acid
DA	Doença de Alzheimer
DP	Doença de Parkinson
FPKM	Fragments por quilobase de transcritos por milhão
LD	Linkage Disequilibrium/Desequilíbrio de Ligação
MAP	Memory and Aging Project
MAPT	Microtubule associated protein tau
mUPDRS	Modified Unified Parkinson's disease Rating Scale.
PSP	Paralisia supranuclear progressiva
RIN	RNA Integrity Number
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Religious Orders Study
SNP	Single nucleotide polymorphism

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Características clínicas e epidemiológicas dos 976 participantes utilizadas nas análises.
Tabela 2: Frequências alélicas e genóticas para MAPT rs1052553 e rs242557 com base em 976 participantes.
Tabela 3: Associação do haplótipos* <i>MAPT</i> H1 e H2 e do subhaplótipo <i>MAPT</i> H1c** parkinsonismo global e seus quarto domínios motores na primeira <sup>a</sup> e na última <sup>b</sup> avaliações.
Tabela 4. Associação de idade e neuropatologias com o escore de parkinsonismo global no momento do óbito.
Figura 1. Depleção dopaminérgica estriatal na DP (B) e no parkinsonismo relacionado com a idade (C) comparados com adultos normais (A).
Figura 2. Locus <i>MAPT</i> e isoformas da proteína tau. Este locus tem dois haplótipos: H1 e H2. <i>Splicing</i> alternativo dos exons 2, 3 e 10 dão origem a seis isoformas tau.
Figura 3. Arquitetura haplotípica do locus MAPT (A/B).
Figura 4. História evolucionária dos haplótipos 17q21.31.
Figura 5: Relação dos sinais clínicos com os haplótipos H1/H2.
Figura 6: Relação da expressão <i>MAPT</i> com os haplótipos H1/H2.
Figura 7. Relação entre os escores motores e a expressão total de <i>MAPT</i> na avaliação próxima ao óbito (parkinsonismo global, p=0.14; bradicinesia, p=0.45; marcha, p=0.12).
Figura 8. Relação entre a idade no momento próximo ao óbito e expressão total do gene MAPT estratificada pelo haplótipo H1/H2.
Figura 9. Relação entre os escores motores na última avaliação antes do óbito e o nível de expressão da isoforma 1N/4R.
Figura 10. Relação entre o escore de parkinsonismo global na última avaliação antes do óbito e o nível de expressão da isoforma 1N/4R.
Figura 11. Relação da idade de óbito e o nível de expressão de 1N/4R estratificado por H1/H2 (p=0.58 ajustado para neuropatologia).

## RESUMO

Recentemente, foi demonstrado que o locus MAPT relacionado com a Doença de Parkinson (DP) está também associado com sinais parkinsonianos em idosos sem diagnóstico clínico de DP. Entretanto, a biologia subjacente a esta associação é desconhecida. Vários estudos têm demonstrado que o haplótipo H1 e subhaplótipo H1c MAPT estão associados com doenças neurodegenerativas como a DP, doença de Alzheimer (DA), paralisia supranuclear progressiva (PSP) e degeneração córtico-basal (DCB). Aqui, vamos refinar a análise desta importante região e avaliar o efeito dos haplótipos MAPT no parkinsonismo em idosos, na expressão total e no *splicing* alternativo deste gene. Foram utilizados dados ante-mortem e post-mortem dos participantes em dois estudos clínico-patológicos sobre o envelhecimento, *Religious Orders Study* e *Memory and Aging Project*. Os escores de parkinsonismo global e seus quatro principais componentes, bradicinesia, rigidez, tremor, e alteração da marcha foram coletados prospectivamente a cada ano. Nas análises de regressão, controladas para idade, sexo, índices post-mortem de PD, AD, outros taupatias, macroinfartos e microinfartos, o haplótipo MAPT H2 estava associado com parkinsonismo global ( $p = 0,049$ ), bradicinesia ( $p = 0,008$ ) e menor expressão total de MAPT ( $p = 1,72^{-14}$ ). Quando analisamos o *splicing* alternativo MAPT, parkinsonismo global e bradicinesia também estavam inversamente associados com a expressão de apenas uma isoforma (1N/4R,  $p=0,01$  e  $p = 0,008$ , respectivamente); ao explorar cada característica clínica separadamente, descobrimos que haplótipo H2 é associado com bradicinesia e marcha, mas não tremor ou rigidez. Não houve associação entre essas características motoras e subhaplótipo H1c. No geral, estes resultados sugerem que ambos, menor expressão total de MAPT associado ao haplótipo H2 em comparação com H1 e *splicing* alternativo MAPT, podem parcialmente explicar a associação do

gene MAPT com o parkinsonismo em idosos e, em certa medida, a associação deste último com doenças neurodegenerativas relacionadas à idade.

## **OBJETIVOS:**

### **1. Geral:**

Avaliar a importância do gene MAPT para o desenvolvimento de parkinsonismo em idosos.

### **2. Específicos:**

- a) Estabelecer a associação dos haplótipos e subhaplótipos do gene MAPT com sintomas parkinsonianos em indivíduos idosos.
- b) Determinar o efeitos dos haplótipos H1 e H2 na expressão total e no *splicing* alternativo do gene MAPT
- c) Estabelecer a associação dos isoformes do gene MAPT com sintomas parkinsonianos

## **INTRODUÇÃO**

Sinais parkinsonianos, caracterizados por bradicinesia, rigidez, tremor e transtornos de marcha, são comuns em indivíduos idosos<sup>1</sup> e estão associados com a incapacidade funcional, maior risco de declínio cognitivo, demência e mortalidade<sup>2</sup>. Vários relatos na literatura apontam para uma associação entre a patologia dos núcleos do tronco encefálico e lesões vasculares cerebrais com parkinsonismo em idosos<sup>3,4</sup>. Recentemente, um artigo em particular demonstrou que o locus *MAPT*, previamente relacionado com a doença de Parkinson, está associado ao parkinsonismo em idosos sem diagnóstico clínico da DP<sup>5</sup>. Entretanto, o mecanismo biológico por trás dessa associação é desconhecido. O gene MAPT reside no cromossomo 17q21 e sua proteína codificada, Tau, está envolvida na estabilidade de microtúbulos e na

interação com o cito-esqueleto<sup>6</sup>. Seis isoformas desta proteína, resultantes de *splicing* alternativo dos exons 2, 3 e 10, são expressos no cérebro humano adulto<sup>7</sup>. Na região que contém MAPT, um polimorfismo de nucleótido único (SNP), marca os dois haplótipos maiores, denominados H1 e H2, os quais são definidos por uma grande inversão de aproximadamente 970 Kb contendo o gene MAPT, bem como vários outros genes. Muitos estudos na última década tem mostrado que este locus afeta o risco de doença: H1 e seu sub haplótipo H1c foram relacionados com aumento do risco de certas doenças neurodegenerativas relacionadas à idade, incluindo paralisia supranuclear progressiva (PSP)<sup>8,9,10,11</sup>, degeneração corticobasal (DCB)<sup>10,11</sup>, atrofia de múltiplos sistemas (MSA)<sup>12</sup> e doença de Parkinson (PD)<sup>13,14</sup>. Estas entidades nosológicas também compartilham um espectro clínico variando de parkinsonismo a demência. Além disso, o *splicing* alternativo e expressão total do gene MAPT tem se revelado importantes no desenvolvimento de processos neuropatológicos<sup>6,15</sup>. Nosso estudo investiga o papel da região *MAPT* no parkinsonismo relacionada à idade em duas coortes prospectivas clínico-patológicas e examina a hipótese de que o efeito dos haplótipos *MAPT* no parkinsonismo pode ser mediado, pelo menos em parte, pela expressão gênica e pelo *splicing* alternativo deste gene. Explorar a fisiopatogênese do parkinsonismo em indivíduos mais velhos pode nos levar a uma melhor compreensão dos fenótipos motores em doenças neurodegenerativas relacionadas com a idade.

## **REVISÃO DA LITERATURA**

### ***Parkinsonismo e idade avançada***

Parkinsonismo, caracterizado por bradicinesia, tremor, rigidez muscular, transtornos de marcha e postura, é mais comumente encontrado nas doenças neurodegenerativas relacionadas com o avançar da idade como a doença de Parkinson, atrofia de

múltiplos sistemas (AMS), paralisia supranuclear progressiva (PSP), degeneração corticobasal (DCB), demência frontotemporal com parkinsonismo-17 (DFTP-17) e, em menor monta, associado às doenças cerebrovasculares<sup>16</sup>. Ademais, sinais parkinsonianos são frequentemente encontrados no exame neurológico de indivíduos idosos desprovidos de qualquer doença neurológica diagnosticada<sup>1</sup>.

Esta distinta forma de parkinsonismo associada a idade avançada, também chamada de sinais parkinsonianos leves (SPL), diferencia-se das demais entidades que cursam com essa síndrome, principalmente a doença de Parkinson, por não se encaixar em nenhum critério diagnóstico (ex. Parkinson's Disease Society Brain Bank diagnostic criteria)<sup>17</sup>. Clinicamente as diferenças entre os SPL e a DP e doenças correlatas residem no número e na gravidade dos sinais presentes, na representação específica de alguns deles e na probabilidade de resposta a terapia com levodopa<sup>2</sup>. Estes sinais, agrupados basicamente nos quatro grandes domínios (bradicinesia, rigidez, tremor e transtorno de postura/marcha), são de leve intensidade, simétricos e progressivos. A maioria destes indivíduos exibem principalmente sinais de transtornos de marcha/postura, seguidos de rigidez e bradicinesia. Poucos são observados com tremor em repouso<sup>18,19,20,21,22</sup>. Em virtude das características próprias e do caráter progressivo do sinais parkinsonianos, estes estão envolvidos com prejuízo funcional como perda da habilidade para realizar atividades habituais físicas e instrumentais e redução progressiva da independência<sup>1</sup>.

A estimativa da prevalência depende do rigor em relação ao conceito de parkinsonismo estabelecido pelos estudos epidemiológicos. Aqueles que exigem a presença de pelo menos 1 sinal com apenas 1 ponto ou mais na Unified Parkinson's

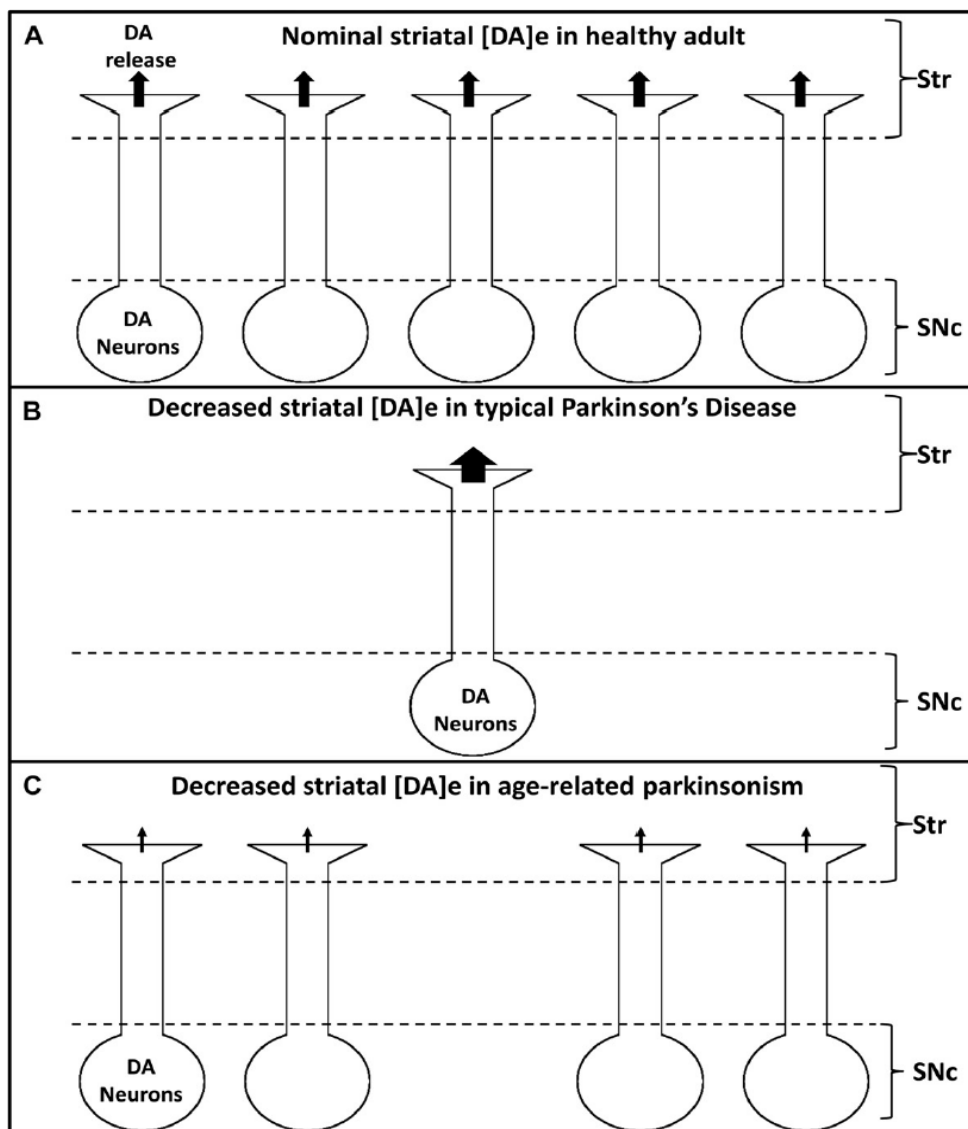
Disease Rating Scale (UPDRS) tem prevalências elevadas (40,1%)<sup>23</sup>. Enquanto os estudos que requerem definições mais restritas (presença de pelo menos dois sinais com 1 ponto cada ou 2 pontos em 1 sinal) para estabelecer a prevalência de parkinsonismo em idosos mostram números mais modestos, que variam de 15,1% a 27,4%<sup>23,24</sup>. Além do anteriormente descrito prejuízo funcional, SPL estão associados com comprometimento cognitivo leve, demência e aumento de mortalidade<sup>25,26</sup>. A associação com o desenvolvimento de DP, demência de Alzheimer (DA) e outras doenças degenerativas é relativa pois a grande maioria dos indivíduos idosos com parkinsonismo não desenvolverão essas enfermidades.

Estudos clínico-patológicos demonstraram que o parkinsonismo em idosos estava associado à presença de corpos de Lewy e emaranhado neurofibrilar na substância negra (SN)<sup>3</sup> e de lesões vasculares encefálicas<sup>4</sup>; e à redução da densidade neuronal no locus ceruleus e na SN<sup>27</sup>. Parece ainda que outros eventos, mediados pelo avançar da idade e que implicam em disfunção da atividade dopaminérgica nigro-estriatal, podem estar associados a sinais parkinsonianos entre eles redução na síntese de dopamina, declínio da ligação de agentes seletivos aos receptores estriatais D1 e D2 e depleção de receptores dopaminérgicos estriatais<sup>28</sup> (Figura 1).

Apesar do recente acúmulo de evidências acerca dos elementos possivelmente envolvidos no parkinsonismo em idosos, elas ainda são insuficientes para explicar os mecanismos por trás desse fenômeno. Acreditamos que, devido às já bem descritas associações entre doenças neurodegenerativas relacionadas a idade que cursam com parkinsonismo e alterações genéticas, estas podem, de fato, contribuir para o surgimento de sinais parkinsonianos associados ao envelhecimento.



**Figura 1. Depleção dopaminérgica estriatal na DP (B) e no parkinsonismo relacionado com a idade (C) comparados com adultos normais (A).**



Darbin O. Parkinsonism and Related Disorders 18 (2012) 426-32

### ***Aspectos genéticos do parkinsonismo – região MAPT***

Nas últimas duas décadas, grandes avanços foram obtidos no campo da genética das mais importantes doenças neurodegenerativas relacionadas com a idade e que dividem o parkinsonismo como principal achado clínico (DP, PSP, DCB, AMS, DFT 17). Inúmeros polimorfismos e mutações em diferentes cromossomos foram descritos nestas doenças, com claro impacto em suas característica fenotípicas, mesmo

naquelas sem um padrão de herança autossômica identificável. Interessante observar que, entre todos os genes descritos, a região do gene MAPT tem sido associada em diferentes estudos genéticos a essas mesmas enfermidades neurodegenerativas que cursam com parkinsonismo<sup>29,30</sup>. Com base nestas observações, percebemos que o gene MAPT e a região em sua volta podem representar uma espécie de intersecção em relação a fisiopatogênese de doenças que tem os sinais parkinsonianos e o avançar da idade como importantes elementos em comum. Outrossim, essas coincidências sugerem que MAPT pode desempenhar um importante papel na patogênese do parkinsonismo relacionado com o envelhecimento.

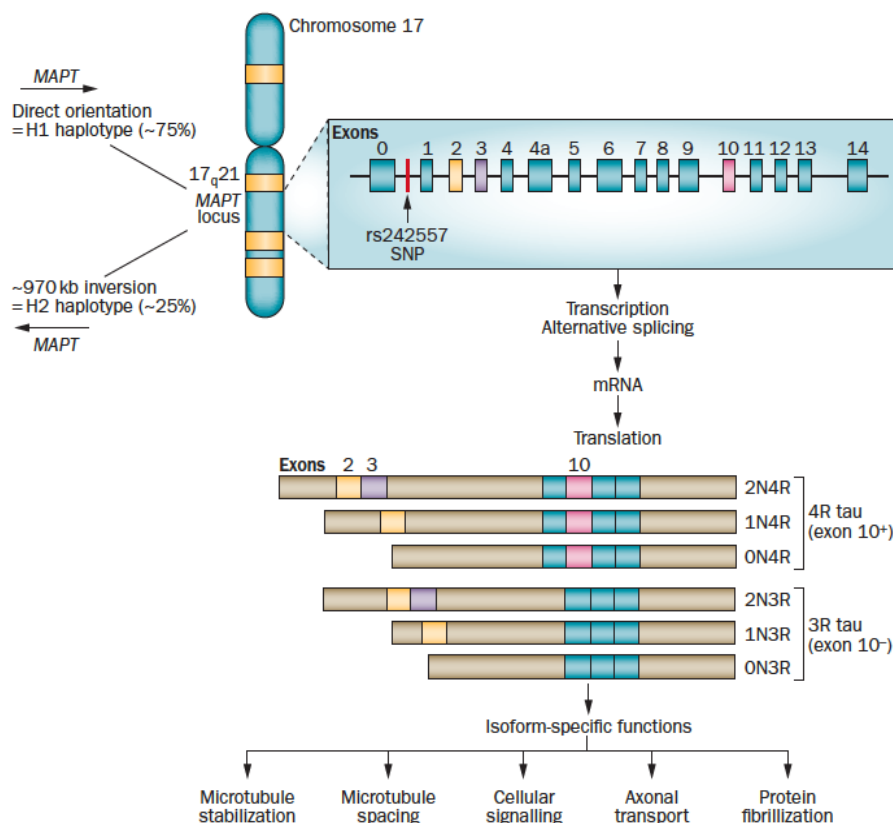
### ***Gene MAPT e proteína tau***

O gene tau humano, MAPT (proteína tau associada ao microtúbulo - *microtubule associated protein tau*) está localizado no cromossomo 17q21.3, abrangendo aproximadamente 150kb de sequência de nucleotídeos e consiste em 16 exons<sup>29,30</sup>. Codifica a proteína tau, responsável por modular a estabilidade dos microtúbulos (MT) axonais por meio da interação com a proteína tubulina e, com isso, manter a estrutura do citoesqueleto, permitir o movimento de vesículas secretórias e organelas, e facilitar transporte de substâncias<sup>31</sup>(Figura 2). Esta fosfoproteína, com mais de 30 sítios de fosforilação, é abundantemente expressa nos neurônios tanto no sistema nervoso central como no periférico e em quantidades muito menores nos oligodendrócitos e astrócitos. Uma vez hiperfosforilada esta proteína torna-se insolúvel, modifica sua estrutura e se acumula na célula neuronal formando os emaranhados neurofibrilares notoriamente envolvidos na patogênese das taupatias (PSP, DCB, DA, doença de Pick)<sup>31</sup>.

### ***Splicing alternativo do gene MAPT***

No cérebro humano adulto, são normalmente encontradas seis isoformas, variando de 352 a 441 aminoácidos, como resultado do *splicing* alternativo dos exons 2, 3 e 10. O *splicing* alternativo do exon 10 produz, no *C-terminus*, isoformas tau com três MT-repetições de ligação (*binding repeats*) devido a exclusão do exon 10 (3R-tau) ou com quatro repetições devido a inclusão deste mesmo exon (4R-tau). O *splicing* dos exons 2 e 3 produz isoformas tau com diferentes *N-terminus* de acordo com a inclusão ou exclusão de ambas (-2-3=0N; +2-3=1N; +2+3=2N). Em consequência, este processo permite a construção de seis combinações de isoformas: 0N3R, 0N4R, 1N3R, 1N4R, 2N3R, 2N4R<sup>29,30,31</sup>. Métodos de análise de RNA avançados tem demonstrado que desequilíbrio na expressão dos transcritos alternativos estão associados a taupatias e outros processos neurodegenerativos<sup>6</sup>. Por exemplo, PSP e DCB estão associadas a maior expressão de mRNA de isoformas 4R quando comparada a expressão 3R. Já a maior expressão de isoformas com inclusão do exon 3 parece ser protetora para doenças neurodegenerativas<sup>32</sup>. Além disso, outros estudos demonstraram que os emaranhados neurofibrilares em diferentes doenças tem uma composição diversa de isoformas, sugerindo que o *splicing* é um elemento chave no processo neuropatológico<sup>7</sup>(Figura 2).

**Figura 2. Gene *MAPT* e isoformas da proteína tau.**



Este locus tem dois haplótipos: H1 e H2. *Splicing* alternativo dos exons 2, 3 e 10 dão origem a seis isoformas tau.

Nature Reviews Neurology **8**, 477-478 (2012)

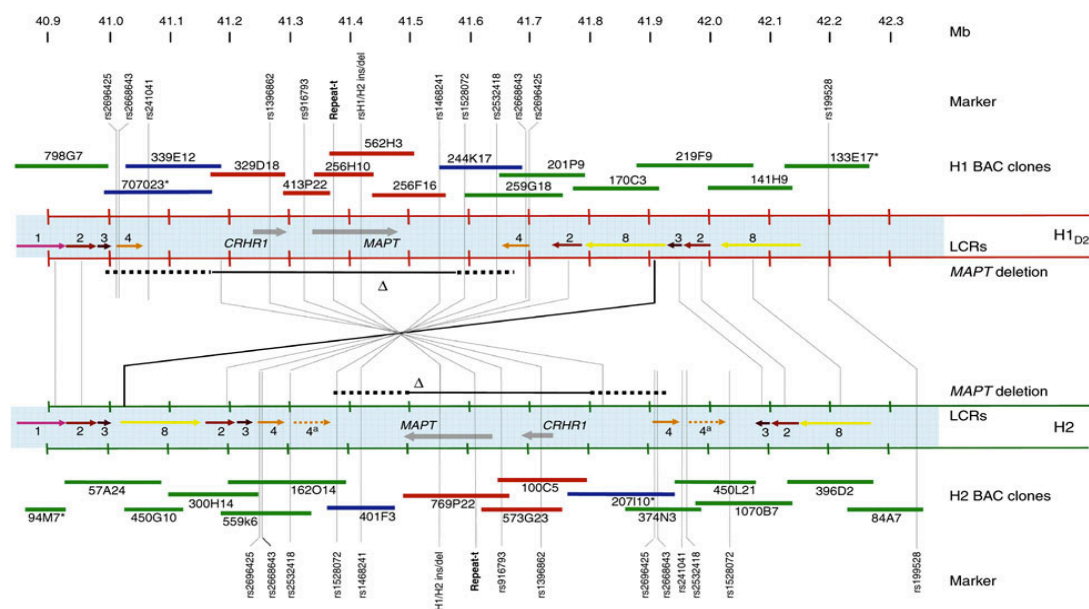
### ***Arquitetura haplotípica do locus *MAPT****

O gene *MAPT* está no meio de uma região de aproximadamente 970kb que sofreu uma antiga inversão na população europeia caucasiana resultando na emergência dos haplótipos *MAPT* H1 (orientação direta) e H2 *MAPT* (orientação inversa) não recombinante. Hoje sabe-se que esta região não recombinante abrange aproximadamente 1,8Mb formando um bloco em completa ligação de desequilíbrio (LD - *linkage disequilibrium*) com algumas dezenas de genes, onde os haplótipos H1 e H2 podem ser definidos por uma série de polimorfismos de nucleotídeos simples

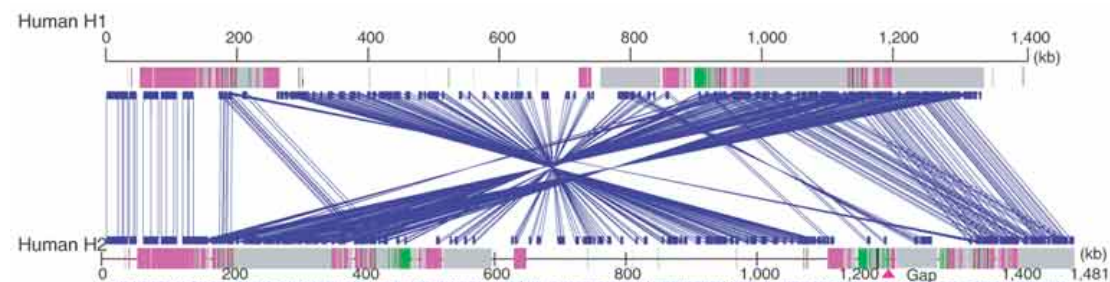
(SNPs) e por uma deleção de 238kb no intron 9 (del-In9), achado apenas no H2<sup>29,30</sup> (Figura 3).

**Figura 3. Arquitetura haplotípica do locus MAPT (A/B).**

**A**



**B**



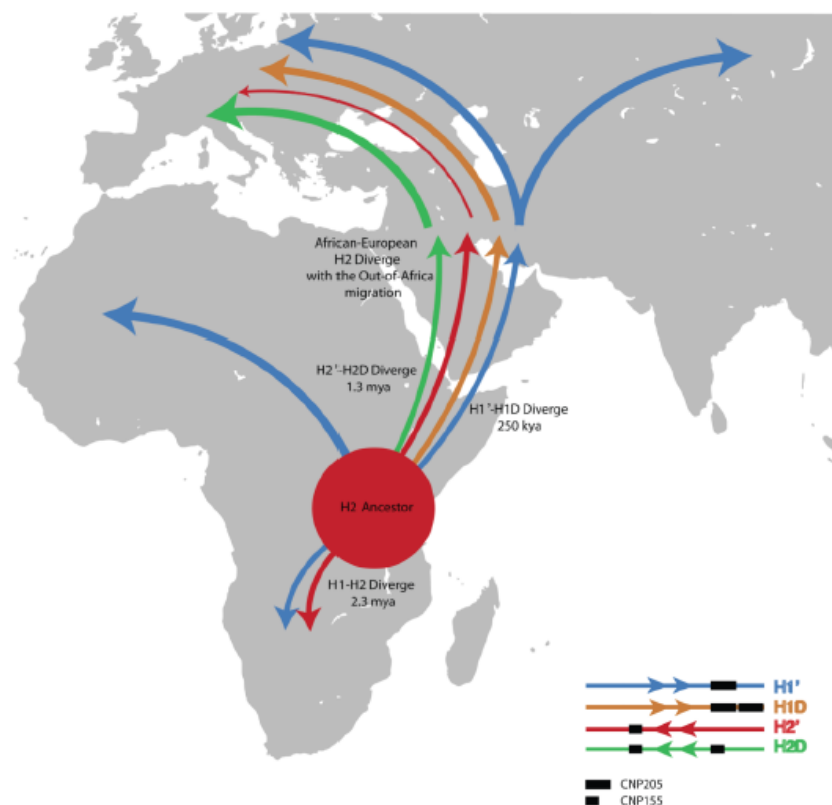
Nesta região são encontradas uma grande inversão de 970Kb e um extenso de 1,8Kb em completo desequilíbrio de ligação.

Nature Genetics - **38**, 1032 - 1037 (2006)

Desperta interesse a variabilidade da frequência do haplótipo H2 em diferentes populações. Sua frequência é estimada em até 30% nas populações caucasianas europeias, entre 5 e 10% na Ásia Central e quase completamente ausente na Ásia Oriental, nativos das Américas e populações africanas<sup>30</sup>. Embora essa divergência entre os haplótipos MAPT H1 e H2 tenha provavelmente ocorrido por volta de 2,3

milhões de anos na África, a alta prevalência de H2 entre os caucasianos se dá em virtude da introdução deste haplótipo nas populações antigas europeias entre 10.000 e 30.000 anos atrás (Figura 4). Esse período coincide com a coexistência do *Homo sapiens* e do *Homo neanderthalensis*<sup>33</sup>. Portanto, alguns autores sugerem que o haplótipo H2 foi introduzido na Europa pelos neandertais mais recentemente. Isso talvez explique a marcada redução da variação da sequência H2 no transcorrer do tempo. De maneira diferente, a sequência do haplótipo H1 divergiu bastante, produzindo vários sub-haplótipos, quatro deles com frequência maior que 5% (H1b-H1e)<sup>11</sup>.

**Figura 4. História evolucionária dos haplótipos 17q21.31. Neste modelo é proposto que o haplótipo H2 representa a configuração ancestral da região 17q21.31 (MAPT) em humanos.**



Neste modelo é proposto que o haplótipo H2 representa a configuração ancestral da região 17q21.31 (MAPT) em humanos.

O hapótipo H1 está associado com o risco aumentado de PSP, DCB (odds ratio ~5) e seu sub-haplótipo H1c, definido pelo SNP rs242557 (A/G), está fortemente associado a PSP<sup>8,9,10,11</sup>. Em relação à demência de Alzheimer os números são conflitantes. Dois estudos clinicopatológicos mostraram que a DA estaria associada a H1<sup>34,35</sup>. Porém um GWAS (*genomewide association studies*) não foi capaz de identificar qualquer associação na região MAPT<sup>36</sup>. Surpreendentemente, em um GWAS publicado em 2009, a doença de Parkinson, entidade desprovida de acúmulo de emaranhados neurofibrilares, estava associada fortemente com alelos em LD com o haplótipo H1 (rs393152,  $p=1,95 \times 10^{-16}$ )<sup>37</sup>.

Contudo, os haplótipos MAPT não estão apenas relacionados com o risco de doença. Eles também influenciam o fenótipo clínico. O genótipo H1/H1 correlaciona-se com fenótipo de parkinsonismo na DFTP-17 enquanto o genótipo H1/H2 está associado ao fenótipo caracterizado por demência<sup>38</sup>. Essa região ainda está relacionada com outras taupatias como esclerose lateral amiotrófica de Guam, complexo Parkinson-demência de Guam e demência de Guam, cujo fenótipo lembra, por vezes, PSP<sup>39</sup>.

E por último, observou-se que as diferenças haplotípicas podem influenciar a expressão total do gene MAPT e o equilíbrio da expressão de suas isoformas, via *splicing* alternativo. Acredita-se que maior expressão total de H1 e de seu subhaplótipo H1c, maior expressão de isoformas que incluam o exon 10 (4R) e menor expressão dos exons 2 e 3 estejam relacionadas com o risco aumentado de doença<sup>6</sup>. De outro modo, a expressão de RNA do haplótipo H2 MAPT parece ser protetor<sup>30</sup>.

A partir das evidências acumuladas, concluímos que a região do gene MAPT tem uma ampla influência na patogênese de doenças neurodegenerativas principalmente aquelas que cursam com parkinsonismo. Essa associação não se relaciona apenas com a agregação aberrante da proteína tau, mas também com mutações e polimorfismos do

gene MAPT que de alguma forma modulam a expressão total e o splicing alternativo deste locus.

## **MÉTODOS**

### ***Seleção da coorte***

Todos os dados utilizados neste projeto foram obtidas junto aos participantes de dois estudos longitudinais que investigam o envelhecimento: Religious Orders Study (ROS)<sup>40</sup> e Memory and Aging Project (MAP)<sup>41</sup>. O estudo ROS, iniciado em 1994, inclui padres, freiras e irmãos católicos de 40 grupos dos Estados Unidos da América (EUA). Todos os participantes eram idosos, livres de demência e concordaram em submeter-se a avaliações clínicas anuais e doar seus cérebros após a morte (alguns da área de Chicago também concordaram em doar medula espinhal, nervos periféricos e músculos). O estudo MAP foi criado pelo Instituto Nacional para o Envelhecimento em 1997. Foram selecionados para o estudo indivíduos idosos sem demência de comunidades de aposentados localizados no nordeste do Estado de Illinois, EUA para a coleta de dados clínicos e epidemiológicos e do cérebro, medula espinhal, músculos e nervos periféricos. Os participantes foram avaliados pelo menos uma vez ao ano.

Ambos os estudos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Rush, Chicago, Illinois (EUA). Todos os indivíduos eram idosos e sem sinais de demência no momento da inclusão, e assinaram o consentimento informado e o formulário do Anatomical Gift Act para doação do cérebro e outros tecidos.

Estes estudos foram desenhados para permitir as seguintes análises: 1) associação dos índices neurobiológicos com DA incidental, transtorno cognitivo leve incidental, declínio cognitivo e sinais motores parkinsonianos; 2) associação dos fatores de risco com as condições supracitadas; 3) entender como as vias neurobiológicas mediam as



associações entre os fatores de risco e os fenótipos clínicos. Até o momento, encontram-se inscritos mais de 3.100 participantes e deles, 976 cérebros foram autopsiados e estavam disponíveis para o presente estudo.

### ***Dados clínicos e patológicos***

A gravidade dos sintomas parkinsonianos foi mensurada anualmente por meio de uma escala de 26 itens, versão modificada da seção motora da Unified Parkinson Disease Rating Scale (mUPDRS). As pontuações dos quatro domínios motores previamente estabelecidos (bradicinesia, rigidez, tremor e transtorno de marcha) foram obtidos a partir desses 26 itens distribuídos da seguinte forma: 6 itens para transtorno de marcha, 8 para bradicinesia, 5 para rigidez e para o tremor 7 itens. O escore de parkinsonismo foi construído pela média dos escores obtidos em cada um dos 4 domínios motores parkinsonianos<sup>42</sup>. Estas medidas têm alta confiabilidade entre avaliadores e estabilidade temporal de curto prazo e são reproduzíveis em homens e mulheres em envelhecimento a partir de uma variedade de cohorts<sup>43,44</sup> (Tabela ANEXO). Os primeiros e últimos escores foram analisados individualmente em modelos multivariáveis, mas focado principalmente na última mensuração, aquela mais próxima do momento da autópsia.

O intervalo médio post-mortem foi de 8,3 horas (SD, 7,4 horas). Corpos de Lewy foram identificados na substância negra no mesencéfalo médio-rostral, próximo ou na saída do terceiro nervo, por meio de anticorpos para alfa-sinucleína. Coloração de hematoxilina-eosina foi usada para indentificação de infartos cerebrais microscópicos no córtex fronto-medial, córtex temporo-medial, córtex parietal inferior, córtex entorrinal, hipocampo, núcleos da base anterior, tálamo anterior e mesencéfalo.

Infartos cerebrais macroscópicos eram identificados por visualização direta (olho-nu). Uma vez identificados, os infartos eram analisados na microscopia. Placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares foram visualizados com a coloração de prata Bielschowsky no córtex fronto-medial, córtex temporo-medial, córtex parietal inferior e hipocampo<sup>45-48</sup>.

### ***Genotipagem***

O DNA foi extraído a partir de sangue total, linfócitos ou tecido cerebral post-mortem congelado. A genotipagem foi realizada em três subgrupos. A genotipagem dos dois primeiros conjuntos de amostras foram geradas usando Affymetrix GeneChip plataforma 6.0 em 2009 no Instituto Broad MIT e Harvard, o terceiro conjunto de amostras foi genotipado na plataforma Illumina HumanOmniExpress em 2012 no Hospital Infantil da Filadélfia, todos de acordo com os protocolos dos fabricantes. Os três conjuntos de dados foram processados através da mesma análise de controle de qualidade e via de imputação<sup>5,49</sup>. Neste estudo, foram investigados os dois principais haplótipos do locus MAPT, marcando o haplótipo H1 e o haplótipo H2 com os alelos maior (A) e menor (G) do SNP rs1052553 (frequência alélica menor = 0,20), respectivamente. O subhaplótipo H1c foi marcado com o alelo menor (G) do SNP rs242557 (frequência alélica menor = 0,38)<sup>50</sup>.

### ***Expressão total e expressão das isoformas do gene MAPT***

Os dados do sequenciamento do RNA foram gerados após análise do tecido cerebral post-mortem do córtex pré-frontal dorsolateral de indivíduos ROS/MAP utilizando-se o Illumina Hi-Seq Sequencing System. O RNA foi extraído do tecido após a avaliação de controle de qualidade baseado em RNA Integrity Number (pontuação RIN)<sup>51</sup>. O

mapeamento foi feito utilizando-se o programa TopHat<sup>52</sup> e o banco de dados transcriptômico do genoma humano do Ensemble (<http://www.ensembl.org>). Os fragmentos por quilobase por milhão (FPKM) foram calculados para cada uma das isoformas de cada gene do genoma humano. Estes valores foram considerados como quantidade de expressão FPKM para cada gene e isoformas, e armazenados para posterior análise.

### *Análise Estatística*

Nos modelos de associação dos achados parkinsonianos com os haplótipos do gene MAPT e sua expressão, os valores dos sinais motores foram raiz quadrada-transformados para se aproximar da distribuição normal. Do mesmo modo, os valores dos emaranhados neurofibrilares foram raiz quadrada-transformados. Na análise de expressão do gene MAPT, usou-se o número de fragmentos por quilobase de transcritos por milhão mapeado (valores FPKM) para quantificar a expressão de cada uma das isoformas e agregou-se estes valores FPKM a fim de quantificar a expressão gênica total. Os valores de rigidez e tremor foram dicotomizados devido a um excesso de valores 0 (sinais relativamente infrequentes), onde os valores não-zero foram representados como 1 e valores zero foram representados como 0. Na análise descritiva calculou-se a frequência para as variáveis categóricas e a média e o desvio padrão para variáveis contínuas.

### *Modelos*

Foram utilizados modelos de regressão linear para os valores contínuos (bradicinesia, marcha e parkinsonismo global) e modelos de regressão logística para tremor e rigidez, usando-se o programa de estatísticas R versão 3.1 ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)). Todos

os modelos de teste para as associações com parkinsonismo foram ajustados para covariáveis pertinentes, incluindo a idade, o sexo, o estudo (ROS/MAP) e diversas patologias cerebrais, como corpos de Lewy (presença ou ausência), infarto cerebral microscópico (presença ou ausência), infarto cerebral macroscópico (presença ou ausência), placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares. Na análise para testar a associação entre os haplótipos e expressão de RNA, apenas a idade, sexo e estudo foram incluídos como covariáveis nos modelos.

## RESULTADOS

Dentre os mais de 3000 participantes das coortes ROS e MAP, foram selecionados 976 indivíduos cujos dados clínicos, neuropatológicos e genotípicos estavam disponíveis para análise de associação entre os haplótipos *MAPT* e os sinais parkinsonianos. Destes, 351 (35,9%) eram do gênero masculino e 625 (64,1%) eram do gênero feminino. A idade média dos participantes na primeira visita era 81,0 anos (DP: 6,9) e na última avaliação antes do óbito 88,4 anos (DP: 6,5). Sessenta indivíduos (6,1%), neste grupo, foram identificados como portadores de doença de Parkinson idiopática na última avaliação clínica antes do óbito. Para a análise da relação da transcrição *MAPT* com os haplótipos *MAPT* e sinais parkinsonianos utilizamos os dados de sequenciamento de RNA disponíveis de 505 (51,7%) dos 976 participantes. Detalhes das características clínicas e demográficas podem ser encontradas na Tabela 1.

**Tabela 1: Características clínicas e epidemiológicas dos 976 participantes utilizadas nas análises.**

<b>Características dos participantes</b>	<b>média +/- DP ou n(%)</b>
<b>Variáveis demográficas e clínicas</b>	
Número de participantes	976
Idade de óbito	88,4 ± (6,5)
Idade na primeira avaliação	81,0 ± (6,9)
Educação	16,4 ± (3,6)
Masculino	35,9% (351)
Diagnóstico de DP até a última avaliação	6,2% (60)
Indivíduos com dados de RNA	51,7% (505)
Porcentagem ROS (versus MAP)	53,2% (519)
<b>mUPDRS scores</b>	
Escore bradicinesia primeira visita	3,3 ± (1,9)
Escore bradicinesia última visita	3,8 ± (2,3)
Escore parkinsonismo global primeira visita	3,1 ± (1,3)
Escore parkinsonismo global última visita	4,0 ± (1,4)
Escore marcha primeira visita	4,0 ± (2,0)

Escore marcha última visita	5,8 ± (2,1)
Escore rigidez > 0 primeira visita	33,3% (324)
Escore tremor > 0 primeira visita	45,8% (445)
Escore rigidez > 0 última visita	53,4% (517)
Escore tremor > 0 última visita	48,4% (471)

### Patologia post mortem

Corpos de Lewy presente na SN	21,5% (210)
Emaranhados Neurofibrilares	0,67 ± (0.42)
Placas neuríticas	0,74 ± (0.54)
Infartos Macroscópicos	35,7% (348)
Infartos Microscópicos	28,5% (278)

DP=doença de Parkinson; ROS=Religious Orders Study, MAP=Memory and Age Project; SN=substância negra

As frequências alélica e genotípica do SNP rs1052553, que marca os haplótipos *MAPT* H1 e H2, e do SNP rs242557 e que marca o subhaplótipo H1c, são descritas na Tabela 2. Como esperado, o avançar da idade está fortemente associada a piora dos escores dos sinais motores (parkinsonismo global:  $b = 0,040$ ,  $p=2,8 \times 10^{-8}$ ) (Tabela 4).

**Tabela 2: Frequências alélicas e genotípicas para *MAPT* rs1052553 e rs242557 com base em 976 participantes**

SNP	Genótipo, n (%)			Alelo, n (%)	
	AA	AG	GG	A	G
rs1052553	631 (64,7%)	298(30,5%)	47 (4,8%)	1560(80,0%)	392(20,0%)
rs242557	103(10,6%)	544(55,7%)	329(33,7%)	750(38,4%)	1202(61,6%)

Para rs1052553, alelo A e G corresponde a H1 e H2 haplótipos, respectivamente. Para rs242557, alelo A corresponde ao sub-haplótipo H1c.

### *Associação de haplótipos *MAPT* com parkinsonismo global e seus quatro domínios motores*

Nós examinamos, por meio do modelo aditivo, a associação entre os dois principais haplótipos *MAPT* e as pontuações do parkinsonismo global e seus quatro domínios motores, bradicinesia, transtorno de marcha, rigidez muscular e tremor. Utilizamos os escores aferidos em ambas as avaliações, a primeira e a última antes do óbito. De

acordo com os dados coletados na primeira avaliação, o haplótipo MAPT H2 estava associado com mais parkinsonismo global, bradicinesia e marcha. O mesmo não se observou com as pontuações de rigidez e tremor nesta mesma avaliação. Ao levarmos em consideração as últimas mensurações, adicionando-se no modelo analítico os dados neuropatológicos, nós observamos uma redução no efeito do haplótipo H2 nos achados motores. A associação entre H2 e transtorno de marcha não é mais detectada, permanecendo apenas associados parkinsonismo global e bradicinesia (Tabela 3, Figura 5). Já o sub-haplótipo H1c não estava associado com nenhum dos sinais motores em qualquer avaliação.

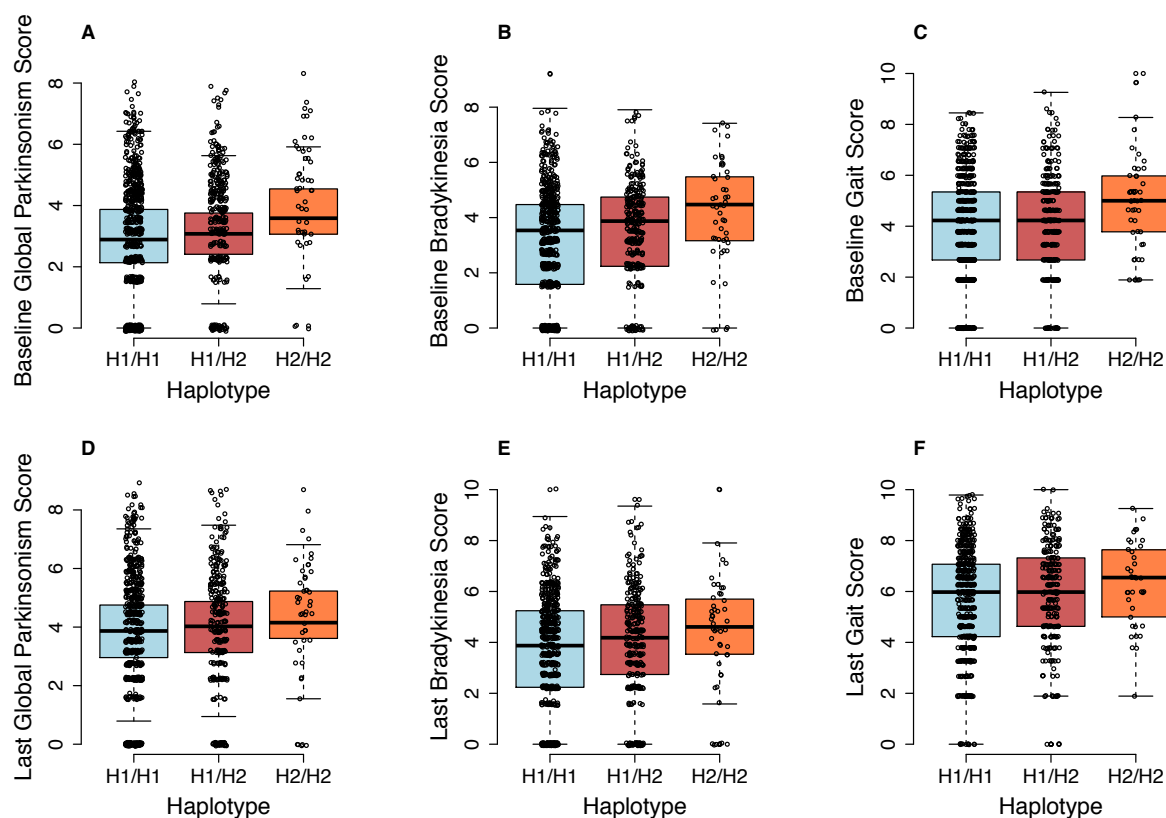
**Tabela 3: Associação do haplótipos\* *MAPT* H1 e H2 e do subhaplótipo *MAPT* H1c\*\* parkinsonismo global e seus quarto domínios motores na primeira<sup>a</sup> e na última<sup>b</sup> avaliações.**

Parkinsonismo - Domínios	rs1052553 (alelo G)*		rs242557 (alelo A)**	
	Efeito	P	Efeito	P
<b>Primeira avaliação</b>				
Parkinsonismo Global	0,21	<0,001	0,093	0,13
Bradicinesia	0,37	<0,001	0,13	0,19
Transtorno de Marcha	0,23	0,021	0,15	0,11
Rigidez	0,12	0,31	0,15	0,17
Tremor	0,17	0,15	0,059	0,58
<b>Última avaliação</b>				
Parkinsonismo Global	0,15	0,05	-0,015	0,82
Bradicinesia	0,32	0,008	0,086	0,45
Transtornos de Marcha/Postura	0,18	0,12	-0,012	0,91
Rigidez	0,15	0,20	-0,13	0,22
Tremor	-0,10	0,38	-0,068	0,52

<sup>a</sup>Teste de associação por meio de regressão linear para o parkinsonismo global, bradicinesia e marcha e de regressão logística para a rigidez e tremor (dicotomizado), após ajuste para idade e sexo.

<sup>b</sup>Teste de associação por meio de regressão linear para o parkinsonismo global, bradicinesia e marcha e de regressão logística para a rigidez e tremor (dicotomizado), após ajuste para idade, sexo, corpos de Lewy, placas neuríticas, emaranhados neurofibrilares, infarto macroscópica e infarto microscópico.

**Figura 5: Relação dos sinais clínicos com os haplótipos H1-H2<sup>a</sup>.**



Para estas análises foi usada o SNP rs 1052553, que diferencia os haplótipos H1/H2. Série de painéis superiores (A,B,C) mostra a associação do genótipo MAPT com achados motores na avaliação inicial (parkinsonismo global,  $P=0,0013$ ; bradicinesia,  $P=0,0034$ ; marcha,  $P = 0,021$ ); ajustado para idade, gênero e estudo. Série de painéis inferiores (D,E,F) mostra a associação do genótipo MAPT com achados motores na última avaliação, próxima ao óbito (parkinsonismo global,  $P=0,05$ ; bradicinesia,  $P=0,008$ ; marcha,  $P=0,12$ ); ajustado para idade, gênero, estudo e neuropatologia. Cada ponto representa um indivíduo.

<sup>a</sup>Baseado em modelos de regressão linear.

Estas associações permaneceram, uma vez excluídos os indivíduos com diagnóstico prévio de DP: parkinsonismo global,  $p<0,001$  e bradicinesia,  $p<0,001$  na primeira avaliação ajustando-se para idade, gênero, estudo; e parkinsonismo global,  $p=0,064$  e bradicinesia,  $p=0,019$  próximo ao óbito, ao adicionar-se patologia no mesmo modelo. Como observado nas análises que levam em conta modelos que incluem os achado neuropatológicos, o efeito do haplótipo H2 no parkinsonismo reduz-se e associação entre ambos parece ser norteadada primariamente pela bradicinesia. Em virtude disso examinamos a influência desses achados no quadro motor. Tanto infartos



macroscópicos ( $b=0,415$ ,  $p<0,0001$ ) como a presença de corpos Lewy ( $b=0,27$ ,  $p=0,009$ ) estavam associados com a piora dos escores motores (Tabela 4).

**Tabela 4. Associação de idade e neuropatologias com o escore de parkinsonismo global no momento do óbito. EP = erro padrão.**

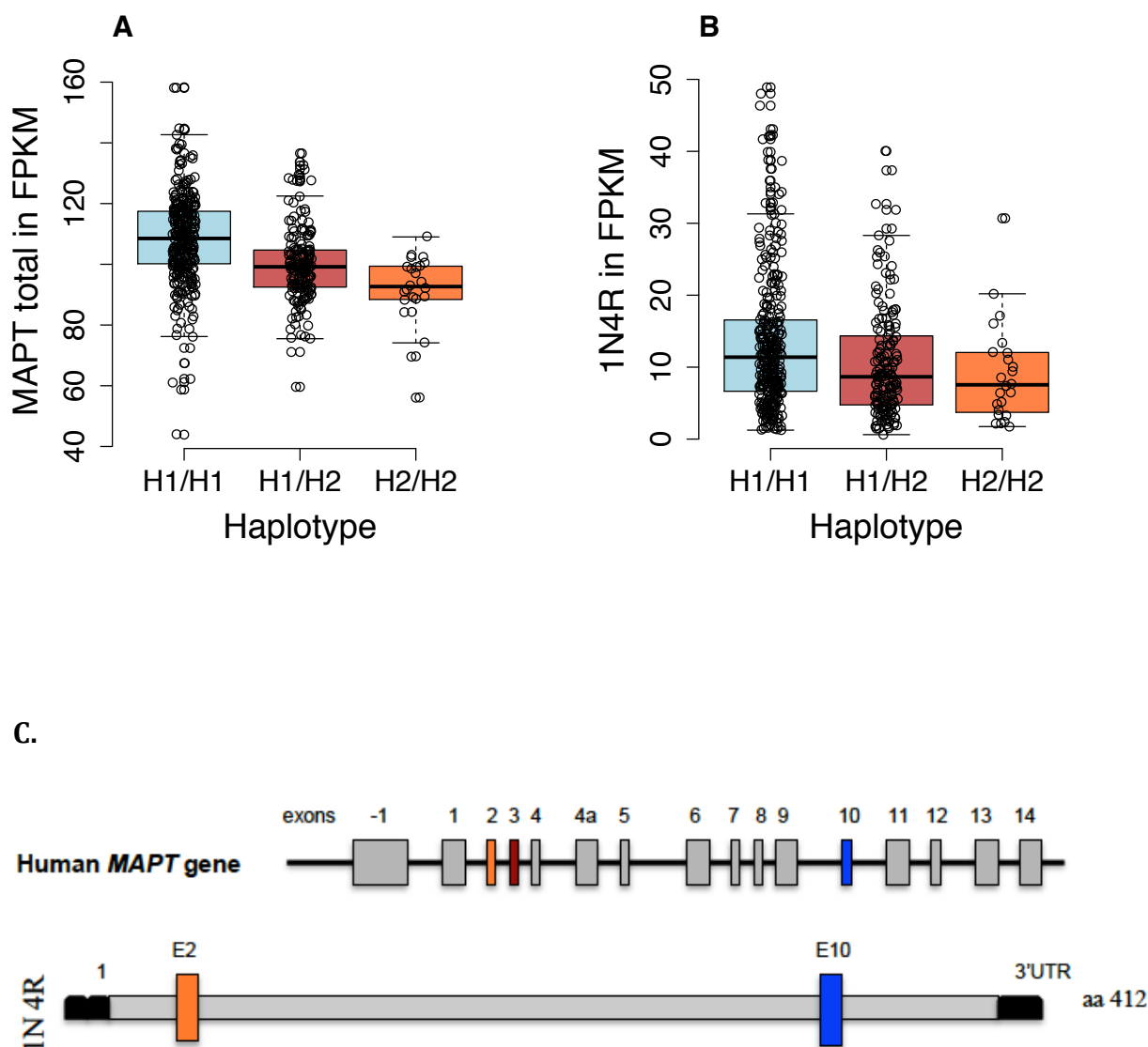
<b>Parkinsonismo Global</b>			
	<b>Efeito</b>	<b>EP</b>	<b>P-valor</b>
Intercept	-0,2	0,63	0,75
rs1052553	0,15	0,074	0,050
Idade de óbito	0,04	0,007	$2,8 \times 10^{-8}$
Masculino	-0,06	0,093	0,51
Corpos de Lewy na SN	0,27	0,11	0,009
Placas Neuríticas	0,09	0,1	0,37
Emaranhado Neurofibrilar	0,25	0,13	0,05
Infartos Macroscópicos	0,42	0,095	$<0,0001$
Infartos Microscópicos	0,15	0,099	0,13

Neuropatologias, infartos macroscópicos and corpos de Lewy, e idade estavam associados com parkinsonismo global na avaliação imediatamente anterior ao óbito. SN=substância negra. Baseado em modelos de regressão linear ou logística.

***Associação de idade, achados motores e dos haplótipos H1 e H2 com expressão total do gene MAPT em tecido cerebral***

Para compreendermos melhor a associação entre os haplótipos MAPT e os sinais parkinsonianos, nós decidimos investigar o efeito da expressão total de RNA do gene MAPT nessa relação. Em primeiro lugar, nossos resultados demonstram que rs1052553, SNP que diferencia os haplótipos H1/H2, influencia fortemente a expressão total de MAPT. Como podemos observar na figura 6A, o haplótipo H2 está fortemente associado com a menor expressão total de RNA quando comparada ao haplótipo H1 ( $p=1,2 \times 10^{-14}$ , incluídos no modelo idade, gênero, estudo e neuropatologia).

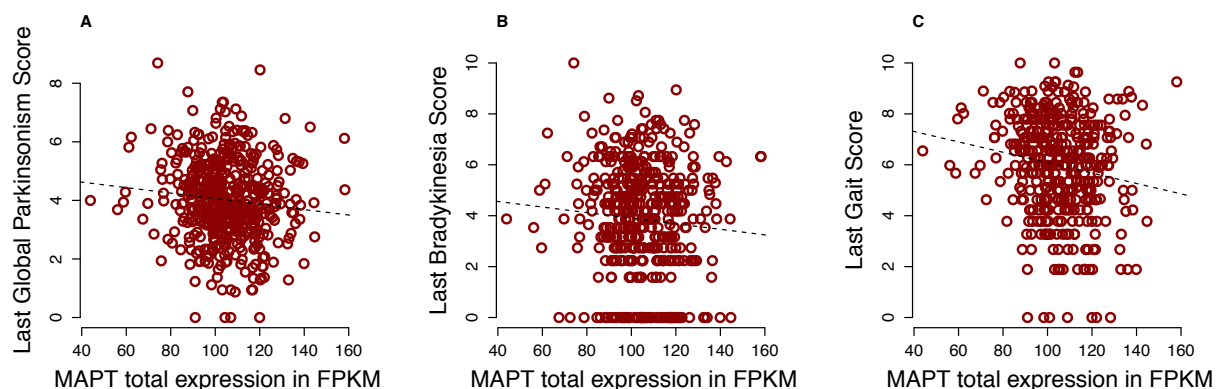
**Figura 6: Relação da expressão *MAPT* com os haplótipos H1/H2.**



Observa-se um efeito dose-dependente do haplótipo H2. Cada ponto representa um indivíduo. (A) Expressão total *MAPT* ( $p=1,2 \times 10^{-14}$  ajustado para idade, gênero, estudo e neuropatologia); (B) Expressão da isoforma *MAPT* 1N4R, a única associada com parkinsonismo ( $p=0,00046$  ajustado para idade, gênero e estudo e  $p=0,0014$  ajustado para idade, gênero, estudo e neuropatologia); (C) Estrutura exônica do gene *MAPT* e composição da isoforma 1N4R: aa=aminoácido, E2=exon 2; E3=exon 3; E10=exon 10.

Embora tenhamos observado que os escores de parkinsonismo global, bradicinesia e alterações da marcha na última avaliação antes do óbito aumentam com a redução da expressão total do gene *MAPT*, a associação entre eles não foi significativa incluindo as mesmas covariáveis da análise anterior (Figura 7).

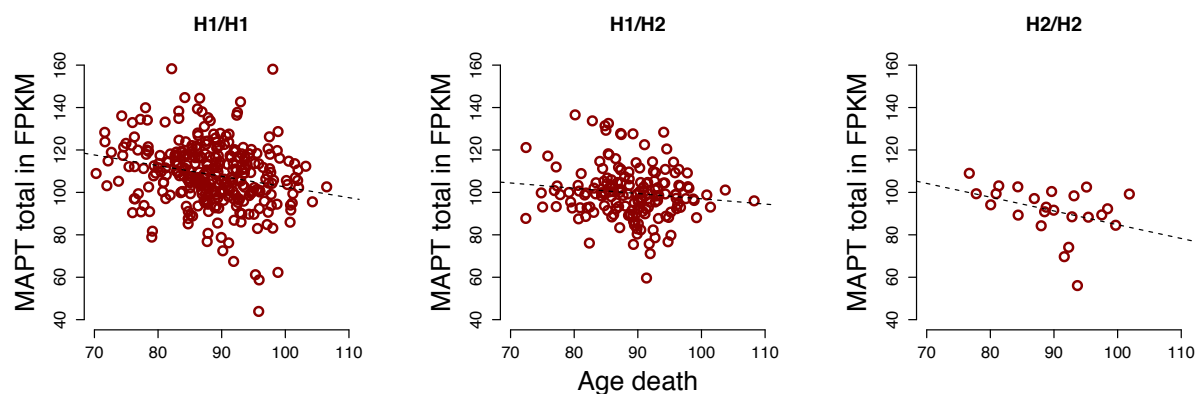
**Figura 7. Relação entre os escores motores e a expressão total de *MAPT* na avaliação próxima ao óbito.**



Parkinsonismo global,  $p=0,14$ ; bradicinesia,  $p=0,45$ ; marcha,  $p=0,12$ .

Ainda verificou-se que a expressão total de *MAPT* é fortemente influenciada pelo avanço da idade, decrescendo linearmente ao longo do tempo, em todas as categorias de haplótipos *MAPT* ( $p<0,001$  modelo ajustado para idade, gênero, estudo e H2 apenas;  $p<0,0001$  modelo ajustado para idade, gênero, estudo, H2 e neuropatologias) (Figura 8).

**Figura 8. Relação entre a idade no momento próximo ao óbito e expressão total do gene *MAPT* estratificada pelo haplótipo H1/H2.**



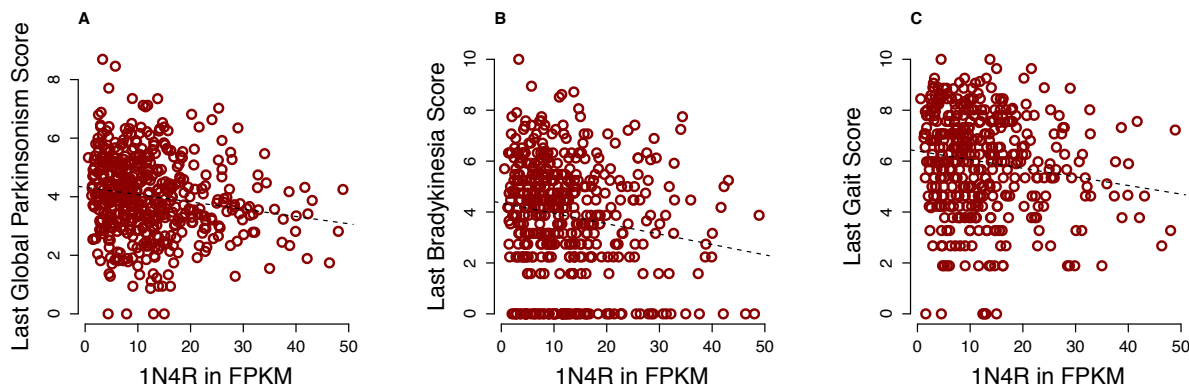
$p<0,001$  ajustado para idade, gênero, estudo e H2 apenas;  $p<0,0001$  ajustado para idade, gênero, estudo e H2 + patologia.

***Associação do haplótipo MAPT H2 e de sinais motores com os níveis de expressão das isoformas MAPT***

Alguns estudos tem demonstrado que níveis alterados das isoformas resultantes do *splicing* alternativo do gene MAPT desempenham um importante papel na susceptibilidade de doenças neurodegenerativas relacionadas ao avançar da idade e que cursam com parkinsonismo<sup>53</sup>. Portanto, analisamos a relação entre as isoformas MAPT e os haplótipos principais e, também, a influência daquelas no parkinsonismo. Os níveis das seis isoformas expressas no cérebro humano estavam disponíveis para as análises e em todas elas idade, gênero, estudo e neuropatologia foram incluídos como covariáveis nos modelos.

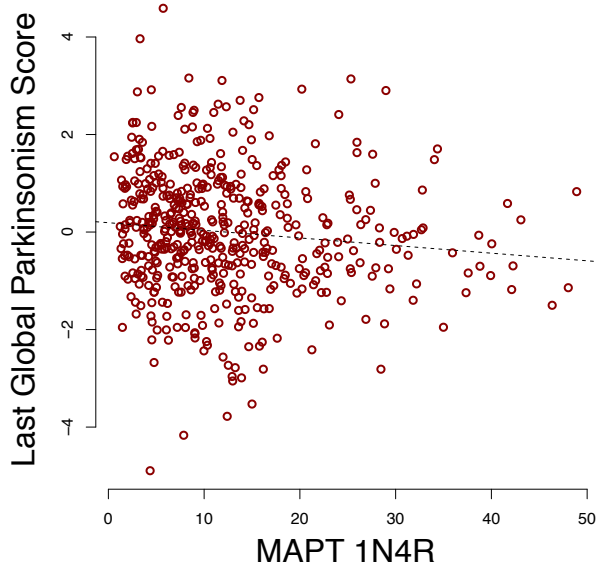
Parkinsonismo global ( $b=-0,0173$ ;  $p=0,008$ ), bradicinesia ( $b=-0,0281$ ;  $p=0,008$ ) e transtorno de marcha ( $b=-0,019$ ;  $p = 0,039$ ) na última visita anterior ao óbito estavam inversamente associados ao nível da isoforma 1N/4R (Figura 9). Quando adicionamos o nível de expressão total MAPT no modelo observamos uma redução no efeito dessa isoforma nos escores motores. Todavia, tanto o escore de parkinsonismo global quanto o de bradicinesia restaram associados a isoforma 1N/4R ( $b=-0,0165$ ,  $p=0,012$  e  $b=-0,0276$ ,  $p=0,011$ , respectivamente) (Figura 10). Nenhuma outra isoforma MAPT expressa no cérebro mostrou-se associada aos sinais parkinsonianos no modelo controlado para a expressão total MAPT e neuropatologia.

**Figura 9. Relação entre os escores motores na última avaliação antes do óbito e o nível de expressão da isoforma 1N/4R.**



Parkinsonismo global,  $p=0,008$ ; bradicinesia,  $p=0,008$ ; marcha,  $p=0,039$ .

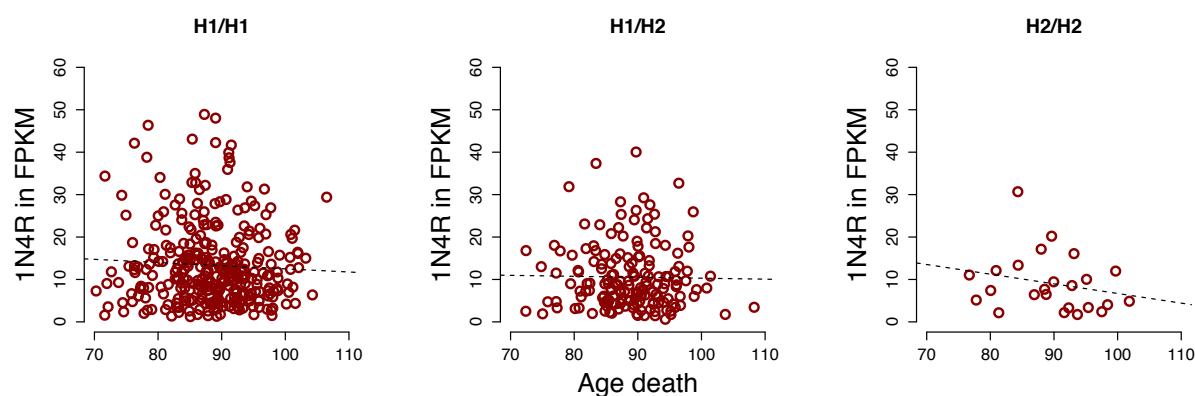
**Figura 10. Relação entre o escore de parkinsonismo global na última avaliação antes do óbito e o nível de expressão da isoforma 1N/4R**



Parkinsonismo global,  $p=0,012$ , ajustado para expressão total *MAPT*.

Em seguida, estudamos a relação entre os haplótipos MAPT e o nível de expressão da única isoforma associada aos sinais motores, 1N/4R. De maneira semelhante o haplótipo H2 estava associado a menor expressão dessa isoforma ( $p=0,00046$  ajustando-se para idade, gênero e estudo;  $p=0,0014$  com neuropatologia) (Figura 6B). Não observamos associação entre idade e o nível de expressão de 1N/4R (Figura 11).

**Figura 11. Relação da idade de óbito e o nível de expressão de 1N/4R estratificado por H1/H2 ( $p=0.58$  ajustado para neuropatologia).**



Nossos resultados nos levaram a investigar se a expressão da isoforma MAPT 1N/4R poderia mediar o efeito do haplótipo H2 na bradicinesia, característica clínica que está mais fortemente associada a ele. Nesta análise, a redução de tamanho do efeito maior que 10% é considerado como evidência de mediação. Aqui, podemos ver que a introdução da isoforma 1N/4R no modelo analítico diminui o  $\beta$  do haplótipo H2 em relação à bradicinesia em 16%, sugerindo que o nível de expressão desse transcrito pode mediar, em parte, o efeito de H2 nesse domínio motor. Observamos ainda que o efeito da isoforma 1N/4R é reduzido quando a expressão total MAPT é adicionado ao modelo ( $\beta$  diminui 3% em 1N/4R). Com isso concluímos que, apesar da expressão total MAPT e do splicing alternativo poderem mediar parte do efeito de H2, a maior parte dos efeitos de H2 e 1N/4R sobre bradicinesia são independentes.

## DISCUSSÃO

Parkinsonismo, caracterizado por bradicinesia, rigidez, tremor e transtornos da marcha e do equilíbrio, pode ser comumente identificado durante o exame clínico de indivíduos mais velhos, sem diagnóstico prévio de doenças neurológicas<sup>1</sup>. Estas características motoras não raramente estão associadas a comprometimento cognitivo leve, aumento do risco de demência, DP, sintomas depressivos e lesões vasculares cerebrais<sup>4,54</sup>. Elas também são um importante preditor de mortalidade<sup>55</sup>.

Recentemente, foram identificadas duas variantes genéticas envolvidas na susceptibilidade da DP como fatores de risco para parkinsonismo relacionado com a idade. Uma delas localizada no locus *MAPT*<sup>5</sup>. Ademais, vários estudos demonstraram que o haplótipo H1 e o subhaplótipo H1c do gene *MAPT* estão associados com aumento do risco de doenças neurodegenerativas relacionadas com a idade que, em maior ou menor monta, compartilham fenótipos parkinsonianos: PD, MSA, PSP e DCB<sup>8-14</sup>. De maneira diferente, em nossa casuística, observamos que sinais parkinsonianos em idosos estão na verdade correlacionados como o haplótipo *MAPT* H2.

Dois relevantes aspectos, no que se refere a essa associação, devem ser destacados. Primeiro, observamos que a associação de parkinsonismo global com *MAPT* H2 se dá principalmente pela contribuição da forma bradicinética do parkinsonismo, forma esta identificada com mais frequência em idosos<sup>2</sup>. Outro aspecto observado é que a associação entre o parkinsonismo e H2 é mais significativa no momento da primeira avaliação do que naquela mais próximo ao óbito. Isto sugere que o efeito do haplótipo H2 no parkinsonismo pode diminuir ao longo do tempo. Esta observação pode ser

explicada pela influência de outros fatores que afetam esses fenômenos motores, tais como patologias cerebrais (presença de corpos de Lewy e infartos macroscópicas), idade e possivelmente mecanismos epigenéticos<sup>56,57</sup>. Dada a idade média da morte dos participantes de 88 anos, o efeito do H2 no parkinsonismo pode ser consideravelmente atenuada. O sub-haplótipo H1c, marcado pelo alelo menor do SNP rs242557, implicado no risco para taupatas (PSP e DCB)<sup>11</sup>, não estava associado ao parkinsonismo global ou qualquer outro componente motor.

Quando investigamos a expressão total de *MAPT* de 505 indivíduos, observou-se que H2 estava fortemente associado com menor expressão total *MAPT* quando comparado ao haplótipo H1. Este resultado confirma um estudo recente<sup>58</sup>, onde os autores avaliaram a associação dos haplótipos *MAPT* com os níveis de expressão total deste gene no cérebro de 202 indivíduos com o diagnóstico de doença de Alzheimer (DA) de início tardio. Neste estudo, verificou-se que o haplótipo H2 estava associado a ambos, menor nível de expressão de RNA *MAPT* e maior risco para DA de início tardio<sup>58</sup>. Observamos também, no nosso estudo, que os níveis de expressão total de *MAPT* diminui com o avançar da idade, em todas as categorias de haplótipos. Esse resultado confirma um estudo no qual observou-se uma diminuição da expressão total *MAPT* em cérebros de adultos de diferentes faixas etárias<sup>59</sup>. Quando colocados em um único modelo, idade e haplótipo *MAPT* H2 estão associados de forma independente com menor expressão total de *MAPT*.

Outro aspecto da expressão *MAPT* abordado em nosso estudo foi a associação dos principais haplótipos e dos achados motores com as seis isoformas *MAPT* expressas no cérebro humano. Observou-se que os níveis de expressão de apenas uma das



isoformas MAPT expressas (1N/4R) (Figura 6C) estava inversamente associada com os escores de parkinsonismo global e bradicinesia. Da mesma forma, descobrimos que a menor expressão de 1N/4R estava associada com haplótipo H2. Portanto, acreditamos que a associação de H2 com maiores escores de parkinsonismo também se dá por meio da menor expressão da isoforma 1N/4R. Esta isoforma apresenta a inclusão dos éxons 2 e 10 e exclui o éxon 3. Curiosamente, os dados publicados demonstraram que os indivíduos haplótipos H2 tem 2 vezes maior expressão de isoformas com segmentos codificados por exons 2 e 3<sup>15,60</sup>. Além disso, as isoformas da tau são liberados em taxas diferentes, dependendo da contribuição do terminal N e da extensão da repetição de ligação aos microtúbulos<sup>61</sup>. Deste modo, acreditamos que variações na expressão de transcritos alternativos podem desempenhar um importante papel no comprometimento motor em pessoas idosas. Importante ainda ressaltar que a maior parte dos efeitos de H2 e 1N/4R sobre bradicinesia são independentes, o que sugere que eles representam processos, em grande parte independentes, que influenciam declínio funcional relacionado com o envelhecimento. Mais uma vez, a idade avançada dos pacientes de nossa coorte pode representar um fator decisivo para essas variações e, portanto, para esta associação<sup>34,62,63</sup>.

Diferentes mecanismos poderiam explicar a biologia por trás do predomínio do fenótipo parkinsoniano em indivíduos com idade avançada e que ostentam o haplótipo H2. Em primeiro lugar, há relatos de que o ferro se acumula gradualmente no cérebro humano, tanto no envelhecimento normal quanto em processos neurodegenerativos<sup>64</sup>. Recentemente, um estudo mostrou que o acúmulo de ferro contribui para o desenvolvimento de parkinsonismo e comprometimento cognitivo em ratos com deficiência de proteína tau e idade avançada<sup>65</sup>. O acúmulo de ferro associado à perda

de tau pode levar a vulnerabilidade neuronal induzida pelo estresse oxidativo<sup>66</sup>. Como demonstrado em nosso estudo, ambos, haplótipo MAPT H2 e idade, influenciam independentemente a expressão total de RNA do gene MAPT e essa relação pode estar envolvida na fisiopatogenia da disfunção neuronal associada ao acúmulo de ferro.

Em segundo lugar, um equilíbrio adequado da regulação das isoformas tau é crítico para a viabilidade neuronal. A quantidade de isoformas com três (3R) e quatro (4R) repetições (resultado do *splicing* alternativo do éxon 10) é semelhante no córtex cerebral do adulto saudável e o *splicing* alternativo é similar em diferentes regiões do cérebro. No nosso estudo, níveis de expressão reduzidos de uma isoforma com 4 repetições (1N/4R) estava associada ao parkinsonismo. Como tau-4R tem maior afinidade pelos microtubúbulos que tau-3R e é um importante promotor da montagem destes, a expressão não equilibrada de isoformas 4R pode afetar a atividade das proteínas motoras cinesina e dineína, comprometendo o transporte celular ativo para a extremidade *minus-end* e *plus-end* dos microtúbulos, respectivamente, levando à disfunção neuronal<sup>7,31,67,68</sup>.

Em resumo, a associação entre o haplótipo H2 e maior pontuação nos escores de parkinsonismo global e principalmente bradicinesia na nossa coorte pode ser determinada pelos níveis de expressão total e do *splicing* alternativo do gene *MAPT*, e pelo nível de expressão da proteína tau mediada pela idade. Isso nos leva a especular se a região do gene *MAPT* poderia, na verdade, contribuir e até mesmo explicar a interseção fenotípica motora encontrada nas doenças neurodegenerativas relacionadas com a idade.

**PROJETOS EM ANDAMENTO:**

1. Avaliar a associação do sub-haplótipo H1c com os índices neuropatológicos e cognição. Dados disponíveis:
  - H1c está associado ao acúmulo de emaranhados neurofibrilares
  - H1c está associado a maior declínio cognitivo
  
2. Investigar a associação dos haplótipos e subhaplótipos com a doença de Parkinson.
  
3. Ampliar as análises eQTL(expression quantitative trait loci):
  - Planejamos avaliar a interação do locus MAPT com outros genes como APOE, SNCA e LRRK2 (trans-eQTL) e sua influência nas características motoras e cognitivas
  
4. Examinar a influências do splicing alternativo MAPT e índices neurpatológicos. Dados disponíveis:
  - Menor nível da isoforma 202 (1N/4R) está associada a menor acúmulo de emaranhados neurofibrilares
  - Maior nível de expressão da isoforma 002 (0N/4R) está associado ao maior acúmulo de emaranhados neurofibrilares.
  
4. Investigar o papel da epigenética no parkinsonismo em idosos e DP:
  - Metilação de DNA.

## CONCLUSÕES

1. Parkinsonismo e, principalmente, bradicinesia em indivíduos idosos estavam associados ao haplótipo MAPT H2 do gene MAPT.
2. O haplótipo H2 estava fortemente associado a menor expressão de RNA total do gene MAPT.
3. Apesar do parkinsonismo global e seus quatro components não estarem associados com a expressão total MAPT, maiores escores de bradicinesia mostraram-se associados a menor expressão da isoforma 1N/4R.
4. O haplótipo MAPT H2 também estava associado a menor expressão de 1N/4R, única isoforma associada ao parkinsonismo em idosos.
5. Quando adicionados ao mesmo modelo, a isoforma 1N/4R reduz o efeito do haplótipo H2 na bradicinesia em 16%, demonstrando que seu efeito é independente.
6. Observamos ainda que a idade estava independentemente associada a maiores escores de parkinsonismo e menor nível de expressão total MAPT.
7. Baseado em nossos resultados, sugerimos os seguintes mecanismos que podem contribuir para o surgimento de parkinsonismo, e principalmente bradicinesia, em idosos:
  - a) *Splicing* alternativo via menor expressão da isoforma 1N/4R. Desequilíbrio na expressão de isoformas tau-3R e 4R.
  - b) Presença do haplótipo H2 via menor expressão total de RNA do gene MAPT: disfunção metabólica neuronal e interação com agregados proteicos e DCV.
  - c) Avançar da idade via menor expressão total de RNA do gene MAPT: disfunção metabólica neuronal e interação com agregados proteicos e DCV.
  - d) Presença de H2 via mecanismos epigenéticos: metilação, acetilação de histonas, micro RNA.

## SUMMARY

In prior work we have shown that the Parkinson's Disease (PD) susceptibility locus *MAPT* is associated with mild parkinsonian signs in older adults without a clinical diagnosis of PD, but the biology underlying this association is unknown. Several studies have demonstrated that *MAPT* major haplotype H1 and subhaplotype H1c are associated with neurodegenerative diseases like Parkinson's Disease, Alzheimer's Disease, Progressive Supranuclear Palsy and Cortico-Basal Degeneration. Here, we refine our analysis of this important locus and assess the effect of *MAPT* haplotypes on alternative splicing and expression levels of *MAPT* to investigate the relation of transcriptomic effects to parkinsonism in older adults. We used ante-mortem and post-mortem data from participants in two clinicopathologic studies of aging, the Religious Order Study and the Memory and Aging Project. A measure of global parkinsonism and certain of its component measures such as bradykinesia, rigidity, tremor, and gait impairment were collected prospectively on an annual basis. In separate regression analyses The *MAPT* H2 haplotype was associated with lower total *MAPT* expression ( $p=1.2 \times 10^{-14}$ ) and global parkinsonism at both study entry ( $p=0.0013$ ) and proximate to death ( $p = 0.050$ ). Specifically, haplotype H2 is primarily associated with bradykinesia in both assessments ( $p=0.00034$  and  $p=0.0086$ ). These associations remained following exclusion of subjects with PD diagnosis. Subhaplotype H1c is not associated with these traits. Moreover, we found that *MAPT* total expression is associated with age and decreases linearly with advancing age ( $p=0.00006$ ). When we analysed *MAPT* alternative splicing, the expression of one isoform was inversely associated with global parkinsonism ( $p=0.0080$ ) and bradykinesia ( $p=0.0089$ ). Diminished 1N/4R isoform expression is also associated with H2 ( $p=0.0014$ ), but their effects on bradykinesia are independent

( $p_{1N4R} = 0.017$ ,  $p_{H2} = 0.12$ ). Overall, these findings suggest that both, lower expression of MAPT haplotype H2 compared with H1 and MAPT alternative splicing and age, may partially account for the association of MAPT and parkinsonism in older adults and in some extent to age-related neurodegenerative diseases.

## REFERÊNCIAS

1. Louis ED, Bennett DA. Mild Parkinsonian signs: An overview of an emerging concept. *Mov Disord.* 2007 Sep 15; 22(12): 1681-8. Review.
2. Hindle JV. Aging, neurodegeneration and Parkinson's disease. *Age Ageing.* 2010 Mar; 39(2): 156-61
3. Buchman AS, Shulman JM, Nag S, et al. Nigral pathology and parkinsonian signs in elders without Parkinson disease. *Ann Neurol.* 2012 Feb; 71(2): 258-66.
4. Buchman AS, Leurgans SE, Nag S, Bennett DA, Schneider JA. Cerebrovascular disease pathology and parkinsonian signs in old age. *Stroke.* 2011 Nov; 42(11): 3183-9.
5. Shulman JM, Yu L, Buchman AS, et al. Association of Parkinson disease risk loci with mild parkinsonian signs in older persons. *JAMA Neurol.* 2014 Apr; 71(4): 429-35
6. Majounie E, Cross W, Newsway V, et al. Variation in tau isoform expression in different brain regions and disease states. *Neurobiol Aging.* 2013 Jul; 34(7): 1922.e7-1922.e12.
7. Niblock M, Gallo JM. Tau alternative splicing in familial and sporadic tauopathies. *Biochem Soc Trans.* 2012 Aug; 40(4): 677-80
8. Höglinger GU, Melhem NM, Dickson DW, et al. Identification of common variants influencing risk of the tauopathy progressive supranuclear palsy. *Nat Genet.* 2011 Jun 19;43 (7): 699-705.
9. Rademakers R, Melquist S, Cruts M, et al. High-density SNP haplotyping suggests altered regulation of tau gene expression in progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet.* 2005 Nov 1; 14 (21): 3281-92.
10. Houlden H, Baker M, Morris HR, et al. Corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy share a common tau haplotype. *Neurology.* 2001 Jun 26; 56(12): 1702-6
11. Pittman AM, Myers AJ, Abou-Sleiman P, et al. Linkage disequilibrium fine mapping and haplotype association analysis of the tau gene in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *J Med Genet.* 2005 Nov; 42(11): 837-46
12. Vilariño-Güell C, Soto-Ortolaza AI, Rajput A, et al. *MAPT* H1 haplotype is a risk

factor for essential tremor and multiple system atrophy. *Neurology*. 2011 Feb 15;76(7): 670-2

13. Zabetian CP, Hutter CM, Factor SA, et al. Association analysis of *MAPT* H1 haplotype and subhaplotypes in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2007 Aug; 62(2): 137-44.

14. Skipper L, Wilkes K, Toft M, et al. Linkage disequilibrium and association of *MAPT* H1 in Parkinson disease. *Am J Hum Genet*. 2004 Oct; 75(4): 669-77

15. Trabzuni D, Wray S, Vandrovcova J, et al. *MAPT* expression and splicing is differentially regulated by brain region: relation to genotype and implication for tauopathies. *Hum Mol Genet*. 2012 Sep 15;21(18):4094-103.

16. Stacy M, Jankovic J. Differential diagnosis of Parkinson's disease and the Parkinsonism plus syndromes. *Neurol Clin* 1992;10:341-359.

17. Hughes AJ, Daniel SE, Ben-Shlomo Y, Lees AJ. The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorders service. *Brain* 2002;125:861-870.

18. Louis ED, Schupf N, Marder K, Tang MX. Functional correlates of mild Parkinsonian signs in the community-dwelling elderly: poor balance and inability to ambulate independently. *Mov Disord* 2006;21:411-416

19. Louis ED, Tang MX, Schupf N, Mayeux R. Functional correlates and prevalence of mild parkinsonian signs in a community population of older people. *Arch Neurol* 2005;62:297-302.

20. Baloh RW, Ying SH, Jacobson KM. A longitudinal study of gait and balance dysfunction in normal older people. *Arch Neurol* 2003;60:835-839

21. Newman RP, LeWitt PA, Jaffe M, Calne DB, Larsen TA. Motor function in the normal aging population: treatment with levodopa. *Neurology* 1985;35:571-573

22. Rajput AH, Rozdilsky B, Ang L. Occurrence of resting tremor in Parkinson's disease. *Neurology* 1991;41:1298-1299

23. Louis ED, Luchsinger JA, Tang M-X, Mayeux R. Parkinsonian signs in older people: prevalence and associations with smoking and coffee consumption. *Neurology* 2003;61:24-28.

24. Bennett DA, Beckett LA, Murray AM, et al. Prevalence of parkinsonian signs and associated mortality in a community population of older people. *N Eng J Med*



1996;334:71-76.

25. Louis ED, Tang M-X, Mayeux R. Parkinsonian signs in older people in a community-based study: risk of incident dementia. *Arch Neurol* 2004;61:1273-1276

26. Mitchell SL, Rockwood K. The association between parkinsonism, Alzheimer's disease, and mortality: a comprehensive approach. *J Am Geriatr Soc* 2000;48:422-425

27. Buchman AS<sup>1</sup>, Nag S, Shulman JM, Lim AS, VanderHorst VG, Leurgans SE, Schneider JA, Bennett DA. Locus coeruleus neuron density and parkinsonism in older adults without Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2012 Nov;27(13):1625-31.

28. Darbin O. The aging striatal dopamine function. *Parkinsonism Relat Disord*. 2012 Jun;18(5):426-32.

29. Pittman AM<sup>1</sup>, Fung HC, de Silva R. Untangling the tau gene association with neurodegenerative disorders. *Hum Mol Genet*. 2006 Oct 15;15 Spec No 2:R188-95.

30. Vandrovcova J<sup>1</sup>, Anaya F, Kay V, Lees A, Hardy J, de Silva R. Disentangling the role of the tau gene locus in sporadic tauopathies. *Curr Alzheimer Res*. 2010 Dec;7(8):726-34.

31. Tau pathology and neurodegeneration. Spillantini MG, Goedert M. *Lancet Neurol*. 2013 Jun;12(6):609-22.

32. Zhong Q<sup>1</sup>, Congdon EE, Nagaraja HN, Kuret J. Tau isoform composition influences rate and extent of filament formation. *J Biol Chem*. 2012 Jun 8;287(24):20711-9.

33. Steinberg KM<sup>1</sup>, Antonacci F, Sudmant PH, Kidd JM, Campbell CD, Vives L, Malig M, Scheinfeldt L, Beggs W, Ibrahim M, Lema G, Nyambo TB, Omar SA, Bodo JM, Froment A, Donnelly MP, Kidd KK, Tishkoff SA, Eichler EE. Structural diversity and African origin of the 17q21.31 inversion polymorphism. *Nat Genet*. 2012 Jul 1;44(8):872-80.

34. Myers AJ, Pittman AM, Zhao AS, et al. The *MAPT* H1c risk haplotype is associated with increased expression of tau and especially of 4 repeat containing transcripts. *Neurobiol Dis*. 2007 Mar;25(3):561-70

35. Myers AJ, Kaleem M, Marlowe L, Pittman AM, Lees AJ, FungHC, et al. The H1c haplotype at the *MAPT* locus is associated with Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*. 2005 14: 2399-404.

36. Mukherjee O, Kauwe JS, Mayo K, Morris JC, Goate AM. Haplotype-based association analysis of the MAPT locus in late onset Alzheimer's disease. *BMC Genet.* 2007; 8: 3.
37. Simon-Sanchez J, Schulte C, Bras JM, Sharma M, Gibbs JR, Berg D, et al. Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet.* 2009; 41: 1308-12.
38. Baba Y, Tsuboi Y, Baker MC, Uitti RJ, Hutton ML, Dickson DW, et al. The effect of tau genotype on clinical features in FTDP-17. *Parkinsonism Relat Disord.* 2005; 11: 205-8.
39. Sundar PD, Yu CE, Sieh W, Steinbart E, Garruto RM, Oyanagi K, et al. Two sites in the MAPT region confer genetic risk for Guam ALS/PDC and dementia. *Hum Mol Genet.* 2007; 16: 295-306.
40. Bennett DA, Schneider JA, Arvanitakis Z, Wilson RS. Overview and findings from the religious orders study. *Curr Alzheimer Res.* 2012 Jul; 9(6): 628-45.
41. Bennett DA, Schneider JA, Buchman AS, Barnes LL, Boyle PA, Wilson RS. Overview and findings from the rush Memory and Aging Project. *Curr Alzheimer Res.* 2012 Jul; 9(6): 646-63.
42. Bennett DA, Shannon KM, Beckett LA, Wilson RS. Dimensionality of parkinsonian signs in aging and Alzheimer's disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 1999 Apr; 54(4):M191-6.
43. Ross GW, Petrovitch H, Abbott RD, et al. Parkinsonian signs and substantia nigra neuron density in decedents elders without PD. *Ann Neurol.* 2004; 56(4):532-9.
44. Dickson D, Fujishiro H, DelleDonne A, et al. Evidence that incidental Lewy body disease is presymptomatic Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica.* 2008; 115(4):437-44.
45. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2003 Mar-Apr; 24(2): 197-211
46. Schneider JA, Li JL, Li Y, Wilson RS, Kordower JH, Bennett DA. Substantia nigra tangles are related to gait impairment in older persons. *Ann Neurol.* 2006 Jan; 59(1): 166-73.
47. Bennett DA, Wilson RS, Schneider JA, et al. Apolipoprotein E epsilon4 allele,

AD pathology, and the clinical expression of Alzheimer's disease. *Neurology*. 2003 Jan 28; 60(2): 246-52.

48. Buchman ASA, Leurgans SES, Nag SS, Bennett DAD, Schneider JAJ. Cerebrovascular disease pathology and parkinsonian signs in old age. *Stroke*. 2011;42(11):3183–3189.

49. Corneveaux JJ, Myers AJ, Allen AN, et al. Association of CR1, CLU and PICALM with Alzheimer's disease in a cohort of clinically characterized and neuropathologically verified individuals. *Hum Mol Genet*. 2010 Aug 15; 19(16): 3295-301.

50. Association of the *MAPT* locus with Parkinson's disease. Wider C, Vilariño-Güell C, Jasinska-Myga B, et al. *Eur J Neurol*. 2010 Mar;17(3):483-6

51. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, et al. *BMC Mol Biol*. 2006 Jan 31;7:3.

52. Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*. 2009 May 1;25(9):1105-11

53. Caffrey TM, Wade-Martins R. The role of *MAPT* sequence variation in mechanisms of disease susceptibility. *Biochem Soc Trans*. 2012 Aug;40(4):687-92

54. Louis ED, Schupf N, Manly J, Marder K, Tang MX, Mayeux R. Association between mild parkinsonian signs and mild cognitive impairment in a community. *Neurology*. 2005 Apr 12;64(7):1157-61.

55. Uemura Y, Wada-Isoe K, Nakashita S, Nakashima K. Depression and cognitive impairment in patients with mild parkinsonian signs. *Acta Neurol Scand*. 2013 Sep;128(3):153-9.

56. Iwata A, Nagata K, Hatsuta H, et al. Altered CpG methylation in sporadic Alzheimer's disease is associated with APP and *MAPT* dysregulation. *Hum Mol Genet*. 2014 Feb 1;23(3):648-56

57. Coupland KG, Mellick GD, Silburn PA, et al. DNA methylation of the *MAPT* gene in Parkinson's disease cohorts and modulation by vitamin E *In Vitro. Mov Disord*. 2013 Dec 27.

58. Allen M, Kachadoorian M, Quicksall Z, et al. Association of *MAPT* haplotypes with Alzheimer's disease risk and *MAPT* brain gene expression levels. 2014, In press.

59. Hayesmoore JB, Bray NJ, Cross WC, Owen MJ, O'Donovan MC, Morris HR. The effect of age and the H1c *MAPT* haplotype on *MAPT* expression in human brain. *Neurobiol Aging*. 2009 Oct;30(10):1652-6
60. Caffrey TM, Joachim C, Wade-Martins R. Haplotype-specific expression of the N-terminal exons 2 and 3 at the human *MAPT* locus. *Neurobiol Aging*. 2008 Dec;29(12):1923-9.
61. Karch CM, Jeng AT, Goate AM. Extracellular Tau levels are influenced by variability in Tau that is associated with tauopathies. *J Biol Chem*. 2012 Dec 14;287(51):42751-62.
62. Caffrey TM, Joachim C, Paracchini S, Esiri MM, Wade-Martins R. Haplotype-specific expression of exon 10 at the human *MAPT* locus. *Hum Mol Genet*. 2006 Dec 15;15(24):3529-37
63. 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 Sep;46(3):325-32.
64. Salvador GA. Iron in neuronal function and dysfunction. *Biofactors*. 2010 Mar-Apr;36(2):103-10.
65. Lei P, Ayton S, Finkelstein DI, et al. Tau deficiency induces parkinsonism with dementia by impairing APP-mediated iron export. *Nat Med*. 2012 Jan 29;18(2):291-5.
66. Zecca L, Youdim MB, Riederer P, Connor JR, Crichton RR. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2004 Nov;5(11):863-73
67. Dixit R, Ross JL, Goldman YE, Holzbaur EL. Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science*. 2008 Feb 22;319(5866):1086-9.
68. Vershinin M, Carter BC, Razafsky DS, King SJ, Gross SP. Multiple-motor based transport and its regulation by Tau. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jan 2;104(1):87-92.

## **The role of *MAPT* haplotype H2 and isoform 1N/4R in Parkinsonism of older adults**

Guilherme T. Valenca, MD<sup>1,2,3,5</sup>, Gyan P. Srivastava, PhD<sup>3,5</sup>, Jamary Oliveira-Filho MD, MS, PhD<sup>2</sup>, Charles C. White, PhD<sup>3,4,5</sup>, Lei Yu, PhD<sup>6</sup>, Julie A. Schneider, MD<sup>6</sup>, Aron S. Buchman, MD<sup>6</sup>, Joshua M. Shulman MD, PhD<sup>7,8</sup>, David A. Bennett, MD<sup>6</sup>, Philip L. De Jager, MD, PhD<sup>3,4,5</sup>

1. Movement Disorders Clinic, Roberto Santos General Hospital – Secretary of Health of State of Bahia, Brazil
2. Post-Graduate Program in Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, BA, Brazil
3. Program in Translational Neuropsychiatric Genomics, Departments of Neurology & Psychiatry, Brigham and Women’s Hospital
4. Harvard Medical School
5. Program in Medical and Population Genetics, Broad Institute
6. Rush Alzheimer’s Disease Center, Rush University Medical Center
7. Departments of Neurology, Molecular and Human Genetics, and Neuroscience, and Program in Developmental Biology, Baylor College of Medicine, Houston, TX
8. Jan and Dan Duncan Neurological Research Institute, Texas Children’s Hospital, Houston, TX

**Word count:** 2,713 (Not including abstract, acknowledgement or references).

**Authors’ Contribution:** all authors have participated actively in this project, and all have seen and approved the final version of the paper.

**Conflict of Interest:** none of the authors has any direct or indirect conflicts of interest, financial or otherwise, relating to the subject of our report.

### **Corresponding Author:**

Philip L. De Jager, MD, PhD  
Department of Neurology, Brigham and Women’s Hospital  
77 Avenue Louis Pasteur, NRB 168C  
Boston, MA 02115  
Phone: 617 525-4529  
Fax: 617 525-5333  
Email: pdejager@partners.org

## ABSTRACT

**Importance:** In prior work we have shown that the Parkinson's disease susceptibility locus *MAPT* is associated with mild parkinsonian signs in older adults without a clinical diagnosis of PD. However, the molecular mechanism underlying this association is unknown.

**Objective:** We investigate the relationship between parkinsonism and *MAPT* transcripts in older adults by assessing the effect of *MAPT* haplotypes on alternative splicing and expression levels of the most common isoforms.

**Design:** *MAPT* haplotypes, H1 and H2, subhaplotype H1c and RNA isoforms were examined in two cohorts of older individuals.

**Setting:** Two prospective clinicopathologic studies of aging, the Religious Order Study (ROS) and the Rush Memory and Aging Project (MAP).

**Participants:** For haplotype analysis, we evaluated 976 subjects with clinical, genotyping and brain pathology data. For transcript analysis, we obtained *MAPT* gene and isoform-level expression from the dorsolateral prefrontal cortex for 505 of these subjects.

**Main outcome measures:** Using regression analysis, controlling for age, sex, study and neuropathology, we investigated the association of *MAPT* haplotypes and expression levels with global parkinsonism and specific parkinsonian signs.

**Results:** The *MAPT* H2 haplotype was associated with lower total *MAPT* expression ( $p=1.2 \times 10^{-14}$ ) and global parkinsonism at both study entry ( $p=0.0013$ ) and proximate to death ( $p = 0.050$ ). Specifically, haplotype H2 is primarily associated with bradykinesia in both assessments ( $p=0.00034$  and  $p=0.0086$ ). These associations remained following exclusion of subjects with PD diagnosis. Subhaplotype H1c is not associated with these traits. Moreover, we found that *MAPT* total expression is

associated with age and decreases linearly with advancing age ( $p=0.00006$ ). When we analysed *MAPT* alternative splicing, the expression of one isoform was inversely associated with global parkinsonism ( $p=0.0080$ ) and bradykinesia ( $p=0.0089$ ). Diminished 1N/4R isoform expression is also associated with H2 ( $p=0.0014$ ), but their effects on bradykinesia are independent ( $p_{1N4R} = 0.017$ ,  $p_{H2} = 0.12$ ).

**Conclusions and Relevance:** Overall, our results suggest that age and H2 are associated with higher parkinsonism score and decreased total *MAPT* RNA expression. Additionally, we found that H2 is associated with altered expression levels of specific isoforms. These findings may contribute to the understanding of the association between *MAPT* locus and parkinsonism in elderly subjects.

## INTRODUCTION

Parkinsonian signs, characterized by bradykinesia, rigidity, tremor and gait disturbance, are common in older individuals<sup>1</sup> and are associated with functional impairment, higher risk of cognitive decline, dementia and mortality<sup>2</sup>. Recently, several reports demonstrated an association between pathology in brainstem nuclei and cerebrovascular lesions with mild parkinsonism<sup>3,4</sup>. In previous work, we have shown that the Parkinson's disease (PD) susceptibility locus *MAPT* is associated with mild parkinsonism in older adults without a clinical diagnosis of PD, but the biological mechanism underlying this association is unknown<sup>5</sup>. The *MAPT* gene lies on chromosome 17q21, and its encoded protein Tau is involved in microtubule stability and interaction with the cytoskeleton<sup>6</sup>. Six isoforms of this protein, resulting from alternative splicing of exons 2, 3 and 10, are expressed in the adult human brain<sup>7</sup>. In the region containing *MAPT*, a single nucleotide polymorphism (SNP) tags the two major haplotype clades, termed H1 and H2, which are defined by a large inversion containing *MAPT* as well as several other genes. Many studies in the past decade have shown that this locus affects disease risk: H1 and its sub haplotype H1c are reported to be associated with increased risk for certain age-related neurodegenerative diseases, including PSP<sup>8,9,10,11</sup>, CBD<sup>10,11</sup>, Multiple System Atrophy (MSA)<sup>12</sup> and PD<sup>13,14</sup>. These nosological entities also share a clinical spectrum ranging from parkinsonism to dementia. Moreover, *MAPT* alternative splicing and expression have been shown to be important in neuropathological processes<sup>6,15</sup>. Our study refines the role of this locus in age-related parkinsonism and examines the hypothesis that the role of the *MAPT* haplotypes in age-related parkinsonism in older adults from the Religious Orders Study<sup>16</sup> and Rush Memory Aging Project (MAP)<sup>17</sup> may be mediated, in part, by alternative splicing. Exploring the pathophysiology of



mild parkinsonism in older individuals can lead us to a better understanding of motor phenotypes in age-related neurodegenerative diseases.

## **METHODS**

### ***Subjects selection from Cohort***

All of the samples used in this project are from autopsied brains obtained from participants in two longitudinal studies of aging, the Religious Orders Study (ROS)<sup>16</sup>, started in 1994, and Rush Memory and Aging Project (MAP)<sup>17</sup>, started in 1997. Both studies were approved by the Institutional Review Board of Rush University Medical Center. All subjects were older and free of known dementia at the time of enrollment and were followed annually with detailed clinical evaluations with a signed informed consent and an Anatomical Gift Act for brain donation. In total, over 3,000 participants have enrolled and 1,200 autopsied to date. Of these, 976 brains were available for the present study.

### ***Genotyping***

DNA was extracted from whole blood, lymphocytes, or frozen postmortem brain tissue. Genotyping was done in three subsets. Genotyping of the first two sets of samples were generated using Affymetrix GeneChip 6.0 platform in 2009 at the Broad Institute's Center for Genotyping, and the third set of samples were genotyped on the Illumina HumanOmniExpress platform in 2012 at the Children's Hospital of Philadelphia. All three datasets were processed through the same quality control analysis and imputation pipeline that has been published in detail previously<sup>5,18</sup>. In this study, we investigated the two major *MAPT* locus haplotypes by tagging the H1 haplotype and H2 haplotype with the major allele and minor allele of rs1052553 (MAF=0.20), respectively. The subhaplotype H1c was tagged with the minor allele of

SNP rs242557 (MAF=0.38)<sup>19</sup>.

### ***MAPT gene total expression and Isoforms-level expression using RNA-seq data***

RNA-seq data was generated using postmortem brain tissue (dorsolateral prefrontal cortex) from ROS/MAP subjects. The RNA was extracted from the tissue after the quality control evaluation based on RNA Integrity Number (RIN score)<sup>20</sup>. The library was sequenced using Illumina Hi-Seq with 101bp reads with 4-plex pooling. All the paired-end reads were mapped using TopHat software<sup>21</sup> using the human genome transcriptomic database from Ensemble (<http://www.ensembl.org>). The Fragment Per Kilobase Per Million (FPKM) was calculated for each isoform of each gene from the human genome. These FPKM values were regarded as expression quantity for each gene and its isoform for further analysis.

### ***Clinical and pathological outcome measures***

The parkinsonian symptoms measurements were performed annually using a 26-items modified version of the motor section of the Unified Parkinson Disease Rating Scale (mUPDRS). Four previously established parkinsonian sign scores (bradykinesia, rigidity, tremor, and gait impairment) were derived from these 26 items, and a summary global parkinsonism score was constructed by averaging these 4 scores, as previously described (3). We analyzed the first and last measurements of these scores as separate continuous outcomes in multivariable models, but focused primarily on the last measurement because it was taken closest to the time of autopsy.

Postmortem assessment for Lewy bodies, neurofibrillary tangles, neuritic plaque and macro-microscopic cerebral infarcts were collected as detailed in prior publications<sup>4,</sup>

22, 23, 24

### ***Statistical Analysis***

In models linking parkinsonism, and its elemental motor traits, with the *MAPT*

haplotype and *MAPT* expression, parkinsonian outcomes (global parkinsonism, bradykinesia and gait impairment) were skewed to the right and square root transformations were applied prior to the analysis. Similarly, neuritic plaques and neurofibrillary tangles were square root transformed. We dichotomized the measurements of rigidity and tremor due to a excess of 0 values, where non-zero values were represented as one and 0 values were represented as 0 in order to increase the signal to noise ratio. In the analysis of *MAPT* expression, we used number of Fragments Per Kilobase of transcripts per Million mapped reads (FPKM values) to quantify the expression of each isoform and aggregated these FPKM values in order to quantify total gene expression. We summarize continuous variables with means and standard deviations, and dichotomous variables with percentages, for the analyzed population in Table 1.

### ***Analysis***

We applied linear regression for continuous outcomes (bradykinesia, gait and global parkinsonism), and logistic regression models for tremor and rigidity. All models testing for associations with parkinsonism were adjusted for pertinent covariates, including age, sex, study (ROS or MAP) and various brain pathologies, if available at time of measure, including Lewy body (presence or absence), microinfarct (presence or absence), macroinfarct (presence or absence), neuritic plaque and neurofibrillary tangles. In analysis testing association between haplotype and expression, age, sex, cohort and neuropathology were included as covariates in the models. Analyses were done using the base stats package in R version 3.1 ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)).

## **RESULTS**

For the analysis of haplotypes in relation to parkinsonism, a total of 976 subjects with

non-missing genotype and phenotype data were evaluated. A subset of 505 of these subjects also had *MAPT* RNA sequencing data available (51.7%) (Table 1). Allele and genotype frequencies for *MAPT* rs1052553 and rs242557 are shown in eTable 1. The rs1052553 SNP tags the *MAPT* H1/H2 haplotypes, and the rs242557 SNP tags the *MAPT* H1c subhaplotype. As expected, advancing age is strongly associated with worsening motor traits (global parkinsonism:  $b = 0.040$ ,  $p=2.8 \times 10^{-8}$  in eTable2).

### **Association of *MAPT* haplotypes with parkinsonism and its four comprising components**

Using an additive model, we examined the association between the two major *MAPT* haplotypes and global parkinsonism as well as its four component motor domains: bradykinesia, gait impairment, tremor and rigidity, which are measured at both at baseline and annually thereafter (Table 2)(Figure 1). In our data, we observed an association of the *MAPT* H2 haplotype with greater global parkinsonism and its component measures of bradykinesia and gait, but not rigidity or tremor, at the baseline measurement of each subject. This is consistent with our prior analysis in a subset of these subjects<sup>5</sup>. By contrast, the *MAPT* H1c haplotype is not associated with global parkinsonism or its component measures. The association between the H2 haplotype and gait is no longer detected when considering parkinsonian motor domains at the last evaluation proximate to death (Table 2)(Figure 1), accounting for brain pathology. These associations remained following exclusion of subjects with a PD diagnosis: global parkinsonism,  $p=0.0006$  at baseline at baseline adjusting for age, sex, study, and  $p=0.064$  proximate to death adjusting for age at death, sex, study and path; bradykinesia,  $p=0.0002$  at baseline at baseline adjusting for age, sex, study, and  $p=0.019$  proximate to death adjusting for age at death, sex, study and path. In older age, other neuropathologies can also influence parkinsonian signs in this cohort,

including macroscopic infarcts ( $b=0.415$ ,  $p=0.000012$ ) and Lewy bodies ( $b=0.27$ ,  $p=0.0094$ ) (eTable 2). Once these confounding effects are accounted for in the model, an association with global parkinsonism is seen at the last evaluation and appears to be driven primarily by an effect on bradykinesia (Table 2) ( $p=0.0086$ ). These intriguing results suggest that the effect of the H2 haplotype on bradykinesia may be more pronounced earlier in life and that this effect is obscured in later life by the accumulation of neurological insults to the brain such as cerebral infarcts and Lewy bodies.

### **Association of age, parkinsonian signs and the H1 and H2 haplotypes with total *MAPT* gene brain expression**

In order to gain insight into the association between the *MAPT* haplotypes and parkinsonian signs, we further analyzed the relationships between the haplotypes, *MAPT* RNA expression, and parkinsonian phenotypes. First, we found that *MAPT* total expression is strongly influenced by age ( $p=0.00011$  age, sex, study and H2 only;  $p=0.000060$  adjusting for age, sex, study, H2 + path), decreasing linearly with advancing age in all *MAPT* haplotype categories (eFigure 1a). In the analysis testing for evidence of association between haplotypes and total *MAPT* expression, age, sex, study and neuropathologies were included as covariates in the models. Our results show that rs1052553, the tag SNP differentiating the H1/H2 haplotypes, strongly influences *MAPT* total expression: as shown in Figure 2a, the H2 haplotype is strongly associated with lower *MAPT* total expression relative to the H1 haplotype ( $p=1.2 \times 10^{-14}$  adjusted for age, sex, and path). Although we observed that the global parkinsonism, bradykinesia and gait disturbance scores increase with decreasing *MAPT* gene total expression, the association between them was not significant (eFigure 2a).

### ***MAPT* H2 haplotype, motor traits and *MAPT* isoform level analysis**

Since the literature suggests that altered levels or ratios of *MAPT* RNA isoforms play a role in the susceptibility of age-related neurodegenerative diseases associated with motor impairment<sup>26</sup>, we also analysed the relationship between isoform levels to parkinsonism and *MAPT* haplotypes. Six different isoforms of *MAPT* are available in our RNA sequencing data. Adjusting for age, sex and brain pathology, we found that the level of the 1N/4R *MAPT* isoform was inversely associated with global parkinsonism ( $b=-0.0173$ ;  $p=0.0080$ , adjusted for age, sex, study + path), bradykinesia ( $b=-0.0281$ ;  $p=0.0089$ , adjusted for age, sex, study + path) and gait impairment ( $b=-0.019$ ;  $p = 0.039$ ) at the last visit prior to death. (eFigure 2b). After further adjusting for *MAPT* total level of expression, this isoform remained associated with global parkinsonism ( $b=-0.0165$ ,  $p=0.012$ , adjusted for age, sex, study and pathology) and bradykinesia ( $b=-0.0276$ ,  $p=0.011$ , adjusted for age, sex, study and pathology) (eFigure 3). None of the other *MAPT* common isoforms expressed in the brain showed association with parkinsonian signs in a model controlling for total expression level and brain pathologies.

We next investigated the relation of the *MAPT* haplotypes to the level of this RNA isoform. Interestingly, H2 haplotype was associated with lower expression of the 1N/4R isoform ( $p=0.00046$  adjusting for age, sex and study;  $p=0.0014$  with pathology) (Figure 2b). In addition, age was not associated with the *MAPT* 1N4R ( $p=0.58$ )(e Figure 1b).

Finally, we assessed whether the *MAPT* RNA 1N/4R isoform expression mediated the effect of the H2 haplotype on the clinical trait that is most strongly associated with it, bradykinesia. In this analysis, a reduction of effect size by  $>10\%$  is taken as evidence of mediation. Here, we see that inclusion of the 1N/4R isoform in the analytic model

diminishes the  $b$  for the H2 haplotype in relation to bradykinesia by 16%, suggesting that it may mediate, in part, the effect of the H2 haplotype on bradykinesia. We note that the effect of 1N/4R isoform is reduced when total MAPT gene expression is added to the model ( $b$  decreases 3% with 1N/4R). Thus, while the effects on MAPT expression and splicing may mediate part of the H2 effect, most of the effects of H2 and 1N/4R on bradykinesia are independent, suggesting that they represent largely independent processes that influence aging-related functional decline.

## DISCUSSION

Parkinsonism, characterized by bradykinesia, rigidity, tremor, gait and balance problems, can commonly be identified during clinical examination of older individuals without prior diagnosis of neurological conditions<sup>1</sup>. These motor features are associated with mild cognitive impairment, increased risk of dementia, PD, depressive symptoms, and cerebrovascular lesions<sup>27</sup>. They are also a significant predictor of mortality<sup>4,28</sup>. Recently, we have identified two genetic variants implicated in PD susceptibility as risk factors for age-related motor impairment; one of these resides in the *MAPT* locus<sup>5</sup>.

Multiple studies have reported the role of haplotype H1 and subhaplotype H1c as risk factors for age-related neurodegenerative diseases that share parkinsonian phenotypes, such as PD, MSA, PSP and CBD<sup>8-14</sup>. By contrast, in our cohorts, we observed a significant positive correlation between *MAPT* H2 haplotype and global parkinsonism. In fact, it is the bradykinetic sign of parkinsonism, which is commonly seen in older individuals<sup>2</sup>, that drives the association of parkinsonism with *MAPT* H2. We also found that the association between parkinsonism and H2 is stronger in our baseline measurements than in the measurement taken closest to death. This implies

that H2 drives parkinsonism at a younger age and that its effect may wane over time. This observation also may be explained in part by the effect of other factors affecting the same trait, such as other neuropathologies (e.g., the presence of Lewy bodies and macroscopic infarcts), age and possibly epigenetic mechanisms<sup>29,30</sup>. Given that the mean age at death of our subjects is 88, the effect of H2 on parkinsonism might be significantly attenuated by the increasing prevalence of these other pathologies. The subhaplotype H1c, tagged by the snp rs242557, which is implicated in tauopathy risk<sup>11</sup>, was not associated with any of the parkinsonian signs.

When we investigated the expression of total *MAPT* in 505 individuals, we observed that H2 was strongly associated with lower total *MAPT* expression compared when compared to H1. This result confirms a recent study<sup>31</sup> where the authors evaluated the association of *MAPT* haplotypes with brain *MAPT* gene expression levels in 202 late onset Alzheimer's disease individuals. It was found that the H2 haplotype was associated with both lower *MAPT* RNA brain expression at the gene level and late onset AD risk<sup>31</sup>. We also observed that total *MAPT* brain expression decreases with age in each haplotype category. In fact, the decrease of total *MAPT* gene expression with advancing age has been described previously<sup>32</sup>. When placed in a single model, both age and the *MAPT* H2 haplotype are independently associated with lower total *MAPT* expression.

Another aspect of *MAPT* expression addressed in our study was the association of major haplotypes and parkinsonism signs with the six common *MAPT* isoforms. We observed that the levels of expression of only one of the *MAPT* isoforms expressed in the human brain were significantly associated with global parkinsonism and bradykinesia scores. Whilst 1N/4R isoform was inversely associated with motor findings, we found that H2 haplotype was associated with increased scores of global



parkinsonism and bradykinesia, and lower expression of the transcript 1N/4R; therefore, the association of H2 on isoform expression results in competing effects on motor components. In addition, the mediation model suggests that the isoform and H2 haplotype influence these motor traits largely independently of one another.

Interestingly, published data report that H2 haplotype subjects have 2-fold greater expression of isoforms with segments encoded by exons 2 and 3<sup>15,33</sup>. Furthermore, Tau isoforms are released at differing rates depending on the contribution of the N terminus and microtubule binding repeat length<sup>34</sup>. This imbalanced expression of alternative transcripts is critical for neuronal function and may play a role in motor impairment in older people. Again, the advanced age of the subjects in our cohort could be a decisive factor for this imbalance and hence for this association<sup>35,36</sup>.

In summary, the association our results begin to dissect the complex interplay of different risk factors related to the *MAPT* locus in its influence of aging-related parkinsonism, mainly through an effect that is manifested clinically as bradykinesia.

In addition, we describe the relation of *MAPT* isoform expression in the frontal cortex in relation to the H1 and H2 haplotypes, providing additional data for understanding the role of this important locus in other neurologic diseases.

**ACKNOWLEDGEMENT**

The authors thank the participants in the Rush Memory and Aging Project and Religious Order

Study. This work is supported by NIH grants R01AG036836, R01AG015819, K08AG034290, R01NS078009. JMS is additionally supported by a Career Award for Medical Scientists from the Burroughs Wellcome Fund. This work was also supported by CAPES Foundation (Brazil Ministry of Education) research scholarships proc n<sup>o</sup>: BEX 7281/13-7 awarded to GTV and BEX 18178/12-0 awarded to JOF.

**CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare that they have no conflict of interest.

**REFERENCES**

1. Louis ED, Bennett DA. Mild Parkinsonian signs: An overview of an emerging concept. *Mov Disord*. 2007 Sep 15; 22(12): 1681-8. Review.
2. Hindle JV. Aging, neurodegeneration and Parkinson's disease. *Age Ageing*. 2010 Mar; 39(2): 156-61
3. Buchman AS, Shulman JM, Nag S, et al. Nigral pathology and parkinsonian signs in elders without Parkinson disease. *Ann Neurol*. 2012 Feb; 71(2): 258-66.
4. Buchman AS, Leurgans SE, Nag S, Bennett DA, Schneider JA. Cerebrovascular disease pathology and parkinsonian signs in old age. *Stroke*. 2011 Nov; 42(11): 3183-9.
5. Shulman JM, Yu L, Buchman AS, et al. Association of Parkinson disease risk loci with mild parkinsonian signs in older persons. *JAMA Neurol*. 2014 Apr; 71(4): 429-35
6. Majounie E, Cross W, Newsday V, et al. Variation in tau isoform expression in different brain regions and disease states. *Neurobiol Aging*. 2013 Jul; 34(7): 1922.e7-1922.e12.
7. Niblock M, Gallo JM. Tau alternative splicing in familial and sporadic tauopathies. *Biochem Soc Trans*. 2012 Aug; 40(4): 677-80
8. Höglinger GU, Melhem NM, Dickson DW, et al. Identification of common variants influencing risk of the tauopathy progressive supranuclear palsy. *Nat Genet*. 2011 Jun 19;43 (7): 699-705.
9. Rademakers R, Melquist S, Cruts M, et al. High-density SNP haplotyping suggests altered regulation of tau gene expression in progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet*. 2005 Nov 1; 14 (21): 3281-92.
10. Houlden H, Baker M, Morris HR, et al. Corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy share a common tau haplotype. *Neurology*. 2001 Jun 26; 56(12): 1702-6
11. Pittman AM, Myers AJ, Abou-Sleiman P, et al. Linkage disequilibrium fine mapping and haplotype association analysis of the tau gene in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *J Med Genet*. 2005 Nov; 42(11): 837-46
12. Vilariño-Güell C, Soto-Ortolaza AI, Rajput A, et al. *MAPT* H1 haplotype is a risk factor for essential tremor and multiple system atrophy. *Neurology*. 2011 Feb 15;76 (7): 670-2
13. Zabetian CP, Hutter CM, Factor SA, et al. Association analysis of *MAPT* H1 haplotype and subhaplotypes in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2007 Aug; 62(2): 137-44.

14. Skipper L, Wilkes K, Toft M, et al. Linkage disequilibrium and association of *MAPT* H1 in Parkinson disease. *Am J Hum Genet.* 2004 Oct; 75(4): 669-77
15. Tratzuni D, Wray S, Vandrovcova J, et al. *MAPT* expression and splicing is differentially regulated by brain region: relation to genotype and implication for tauopathies. *Hum Mol Genet.* 2012 Sep 15;21(18):4094-103.
16. Bennett DA, Schneider JA, Arvanitakis Z, Wilson RS. Overview and findings from the religious orders study. *Curr Alzheimer Res.* 2012 Jul; 9(6): 628-45.
17. Bennett DA, Schneider JA, Buchman AS, Barnes LL, Boyle PA, Wilson RS. Overview and findings from the rush Memory and Aging Project. *Curr Alzheimer Res.* 2012 Jul; 9(6): 646-63.
18. Corneveaux JJ, Myers AJ, Allen AN, et al. Association of CR1, CLU and PICALM with Alzheimer's disease in a cohort of clinically characterized and neuropathologically verified individuals. *Hum Mol Genet.* 2010 Aug 15; 19(16): 3295-301.
19. Association of the *MAPT* locus with Parkinson's disease. Wider C, Vilariño-Güell C, Jasinska-Myga B, et al. *Eur J Neurol.* 2010 Mar;17(3):483-6
20. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, et al. *BMC Mol Biol.* 2006 Jan 31;7:3.
21. Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics.* 2009 May 1;25(9):1105-11
22. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2003 Mar-Apr; 24(2): 197-211
23. Schneider JA, Li JL, Li Y, Wilson RS, Kordower JH, Bennett DA. Substantia nigra tangles are related to gait impairment in older persons. *Ann Neurol.* 2006 Jan; 59(1): 166-73.
24. Bennett DA, Wilson RS, Schneider JA, et al. Apolipoprotein E epsilon4 allele, AD pathology, and the clinical expression of Alzheimer's disease. *Neurology.* 2003 Jan 28; 60(2): 246-52.
25. Caffrey TM, Wade-Martins R. The role of *MAPT* sequence variation in mechanisms of disease susceptibility. *Biochem Soc Trans.* 2012 Aug;40(4):687-92
26. Louis ED, Schupf N, Manly J, Marder K, Tang MX, Mayeux R. Association between mild parkinsonian signs and mild cognitive impairment in a community. *Neurology.* 2005 Apr 12;64(7):1157-61.
27. Uemura Y, Wada-Isoe K, Nakashita S, Nakashima K. Depression and cognitive

- impairment in patients with mild parkinsonian signs. *Acta Neurol Scand.* 2013 Sep;128(3):153-9.
28. Iwata A, Nagata K, Hatsuta H, et al. Altered CpG methylation in sporadic Alzheimer's disease is associated with APP and *MAPT* dysregulation. *Hum Mol Genet.* 2014 Feb 1;23(3):648-56
29. Coupland KG, Mellick GD, Silburn PA, et al. DNA methylation of the *MAPT* gene in Parkinson's disease cohorts and modulation by vitamin E *In Vitro. Mov Disord.* 2013 Dec 27.
30. Allen M, Kachadoorian M, Quicksall Z, et al. Association of *MAPT* haplotypes with Alzheimer's disease risk and *MAPT* brain gene expression levels. *Alzheimers Res Ther.* 2014 Jul 1;6(4):39.
31. Hayesmoore JB, Bray NJ, Cross WC, Owen MJ, O'Donovan MC, Morris HR. The effect of age and the H1c *MAPT* haplotype on *MAPT* expression in human brain. *Neurobiol Aging.* 2009 Oct;30(10):1652-6
32. Caffrey TM, Joachim C, Wade-Martins R. Haplotype-specific expression of the N-terminal exons 2 and 3 at the human *MAPT* locus. *Neurobiol Aging.* 2008 Dec;29(12):1923-9.
33. Karch CM, Jeng AT, Goate AM. Extracellular Tau levels are influenced by variability in Tau that is associated with tauopathies. *J Biol Chem.* 2012 Dec 14;287(51):42751-62.
34. Myers AJ, Pittman AM, Zhao AS, et al. The *MAPT* H1c risk haplotype is associated with increased expression of tau and especially of 4 repeat containing transcripts. *Neurobiol Dis.* 2007 Mar;25(3):561-70
35. Caffrey TM, Joachim C, Paracchini S, Esiri MM, Wade-Martins R. Haplotype-specific expression of exon 10 at the human *MAPT* locus. *Hum Mol Genet.* 2006 Dec 15;15(24):3529-37
36. 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 Sep;46(3):325-32.

## TABLES AND FIGURES

**Table 1: Cohort characteristics for 976 subjects used for the analysis**

<b>Study Subject Characteristics</b>	<b>mean +/- SD or n(%)</b>
<b>Demographics and Clinical Variables</b>	
Number of subjects	976
Age at death	88.36 ± (6.5)
Age at baseline visit	81.02 ± (6.91)
Education	16.44 ± (3.61)
Male	35.9% (351)
PD diagnosis at death	6.2% (60)
Subjects with RNA data	51.7% (505)
Percent in ROS (versus MAP)	53.2% (519)
Age at baseline visit	81.02 ± (6.91)
<b>mUPDRS scores</b>	
Bradykinesia score baseline visit	3.31 ± (1.94)
Bradykinesia score last visit	3.79 ± (2.26)
Global parkinsonism score baseline visit	3.07 ± (1.26)
Global parkinsonism score last visit	3.95 ± (1.41)
Gait score baseline visit	4.02 ± (2.01)
Gait score last visit	5.78 ± (2.05)
Rigidity > 0 baseline visit	33.3% (324)
Tremor score > 0 baseline visit	45.8% (445)
Rigidity > 0 last visit	53.4% (517)
Tremor score > 0 last visit	48.4% (471)
<b>Post Mortem Pathology</b>	
Lewy bodies present in nigra	21.5% (210)
Neurofibrillary tangles	0.67 ± (0.42)
Neuritic plaques	0.74 ± (0.54)
Macroscopic infarcts	35.7% (348)
Microscopic infarcts	28.5% (278)

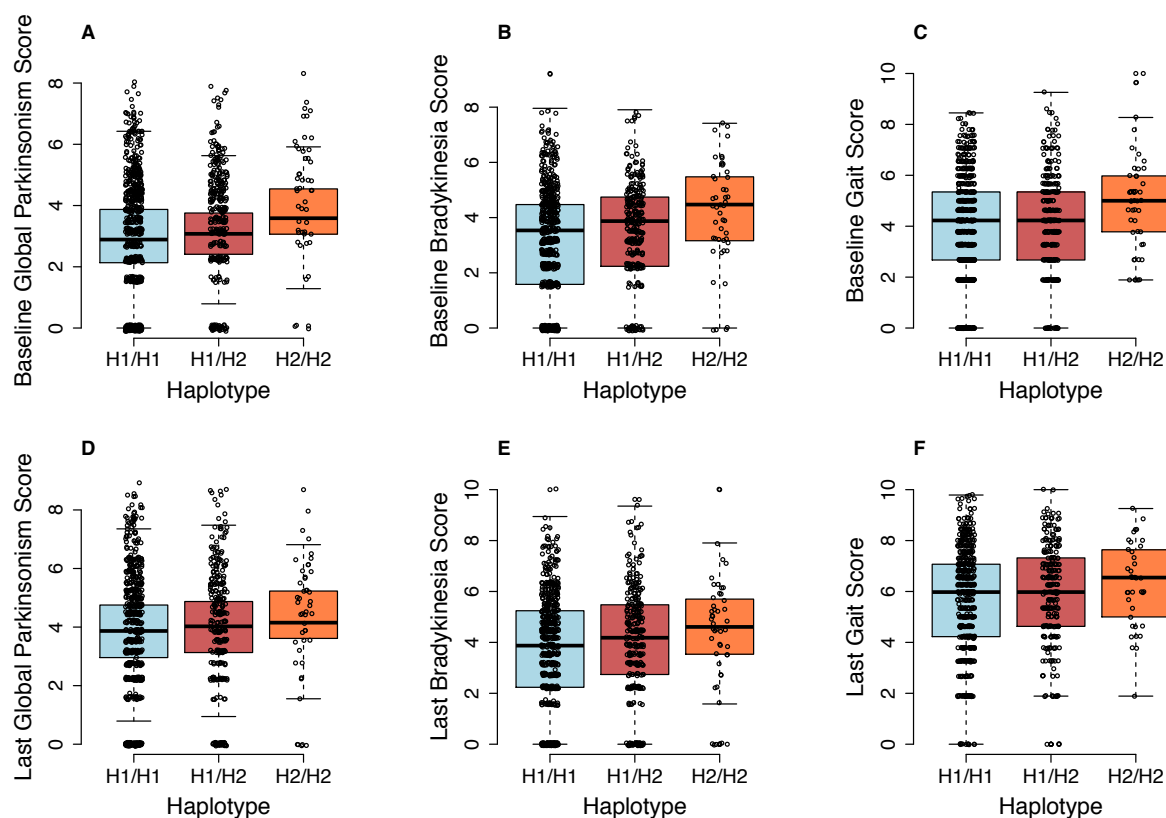
**Table 2: *MAPT* H1 and H2 major haplotypes\* and *MAPT* subhaplotype H1c\*\* association with global parkinsonism and motor components at baseline<sup>a</sup> and last<sup>b</sup> measurements.**

Parkinsonism Component	rs1052553*		rs242557**	
	Estimate	Pvalue	Estimate	Pvalue
<b>Baseline measurement</b>				
Global Parkinsonism	0.21	0.001	0.093	0.13
Bradykinesia	0.37	<.001	0.13	0.19
Gait impairment	0.23	0.021	0.15	0.11
Rigidity	0.12	0.31	0.15	0.17
Tremor score	0.17	0.15	0.059	0.58
<b>Last measurement</b>				
Global Parkinsonism	0.15	0.050	-0.015	0.82
Bradykinesia	0.32	0.008	0.086	0.45
Gait	0.18	0.12	-0.012	0.91
Rigidity	0.15	0.20	-0.13	0.22
Tremor	-0.10	0.38	-0.068	0.52

<sup>a</sup>Summary of association test using linear regression for global parkinsonism, bradykinesia and gait and logistic regression for dichotomized rigidity and tremor measurement, after adjustment for age,sex, and study.

<sup>b</sup>Summary of association test using linear regression for global parkinsonism, bradykinesia and gait and logistic regression for dichotomized rigidity and tremor measurement, after adjustment for age, sex, study, Lewy body, neuritic plaque, neurofibrillary tangle, macroscopic infarct and microscopic infarct.

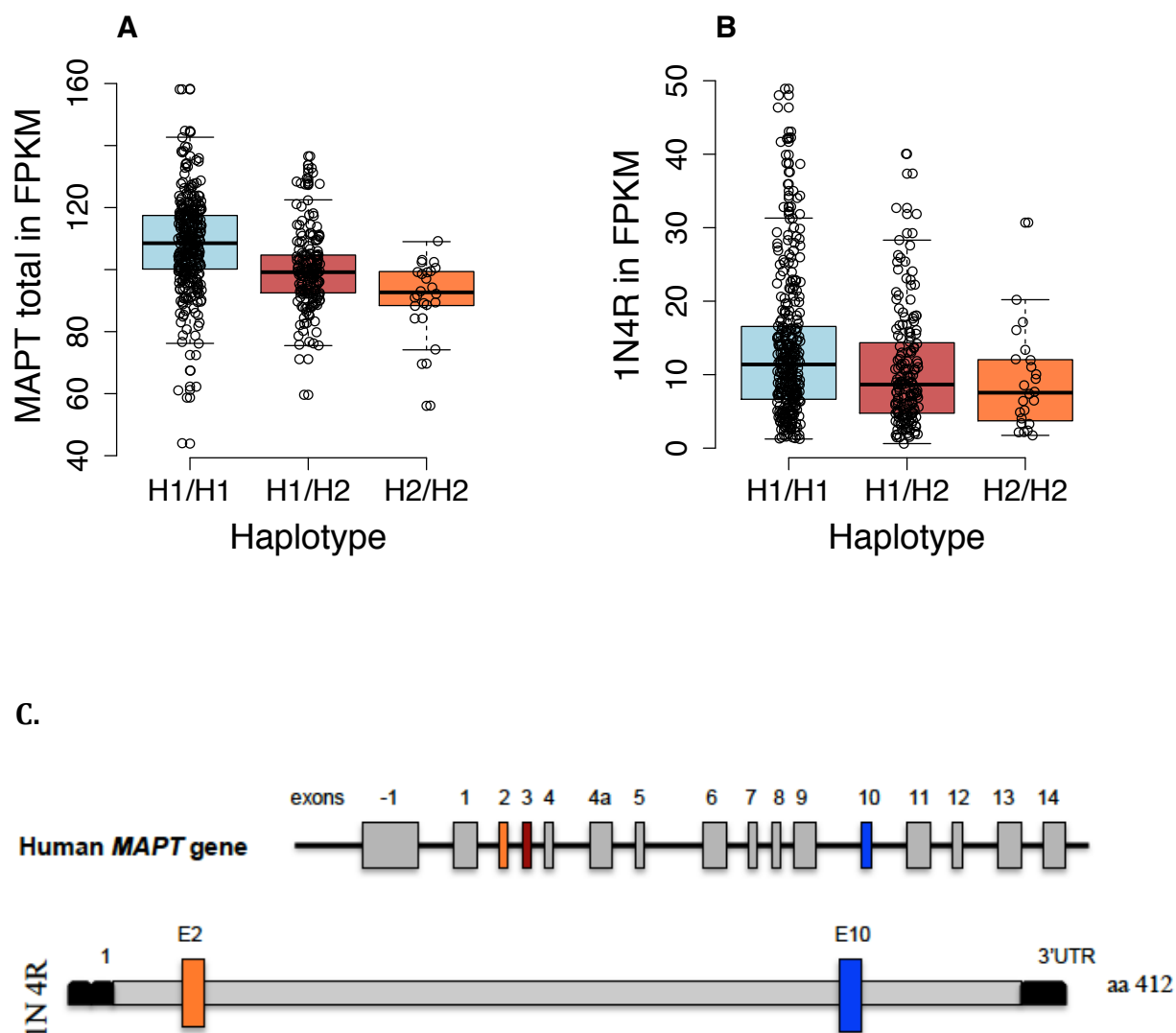
**Figure 1: Relation of clinical signs to the H1-H2 haplotype.**



The tag SNP rs1052553 is used to differentiate the H1/H2 haplotypes. The top series of panels (A,B,C) report the association of *MAPT* genotype with motor traits at the baseline assessment (global  $p=0.0013$ ; brady  $p=0.00034$ ; gait  $p=0.021$  - adjusted for age, sex, study). The bottom series of panels (D,E,F) report the association of *MAPT* genotype with motor traits at the time of the last available assessment (global  $p=.050$ ; brady  $p=.0086$ ; gait  $p=0.12$ , adjusted for age, sex, study, + path). Each dot represents one subject.



**Figure 2: Relation of MAPT expression to the H1/H2 haplotypes.**



A dose-dependent effect of the H2 haplotype is noted. Each dot represents one subject. (A) Total MAPT expression ( $p = 1.2 \times 10^{-14}$  adjusted for age, sex, and path) (B) Expression of MAPT isoform 1N4R, the only isoform to be significantly associated with parkinsonism. ( $p=0.00046$  adjusted for age, sex, and study and  $p=.0014$  adjusted for age, sex, study and path) (C) MAPT exon structure and composition of the 1N4R isoform: aa=amino acids; E2=exon 2; E3=exon 3; E10=exon 10

## Online-only Supplement

### The role of *MAPT* haplotype H2 and isoform 1N/4R in Parkinsonism of older adults

Guilherme T. Valenca, MD<sup>1,2,3,5</sup>, Gyan P. Srivastava, PhD<sup>3,5</sup>, Jamily Oliveira-Filho MD, MS, PhD<sup>2</sup>, Charles C. White, PhD<sup>3,4,5</sup>, Lei Yu, PhD<sup>6</sup>, Julie A. Schneider, MD<sup>6</sup>, Aron S. Buchman, MD<sup>6</sup>, Joshua M. Shulman MD, PhD<sup>7,8</sup>, David A. Bennett, MD<sup>6</sup>, Philip L. De Jager, MD, PhD<sup>3,4,5</sup>

eTable 1: Allele and genotype frequencies for <i>MAPT</i> rs1052553 and rs242557 based on 976 subjects .....	2
eTable 2 . Association of neuropathologies with global parkinsonism score at time of death .....	3
eFigure 1a. Relation between age at time of death and <i>MAPT</i> expression stratified by H1/H2 haplotype (p<0.001 age, sex, study and H2 only; p<0.001 adjusting for age, sex, study, H2 + path) .....	4
eFigure 1b. Relation between age at time of death and <i>MAPT</i> 1N4R expression stratified by H1/H2 (p=0.58 adjusting for pathologies) .....	5
eFigure 2a. Relationship between motor traits scores at time prior to death and <i>MAPT</i> total expression (global parkinsonism score, p=0.14; bradykinesia score, p=0.45; gait score, p=0.12) .....	6
eFigure 2b. Relationship between motor traits scores at time prior to death and <i>MAPT</i> 1N4R total expression (global parkinsonism score, p=0.0080; bradykinesia score, p=0.0089; gait score, p=0.039) .....	7
eFigure 3. Relation between global parkinsonism score at time prior to death and <i>MAPT</i> isoform 1N/4R expression adjusted for <i>MAPT</i> total expression and brain pathology (p=0.012) .....	8

**eTable 1: Allele and genotype frequencies for *MAPT* rs1052553 and rs242557 based on 976 subjects**

SNP	Genotype, n (%)			Allele, n (%)	
	AA	AG	GG	A	G
rs1052553	631 (64.7%)	298(30.5%)	47 (4.8%)	1560(80.0%)	392(20.0%)
rs242557	103(10.6%)	544(55.7%)	329(33.7%)	750(38.4%)	1202(61.6%)

For rs1052553 allele A and G correspond to H1 and H2 haplotypes, respectively. For rs242557 allele A corresponds to the H1c haplotype.

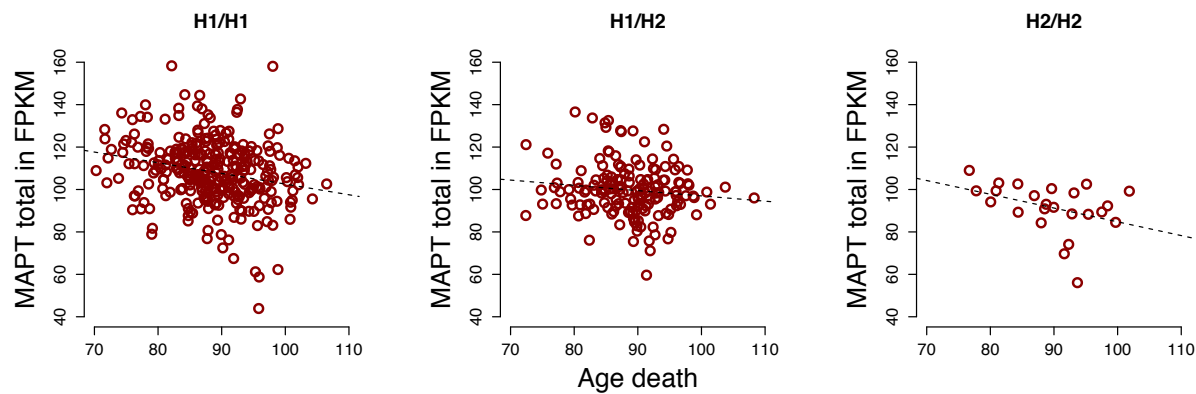
**eTable 2 . Association of neuropathologies with global parkinsonism score at time of death.**

Global Parkinsonism	Estimate	SE	P-value
Intercept	-0.2	0.63	0.75
rs1052553	0.15	0.074	0.050
Age at death	0.04	0.0071	<.001
Male	-0.062	0.093	0.51
Lewy bodies present in nigra	0.27	0.11	0.0094
Neuritic plaques	0.09	0.1	0.37
Neurofibrillary tangles	0.25	0.13	0.054
Macroscopic infarcts	0.42	0.095	<.001
Microscopic infarcts	0.15	0.099	0.13
Study	0.24	0.088	0.0061

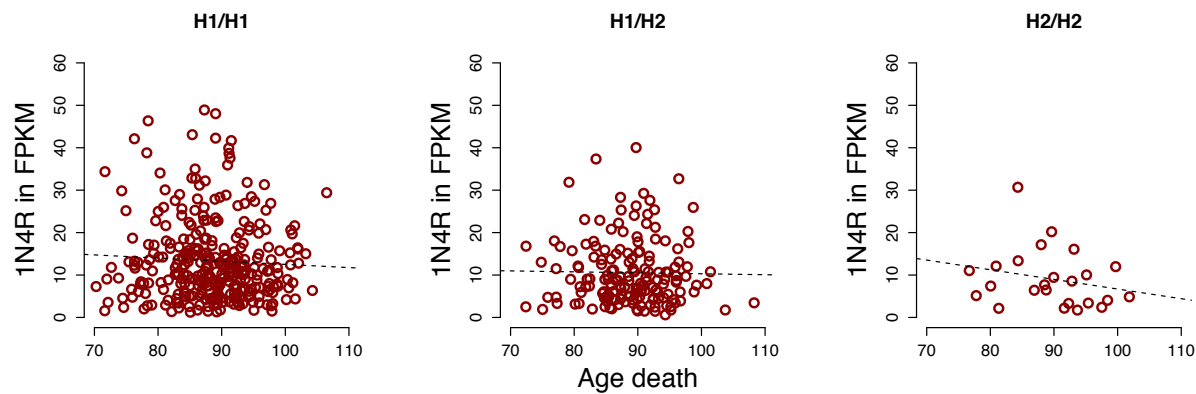
Neuropathologies, macroscopic infarcts and Lewy bodies, and age were also associated with global parkinsonism at time prior to death.

Based on linear or logistic regression models.

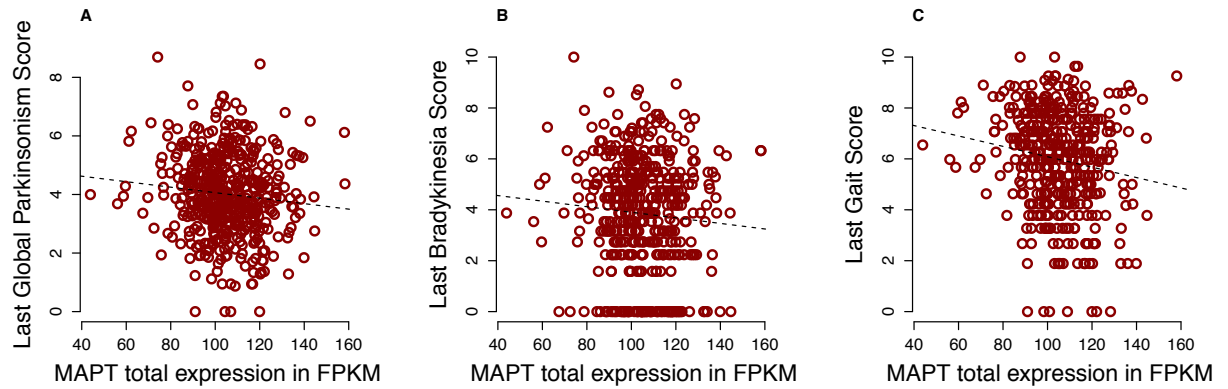
**eFigure 1a. Relation between age at time of death and *MAPT* expression stratified by H1/H2 haplotype (p<0.001 age, sex, study and H2 only; p<0.001 adjusting for age, sex, study, H2 + path).**



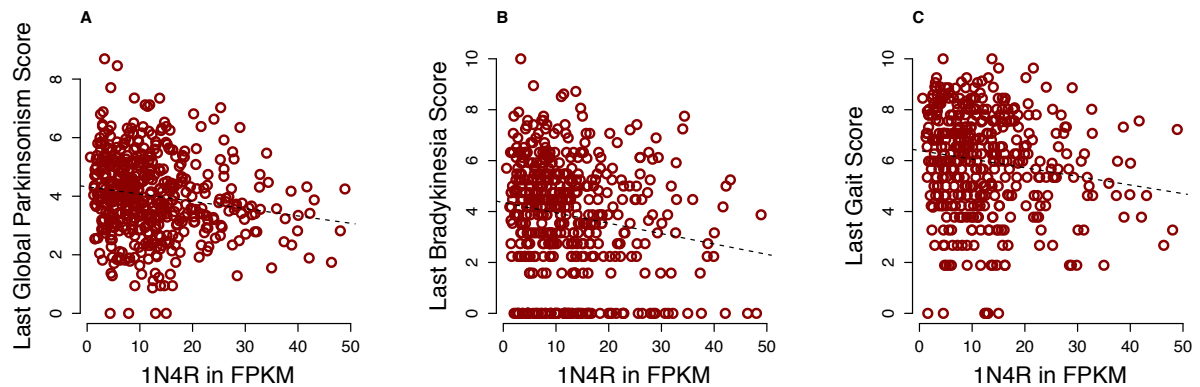
**eFigure 1b. Relation between age at time of death and *MAPT* 1N4R expression stratified by H1/H2 (p=0.58 adjusting for pathologies).**



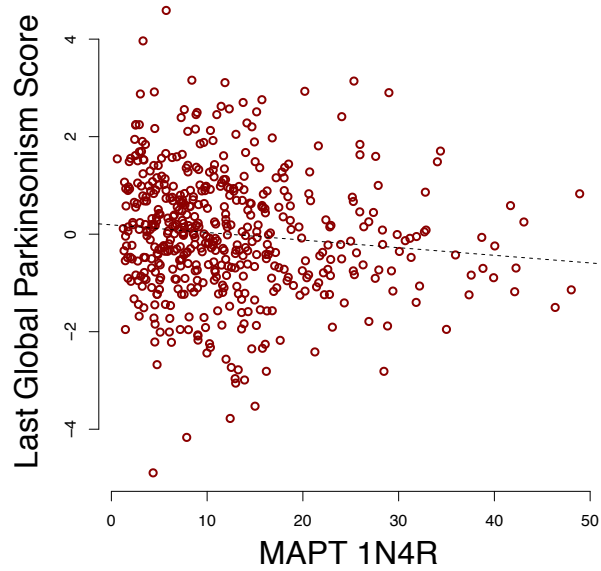
**eFigure 2a. Relationship between motor traits scores at time prior to death and *MAPT* total expression (global parkinsonism score,  $p=0.14$ ; bradykinesia score,  $p=0.45$ ; gait score,  $p=0.12$ ).**



**eFigure 2b. Relationship between motor traits scores at time prior to death and *MAPT 1N4R* total expression (global parkinsonism score,  $p=0.0080$ ; bradykinesia score,  $p=0.0089$ ; gait score,  $p=0.039$ ).**



**eFigure 3. Relation between global parkinsonism score at time prior to death and *MAPT* isoform 1N/4R expression adjusted for *MAPT* total expression and brain pathology (p=0.012).**



## Anexo

### Tabela 1. Itens da UPDRS modificada

Domínio/Tarefa	Escore 0 N (%)	Escore 1 N (%)	Escore 2 N (%)	Escore 3 N (%)	Escore 4 N (%)	Escore 5 N (%)	Escore Médio (DP)
<b>Marcha/Postura</b>							
Turning							
Posture							
Postural stability							
Arising from a chair							
Shuffling gait							
Body bradykinesia							
<b>Rigidez</b>							
Neck							
Right arm							
Left arm							
Right leg							
Left leg							
<b>Bradicinesia</b>							
Right finger tap							
Left finger tap							
Right fist clench							
Left fist clench							
Right pronation-supination							
Left pronation-supination							
Right leg agility							
Left leg agility							
<b>Tremor</b>							
Right arm rest tremor							
Left arm rest tremor							
Right leg rest tremor							
Left leg rest tremor							
Chin-jaw rest tremor							
Right arm action-postural tremor							
Left arm action-postural tremor							

Versão modificada da sessão motora da mUPDRS. Quatro pontuações dos sinais parkinsonianos previamente estabelecidos foram obtidos a partir dos 26 itens avaliados. Cada um dos itens foi classificado numa escala de 0-5: 0 = normal; 1 = Lentidão ou redução na amplitude que poderia ser normal; 2 = leve lentidão e diminuição da amplitude; 3 = moderada. Fatigante. Ocasionalmente pode ocorrer interrupção do movimento; 4 = comprometimento grave. Hesitação frequente ao iniciar movimentos; 5 = Mal consegue executar a tarefa.