

TESI DOCTORAL

**FACTORS GENÈTICS DE RISC EN LA  
MALALTIA D'ALZHEIMER.**

Jordi Clarimón Echavarria

2003



Departament de Ciències Experimentals i de la Salut

Programa de Doctorat en Ciències de la Salut i de la Vida

Universitat Pompeu Fabra (UPF)

**FACTORS GENÈTICS DE RISC EN LA MALALTIA  
D'ALZHEIMER.**

Memòria presentada per Jordi Clarimón i Echavarría per a optar al grau de doctor en Ciències Biològiques per la Universitat Pompeu Fabra. Treball realitzat sota la co-direcció de Jaume Bertranpetit Busquets i David Comas Martínez, a la Unitat de Biologia Evolutiva del Departament de Ciències Experimentals i de la Salut. Universitat Pompeu Fabra.

Amb el vist i plau de:

Els directors de Tesi:

Jaume Bertranpetit Busquets

David Comas Martínez

Barcelona, gener de 2003

Dipòsit legal: B.7785-2004

ISBN: 84-688-5718-1

# ÍNDIX

## INTRODUCCIÓ

### 1. ENVELLIMENT

1.1. SOBRE LA NATURALSA DE L'ENVELLIMENT	1
1.2. ENVELLIMENT CEREBRAL	3

### 2. DEMÈNCIA

2.1. LA DEMÈNCIA: PERSPECTIVA HISTÒRICA	5
2.2. DIAGNÒSTIC DE LA DEMÈNCIA	7
2.3. CLASSIFICACIÓ DE LES DEMÈNCIES	8
2.4. EPIDEMIOLOGIA DE LES DEMÈNCIES	9

### 3. LA MALALTIA D'ALZHEIMER

3.1. CARACTERÍSTIQUES CLÍNiques	12
3.2. CARACTERÍSTIQUES NEUROPATOLÒGIQUES	14
3.3. IMATGE CEREBRAL EN LA MALALTIA D'ALZHEIMER	16
3.4. HETEROGENEÏTAT EN LA MALALTIA D'ALZHEIMER	17
3.5. FACTORS DE RISC EN LA MALALTIA D'ALZHEIMER	19
3.5.1. Factors de risc definitiu	20
3.5.2. Factors de risc probables	21
3.5.3. Factors de risc possibles	23

## **4. ASPECTES GENÈTICS EN LA MALALTIA D'ALZHEIMER**

4.1. FORMES FAMILIARS PRESENILS DE LA MALALTIA D'ALZHEIMER	25
4.1.1. APP: Mutacions i metabolisme	26
4.1.2. Gen PS1	29
4.1.3. Gen PS2	31
4.2. FORMES TARDANES DE LA MALALTIA D'ALZHEIMER	32
4.2.1. Apolipoproteïna E (APOE)	33
4.2.1.1. Mecanismes d'actuació de l'APOE en la malaltia d'Alzheimer	36
4.2.2. Altres gens implicats en la forma tardana de la MA	38
4.2.3. Estrategia de tria de gens candidats	47

## **OBJECTIUS**

## **SUBJECTES I MÈTODES**

## **RESULTATS**

CAPÍTOL I: Apolipoprotein E Chritchurch in a family with Alzheimer's disease and altered lipid values. <i>Alzheimer's Reports</i> (5)1: 17-20 (2002)	65
CAPÍTOL II: Possible increased risk for Alzheimer's disease associated with NEPRILYSIN gene. <i>J Neural Transm</i> (en premsa)	71

CAPÍTOL III: Joint analysis of candidate genes related to Alzheimer's disease in a Spanish population. <i>Psychiatr Genet</i> (en premsa)	89
CAPÍTOL IV: Association study between Alzheimer's disease and different genes involved in A $\beta$ biosynthesis, aggregation and degradation: positive results with BACE1. <i>J Neurol</i> (sota consideració editorial)	111
CAPÍTOL V: HSP70-2 is associated with noncognitive symptoms in late onset Alzheimer's disease. <i>J Geriatr Psych Neur</i> (sota consideració editorial)	131
CAPÍTOL VI: Comparative analysis of the Alu insertion sequences in the APP 5' flanking region in primates (en preparació)	149
<b>DISCUSSIÓ</b>	175
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	189

# 1. ENVEL·LIMENT

## 1.1. SOBRE LA NATURALESA DE L'ENVEL·LIMENT

El procés vital de qualsevol espècie coneguda, condueix indefectiblement a la mort. Sempre que aquesta no es produeixi de forma primerenca, ja sigui per una malaltia o accident, vindrà precedida per un període més o menys llarg de declivi progressiu o esglaonat que denominem envel·liment. Podem doncs, definir l'envel·liment com un procés en el qual tenen lloc un conjunt de canvis i modificacions morfològiques, fisiològiques i, en algunes espècies, psicològiques, que es produeixen en els éssers vius amb el pas del temps. En termes termodinàmics, l'envel·liment es pot entendre com un augment progressiu de l'entropia, és a dir, un increment en el desordre molecular, que es manifesta per un deteriorament progressiu dels processos bioquímics i que arribaria al seu màxim exponent amb la mort de l'individu.

S'han proposat diverses teories que intenten explicar la naturalesa de l'envel·liment (Knight 1995). Les diverses teories no són mútuament excloents, sinó que fan més o menys èmfasi en determinats factors o modificacions que es donen amb el procés d'envel·liment.

Una d'elles entén el procés d'envel·lir com el resultat d'una acumulació estocàstica d'errors en el material genètic que acabarien alterant el conjunt de mecanismes moleculars i, per tant, de supervivència cel·lular.

Una altra teoria fa èmfasi en l'anomenada programació genètica per a la mort. Aquesta sosté que l'envel·liment és un procés programat i calculat genèticament. Això implicaria una mena de "rellotge biològic" que determinaria el temps màxim de longevitat de l'individu. Recolza aquesta teoria el fet que cada espècie presenti un temps de vida característic i que els canvis físics que presenten els individus són

ordenats i previsibles. Per tant, tots els individus tindrien una expectativa de vida que vindria donada pels propis gens. Aquest rellotge no és determinístic, sinó estocàstic: no hi ha un inici precís del procés, sinó que hi ha una acumulació d'errors, que es poden observar en el material genètic.

Una tercera teoria implicaria l'acúmulo d'errors en sistemes responsables de la coordinació de moltes funcions i amb una àmplia influència en l'organisme. Així, la disfunció que amb el pas del temps patirien alguns sistemes com l'hormonal o l'immunològic produirien una disminució en la capacitat de resposta als diversos factors nocius del medi i, conseqüentment, a una major propensió a malalties infeccioses i càncers.

Una quarta teoria es basa en les alteracions morfològiques i funcionals que pateixen les mitocondries amb el devenir del temps. Aquestes alteracions tindrien unes conseqüències dràstiques per a l'individu ja que es veurien afectades les fonts d'energia, fonamentals per a qualsevol procés metabòlic.

Finalment, una altra teoria es recolza en l'activitat metabòlica de l'ésser viu. La generació de radicals lliures com a subproductes de les reaccions bioquímiques produirien danys tòxics a la pròpia maquinària cel·lular. Hi hauria, doncs, un desajust en l'equilibri entre els mecanismes de defensa antioxidants i els agents que resulten de les reaccions químiques, que implicaria un increment desmesurat i constant dels diversos components tòxics.

Possiblement, cadascuna d'aquestes teories està, d'alguna manera, relacionada amb la resta i té un efecte similar en el procés d'envelliment. Així, els radicals lliures produirien danys en el DNA nuclear, el DNA mitocondrial, la membrana cel·lular i les proteïnes; això, sumat al propi llinyar d'esperança de vida que ve regulat i és característic per a cadascuna de les espècies, provocaria el fet universal i inevitable per a qualsevol forma de vida, que és l'envelliment.



## **1.2. ENVEL·LIMENT CEREBRAL**

Els canvis estructurals que pateix el cervell durant l'envelliment han estat motiu de nombrosos estudis, els resultats dels quals, sovint, han esdevingut força contradictoris. Tot i que els primers estudis apuntaven a la presència d'una gran quantitat de canvis en el teixit cerebral com a conseqüència de l'envelliment, estudis més recents, duts a terme amb tecnologia més novedosa i fiable, i amb un control més exhaustiu i estricte pel que fa a l'exclusió de mostres amb malaltia neurològica associada, apunten a que els canvis cerebrals que tenen lloc durant el procés d'envelliment normal no presenten la magnitud que havia estat documentada anteriorment (Wickelgren 1996). Tot i així, sembla ser que les alteracions més evidents que tenen lloc inclouen: disminució del pes i volum cerebrals, atròfia cortical, pèrdua de neurones corticals i d'alguns nuclis subcorticals, disminució de la substància grisa subcortical, i hipertròfia i augment de densitat de la glia astrocitària. La seqüència dels canvis involutius en la morfologia dels hemisferis cerebrals segueix paral·lelament la seqüència fil·logènica i ontogènica del cervell. Així, les estructures més ancestrals - rinencefàliques i la formació hipocàmpica - serien les primeres en mostrar signes d'atròfia, mentre que els nuclis diencefàlics talàmics i hipotalàmics patirien una atròfia que s'evidenciaria en estadis posteriors.

Possiblement, molts d'aquests canvis són deguts a la pròpia naturalesa del teixit cerebral. Aquest és un teixit generador d'una gran despesa energètica i, per tant, de radicals lliures i d'altres tòxics derivats del metabolisme. A més, el teixit neuronal conté una baixa proporció de mecanismes antioxidants quan es compara amb d'altres teixits (Olanow i Arendash 1994); en conseqüència, existeix una gran susceptibilitat a l'estrés oxidatiu, la qual cosa podria ser la causa de la major part dels esdeveniments cerebrals que tene n lloc durant l'envelliment.

### **1.3. ENVELLIMENT POBLACIONAL**

L'esperança de vida durant l'època de l'Imperi Romà era de 29 anys i no fou fins força més tard, al segle XVIII, que s'incrementà fins als 35 anys d'edat (Mahendra 1987).

La medicina, com moltes altres disciplines, ha experimentat en els darrers anys un avanç espectacular. Això, juntament amb els canvis d'estil de vida i les normes higièniques, de salubritat i condicions de treball, ha permès reduir la mortalitat infantil i juvenil, i incrementar l'esperança de vida a uns límits que, de ben segur, serien inimaginables per als qui vivien a principis del segle passat. Així doncs, s'ha passat d'una expectativa de vida de 47,3 anys al 1900 als 74,5 al 1982 (Martínez-Lage i Láinez Andrés 2000) i als 82,7 anys per a les dones espanyoles segons els estudis efectuats a l'any 2000 (Eurostat, Statistical Office of the European Community, 2000).

Tanmateix, aquesta longevitat ha suposat l'envelliment global de la població mundial, especialment en les àrees més industrialitzades. Dels 10 a 17 milions de persones amb 65 anys o més en el 1900 (el que suposava menys de l'1% de la població total) s'ha passat als 342 milions l'any 1995, el que equival al 6,2% de la població. Les estimacions més conservadores indiquen que aquest percentatge s'incrementarà fins al 20-25% l'any 2020 (Olshansky et al. 1993).

A Espanya, amb una situació similar a la resta d'Europa, s'estima que l'any 2011 hi haurà aproximadament 3,3 milions de persones amb 65 o més anys. Finalment, el 2010 Catalunya incrementarà en unes 127 mil persones el número de gent amb 65 anys o més respecte el 1999. Així doncs, s'estima que en aquest any hi haurà a Catalunya aproximadament 1,2 milions de persones que tindran 65 anys o més (Institut d'Estadística de Catalunya, Generalitat de Catalunya).

## 2. DEMÈNCIA

### 2.1. LA DEMÈNCIA: PERSPECTIVA HISTÒRICA

El terme demència (del llatí *de mentis*) ja fou utilitzat en el segle I a.C. per Titus Lucrecius per tal d'expressar que algú havia perdut la ment, o que era boig. Celsus (30 aC-50 dC) fou el primer en utilitzar el terme dins un context mèdic. Aquest inclogué quatre categories dins la demència: el frenesí (per a expressar el deliri), la malenconia (fent referència a la depressió), les imatges enganyoses (al·lucinacions) i les aberracions mentals (psicosis). Al segle II a.C., el grec Arecatius de Capadòcia utilitzà el terme “demència senil”, en referència a la pèrdua de la raó que apareixia en estadis de senescència. Posteriorment, el metge de l'emperador Julià, Oribasiu (325-400), descrigué en una atròfia cerebral, a la qual atribuí la pèrdua de capacitat intel·lectual i la paràlisi.

Però no fou fins el 1672 quan aparegué el que, per a molts, fou la primera descripció d'un cas de demència. Aquesta fou realitzada per Thomas Willis (1621-1675) a l'obra “*De Anima Brutorum*” i és en aquest escrit on s'emfasitza que la demència comportava, a més d'un trastorn en l'intel·lecte, una alteració en el patró del comportament.

El metge francès Jean-Dominique Esquirol (1772-1840), utilitzant el terme *démence*, diferencià el retard mental i la demència en base al caràcter adquirit de la darrera. En la seva obra “*Des maladies mentales considérées sous le rapport médical, hygiénique et médico-légal*”, al 1838, definí la demència com una alteració mental que afectava a funcions neuropsicològiques com la comprensió, la memòria i la comparació.

La confusió arribà quan Emil Kraepelin (1856-1926) classificà els trastorns mentals basant-se en la oposició entre la *dementia praecox* (el que actualment anomenem psicosis) i la psicosi maníaco-depressiva (terme utilitzat per a referir-nos a la demència). Tot i així, segurament degut a les ensenyances del seu mestre Wilhem Griesinger, un defensor de la psiquiatria orgànica, Kraepelin utilitzà el terme de “demències orgàniques” per a designar totes aquelles psicosis originades per una malaltia del sistema nerviós central.

Poc després, el psiquiatre suís Eugene Bleuner (1857-1939), va anomenar esquizofrènia a allò que fins aleshores es coneixia com a demència precoç.

El concepte actual de demència és força més precís i s'aplica al deteriorament progressiu del conjunt de les funcions intel·lectuals (memòria, atenció, judici i capacitat de raonament) i als conseqüents trastorns de conducta. Lishman (1978) definí la demència com a “un deteriorament global adquirit de la intel·ligència, la memòria i la personalitat sense alteració del nivell de consciència”. Una altra definició que explicaria d'una forma detallada i concisa el concepte de demència és la de Casanova i Barraquer (Peña et al. 1983), els quals defineixen la demència com a un “estat patològic global adquirit que cursa amb un dèficit en el conjunt de les activitats psíquiques i amb normalitat en el nivell de consciència, essent llur evolució crònica i progressiva”.

Així doncs, ens trobem davant un concepte que ha estat emprat durant un llarg període de la història de la humanitat i que, cada cop més, se li ha anat adjudicant un significat més homogeni i precís.

## 2.2. DIAGNÒSTIC DE LA DEMÈNCIA

La demència, com a síndrome complexa, és una entitat definida com a una agrupació de símptomes i signes. Els criteris diagnòstics de demència més àmpliament emprats són els que es descriuen en el *Manual Diagnòstic i Estadístic dels Trastorns Mentals* (DSM-IV), elaborada per la American Psychiatric Association, i en la *Classificació Internacional de Malalties i problemes de Salut* (ICD-10), desenvolupat per la Organització Mundial de la Salut (veure taula 1).

Segurament, la laxitud dels criteris i la menor concreció del darrer suposen la principal diferència entre ambdós criteris diagnòstics. Tot i així, en tots dos casos, el diagnòstic segueix essent establert per criteris purament clínics, i no existeix cap marcador biològic o d'imatge amb un 100% de sensibilitat i especificitat.

**Taula 1.** Criteris diagnòstics de demència segons el DSM-IV i el ICD-10.

DSM IV	ICD-10
<b>A.</b> Desenvolupament de múltiples dèficits cognitius. 1. Alteració de la memòria. 2. Deteriorament cognitiu manifestat almenys en: - afàsia - apràxia - agnòsia - perturbació en funcions executives	<b>A.</b> Presència de cadascun dels següents aspectes: 1. Deteriorament de la memòria. 2. Deteriorament en les capacitats intel·lectuals
<b>B.</b> Els dèficits cognitius (A1 i A2) interfereixen significativament en el treball o activitats socials i suposen un deteriorament previ de funcionament.	<b>B.</b> Absència d'alteració de consciència.
<b>C.</b> El curs està caracteritzat per un començament gradual i continua el declivi cognitiu.	<b>C.</b> Deteriorament de la conducta social, control emocional o motivació.
<b>D.</b> Els dèficits cognitius (A1 i A2) no es deuen a altres condicions: - del sistema nerviós - sistèmiques - ús de substàncies	<b>D.</b> Més de sis mesos de durada de la simptomatologia.

### 2.3. CLASSIFICACIÓ DE LES DEMÈNCIES

Tot i que han existit una gran quantitat de formes de classificació de les demències, moltes d'elles han esdevingut obsoletes i han deixat d'emprar-se en l'àmbit de la gerontologia. Per exemple, les classificacions segons l'edat (senil i presenil) o bé segons el pronòstic (reversible i irreversible) s'han deixat d'utilitzar. Per contra, els criteris més emprats en l'actualitat fan referència a les característiques clíniques de la síndrome demencial i a la seva etiologia.

Pel que fa a la classificació en base a la manifestació clínica, hom distingeix les demències en corticals i subcorticals (Alberca i López-Pousa 1998).

S'entén per demències subcorticals aquelles que tenen unes manifestacions cognitives basades en la lentitud dels processos mentals. Tanmateix, són característics els canvis en la conducta i personalitat. La presència d'alteracions en el sistema motor, ja sigui en forma d'alteracions posturals, de la marxa, bradicinèsies, síndrome rígid-acinètic, tremolors o moviments coreics, també és freqüent en les demències subcorticals.

Les demències corticals són aquelles en què es troben alterades les capacitats cognitives relacionades amb el còrtex cerebral.

Cal remarcar, però, que aquesta classificació es basa únicament en la simptomatologia manifestada per l'individu i no s'hauria de confondre amb alteracions orgàniques localitzades en àrees exclusivament corticals, ja que anomalies subcorticals podrien donar manifestacions cognitives de semiologia típicament cortical.

Tanmateix, la classificació més emprada actualment per a les demències es basa en les característiques etiopatogèniques. Segons aquesta classificació etiològica de la demència, podem distingir-hi tres grans apartats: les demències degeneratives primàries, les demències secundàries i les demències vasculares. En el primer grup, hom hi ubica aquelles demències en què es desconeix l'agent causal o bé aquest no

està ben establert; pel que fa a les demències secundàries, s'hi inclouen aquelles demències amb etiologia coneguda (infeccions, neoplàsies, tòxics, traumatismes...); finalment, les demències vasculars es caracteritzen principalment per la manifestació de lesions en els vasos cerebrals.

## **2.4. EPIDEMIOLOGIA DE LES DEMÈNCIES**

Com s'ha esmentat anteriorment, la població humana actual, sobre tot en aquells països desenvolupats, ha sofert un canvi molt important pel que fa a l'estructura per edats. La disminució de la mortalitat, l'increment de l'esperança de vida i el control de la natalitat han estat, entre d'altres factors, els causants d'aquest esdeveniment poblacional. Això ha provocat un gran increment de la incidència de les malalties associades a l'increment d'edat.

Tot i que existeix una gran quantitat d'estudis epidemiològics sobre les demències, la disparitat en els resultats és habitual quan es comparen entre ells. Una de les raons que explicarien aquestes discrepàncies és la utilització de diferents criteris diagnòstics per a la demència, que fa que els resultats hagin estat, sovint, força esbiaixats en funció de la sensibilitat i especificitat del mètode diagnòstic emprat.

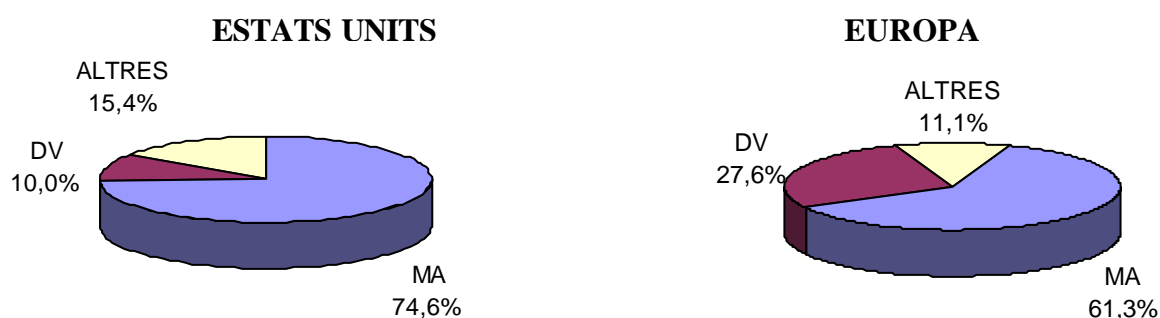
Aquesta abundància de dades ha portat a la realització de múltiples revisions sobre el tema. Una d'aquestes revisions fou duta a terme per Laura Fratiglioni (1999) que analitzà les dades referents a 36 estudis de prevalença i 15 d'incidència. La conclusió fou que, de forma global, l'estimació mundial de prevalença de la demència en individus d'entre 60 i 64 anys era del 0,3 a l'1%, i aquesta augmentava fins a valors d'entre el 42,3 i el 68,3% per als individus amb 95 anys o més. A grans trets, podríem dir que la prevalença es duplica cada cinc anys després dels 65. Pel que fa a la incidència, els valors variaven entre 0,8 i 4 nous casos per cada 1000 persones i any en el rang d'edat de 60 a 64 anys, i incrementava fins a 49,8 – 135,7 nous casos per cada

1000 persones i any en població major de 95 anys. Tant la prevalença com la incidència mostraren poques variacions geogràfiques, i les poques diferències foren atribuïdes a la diversitat de la metodologia emprada en les diferents regions i no a esdeveniments epidemiològics reals.

Quelcom que es replica en la majoria dels estudis d'aquest tipus (exceptuant alguns estudis fets en població oriental), quan s'analitza el pes específic que tenen cadascuna de les demències respecte el total, és el fet que la demència senil de tipus Alzheimer representa la principal causa de demència, diagnosticant-se en quasi la meitat dels casos.

L'any 2000, el grup EURODEM (*European Community Concerted Action Epidemiology and Prevention of Dementia*), format l'any 1988 amb la intenció de fer confluïr diferents estudis de cohort i inferir resultats que es desprenen dels diversos grups de la Comunitat Europea, van aportar les dades de 31.032 individus de més de 65 anys (Lobo et al. 2000). D'aquests, el 7,5% foren diagnosticats de demència. La malaltia d'Alzheimer (MA) fou diagnosticada en més de la meitat dels casos (Figura 1).

Pel que fa a l'estat espanyol, la MA representaria entre el 40 i el 60% del total de les demències. La demència vascular, en segon lloc, comprendria valors d'entre el 13 i el 38%, les demències mixtes representarien el 11-12% i, finalment, el 8-9% del total de les demències serien demències secundàries (Martínez Lage, 2000).



**Figura 1.** Prevalença dels diversos tipus de demència als Estats Units i Europa.

MA = Malaltia d'Alzheimer; DV = Demència Vascular. Fratiglioni *et al.*, 1999.



### 3. LA MALALTIA D'ALZHEIMER

El 4 de Novembre de 1906, Aloysius Alzheimer, patòleg del *Nerven Klinik der Maximilian Institut*, presentà, a la ciutat de Tübingen, una observació anatomo-clínica amb la descripció de plaques senils, cabdells neurofibril·lars i canvis arterioscleròtics. Aquestes lesions, les quals no havien estat mai abans descrites, provenien d'una pacient, Augusta D., la qual va morir als 55 anys d'edat després d'haver estat més de 4 anys ingressada. Durant aquest temps d'ingrés va presentar un quadre clínic constituït per un progressiu deteriorament cognitiu, disminució de la memòria, símptomes focals (afàsia), al·lucinacions auditives, trastorns delirants (cel·lotípia), paranoics, de conducta, i incompetència psicosocial. Es tractava, doncs, del primer cas descrit de malaltia Alzheimer (MA). Tanmateix, no fou fins el 1910 que Kraepelin, director d'Aloysius Alzheimer, donà nom a la nova entitat (Belart 1993).

Tot i així, la MA es considerava presenil, poc freqüent i es va diferenciar de la demència senil durant força temps.

Avui dia, però, tal i com s'ha esmentat anteriorment, la MA representa la forma més comú de demència en la població envellida. A Espanya s'estima que hi ha, com a mínim, 200.000 persones que la pateixen i, segons la OMS, la xifra arriba als 20 milions de casos a tot el món. A Catalunya s'estima que hi ha més de 40.000 persones afectades per aquesta malaltia neurodegenerativa i es calcula que només un terç han estat diagnosticades.

Amb un cost anual estimat en més de cent-mil milions de dòlars als Estats Units (Max 1996), i d'uns 16.000 euros anuals per malalt a Espanya (Boada et al. 1999), aquesta patologia ha esdevingut una important causa de despesa pública (i privada) en els països més desenvolupats. És més, les projeccions futures sobre la prevalença de MA estimen que en els propers 50 anys es multiplicarà per 3,7 als Estats Units i el

nombre anual de nous casos (incidència) s'espera que es multipliqui per tres, passant així dels 360.000 casos al 1997 als 1,14 milions de nous casos al 2047 als USA.

### 3.1. CARACTERÍSTIQUES CLÍNIQUES

La MA és una entitat clínica amb una gran heterogeneïtat neuropsicològica (Martin et al. 1986), evolutiva (Mann et al. 1992), neuropatològica (Armstrong et al. 2000) i histopatològica (Bondareff et al. 1987). Possiblement, avui dia no es pot dir amb seguretat si la demència senil de tipus Alzheimer és una única malaltia, un complex sindròmic amb molts subtipus i varietats en llurs manifestacions o bé es tracta de diverses malalties amb una agrupació similar de símptomes (Khachaturian 1992).

Sigui com sigui, els trets clínics són clàssicament els d'una demència cortical i es caracteritzen per una alteració de la memòria, associada a disfàsia i, freqüentment, amb dèficits gnòsics (principalment visuals), víuo-espacials i pràctics.

El diagnòstic actual de MA es realitza en base als criteris proposats pel *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (NINCDS)* i la *Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (ADRDA)* (taula 2), així com els de l'Associació Americana de Psiquiatria (DSM-IV) i les de l'OMS (CIE-10). Pel que fa al primer, el diagnòstic es pot realitzar amb tres graus de certesa: possible, probable i definitiu, essent aquest darrer el que ofereix, a partir d'un examen neuropatològic efectuat de biòpsia cerebral o bé d'autòpsia, el màxim grau de certesa diagnòstica.

**Taula 2 Criteris NINCDS-ADRDA per al diagnòstic clínic de la MA.**
***I. Els criteris per a un diagnòstic de probabilitat inclouen:***

- A. Demència establerta per un diagnòstic clínic i documentada per Mini-Mental Test, Escala de demència de Blessed o similars, i confirmada per neuropsicologia.
- B. Dèficit en dues àrees cognitives o més.
- C. Pèrdua progressiva de memòria i altres funcions cognitives.
- D. No alteracions de consciència.
- E. Començament entre els 40 anys i els 90 anys, sovint després dels 65.
- F. Absència de trastorns sistèmics o d'altres malalties cerebrals que poguessin ser responsables dels dèficits de memòria i cognició.

***II. El diagnòstic de probable MA és recolçada per:***

- A. Deteriorament progressiu de funcions cognitives específiques com el llenguatge (afàsia), la conducta motora (apràxia) i la percepció (agnòsia).
- B. Alteracions de les conductes de la vida quotidiana i pautes de conducta habitual.
- C. Història familiar d'alteracions semblants, especialment si s'acompanyen de dades neuropatològiques.
- D. Proves de laboratori:
  - L.C.R. normal
  - EEG normal o amb manifestacions inespecífiques, com ara augment de l'activitat d'ones lentes.
- Evidència d'atròfia cerebral a TAC amb progressió comprovada en diversos moments.

***III. Altres aspectes clínics compatibles amb probable MA una vegada excloses totes les altres possibles causes de demència, poden ser:***

- A. Períodes d'aturada en el curs de la malaltia.
- B. Síntomes de depressió, insomni, incontinència, ideació delirant, al·lucinacions; episodis crítics transitoris (*outbursts*) catastròfics verbals, emocionals o motors; alteracions sexuals; pèrdua de pes.
- C. Altres anomalies neurològiques en alguns pacients, especialment en curs avançat, que inclouen signes motors, com ara augment de to muscular, mioclonus o alteracions de la marxa.
- D. Crisis convulsives en estats avançats.
- E. TAC normal, tenint en compte l'edat.

***IV. Característiques que fan dubtar del diagnòstic de probable MA:***

- A. Començament sobtat, aploplèctic.
- B. Signes de focalitat neurològica, com ara hemiparèsies, pèrdues sensorials, dèficits del camp visual i incoordinació primerenca.
- C. Convulsions o alteracions de la marxa al començament o en estadis molt primerencs de la malaltia.

***V. Diagnòstic de probable MA:***

- A. Pot ser sobre la base d'una síndrome demencial, en absència d'altres alteracions neurològiques, psiquiàtriques o sistèmiques, suficients per causar demència i en presència de variacions en el començament, en la presentació o en el curs clínic.
- B. Pot ser en presència d'una segona alteració sistèmica o cerebral suficient per produir demència, però que no es considera que sigui la causa del quadre.
- C. Es podrà considerar en estudis de recerca quan hi hagi un únic dèficit cognitiu greu i progressiu en absència d'altres causes identificables.

***VI. Criteris per a un diagnòstic definitiu:***

- A. Criteris clínics de probable MA.
- B. Evidència histopatològica obtinguda per biòpsia o autòpsia.

***VII. La classificació de la malaltia d'Alzheimer per finalitat de recerca haurà d'especificar els aspectes que poden diferenciar els subtipus de malaltia, com ara:***

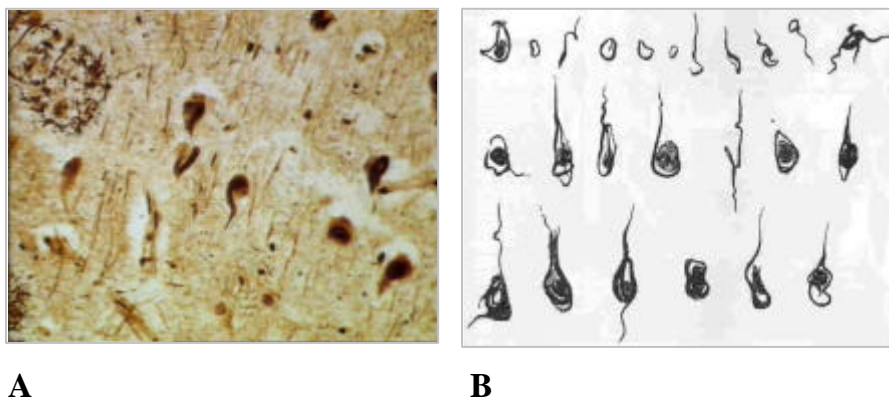
- A. Incidència familiar.
- B. Començament abans dels 65 anys.
- C. Presència de trisomia 21D.
- D. Coexistència amb altres condicions rellevants com ara la malaltia de Parkinson.

### 3.2. CARACTERÍSTIQUES NEUROPATOLÒGIQUES

L'anàlisi de teixit cerebral provinent de pacients amb MA posa de manifest un conjunt d'alteracions patognomòniques de la malaltia tals com les plaques senils, la degeneració neurofibrilar, l'angiopatia amiloide, la degeneració granulovacuolar i els cossos d'hirano, termes que descrivim tot seguit.

Les plaques senils apareixen com a precipitats proteics constituïts principalment per una zona central d'amiloide, la qual es troba sovint envoltada de neurites distròfiques (terminacions neuronals degenerades, tant axonals com dendrítiques) i d'algunes cèl·lules glials com astròcits i microgila activada (Figura 2). Existeixen també dipòsits d'amiloide que careixen d'elements cel·lulars, és a dir, sense neurites distròfiques ni relacionades amb cèl·lules glials, les quals reben el nom de plaques difuses. Aquestes lesions es poden visualitzar mitjançant tinció amb plata o tioflabina-S i poden trobar-se tant en malalts com en individus sans d'edat avançada. El component fonamental de l'amiloide cerebral és el pèptid  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A), el qual procedeix d'una proteïna transmembrana de tipus 1 anomenada proteïna precursora de l'amiloide (APP). Actualment es desconeixen els mecanismes que contribueixen al procés de formació de les plaques senils. Tot i així, sembla ser que la seqüència d'esdeveniments és l'aparició en primer terme de la placa difusa, la qual donaria lloc a la placa madura (Yamaguchi et al. 1994). El diagnòstic neuropatològic de MA requereix la presència d'un cert nombre de plaques senils comptades per camp microscòpic (Khachaturian 1985). Nogensmenys, existeixen casos diagnosticats clínicament amb MA probable sense la presència de suficients plaques senils per a un diagnòstic definitiu (Galasko et al. 1994). Tot i que les plaques amiloides siguin una característica morfològica típica de la MA, ni el seu nombre ni la seva distribució es correlacionen amb l'edat d'inici de la simptomatologia o amb el ritme de progressió de la malaltia (Hyman et al. 1993; Arriagada et al. 1992).

La degeneració neurofibril·lar es caracteritza per un acúmulo de fibril·les en el citoplasma de les neurones que acaba donant lloc a la formació dels anomenats cabdells neurofibril·lars (de l'anglès, neurofibrillary tangles: NFT). Aquests cabdells estan formats per parelles de filaments creuats helicoidalment (PHF: Paired Helical Filaments), els quals són formats principalment per la proteïna associada a microtúbuls TAU. La proteïna TAU, la qual té una funció estabilitzadora dels microtúbuls, apareix en els PHF altament fosforilada, insoluble i difícilment degradable. Els cabdells neurofibril·lars es presenten principalment en les neurones piramidals de l'hipocamp, còrtex entorrinal i parahipocampal, nuclis del tronc, i, en estadiats més avançats, en diverses zones del neocòrtex (Corder et al. 2000). Cal esmentar que el nombre de neurones amb NFT s'incrementa amb la progressió de la malaltia i es correlaciona força amb el grau de severitat de MA (Hyman et al. 1993).



**Figura 2.**

**A.** Plaques senils i cabdells neurofibril·lars.

**B.** Degeneració neurofibril·lar. Dibuxos originals d'A. Alzheimer.

L'angiopatia amiloide, també coneguda com angiopatia congòfila, es produeix pel dipòsit d'amiloide en les parets dels vasos leptomeníngics (principalment en l'adventície i la mitjana de les artèries de petit i mig calibre) i els capilars del còrtex cerebral.

La degeneració granulovacuolar és la presència de vacuoles buides que apareixen majoritàriament en els cossos cel·lulars de les cèl·lules piramidals de l'hipocamp. L'extensió d'aquest tipus de lesió incrementa amb l'edat i es troba molt més estesa en els cervells de pacients amb MA.

Finalment, els cossos d'hirano són agregacions d'estructures en forma d'espines que també es troben en les neurones piramidals de l'hipocamp i semblen estar formats per diversos elements citoesquelètics i d'altres proteïnes associades amb els microfilaments (tropomiosina,  $\alpha$ -actinina, vinculina...).

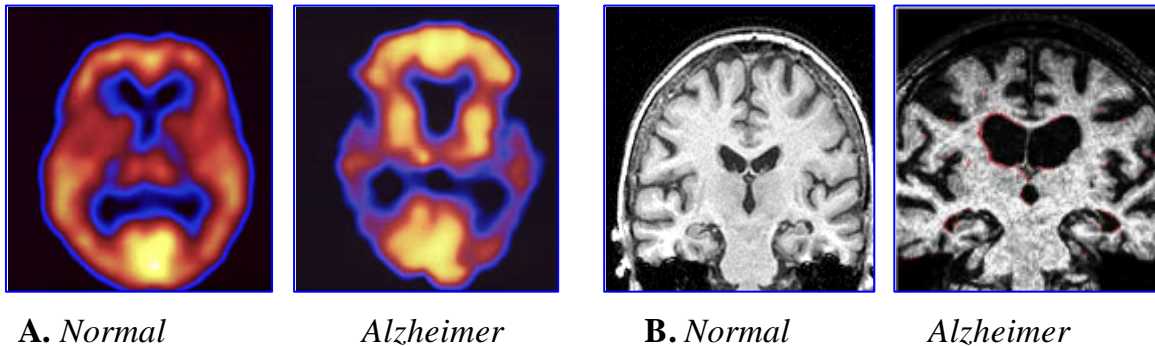
### **3.3. IMATGE CEREBRAL EN LA MALALTIA D'ALZHEIMER**

En els darrers anys hi ha hagut un gran avanç en diverses tècniques de neuroimatge, que ha provocat un canvi molt important en l'enfocament diagnòstic i forma de seguiment del curs clínic de la MA. Tant és així, que avui dia la neuroimatge ha esdevingut una eina no invasiva de primer ordre i d'aplicació obligada per a qualsevol diagnòstic i seguiment dels processos demencials.

La Tomografia Axial Computaritzada (TAC) i la Ressonància Magnètica Nuclear (RMN) han permès apreciar clarament tant la presència d'atròfia hipocampal, com el progressiu augment dels solcs corticals i del volum ventricular que té lloc durant el transcurs de la MA. Igualment, també ha permès mesurar de forma objectiva la pèrdua de volum cerebral que té lloc durant l'evolució de la malaltia.

D'altra banda, tècniques com la Tomografia per Emisió de Positrons (PET) i la Tomografia Computeritzada per Emisió de Fotons Simples (SPECT), han permès avaluar i caracteritzar els diversos patrons de funció cerebral que presenten els cervells de pacients amb MA. Per exemple, l'SPECT, amb un cost i unes complexitats tècniques molt menors que el PET, però capaç d'oferir imatges representatives de perfusió cerebral, volum sanguini i distribució de receptors, ha demostrat que existeix una hipoperfusió del flux sanguini cerebral en els lòbuls temporals posterior i parietal bilateral amb afectació del lòbul frontal en estadis més avançats de la malaltia. Contràriament, no s'observen alteracions del flux sanguini en les àrees motores i

sensorials primàries, l'escorça visual i els ganglis basals, el que correlaciona força clarament amb les característiques clíniques de la malaltia.



**Figura 3.** **A.** SPECT mostrant la hipocapatació del traçador en regions temporo-parietals del cervell. **B.** RMN, secció coronal on s'observa l'atròfia hipocàmica, la dilatació ventricular i l'atròfia cortical difusa, típica de la MA.

### 3.4. HETEROGENEÏTAT EN LA MA

Tot i que la MA es caracteritza principalment per una pèrdua de memòria progressiva i l'existència de simptomatologia afaso-apraxo-agnòsica, s'ha demostrat que existeix una gran varietat d'alteracions no només a nivell cognitiu, sinó també de tipus no cognitiu i, fins i tot, neuropatològic. Així, s'ha parlat de possibles subgrups de pacients atenent a llurs característiques neuropsicològiques (Fisher et al. 1996). Per exemple, hi hauria un subgrup, el més freqüent, caracteritzat per una anòmia moderada o severa i apraxia constructiva; un altre amb una relativa conservació de les funcions visuo-perceptuals i constructives però amb grans alteracions fàsiques, i un tercer subgrup sense afàsia però amb importants alteracions pràxiques (sobre tot constructives). Igualment, diversos estudis han identificat subgrups de pacients atenent a patrons neuropsicològics de tipus simètric o asimètric (Strite et al. 1997). En aquest cas, s'ha postulat que el 27% dels malalts podrien patir anomalies neuropsicològiques eminentment asimètriques, les quals perdurarien en tots els estadis de la malaltia. Fins i tot s'han establert correlacions entre la presència d'hipometabolisme en el còrtex

frontal, que és força heterogeni entre els diversos malalts, i una pitjor prognosi de la malaltia (Mann et al. 1992). Hi ha estudis que descriuen fins a 5 tipus o subgrups de pacients caracteritzats per diferents patrons d'alteracions cognitives, cadascun dels quals tindria unes característiques d'hipometabolisme cerebral concretes i ben diferenciades de la resta (Martin et al. 1986). Igualment, l'edat d'inici, la progressió i la severitat de la malaltia varia enormement entre els individus. Així, molts autors defensen que aquells pacients amb un inici primerenc tindran una supervivència menor, un deteriorament cognitiu més ràpid i major freqüència d'alteracions en el llenguatge (Rossor et al. 1984). De la mateixa manera, la presència d'afàsia, signes extrapiramidals, i alteracions de tipus psicòtic afavoriria un deteriorament cognitiu i funcional més ràpid (Miller et al. 1991). Una de les característiques més heterogènies en els malalts d'Alzheimer és la presència de simptomatologia no cognitiva, és a dir, l'existència de diferents patrons de tipus psiquiàtric en els diferents individus. De fet, aproximadament un de cada quatre malalts presenta simptomatologia psicòtica (majoritàriament deliris), i més del 70% presenta un quadre d'apatia més o menys sever (Mega et al. 1996). Patrons conductuals d'agitació (60% dels malalts), ansietat (48%), irritabilitat (42%), disfòria i comportament motor aberrant (38%) o desinhibició (36%) es presenten d'una forma molt heterogènia durant el transcurs de la malaltia. El fet que existeixi una clara associació entre l'aparició de manifestacions psicòtiques/conductuals, intensitat de l'afectació cognoscitiva i rapidesa de la evolució de la MA, suggereix la existència d'un subgrup de malalts definits per la presència d'un patró de tipus no cognitiu característic.

Així doncs, pacients amb uns criteris clínics comuns per a ser diagnosticats de malaltia d'Alzheimer, poden tenir uns patrons cognitius, de comportament i, fins i tot, d'imatge cerebral força diferents entre ells. Aquestes diferències en el propi fenotip de la malaltia obren noves qüestions sobre la seva etiologia. De fet, tal i com va anunciar Khachaturian (1992), avui dia no podem dir amb seguretat si la MA és una sola entitat



nosològica amb la varietat clínica i habitual d'un fenotip (de fet, quelcom freqüent en medicina), si és un complex sindròmic amb molts subtipus i varietats en les seves manifestacions (les diferències que apreciem tan sols representarien punts concrets d'un continuum, els quals vindrien donats per la pròpia metodologia emprada i, per tant, correspondrien a biaixos metodològics), o si realment es tractaria de diverses malalties amb varietats morfològiques i etiopatogèniques característiques que correspondrien a bases biològiques diferents però amb una simptomatologia similar.

### **3.5. FACTORS DE RISC EN LA MALALTIA D'ALZHEIMER**

Degut a la important repercussió individual, familiar i social que té la MA, hi ha hagut i s'estan duent a terme nombrosos estudis sobre els possibles factors de risc implicats en l'aparició de la malaltia. Aquests estudis permetran no només establir hipòtesis causals, sinó que seran cabdals per a l'aplicació de futures i importants estratègies preventives.

Fins a la data d'avui, s'han establert una gran quantitat de factors de risc que es podrien classificar en tres grans grups: en un primer grup hi haurien aquells factors ben establerts, és a dir, amb una gran associació, consistents i amb plausibilitat biològica; en un altre grup hi haurien els factors de risc probables, molt menys reproduïbles però amb un cert grau de consistència; finalment, els factors de risc possibles serien aquells que han estat postulats però que no sempre han estat detectats per d'altres estudis. Són doncs, els més discutits i, possiblement, els més dubtosos.

### **3.5.1. Factors de risc definitiu.**

Tots els estudis epidemiològics encaminats a esbrinar possibles mecanismes etiològics per a la MA indiquen, de forma consistent, que el principal factor de risc per a la demència senil de tipus Alzheimer és la pròpia edat de l'individu. Existeix un ràpid increment amb l'edat tant de la incidència com de la prevalença de MA. De fet, aquesta clara associació entre l'edat i la malaltia ha portat a la hipòtesi que la manifestació clínica de MA seria tan sols la presentació d'un envelliment prematur o exagerat, però les gràfiques de tendència de la incidència indiquen que, aquesta arribaria a valors propers al 100% en poblacions amb més de 120 anys.

Un altre factor de risc ben establert és l'acúmulo familiar de MA. S'estima que el 40% dels individus afectats de MA presenten un cert acúmulo familiar. L'estudi MIRAGE (Lautenschlager et al. 1996), que va analitzar un total de 12.971 familiars de 1.694 pacients, conclogué que el risc de patir la MA per a un individu amb un familiar de primer grau malalt, anava, des del 2,3% als 65 anys fins al 39% a l'edat de 96. Tanmateix, aquest risc era superior per a les dones que per als homes amb un familiar afectat. Així, l'estimació del risc de patir MA per a un individu amb un familiar de primer grau afectat seria de 2 a 3 cops el de la població. Tanmateix, aquest risc incrementaria en funció del nombre de familiars de primer grau afectats. Un estudi que agrupava un total de 11 anàlisis de tipus cas-control conclogué que el risc relatiu de patir MA en individus que eren familiars de primer grau de pacients amb Alzheimer era de 3,5 (95% interval de confiança entre 2,6 i 4,6) (van Duijn i Hofman 1992).

Tot i que no es pot descartar que l'acúmulo familiar de MA pot ser indicador d'un factor ambiental comú, aquests resultats apunten cap a un factor genètic de risc per a la MA. Això ve recolzat per estudis de risc duts a terme en bessons. Aquests estudis, que presenten una enorme quantitat de dificultats, permeten determinar el nivell d'influència genètica de la malaltia. Tot i que no són nombrosos, tots ells

suggereixen que la concordança, és a dir, la probabilitat que ambdós bessons estiguin afectats per la MA, oscil·la entre el 40 al 50% per a bessons monozigòtics i entre el 10 al 50% per als dizigòtics. (Pericak-Vance i Haines 1995). Com veurem més endavant (Capítol 4), existeixen gens, les mutacions dels quals provoquen la MA, que segreguen de forma mendeliana (autosòmica dominant). Igualment existeixen variants genètiques que incrementen la susceptibilitat de patir la malaltia, és a dir, confereixen un increment en el risc de desenvolupar MA respecte a la població que no té aquestes variants. Així doncs, existeixen factors genètics de risc per a la MA que són els causants de l'existència d'acúmul familiars de la patologia.

Els individus amb la síndrome de Down tenen un alt risc de presentar característiques clíniques i patològiques de MA si sobrepassen els 40 anys d'edat. Igualment, els familiars amb almenys un familiar de primer grau amb trisomia 21 poden arribar a tenir un risc relatiu global de 2,7 de patir MA. L'estudi de Schupf i col·laboradors (2001) atribueix un risc cinc cops més elevat a les dones que, quan tenien menys de 35 anys, van donar a llum un nadó amb la síndrome de Down en comparació amb el risc de les dones que havien tingut fills sense la síndrome (95% de l'interval de confiança estava entre 2,1 i 11,2).

### **3.5.2. Factors de risc probables.**

L'aparició de demència és quelcom freqüent en individus que han patit repetits episodis amb lesions craneals. Aquest és el cas dels boxejadors (demència pugilística), els quals presenten lesions neuropatològiques molt similars als de la MA. Igualment, els traumatismes craneoencefàlics amb pèrdua de consciència han estat associats amb la MA (Graves et al. 1990). Cal remarcar, però, que existeix una inconsistència de resultats. Així, l'estudi EURODERM (Launer et al. 1999) no va trobar cap associació entre els traumatismes i la MA.

La relació entre un menor nivell educatiu i un major risc de patir la MA és quelcom que ha estat constatat en nombrosos estudis. Tanmateix, en la literatura hi apareixen força treballs que ho desmenteixen. Així, per exemple, en els dos estudis de cohort, Rochester i Framingham, (Beard et al. 1992 i Cobb et al. 1995, respectivament) no s'ha evidenciat associació entre nivell cultural i incidència de MA. Pel contrari, un estudi realitzat al nord de Manhattan, amb una població més diversificada culturalment, els resultats van ser positius (Stern et al. 1994). També van aparèixer resultats positius en l'estudi de Qiu i col·laboradors (Qiu et al. 2001). En aquest cas es tractava d'un estudi de cohort realitzat en 1296 individus majors de 75 anys. Es va trobar una associació entre un baix nivell educatiu (menys de 8 anys) i un increment de la incidència de MA independentment de l'edat, del sexe, de presència de malaltia vascular i de l'estatus socioeconòmic (risc ajustat de 2,7 en les dones i 2,5 en els homes). Val a dir, però, que aquests tipus d'estudis pateixen d'un possible biaix de selecció. Això vindria donat pel fet que els individus amb demència i amb menor nivell cultural podrien ser diagnosticats en estadis primerencs de la malaltia degut a un menor rendiment en els diversos tests cognitius. D'altra banda, els individus amb un alt nivell cultural serien identificats posteriorment i, per tant, no serien inclosos en el primer grup.

La prevalença de la malaltia és, generalment, més gran en dones que en homes per a tots els grups d'edat (Alberca i López-Pousa 1998). Possiblement aquest fet es deu a l'efecte protector dels estrògens, ja que diverses investigacions han demostrat que les dones tractades amb hormones estrogèniques durant la menopausa tenen menys risc de patir MA. Aquesta hipòtesi ha estat recolzada per dades de laboratori que demostren que les hormones estrogèniques tenen un paper antioxidant (Sawada et al. 1998), tenen una funció inhibidora *in vitro* de la neurotoxicitat induïda pel pèptid A $\beta$  (Behl et al. 1992), augmenten la transmissió colinèrgica i serotoninèrgica (Miller i

Franklin 1999) i regulen, frenant l'alliberament de interleucines, la resposta immunitària que té lloc a la placa (McCarty 1999).

Factors de risc vascular com la hipertensió arterial crònica (HTA) i la diabetis, s'han associat a la MA (Skoog et al. 1996; Ott et al. 1996). Tot i que la relació entre HTA i la demència vascular és força evident, no se sap si els factors vasculars que tenen lloc en la MA serien conseqüència del propi envelliment i, per tant, quelcom independent de la MA o seria una part important de la fisiopatologia de la malaltia. Sigui com sigui, alguns estudis estimen que en més de la meitat dels casos amb MA hi ha alteracions de la substància blanca, sovint en forma de leucaraiosis periventricular, que podria indicar alteracions de tipus vascular. Igualment, una alta proporció de diagnòstics neuropatològics de MA tenen lesions típiques de malaltia cerebrovascular (Lim et al. 1999). L'exacerbació de canvis cerebrals de tipus degeneratius en individus amb factors de risc vascular podrien propiciar la predisposició o acceleració d'una patologia demenciant com la demència vascular o la MA (Meyer et al. 2000).

### **3.5.3. Factors de risc possibles.**

Tot i que hi ha diversos estudis que han atribuït un paper protector al fet de fumar tabac (Jones et al. 1992; van Duijn et al. 1991), caldria remarcar que aquests eren estudis de tipus cas-control i, per tant, estaven subjectes a errors deguts a l'elevada mortalitat que podien tenir els pacients fumadors respecte als fumadors no malalts. De fet, l'estudi de cohort efectuat pel grup EURODERM, on es va fer el seguiment de més de 12.000 persones que provenien de quatre estudis diferents (l'estudi Odense de Dinamarca, l'estudi PAQUID de França, l'estudi Rotterdam d'Holanda i l'estudi MRC-ALPHA del Regne Unit) conclogué que no existia cap efecte protector de l'hàbit tabàtic en la MA (Launer et al. 1999).

Diversos agents tòxics com els disolvents orgànics i l'alumini han estat associats amb la MA. Un estudi que avaluava la concentració d'alumini en aigua potable i la seva associació amb l'aparició de MA suggerí un possible paper etiològic d'aquest metall (McLachlan et al. 1996). Aquest fet, però, no ha estat confirmat per d'altres estudis i encara avui dia hi ha una gran controvèrsia al respecte.

Altres factors potencials de risc descrits en la literatura han estat, en llur majoria, poc estudiats i amb resultats poc congruents. L'exposició a agents vírics com l'herpes simplex, prions, anestèsia general o alteracions del sistema immunològic en són alguns exemples.

Per finalitzar, existeixen factors ambientals de tipus psicosocial, tals com l'estatus socioeconòmic, el grau d'activitat, i factors que fan referència a determinades personalitats premòrbides, que han estat avaluades des del camp de la psicogerontologia per tal d'establir-hi alguna relació amb la MA (Conde 1999).

## **4. ASPECTES GENÈTICS EN LA MALALTIA D'ALZHEIMER.**

La implicació de factors genètics de risc per a la MA ja es va evidenciar amb l'existència de diferents casos amb agregació familiar, els quals tenien una aparició primerenca (abans dels 65 anys) de la MA i en els quals s'hi observava un patró d'heretabilitat clarament de tipus autosòmic dominant. Avui se sap que aquestes formes familiars són conseqüència de diferents mutacions que es troben en tres gens: el gen que codifica la proteïna precursora del pèptid  $\beta$ -amiloide (APP), el gen de la presenilina 1 (PS1) i el gen de la presenilina 2 (PS2).

L'estudi d'aquestes proteïnes ha estat de gran utilitat per tal d'entendre millor l'etiopatogènia de la MA i ha permès el desenvolupament d'animals transgènics, els quals s'utilitzen com a models no humans de la MA.

Tot i així, el conjunt de totes aquestes formes d'Alzheimer en què hi ha un patró clarament genètic, correspon tan sols al 5% del total dels casos de la MA (Shastri i GIBLIN 1999). Per tant, aquests patrons mutacionals no són en absolut transferibles a la resta de malalts amb una aparició esporàdica o bé un cert acúmulo familiar, però que en cap cas segueixen un patró autosòmic dominant com el descrit anteriorment.

### **4.1. Formes familiars presenils de la malaltia d'Alzheimer**

Com s'ha esmentat anteriorment, aproximadament el 5% del total de casos de MA presenten un patró d'herència familiar de tipus autosòmic dominant amb penetrància gairebé completa (més del 85%). L'existència d'aquestes formes d'Alzheimer va permetre identificar els tres gens que es troben implicats en aproximadament el 50% d'aquests casos: APP, PS1 i PS2.

#### 4.1.1. APP: mutacions i metabolisme

L'any 1987 es va publicar el que esdevindria el primer lligament genètic significatiu en la MA (St George-Hyslop et al. 1987). Es tractava d'un lligament en el braç llarg del cromosoma 21. Gairebé al mateix temps, es va localitzar al cromosoma 21 el gen que codificava per la proteïna precursora del pèptid  $\beta$ -amiloide (APP), el qual se sabia que era el component principal de la placa senil (Goldgaber et al. 1987). Degut a que estudis posteriors no van trobar el mateix lligament en el cromosoma 21, es va arribar a la conclusió que hi havia d'haver un cert grau d'heterogeneïtat genètica per a les formes primerenques amb segregació de tipus mendelià de la MA. No fou fins l'any 1991 que es va trobar la primera mutació en el gen APP, la qual segregava amb la malaltia en un conjunt de famílies (Goate et al. 1991). La mutació provoca un canvi de valina a isoleucina en la posició 717, prop de la regió carboxi terminal de la proteïna precursora de l'amiloide. Fins a la data d'avui s'han descrit unes 10 mutacions en el gen APP que causen la forma presenil de MA (un llistat actualitzat de mutacions es pot trobar a l'adreça web <http://www.alzforum.org/home.asp> i a l'adreça de la base de dades del Human Gene Mutation <http://uwcmm1s.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/119692.html>). Aquestes mutacions s'han trobat en unes 20 famílies i s'estima que representen el 5% dels casos amb la forma autosòmica dominant de la MA.

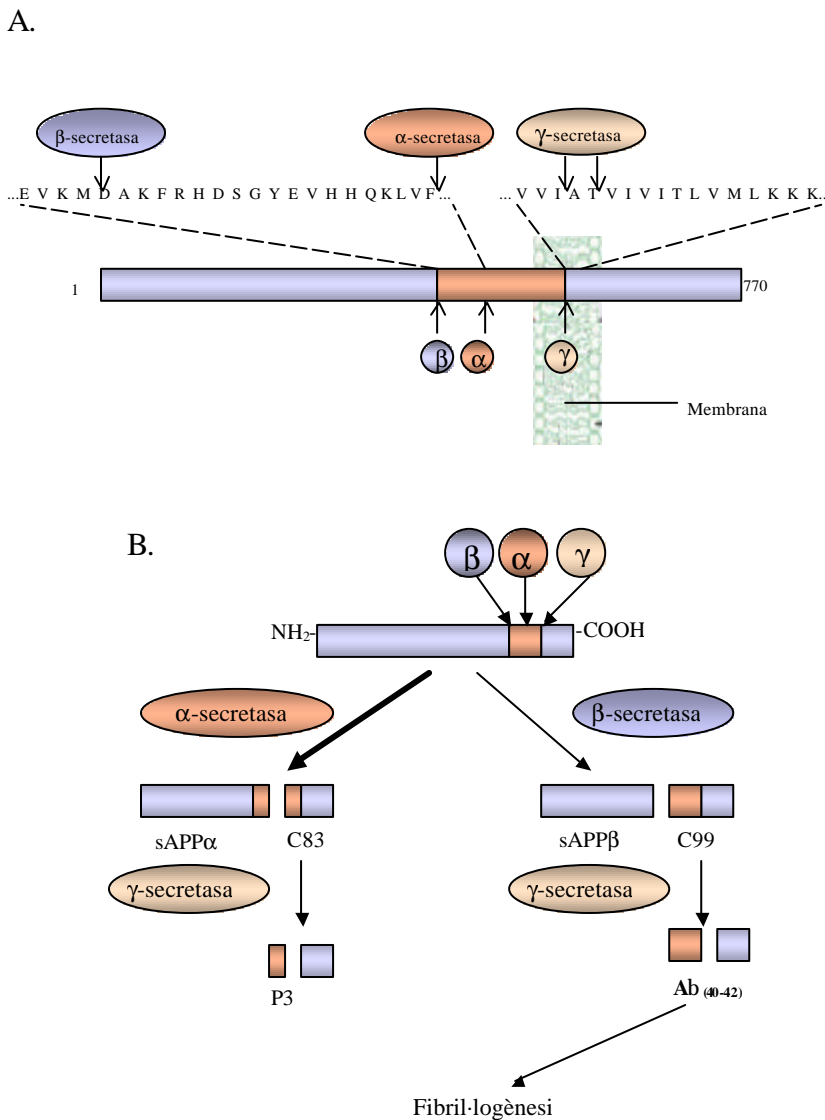
És important remarcar que les mutacions descrites en el gen APP no es troben repartides al llarg de tota la proteïna, sinó que es troben sempre ubicades en regions força concretes. Això es deu al fet que aquestes regions són crítiques per al processament fisiològic de la proteïna precursora de l'amiloide i, per tant, mutacions en aquests segments afecten significativament el metabolisme normal de l'APP.

Aquest processament proteolític de l'APP té lloc mitjançant l'acció de diverses proteases, anomenades  $\alpha$ -secretasa,  $\beta$ -secretasa i  $\gamma$ -secretasa (Figura 4). Tal i com s'ha



esmentat anteriorment, l'APP és una glicoproteïna transmembrana de tipus 1, és a dir, travessa la membrana per un únic lloc, té l'extrem carboxi-terminal en el citoplasma i l'amino-terminal orientat cap al lúmen o espai extracel·lular. Tot i que existeixen diverses isoformes d'APP amb pesos moleculars diferents com a resultat de processos d'empalmament (*splicing*) alternatiu, la forma més gran conté 770 aminoàcids. Aquesta holoproteïna pateix un primer tall endoproteolític mitjançant l'acció, mútuament excloent, de l' $\alpha$ -secretasa o la  $\beta$ -secretasa (Figura 4). En el cas que hi actui l' $\alpha$ -secretasa, el tall s'efectua entre els residus Lys687 i Leu688, que corresponen als residus 16 i 17 del pèptid  $\beta$ -amiloide respectivament. Això provoca l'alliberament de l'extrem extracel·lular amino-terminal, el qual és soluble i rep el nom de sAPP $\alpha$ . Resta, però, un altre fragment menor, que roman inclòs a la membrana, anomenat C83. Aquest fragment és endocitat i processat posteriorment per la  $\gamma$ -secretasa, que podrà tallar C83 per les posicions 712, 714 o 715 d'APP (que correspon a les posicions 40, 42 o 43 del pèptid A $\beta$ ). Així doncs, l'acció consecutiva de l' $\alpha$ -secretasa i la  $\beta$ -secretasa provocaran que apareguin pèptids no amiloidogènics, degut a que l'acció proteolítica de l' $\alpha$ -secretasa no permet que es formi el pèptid A $\beta$  sencer. Això ha portat a que es conegui aquesta via com a via no amiloidogènica. D'altra banda, existeix una via menys comú de processament de l'APP, en què hi participen la  $\beta$ -secretasa i la  $\gamma$ -secretasa. La  $\beta$ -secretasa talla l'APP entre els residus Met671 i Asp672, alliberant una fracció carboxi-terminal soluble anomenada sAPP $\beta$  i un fragment de membrana (anomenat C99), que esdevindrà el substrat de la  $\gamma$ -secretasa. El processament de C99 per la  $\gamma$ -secretasa serà idèntic al de C83, és a dir, per els mateixos residus 712, 714 o 715. En aquest cas es podran generar tres possibles pèptids. Aquests pèptids tindran majoritàriament 40 aminoàcids (que correspondran al resultat del tall per la posició 712) però podran tenir, en menor proporció, 42 o 43 aminoàcids, atenent al lloc concret del tall efectuat per la  $\gamma$ -secretasa. Aquests pèptids

(anomenats respectivament  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$  o  $A\beta_{43}$ ) formaran els autoagregats que constitueixen les fibres insolubles que es troben en els dipòsits amiloides. Cal dir que els que tenen 42 o 43 residus tenen una naturalesa molt més insoluble, la qual cosa provoca que i formin les fibres molt més ràpidament que les que posseeixen 40 aminoàcids. Així doncs, la participació de la  $\beta$ -secretasa i la  $\gamma$ -secretasa en el processament de l'APP donen lloc al pèptid  $\beta$ -amiloide, fet que ha portat a anomenar aquesta via com a via amiloidogènica (Small 1998; Sisodia i St George-Hyslop 2002).



**Figura4.**

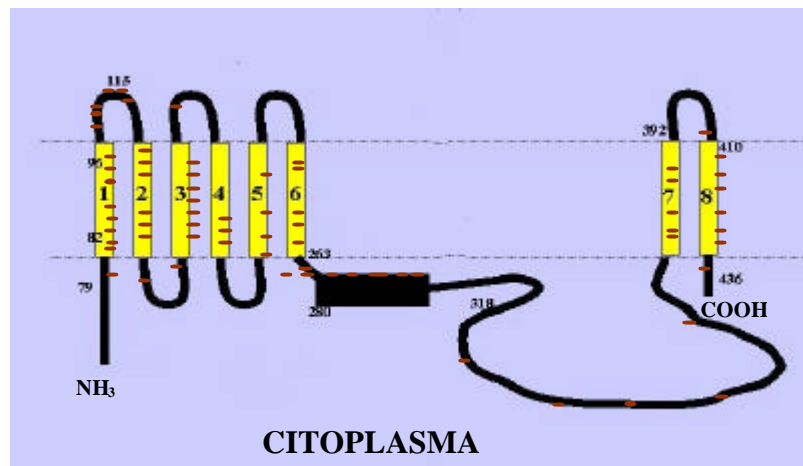
**A.** Representació esquemàtica de l'APP. La seqüència aminoacídica del pèptid  $A\beta$  està representada en la part superior. Igualment, hi figuren les localitzacions concretes de processament del pèptid per les diverses secretases.

**B.** Processament de l'APP. La via més comuna és la no amiloidogènica, en què hi participen l' $\alpha$  i la  $\gamma$ -secretasa. La ruta amiloidogènica és duta a terme per la  $\beta$  i la  $\gamma$ -secretasa i forma el pèptid  $A\beta$ , que es pot agregar de forma esponània i ser neurotòxic.

#### **4.1.2. Gen PS1**

Havent-se demostrat que les mutacions en el gen APP explicaven tan sols una petita fracció del total de casos amb MA de tipus autosòmic dominant, tot apuntava que havien d'existir d'altres loci que expliquessin la resta de casos que manifestaven aquesta forma de MA. Utilitzant anàlisis de lligament genètic, Schellenberg i col·laboradors (1992) van identificar un locus al cromosoma 14. A diferència del que succeí amb el gen APP, aquest locus va resultar ser el responsable de la majoria de famílies que presentaven la forma mendeliana de MA. Aquesta troballa va provocar l'inici d'una carrera per a trobar el nou gen, però no fou fins tres anys més tard que, analitzant un total de 21 famílies diferents amb MA autosòmica dominant, es va arribar a clonar i caracteritzar el gen responsable d'aquestes formes familiars, el qual va ser anomenat S182 (Sherrington et al. 1995). Avui dia ja s'han descrit més de 100 mutacions diferents, les quals causen MA en un rang de presentació que va des dels 28 fins als 65 anys d'edat, depenent de la localització i naturalesa de l'aminoàcid substituït. El gen va ser anomenat poc després presenilina 1 (PS1) i codifica per una proteïna que s'expressa de forma ubiqüa. Mitjançant modelitzacions informàtiques a partir de l'estructura primària dels 463 aminoàcids que conformen la proteïna, es va determinar que aquesta podia tenir fins a 7 segments transmembrana (Sherrington et al. 1995). Tot i així, un elegant estudi en què es van construir proteïnes híbrides en les quals s'hi anava afegint l'activitat  $\beta$ -galactosidasa en diversos punts de la proteïna SEL-12 de *C. elegans* (homòloga a la presenilina humana), i en què s'analitzava consecutivament l'activitat  $\beta$ -galactosidasa (activa només en regions intracitoplasmàtiques i no en compartiments extracitosòlics), va demostrar que la presenilina 1 consta de 8 segments transmembrana més dues regions associades a la membrana però sense travessar-la (Figura 5). Igualment, l'extrem aminoacídic i carboxi-terminal es troben ubicats a la regió citoplasmàtica (Li i Greenwald 1996). Tal

i com es mostra a la Figura 5, les mutacions que s'han trobat a la PS1 no sembla que es localitzin en zones concretes de la proteïna, sinó que aquestes es troben distribuïdes al llarg de tota la seva estructura. Això podria ser un bon indicador de la importància que la integritat de la proteïna té per a la seva correcta funció.



**Figura 5.** Representació esquemàtica de la presenilina 1, amb els 8 dominis transmembrana i un domini hidrofílic, situat entre els segments 6 i 7. Els cercles representen les zones on s'han descrit algunes de les mutacions de les formes familiars de MA.

D'altra banda, estudis com el que van dur a terme el prestigiós grup d'investigació dirigit per el Dennis Selkoe (Wolfe et al. 1999) van arribar a la conclusió que la PS1 podria estar implicada en el processament de l'APP degut a que tindria una activitat de  $\gamma$ -secretasa. Això concordaria perfectament amb el fet que diverses mutacions del gen APP o del gen PS1 poguessin donar el mateix fenotip, degut a que els dos tipus de mutacions provocarien, en última instància, l'augment del pèptid  $\beta$ A. Tot i així, cal dir que, fins al moment, no s'ha demostrat que PS1 i APP, o els fragments susceptibles de ser processats per la  $\gamma$ -secretasa, es trobin localitzats físicament junts o, si més no, en el mateix compartiment cel·lular. Això ha portat a parlar de l'anomenada "paradoxa espacial" (Cupers et al. 2001).

### 4.1.3. Gen PS2

Poc després de la troballa del gen PS1, i gràcies als resultats del projecte de seqüenciació del genoma humà, es va trobar una seqüència molt similar en el cromosoma 1 (Rogaev et al. 1995). Es tractava d'un gen paràleg a la PS1, que codificava una proteïna de 448 aminoàcids, i compartia el 63% de similitud amb la PS1 (la identitat arribava al 84% en els dominis hidrofòbics). Aquest gen, que al principi se'l va anomenar E5-1, però que després fou anomenat PS2, també provocava una forma mendeliana de MA quan estava mutat. Les mutacions van ser trobades en una sèrie de famílies de colons d'una ètnia germànica que foren instal·lats pels tsars en la regió del Volga (Rússia) durant els segles XVII i XIX i que en els darrers 100 anys han anat emigrant als Estats Units i Alemanya (Bird et al. 1988). A data d'avui, tan sols s'han trobat 6 mutacions diferents en el gen PS2, les quals es diferencien de les de PS1 en que causen la MA amb una edat de presentació molt variada i fins i tot amb penetrància incompleta (Sherrington et al. 1996).

En resum, hi ha descrits tres gens, les mutacions dels quals poden causar la forma familiar, presenil de MA. Aquest subtipus de MA s'hereta de forma autosòmica dominant i representa tan sols el 5% del total de casos d'Alzheimer. Tot i així, en gairebé la meitat dels casos amb MA d'herència autosòmica dominant no s'ha trobat cap mutació en aquests gens. Això pot significar que és força probable que hi hagi d'altres gens, encara no identificats, les mutacions dels quals causen el mateix fenotip que els gens PS1, PS2 o APP. També és important assenyalar que en totes les formes genètiques de MA existeix un augment en la producció total del pèptid A $\beta$ , fet que ha portat a la hipòtesi etiològica de la "*cascada amiloide*" (Hardy i Allsop 1991).

## **4.2. Formes tardanes de la malaltia d'Alzheimer**

La forma tardana (amb més de 65 anys d'edat) de MA és molt més comuna que la primerenca i representa aproximadament el 95% del total dels casos. En aquests casos, però, existeix una major dificultat en la recerca de gens associats a la malaltia. Això es deu a la gran dificultat que representa aconseguir famílies nombroses on hi hagi un cúmul familiar de MA de presentació tardana, fet que dificulta enormement els estudis clàssics d'associació. Igualment, existeix una gran heterogeneïtat genètica, que implica l'existència de molts gens amb efectes diversos. Aquests gens no seran determinants, sinó que hi haurà al·lels que donaran a l'individu una susceptibilitat augmentada de patir la malaltia. Aquesta susceptibilitat serà, a més, modulada per d'altres gens, els quals podran tenir efectes protectors o potenciadors sobre els gens de susceptibilitat. Igualment, el fet que la MA sigui una malaltia complexa implica que els factors ambientals tenen una incidència en el fenotip final. Per aquestes raons, l'estudi de factors genètics de risc en la forma tardana de MA ha tingut i està tenint unes grans dificultats. Tot i així, la gran quantitat d'esforços ha donat alguns resultats prometedors. De fet, es coneix un gen (APOE), una variant del qual confereix un risc incrementat de patir MA. Igualment, hi ha una gran quantitat de gens que s'han associat a la malaltia. Malauradament, moltes d'aquestes associacions no han estat replicades en posteriors estudis, fet que fa difícil de discernir si les diverses associacions trobades són certes, però potser limitades a un grup particular de malalts, o bé es tracta de possibles errors estadístics (error tipus 1) però sense cap rellevància biològica.

#### **4.2.1. Apolipoproteïna E (APOE)**

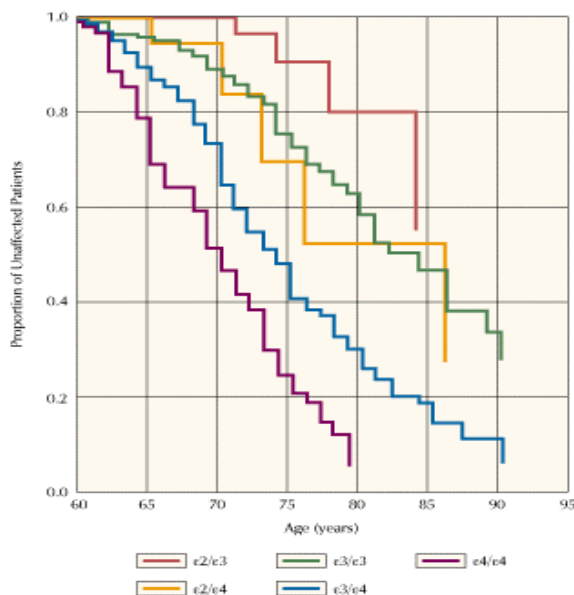
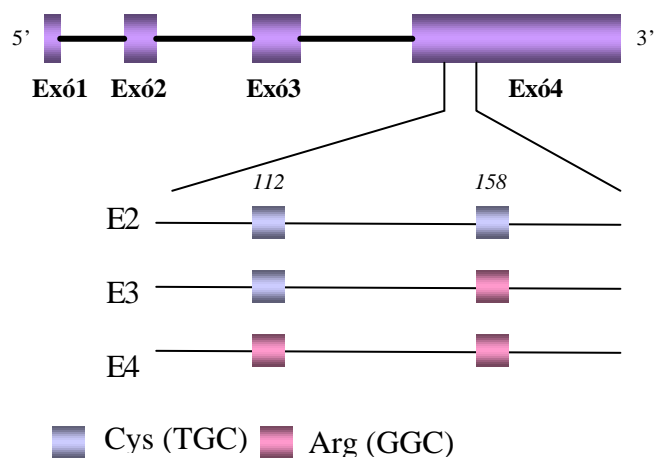
L'any 1991, estudis de lligament genètic amb pedigrís amb agregació familiar de la MA d'aparició tardana, van donar evidències d'un nou locus de susceptibilitat a prop dels marcadors *BCL3* i *ATPIA3*, els quals mapaven al cromosoma 19q12-q13 (Pericak-Vance et al. 1991). Un cop localitzada la situació d'un potencial gen de susceptibilitat per a la MA, els esforços es van concentrar en la identificació de possibles gens candidats que mapaven en aquesta regió. Degut a que l'apolipoproteïna E (ApoE) s'havia trobat associada a la placa senil i als cabdells neurofibril·lars, i es trobava a prop d'aquest locus, diversos grups van analitzar, amb èxit, el possible paper que els diversos al·lels del gen que codificava per l'apolipoproteïna E (APOE) podien tenir en la manifestació de la MA d'aparició tardana, tant en les formes familiars com en les esporàdiques (Corder et al. 1993; Saunders et al. 1993; Strittmatter et al. 1993). L'associació va ser trobada en un al·lel concret del gen APOE, l'al·lel  $\epsilon 4$ , el qual estava sobrerrepresentat en els malalts d'Alzheimer. De fet, aquesta proteïna que ja era coneguda aleshores degut a la seva implicació en el metabolisme del colesterol. Es tracta d'una lipoproteïna plasmàtica de 37 kDa de pes molecular i formada per 299 aminoàcids. L'APOE s'expressa en una gran quantitat de teixits però principalment es sintetitza en el fetge (Dang et al. 1995), formant part de les lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL), les quals estan implicades majoritàriament en el transport de triglicèrids des del fetge a la resta de l'organisme. També forma part de les lipoproteïnes d'alta densitat (HDL), que participen en la redistribució del colesterol entre les cèl·lules, i dels quilomicrons, formant part en el procés de transport dels triglicèrids i colesterol que s'obtenen de la dieta. La naturalesa polimòrfica de l'apoE ja va ser establerta per Utermann i col·laboradors l'any 1980 utilitzant enfocament isoelèctric (Utermann et al. 1980).

Se sabia, doncs, que la proteïna codificada pel gen APOE presenta tres variants o al·lels que corresponen a les tres isoformes principals de l'ApoE. Aquestes variants al·lèliques són la  $\epsilon 2$  (amb una freqüència aproximada a la població general del 6%), la  $\epsilon 3$  (representa un 78% dels al·lels) i, finalment, la  $\epsilon 4$  (amb una representació del 16%). Aquestes tres isoformes es caracteritzen per la presència dels aminoàcids cisteïna o arginina en les posicions 112 i 158 de la proteïna. Així, quan en les dues posicions hi ha l'aminoàcid cisteïna es tracta de la isoforma ApoE2, si en la posició 112 hi ha una cisteïna però en el residu 158 una arginina, parlarem de la isoforma ApoE3 (el qual s'ha demostrat que és l'al·lel ancestral) i, finalment, si en les dues posicions hi ha una arginina, ens referirem a la isoforma ApoE4. Aquests polimorfismes es poden determinar d'una forma més fàcil i ràpida mitjançant l'amplificació del DNA per PCR, seguit de la digestió del producte amplificat per un enzim de restricció i posterior electroforesi amb gel d'acrilamida (Wenham et al. 1991). Utilitzant doncs, aquesta tècnica, ja sigui en un conjunt de famílies o bé en casos esporàdics de la MA, es va trobar que l'al·lel  $\epsilon 4$  del gen APOE es trobava significativament incrementat en els malalts. Així, mentre que la freqüència de l'al·lel  $\epsilon 4$  en individus sans era d'aproximadament el 15%, aquesta s'incrementava fins a valors d'entre 40 i 50% en els malalts (Corder et al. 1993; Saunders et al. 1993; Strittmatter et al. 1993). Igualment, es va trobar que hi havia un efecte de dosi gènica per a l'al·lel  $\epsilon 4$ . Això volia dir que el risc de patir la MA incrementava substancialment en funció del número de còpies de l'al·lel  $\epsilon 4$  que es posseïen. Aquests resultats han estat reproduïts per una gran quantitat d'estudis que s'han dut a terme amb posterioritat. A mode de resum, podríem dir que tots els estudis conclouen que el risc de patir la MA si s'és portador d'una còpia de l'al·lel  $\epsilon 4$  del gen APOE (individus heterozigots) aniria des de valors de 1,1 fins a 5,6 respecte la població sense l'al·lel  $\epsilon 4$ . Igualment, els individus portadors de dos al·lels  $\epsilon 4$  (homozigots) tindrien riscos que anirien des de 2,2 fins a 33,1



(segons dades extretes del meta-anàlisi efectuat per Farrer i col·laboradors, 1997). D'altra banda, l'al·lel  $\epsilon 2$  del gen APOE es troba sotarepresentat en el grup de malalts quan es compara amb població envellida sense MA. Quan es comparen els riscos de patir MA per als individus portadors del genotip  $\epsilon 2/\epsilon 3$  respecte aquells amb, almenys, un al·lel  $\epsilon 4$ , es pot comprovar que el risc és de 0,6. Per tant, l'al·lel  $\epsilon 2$  podria ser considerat com a un al·lel protector per a la MA. Cal assenyalar que diversos estudis indiquen que l'associació entre l'al·lel  $\epsilon 4$  i la MA va disminuint a mesura que avança l'edat de l'individu.

**Figura 6.** Estructura del gen APOE. Es tracta d'un gen que té 3,7 kilobases i que conté 4 exons. Les tres possibles isoformes de la proteïna presents en humans venen donades per la presència de cisteïna o arginina en els codons 112 o 158 del gen, els quals es troben a la regió 5' de l'exó 4. La combinació dels al·lells en les diferents posicions donarà com a resultat els 6 possibles genotips.



**Figura 7.** Representació del percentatge d'individus no afectats de MA en funció de l'edat i del genotip APOE. La mitjana d'edat de presentació de la malaltia va ser anterior als 70 anys en els subjectes homozigots per a l'al·lel  $\epsilon 4$ , mentre que pels heterozigots  $\epsilon 2/\epsilon 3$  va ser de 90 anys. La tendència de la gràfica suggereix que la totalitat de la població es veuria afectada de MA si el temps de vida fos superior als 140 anys, independentment del genotip APOE. De A.D.Roses, Duke University.

Igualment, el possible efecte protector de l'al·lel  $\epsilon 2$  és menys clar en els casos on la MA ha aparegut en edats més primerenques, on fins i tot s'ha associat a un curs més agressiu de la malaltia (Rebeck et al. 1994; van Duijn et al. 1994). També s'ha observat que els individus portadors de l'al·lel  $\epsilon 2$  presenten la malaltia a edats posteriors (Corder et al. 1994).

#### **4.2.1.1. Mecanismes d'actuació de l'APOE en la malaltia d'Alzheimer**

Existeix una gran quantitat d'estudis que intenten explicar els possibles mecanismes pels quals les diferents isoformes d'ApoE poden incidir en el procés patogènic que té lloc en la MA. La majoria d'aquests estudis suggereixen que el processament de l'APP es troba influenciat pels polimorfismes  $\epsilon 4$  i  $\epsilon 2$  de l'APOE. Els estudis *in vitro* indiquen que existeix una interacció directa entre l'APOE i els productes i metabolits de l'APP. De fet, els experiments demostren que existeix una afinitat diferent entre les diverses isoformes d'APOE i el pèptid  $A\beta$ , de manera que l'APOE $\epsilon 4$  s'hi uniria amb molta més afinitat (Strittmatter et al. 1993). L'APOE, a més, té una funció de chaperona, accelerant el procés de formació de fil·laments amiloides a partir de la polimerització del pèptid  $A\beta$  (Ma et al. 1994). Aquesta formació de fibres amiloides a partir del pèptid  $A\beta$  té lloc de forma més ràpida i eficaç amb la presència de l'al·lel  $\epsilon 4$  d'APOE. L'al·lel  $\epsilon 4$  també condiciona una edat d'inici més primerenca amb individus amb mutacions patogèniques en el gen APP (Beffert et al. 1999). Ratolins transgènics que sobre expressen la proteïna APP amb la mutació Val717Phe desenvolupen grans quantitats de dipòsits d' $A\beta$  extracel·lulars als 9 mesos d'edat si tenen intacte el gen APOE. En canvi, els ratolins sense el gen APOE (*knockouts*) però portadors de les mateixes mutacions en el gen APP, tenen una

reducció dràstica dels dipòsits amiloides, fet que confereix a l'apolipoproteïna E un paper important en la formació de la placa senil (Bales et al. 1997).

Existeixen d'altres evidències que postulen l'existència d'una relació directa entre els cabdells neurofibril·lars i l'APOE. Experiments *in vitro* indiquen que les isoformes ApoE-E2 i ApoE-E3 s'uneixen amb més afinitat a la proteïna TAU que la ApoE-E4, reduint així la capacitat d'autoagregació de TAU, al inhibir la seva autofosforil·lació (Strittmatter et al. 1994).

Un altra fenomen que relaciona l'APOE amb la MA és la existència d'una activitat antioxidant diferent per part dels cultius cel·lulars en funció de les diverses isoformes d'ApoE, quan aquests s'exposen al pèptid A $\beta$ . En aquest sentit, s'ha descrit que la presència de la isoforma ApoE-E4 confereix una activitat antioxidant significativament menor que les altres dues isoformes (Miyata i Smith 1996).

Finalment, s'ha suggerit que l'APOE podria estar involucrada en la plasticitat sinàptica que té lloc durant la regeneració i reparació neuronal. L'al·lel  $\epsilon$ 4 tindria una capacitat més limitada de dur a terme aquesta funció (Nathan et al. 1994). Això significaria que la possessió d'aquest al·lel podria incidir negativament en la resposta a lesions (traumatismes craneals), i, potser, en l'aprenentatge i resposta neuronal als processos que tenen lloc en durant l'envelliment de l'individu.

Sigui com sigui, la presència de l'al·lel  $\epsilon$ 4 del gen APOE no és una condició ni necessària ni suficient per a patir la MA. De fet, gairebé la meitat dels individus malalts no tenen cap al·lel  $\epsilon$ 4. Aquest fet indica clarament que han d'existir d'altres gens, amb efectes més o menys importants, que incidiran en el risc de patir la MA.

#### 4.2.2. Altres gens de risc en la forma tardana de la MA

S'estima que del 30% al 70% de la variabilitat genètica que té lloc en la MA es pot explicar per diversos loci que encara no s'han trobat (Daw et al. 2000). Els mateixos autors, analitzant 75 famílies on 282 individus estaven afectats i 318 no ho estaven, i en els quals no s'havia trobat cap mutació en els gens APP, PS1 i PS2, van concloure que havia d'existir de 4 a 7 gens a part de l'APOE amb un efecte significatiu en l'edat de presentació de la MA. És més, un d'ells tenia que representar el 50% de la variabilitat genètica present en la MA. Tanmateix, les diferents estratègies que s'han utilitzat per tal d'identificar aquests nous loci han donat resultats contradictoris i poc congruents.

Els esforços per conèixer aquests loci addicionals s'han dut a terme mitjançant dues estratègies principals: l'anàlisi de lligament del genoma sencer (*whole-genome scan*) i els estudis d'associació en gens candidats. Pel que fa al primer tipus d'aproximació, es mesura la cosegregació de marcadors genètics (per exemple, microsatèl·lits) i el fenotip (en aquest cas, la presència o absència de MA) en individus que pertanyen a una mateixa família. En aquests estudis es poden incloure (models paramètrics) o no (models no paramètrics) especificacions sobre el mode de transmissió, les freqüències al·lèliques i les penetràncies del locus de susceptibilitat. Tot i que els models paramètrics són més eficaços, la pròpia naturalesa complexa que té la MA fa que aquests no puguin ser emprats per a l'estudi de les formes tardanes, no mendelianes, d'Alzheimer. Igualment, aquest tipus d'aproximacions en l'estudi de la MA tenen els inconvenients de treballar amb dades familiars incompletes degut a la tardana presentació de la malaltia, que fa que sovint no es puguin obtenir les dades genètiques dels pares dels malalts o les dades d'individus que van morir abans de desenvolupar la malaltia. Un altre dels problemes que tenen aquests tipus d'estudis és l'existència de fenocòpies, és a dir, individus amb formes no genètiques de la malaltia

o que pateixen d'altres formes de declivi cognitiu associat a l'edat (Bertram i Tanzi 2001). En aquests casos, estudis duts a terme amb 500 o fins i tot 1.000 famílies podrien no ser suficients per a la recerca de factors genètics amb efectes menors o moderats. Els diversos resultats obtinguts utilitzant aquestes tècniques han donat evidències més o menys importants de lligament amb la MA en regions del cromosoma 9 (Pericak-Vance et al. 1997), del cromosoma 10 (Bertram et al. 2000b; Ertekin-Taner et al. 2000; Myers et al. 2000) del cromosoma 12 (Pericak-Vance et al. 1997) o del cromosoma X (Zubenko et al. 1998). D'altres estudis han trobat associacions significatives en regions del cromosoma 1, 9, 10 i 19 (Kehoe et al. 1999a). Igualment, utilitzant un model de lligament que permetia incloure covariables que podien estar relacionades amb l'heterogeneïtat de locus i, per tant, permetia descobrir nous loci relacionats amb la malaltia però que havien estat ignorats degut a la pròpia heterogeneïtat, es va trobar un senyal important de lligament en el braç curt del cromosoma 20 (Olson et al. 2002).

La disparitat de tots aquests resultats pot respondre al fet que aquests mètodes no siguin prou sensibles per trobar gens amb efectes menors, que pot donar lloc a falsos positius i incongruències en els diversos resultats. De fet, ha estat suggerit que la millor aproximació metodològica per a la recerca d'aquests tipus de loci amb efectes moderats o menors en malalties complexes són els estudis d'associació (Risch i Merikangas 1996). Aquests tipus d'estudis es basen en la comparació de freqüències al·lèliques o genotípiques entre malalts i no malalts (controls) de gens que codifiquen per proteïnes que estan involucrades en el procés fisiopatològic de la malaltia. La capacitat de detecció d'una possible associació utilitzant aquest tipus de metodologia depèn de diversos factors: (1) el grau de desequilibri de lligament entre el marcador i l'hipotètic gen de susceptibilitat; (2) la freqüència en què es troba l'al·lel; (3) la fracció de recombinació que hi ha entre el marcador i el gen relacionat amb la malaltia; (4) l'increment del risc atribuïble al locus que s'està considerant; i (5) la penetrància del

locus en concret (Weeks i Lathrop 1995). Tanmateix, aquests tipus d'estudis no estan exempts de problemes. Un d'aquests problemes és l'existència de falsos positius (errors de tipus I), és a dir, l'associació estadísticament significativa entre el polimorfisme estudiat i el fenotip com a resultat fortuït d'haver utilitzat una mostra concreta, però sense cap rellevància biològica real. Quelcom que s'utilitza per tal d'evitar els falsos positius que es deuen a l'atzar és la correcció de Bonferroni. Tot i així, cal remarcar la naturalesa conservativa d'aquest mètode estadístic, el qual pot esdevenir excessiu a mesura que el nombre de tests realitzats incrementen. Això pot provocar que s'acabin produint falsos negatius degut al rebuig de casos no extrems però en què realment hi existeix una associació. Una altra dificultat en aquests tipus d'estudis és la d'evitar la possible estratificació en la població a analitzar. Aquesta situació apareix quan els casos i els controls no només difereixen respecte llur fenotip, sinó que també representen poblacions diferents, és a dir, genèticament llunyanes i per tant, diferenciades. Això pot implicar que l'espectre general de polimorfisme pot ser força diferent entre ambdues subpoblacions, fet que pot donar associacions positives en marcadors que són totalment irrellevants. Un problema afegit en els estudis d'associació és l'existència d'heterogeneïtat, és a dir, l'etiologia subjacent pot incloure una gran quantitat de factors genètics i/o ambientals diferents, els quals poden interactuar entre sí. Això comporta la no existència de cap marcador genètic que sigui suficientment predictiu de malaltia en l'escala pràctica de l'experiment. Finalment, un problema important que estan tenint aquests tipus d'estudis i que s'estan accentuant en els darrers anys és l'existència de biaix de publicació, és a dir, la tendència a publicar molt més freqüentment aquells estudis en què es descriu una associació positiva (sigui certa o no) que els que descriuen associacions negatives, creant una impressió distorsionada sobre una possible causa genètica que provoqui un fenotip concret.

Tot i els possibles problemes que poden presentar els mètodes d'associació, podem trobar una gran quantitat de treballs en què s'ha intentat esbrinar el possible

paper que un marcador genètic determinat pugui tenir en la manifestació de la MA. Molts d'aquests treballs han trobat associacions més o menys importants entre el marcador analitzat i la malaltia. Tot i així, cal dir que, sovint, aquestes associacions no han pogut ser replicades per altres autors.

La Taula 3 conté un resum d'alguns dels gens que s'han associat amb la MA. Tal i com es pot apreciar, existeix una clara manca de replicabilitat en la majoria d'associacions descrites. Tot i que *a priori* podríem pensar que aquestes incongruències en els resultats podrien venir donades per errors de tipus I, és a dir, per falsos positius, cal dir que també poden provenir de l'existència d'una gran disparitat en el disseny dels estudis, tot i que s'analitzi un mateix polimorfisme. Així, per exemple, la grandària de la mostra pot variar molt d'un estudi a un altre, la qual cosa pot provocar divergències en els resultats, degudes a la grandària mostral i no al propi efecte del gen. Les associacions lleus (potser quantitativament poc importants) poden ser detectades només en mostres de grandària elevada i poden passar desapercebudes en mostres menors, la qual cosa genera una aparent manca de replicació. De la mateixa manera, existeixen estudis duts a terme amb un nombre molt baix d'individus, els quals no han trobat associacions significatives, fet que pot respondre a un baix poder estadístic. Tanmateix, degut a la mateixa exigüitat de la mostra es poden estimar els nivells d'associació amb una desviació palesa respecte el valor real. El cas concret de sobreestimació rep el nom d'efecte "jackpot". En aquests casos, es descriu un efecte important d'un gen que estudis posteriors no troben tan important o, fins i tot, poden no trobar. Igualment, diversos estudis que descriuen la mateixa associació positiva poden respondre en realitat a processos d'estratificació diferents. Així, per exemple, l'associació descrita per al gen ACE (Kehoe et al. 1999b) utilitzant la totalitat de la mostra, és replicada posteriorment (Farrer et al. 2000) però només en el subgrup format pels individus amb edats compreses entre els 66 i els 70 anys. Un altre exemple és l'associació entre el gen LRP i la MA descrita pel grup de Kang (Kang et al. 1997).

En aquest cas, l'associació tan sols és significativa en el subgrup de pacients amb aparició tardana de la malaltia però amb història familiar d'Alzheimer, mentre que no ho és en el subgrup de pacients que presenten la forma esporàdica (no familiar) de la malaltia. Tanmateix, l'associació és descrita posteriorment en la forma esporàdica tardana de la MA (Lambert et al. 1998b). De la mateixa manera, els processos d'estratificació poden donar lloc a resultats contraposats. Aquest és el cas de l'associació descrita per al gen de la Bleomycin Hydrolase (BH) (Montoya et al. 1998). En aquesta ocasió, l'associació que es va trobar analitzant la totalitat de la mostra (OR=2,05) provenia únicament del subgrup d'individus que no posseïen cap al·lel  $\epsilon 4$  del gen APOE (OR=3,81), mentre que les freqüències gèniques van resultar ser idèntiques entre el grup de controls i malalts que tenien algun al·lel  $\epsilon 4$  (OR~1). Posteriorment es va descriure l'efecte contrari (Papassotiropoulos et al. 2000b): la sobrerepresentació del genotip de risc en els malalts es trobava tan sols en el grup que era portador de l'al·lel APOE- $\epsilon 4$ . Aquest fet, doncs, suggereix que el propi procés d'estratificació ha provocat una associació espúria en un subgrup concret, però que no respon a un efecte biològic real (errors de tipus II o falsos positius). Finalment, sovint apareixen discrepàncies en els resultats que provenen d'estudis en què s'han analitzat poblacions diferents. Per exemple, l'associació descrita per diversos grups entre una variant del polimorfisme -491A/T en el promotor de l'APOE i la MA en poblacions d'origen europeu (Taula3), no ha estat replicada en cap dels dos estudis que utilitzaven població xinesa (Chen et al. 1999) o japonesa (Toji et al. 1999). Aquests efectes poden respondre a la possible heterogeneïtat genètica de la malaltia, que podria presentar arquitectures genètiques lleugerament diferents en diferents poblacions. La possibilitat de detectar una associació podria ser diferent entre poblacions degut a diferents nivells de desequilibri de lligament. Si el polimorfisme estudiat i la variant real de risc es troben lligats, la detecció de l'associació serà més fàcil en aquelles poblacions on, degut a la seva pròpia història, existís un desequilibri de lligament superior, ja que



haurien presentat menys recombinació entre la variant estudiada i l'al·lel de risc, la qual cosa faria que ambdós es transmetessin conjuntament i es presentessin amb la malaltia. Els efectes del desequilibri de lligament entre el polimorfisme analitzat i la variant real de risc també pot provocar que diferents al·lells en el mateix locus resultin associats a la malaltia en diferents poblacions. Això és, per exemple, el que succeí amb el polimorfisme Val1000Ile del gen Alpha-2-macroglobulin (A2M), en el qual es va descriure una associació entre la presència de valina en la posició 1000 de la proteïna i la MA en població majoritàriament d'Alemanya, Suïssa i Itàlia (Liao et al. 1998) però que, en un altre estudi realitzat en població finlandesa, l'associació va ser amb la isoleucina enlloc de la valina (Myllykangas et al. 1999). Per tal, doncs, d'explorar la possibilitat de desequilibri de lligament entre el polimorfisme analitzat i un hipotètic factor de risc, caldria analitzar diversos marcadors propers al polimorfisme d'estudi (tant individualment com en forma d'haplotips). En el cas que el polimorfisme es trobés en desequilibri de lligament amb la vertadera variant causal del risc, s'observaria un increment del risc, ja sigui per alguna de les variants estudiades o per algun dels haplotips, en comparació amb el risc que s'havia trobat inicialment.

**Taula 3.** Resum d'alguns dels gens i polimorfismes que han estat estudiats per la MA.

GEN	Posició	Polimorfisme	Associació positiva	Associació negativa
Alpha-2-macroglobulin (A2M)	12p13.3	Val1000Ile	Liao et al. 1998 Myllykangas et al. 1999 Zappia et al. 2002	Shibata et al. 2000 Gibson et al. 2000 McIlroy et al. 2001 Nacmias et al. 2001 Wang et al. 2001 Janka et al. 2002 Poduslo et al. 2002 Tang et al. 2002
		Deleció 5 bp (exó18)	Blacker et al. 1998 Dodel et al. 2000 Jhoo et al. 2001 Zappia et al. 2002	Crawford et al. 1999 Dow et al. 1999 Rudrasingham et al. 1999 Rogaeva et al. 1999 Korovaitseva et al. 1999 Blennow et al. 2000 Gibson et al. 2000 Sodeyama et al. 2000 Ki et al. 2001 McIlroy et al. 2001 Nacmias et al. 2001 Wang et al. 2001 Poduslo et al. 2002
Alpha-1-antichymotrypsin (AACT)	14q32.1	Microsatèl·lit a 5' del gen	Morgan et al. 1997	
		A/T (Ala15Thr) al residu 15 del pèptid senyal	Kamboh et al. 1995 Thome et al. 1995 Muramatsu et al. 1996 Ezquerra et al. 1998 Licastro et al. 1999 McIlroy et al. 2000b	Haines et al. 1996 Muller et al. 1996 Helisalimi et al. 1997 Itabashi et al. 1998 Nacmias et al. 1998 Schwab et al. 1999 Wang et al. 1999 Kim et al. 2000 Tang et al. 2000
Angiotensin Converting enzyme (ACE)	17q23	250bp ( <i>Alu</i> ) ins/del	Hu et al. 1999 Kehoe et al. 1999b Crawford et al. 2000a Farrer et al. 2000	Palumbo et al. 1999 Myllykangas et al. 2000
Apolipoprotein E (APOE)	19q3.2	ε4	Tots els grups	Tang et al. 1996
		-219 T/G	Halimi et al. 2000	Rebeck et al. 1999 Wang et al. 2000 Zurutuza et al. 2000

GEN	Posició	Polimorfisme	Associació positiva	Associació negativa
Apolipoprotein E (APOE)	19q3.2	-186G/T (Th1/E47cs)	Lambert et al. 1998a Beyer et al. 2002	Zill et al. 2001
		-491A/T	Bullido et al. 1998 Casadei et al. 1999 Wang et al. 2000 Alvarez-Arcaya et al. 2001	Roks et al. 1998 Town et al. 1998 Chen et al. 1999 Helisalmi et al. 1999 Thome et al. 1999 Toji et al. 1999 Zurutuza et al. 2000
		-427T/C		Wang et al. 2000 Zurutuza et al. 2000
Bleomycin hydrolase (BLMH)	17q11.2	A1450G	Montoya et al. 1998 Papassotiropoulos et al. 2000b	Farrer et al. 1998 Thome et al. 1999 Prince et al. 2001
Butyrylcholinesterase (BCHE)	3q26.1	G1615A (Ala539Thr)	Lehmann et al. 1997 Hiltunen et al. 1998 Tilley et al. 1999 Wiebusch et al. 1999 McIlroy et al. 2000a	Brindle et al. 1998 Crawford et al. 1998 Singleton et al. 1998 Kehoe et al. 1998 Ki et al. 1999 Lee et al. 2000 Prince et al. 2001
Cathepsin D (CTSD)	11p15.5	Ala224Val	Papassotiropoulos et al. 1999 Papassotiropoulos et al. 2000c	McIlroy et al. 1999 Bertram et al. 2000a Bhojak et al. 2000 Menzer et al. 2001 Prince et al. 2001 Mateo et al. 2002
Cystatin C (CST3)	20p11.21	Ala/Thr (G+73A)	Crawford et al. 2000c Finckh et al. 2000	Maruyama et al. 2001 Beyer et al. 2001 Roks et al. 2001
Estrogen receptor alpha (ESR1)	6q25.1	<i>PvuII</i> + <i>XbaI</i> (intró1)	Brandi et al. 1999 Ji et al. 2000 Mattila et al. 2000	Maruyama et al. 2000 Lambert et al. 2001
Fe65 (APBB1)	11p15	Del 3bp a intró 13	Hu et al. 1998 Lambert et al. 2000	Bertram et al. 2000a Guenette et al. 2000 Papassotiropoulos, 2000a Prince et al. 2001
Nicastrin (NCSTN)	1q23	Haplotip (4SNPs)	Dermaut et al. 2002	Orlacchio et al. 2002

GEN	Posició	Polimorfisme	Associació positiva	Associació negativa
Interleukin-1-alpha (IL1A)	2q14	-889C/T	Du et al. 2000 Grimaldi et al. 2000 Nicoll et al. 2000 Rebeck 2000 Hedley et al. 2002 Grimaldi et al. 2000	Minster et al. 2000 Prince et al. 2001 Fidani et al. 2002 Green et al. 2002 Pirkanen et al. 2002
Interleukin-1-beta (IL1B)	2q14	-511C/T  +3953C/T	Nicoll et al. 2000 Hedley et al. 2002	Minster et al. 2000 Green et al. 2002 Hedley et al. 2002
Low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP)	12q13-q14	C766T (exó 3)	Kang et al. 1997 Baum et al. 1998 Hollenbach et al. 1998 Kamboh et al. 1998 Lambert et al. 1998b	Scott et al. 1998 Woodward et al. 1998 Sanchez-Guerra 2001b Verpillat et al. 2001
Myeloperoxidase (MPO)	17q23.1	-463G/A  VNTR (4bp; 3alleles)	Reynolds et al. 2000 Crawford et al. 2001  Lendon et al. 1997 Wavrant-DeVrieze 1997	Combarros et al. 2002
Nitric Oxide Synthase (NOS3)	12q24.2	Glu298Asp	Dahiyat et al. 1999	Crawford et al. 2000b Higuchi et al. 2000 Singleton et al. 2001 Sanchez-Guerra 2001a
tRNA <sup>Gln</sup>	Mitocòndria	A4336G	Shoffner et al. 1993 Hutchin i Cortopassi 1995 Egensperger et al. 1997	Wragg et al. 1995 Edland et al. 2002

### 4.2.3. Estratègia de tria de gens candidats

Quan ens centrem en la naturalesa dels gens candidats que s'han analitzat pels diversos estudis d'associació (Taula3), podem concloure que gairebé tots ells es troben implicats en processos relacionats amb la pròpia etiopatogènia de la MA. Principalment, doncs, s'analitzen gens que responen a tres grans fenòmens existents en la malaltia: aquells que participen d'alguna manera en la interacció amb la proteïna APP o el pèptid A $\beta$ , els gens involucrats en l'estrès oxidatiu i, finalment, gens relacionats amb els processos inflamatoris i d'apoptosi.

Pel que fa al primer grup, qualsevol gen que codifiqui per proteïnes que estiguin involucrades en el processament endoproteolític d'APP és susceptible de ser analitzat. Alguns exemples són la Bleomycin Hydrolase (BH), que ha estat proposada com a candidata per a l'activitat  $\beta$ -secretasa; el gen FE65, el producte del qual s'uniria a la part citosòlica d'APP i intervindria en la seva internalització i processament; el gen Cathepsin D (CatD), degut a que presenta activitats  $\beta$ - i  $\gamma$ -secretasa *in vitro*; el gen BACE, que codifica per la  $\beta$ -secretasa; i els gens Nicastrin (NCSTN), o la mateixa Presenilina 1 (PS1), els quals podrien formar part del complex  $\gamma$ -secretasa. Un altre grup de candidats que s'han estudiat i que pertanyen al conjunt de gens relacionats amb l'APP són els que contribueixen a l'agregació o endocitosi del pèptid  $\beta$ -amiloide. En aquest sentit, han estat analitzats gens que codifiquen per proteïnes que acceleren la formació de les fibres amiloides insolubles. Alguns exemples són l'Apolipoproteïna E (APOE), l' $\alpha$ -1-antichymotrypsin (AACT), o la butyrylcholinesterase (BCHE). Igualment, gens que participen en l'endocitosi del pèptid A $\beta$ , tals com l'Alpha-2-macroglobulin (A2M) o el gen que codifica per la Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein (LRP), també han estat estudiats en diverses ocasions (Taula 3).

Quelcom que està íntimament lligat al propi procés patològic de la MA és l'estrès oxidatiu (Butterfield et al. 2001). L'existència de peroxidació lipídica en cervells de pacients amb MA és un fet que queda clarament palès quan s'analitzen els nivells d'un dels productes principals de la peroxidació lipídica, el 4-hydroxidonenal (4HNE), els nivells del qual són molt superiors en diverses regions cerebrals de malalts d'Alzheimer comparats amb les concentracions observades en cervells d'individus sans (Lovell et al. 1997). Un altre fet que demostra l'existència d'estrès oxidatiu en la MA és l'increment significatiu d'oxidació de proteïnes en zones cerebrals concretes de malalts d'Alzheimer, que es pot demostrar fàcilment per la presència de carbonils que apareixen en les cadenes laterals dels aminoàcids (Smith et al. 1996). Finalment, existeix un clar increment d'oxidació en el DNA i RNA en els cervells de pacients amb MA quan es comparen amb els de controls (Mecocci et al. 1994). Tots aquests fets han provocat que els gens involucrats en fenòmens relacionats amb l'oxidació esdevinguin uns bons candidats per als estudis d'associacions genètiques en la MA. El gen que codifica per la Nitric Oxide Synthase (NOS3), enzim que catalitza la formació d'òxid nítric (NO), un gas que es comporta com un radical lliure i que sembla ser que està involucrat en la mort neuronal en pacients d'Alzheimer n'és un bon exemple. Igualment, el fet que els malalts d'Alzheimer pateixin una alteració important del metabolisme energètic del cervell, bàsicament deguda a una disminució del metabolisme de la glucosa, i que pot observar-se en imatges obtingudes amb PET, demostra que existeix una activitat neuronal oxidativa que es troba reduïda en les zones del còrtex que estan més afectades per la malaltia. Això fa que l'estudi de qualsevol gen que codifiqui per proteïnes relacionades amb la mitocòndria, principal orgànul encarregat de l'aport energètic cerebral, sigui candidat per a ser estudiat en els estudis d'associació per a la MA. Un exemple d'això és pot trobar en el gen mitocondrial que codifica pel RNA de transferència de la glutamina (tRNA<sup>Gln</sup>), el qual s'ha associat en diverses ocasions amb la MA (Taula 3).

Finalment, el fet que diversos estudis epidemiològics apuntin cap a un possible paper protector dels fàrmacs antiinflamatoris no esteroideus enfront la MA (McGeer et al. 1996), que existeixi un possible risc de patir la malaltia en individus que han sofert algun tipus de traumatisme craneoencefàlic (Plassman et al. 2000), que hi hagi microglia activada envoltant les plaques amiloides, que hi hagi una clara evidència d'una resposta de fase aguda en cervells de malalts d'Alzheimer (Vandenabeele i Fiers 1991), amb increment de citoquines proinflamàtores com la IL1, la IL-6 i el factor de necrosi tumoral (TNF) $\alpha$  i que hi hagi una activació del sistema clàssic i alternatiu del complement en el cervell dels malalts (Pasinetti 1996), fa pensar que existeix un clar component inflamatori en la MA. En conseqüència, molts estudis d'associació han intentat relacionar diversos gens implicats en la inflamació amb la demència de tipus Alzheimer.

Tot i que en l'actualitat s'han analitzat més d'una trentena de gens candidats diferents per tal d'intentar esbrinar el possible paper que tenen en la MA, la majoria d'ells han donat resultats incongruents. En aquests casos, la meta-anàlisi de tots els estudis publicats sobre un mateix gen podria aclarir el paper real del gen en la patologia. De la mateixa manera, la naturalesa heterogènia de la MA, possiblement farà necessària que aquests tipus d'estudis es portin a terme analitzant cadascun dels subgrups per separat.

En la present tesi, s'ha fet un estudi d'associació de gens candidats, els productes dels quals estan implicats en algun dels tres processos principals que tenen lloc en la MA. Aquesta anàlisi no només s'ha dut a terme utilitzant la població malalta com a un únic fenotip, sinó que en un dels treballs s'ha subdividit la mostra en funció d'altres simptomatologies que presenten una comorbiditat amb la MA i que fan que el curs clínic de la malaltia difereixi enormement entre els pacients: la simptomatologia no cognitiva. Finalment, s'han utilitzat les diverses metodologies de genètica comparativa per tal d'estudiar, des d'un punt de vista filogenètic, el possible paper que

una part concreta del promotor del gen APP té en la regulació de l'expressió d'aquest gen, el qual ha representat i representa encara avui dia un dels gens més íntimament relacionats amb aquesta patologia demenciant.

Pel que fa als gens analitzats, s'ha intentat seguir una via concreta del procés fisiopatològic que té lloc en la MA. Així doncs, s'han analitzat variants de gens que participen en el processament d'APP i que, per tant, estan implicats en la formació del pèptid A $\beta$ , tals com la Bleomycin hydrolase (BH) i el gen que codifica per el  $\beta$ -site APP cleaving enzyme (BACE1). També s'han analitzat d'altres gens implicats tant en la endocitosi del pèptid A $\beta$  (gen  $\alpha$ -2 Macroglobulin, A2M), com en la formació d'agregats amiloides (gens Apolipoprotein E, APOE;  $\alpha$ -1 Antichymotrypsin, AACT i Acetilcholinesterase, ACHE) i la degradació de les formes solubles o agregades d'amiloide (gens Neprilysin, NEP; Tissue Plasminogen Activator, TPA i Plasminogen Activator Inhibitor-1, PAI-1). Finalment, gens involucrats en la resposta inflamatòria, com la Interleukin 1- $\alpha$  (IL1-A) o l'estrès oxidatiu, com el gen codificant de la Heat-Shock Protein 70-2 (HSP70-2) també han estat analitzats. En la Figura 8 hi ha una representació esquemàtica de la via que s'ha volgut estudiar, on hi figuren els gens i els polimorfismes concrets que s'han genotipat.



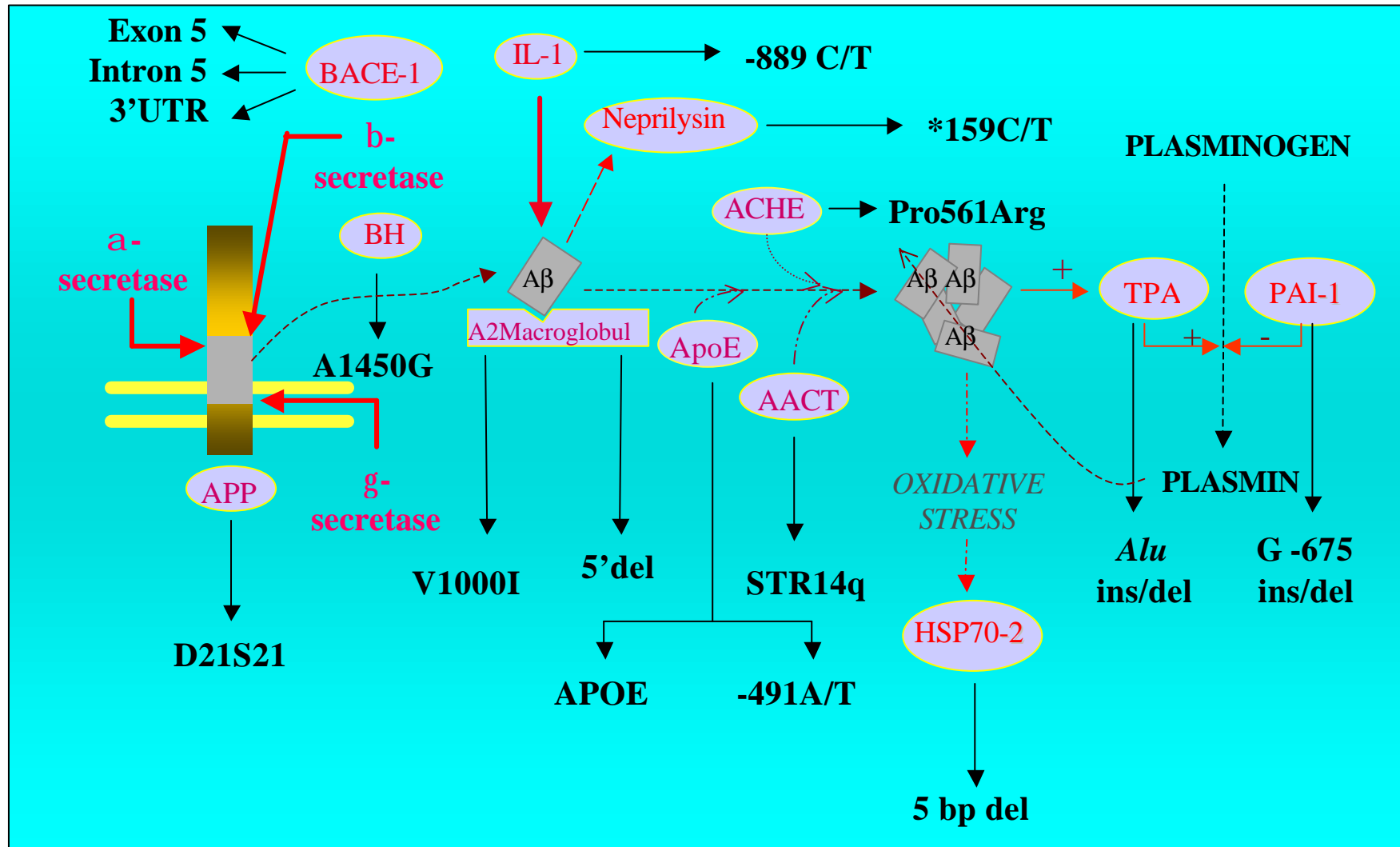


Figura 8. Representació esquemàtica dels gens i polimorfismes analitzats, els quals intervenen en la fisiopatologia de la MA.



L'objectiu principal de la present tesi és l'estudi de diversos gens candidats per tal d'establir el seu possible paper com a factor biològic de risc en la demència senil de tipus Alzheimer.

**OBJECTIUS:**

1. *Replicar algunes de les associacions que havien estat descrites anteriorment per altres grups en polimorfismes presents en diversos gens candidats.*

Es va dur a terme un estudi de tipus cas-control, en què es van examinar polimorfismes concrets que ja havien estat descrits com a variants comunes implicades en el risc per a la MA per tal d'analitzar el seu efecte en població espanyola. En concret, es van estudiar polimorfismes dels gens Apolipoprotein E (APOE),  $\alpha$ -2-Macroglobulin (A2M),  $\alpha$ -1 Antichymotrypsin (ACT), Amyloid Precursor Protein (APP), Bleomycin Hydrolase (BH), Interleukin 1- $\alpha$  (IL1-A) i  $\beta$ -site APP cleaving enzyme (BACE1).

2. *Anàlisi d'haplotips presents en loci de susceptibilitat per a la MA.*

Per tal d'incrementar la sensibilitat de l'estudi i esbrinar el veritable paper d'un gen concret com a factor predisposant a la MA, es van estudiar diversos marcadors contigus situats en alguns gens de susceptibilitat. Aquest estudi d'haplotips es va dur a terme en els gens A2M, BACE1 i APOE.

3. *Analitzar variants genètiques que no s'havien estudiat prèviament en estudis d'associació per a la MA.*

Van ser estudiats diversos polimorfismes presents en gens que codificaven per proteïnes que recentment s'havien vist implicades en diversos processos que tenen lloc en la fisiopatologia de la MA. Els gens estudiats van ser els següents: Neprilysin (NEP), Heat-Shock Protein 70-2 (HSP70-2), Acetilcolinesterase (ACHE), Tissue Plasminogen Activator (TPA) i Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1). Tots ells

representen propostes noves de gens candidats amb un interessant fonament molecular i fisiològic.

4. *Estudiar la implicació d'un gen en la heterogeneïtat clínica present en la MA.*

Es va estudiar la possible relació entre el gen HSP70-2 i la presència de simptomatologia no cognitiva que té lloc en la MA.

5. *Anàlisi comparativa entre humans i primats no humans de la regió 5' flanquejant del gen APP.*

Es va intentar fer un enfocament diferent i novedós de l'estudi sobre una regió promotora del gen APP, el qual es troba sobreexpressat en la MA. Es va fer una anàlisi comparativa de diverses seqüències de DNA de diferents primats per tal d'identificar regions possiblement implicades en el control de l'expressió del gen APP i que, per tant, tenen un alt interès en l'estudi dels fenòmens biològics que tenen lloc en la MA.

Per tot això, s'ha dut a terme una llarga i feixuga feina de recollida de mostres, tant pel que fa a la població de malalts com la de controls. Pel que fa als malalts, hi ha hagut una gran cura en el diagnòstic i en la història clínica, obtenint-se, per cadascun dels pacients, una informació detallada en una àmplia bateria de tests neurològics i neuropsicològics.

## **SUBJECTES:**

La totalitat dels individus analitzats en el present treball provenien de la Fundació ACE (Alzheimer Centre Educacional), Institut Català de Neurociències Aplicades. Per a cadascun dels malalts d'Alzheimer es disposava d'informes clínics detallats els quals havien estat efectuats per personal qualificat de la Fundació ACE i amb protocols validats (DMSIV i NINCDS-ADRDA). Tots els malalts van ser diagnosticats clínicament de MA probable o possible. Una població sense deteriorament cognitiu (control) va ser valorada amb bateries de cribatge per a demències tals com el Mini Mental Status Examination (Folstein et al. 1975) i el Mini Examen Cognoscitiu (Lobo et al. 1979), a fi i efecte de descartar presència de demència. Per tal de valorar la presència de simptomatologia no cognitiva en els pacients (presència i intensitat de deliris, al·lucinacions, depressió, eufòria...) es va fer ús de l'inventari neuropsiquiàtric (Neuropsychiatric Inventory, Cummings et al. 1994) el qual va ser practicat en 77 pacients.

Tots els individus (malalts i controls) tenien més de 65 anys d'edat, eren originaris de l'estat Espanyol i majoritàriament residien a la província de Barcelona. Les característiques demogràfiques van diferir lleugerament entre els estudis degut a petites variacions en el nombre d'individus utilitzats, ja que cadascun dels estudis es va efectuar amb la totalitat de la mostra que es disposava en aquell moment.

Per a totes les persones que es van oferir a participar en l'estudi es va obtenir un consentiment informat, el qual va ser perfectament llegit, entès i signat pels mateixos individus. En casos d'impossibilitat per part del pacient, el consentiment va ser realitzat per l'acompanyant, el cuidador principal i/o el representant legal (veure pàgina següent).

Totes les mostres de primats utilitzats per a l'anàlisi comparativa de seqüències de la regió 5' flanquejant del gen APP van provenir del Parc Zoològic de la ciutat de Barcelona.

**HOJA DE CONSENTIMIENTO**  
PARA EL ESTUDIO DE LAS BASES GENÉTICAS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y  
OTRAS DEMENCIAS

INVESTIGADORES PRINCIPALES

Dra. Mercè Boada  
Dr. Jaume Bertranpetit

LEA LA SIGUIENTE INFORMACIÓN PARA ASEGURARSE QUE ENTIENDE PERFECTAMENTE EL ESTUDIO QUE SE LLEVARÁ A CABO . FIRME EN CASO DE CONFORMIDAD PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO.

PROPÓSITO DEL ESTUDIO:

A modo de resumen muy breve, el presente proyecto pretende conocer las posibles bases genéticas que puedan influir en el desarrollo de algún tipo de deterioro cognitivo y de la conducta y, en especial, de la enfermedad de Alzheimer, demencia vascular u otro tipo de demencia.

PROCEDIMIENTOS:

Se precisarán muestras de sangre para llevar a cabo dicho estudio. Estas muestras serán utilizadas para obtener el material genético, el cual será usado para los diversos análisis. Los resultados no se incluirán en su historial médico.

BENEFICIOS:

No recibirá ningún beneficio directo por el hecho de participar en el estudio, ya que los resultados tendrán un interés científico.

COSTES:

Los costes serán totalmente asumidos por las partes implicadas en el estudio (Fundació ACE y Universitat Pompeu Fabra) y el donante no tendrá ninguna responsabilidad.

CONFIDENCIALIDAD:

Aunque los datos obtenidos puedan ser publicados en revistas científicas, se mantendrá la confidencialidad y sus datos médicos únicamente podrán ser consultados por los investigadores del estudio.

CON LA FIRMA DE LA HOJA DE CONSENTIMIENTO, USTED DA PERMISO PARA EL USO DE SUS MUESTRAS EN EL PRESENTE ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN. SI SE ESTIMA NECESARIO, SE LE ENVIARÁ UNA CARTA DESCRIBIENDO LA NATURALEZA DE LOS FUTUROS PROYECTOS, DE FORMA QUE USTED PODRÁ REHUSAR LA PARTICIPACIÓN EN DICHOS ESTUDIOS. USTED PUEDE SOLICITAR EN CUALQUIER MOMENTO QUE SU MUESTRA NO SEA INCLUIDA EN EL ESTUDIO.

**CONSENTIMIENTO: DESPUÉS DE HABER LEÍDO Y ENTENDIDO PERFECTAMENTE LAS BASES DEL ESTUDIO, DOY MI CONFORMIDAD PARA PARTICIPAR EN ÉL.**

**NOMBRE** \_\_\_\_\_  
**FECHA** \_\_\_\_\_  
**DNI** \_\_\_\_\_

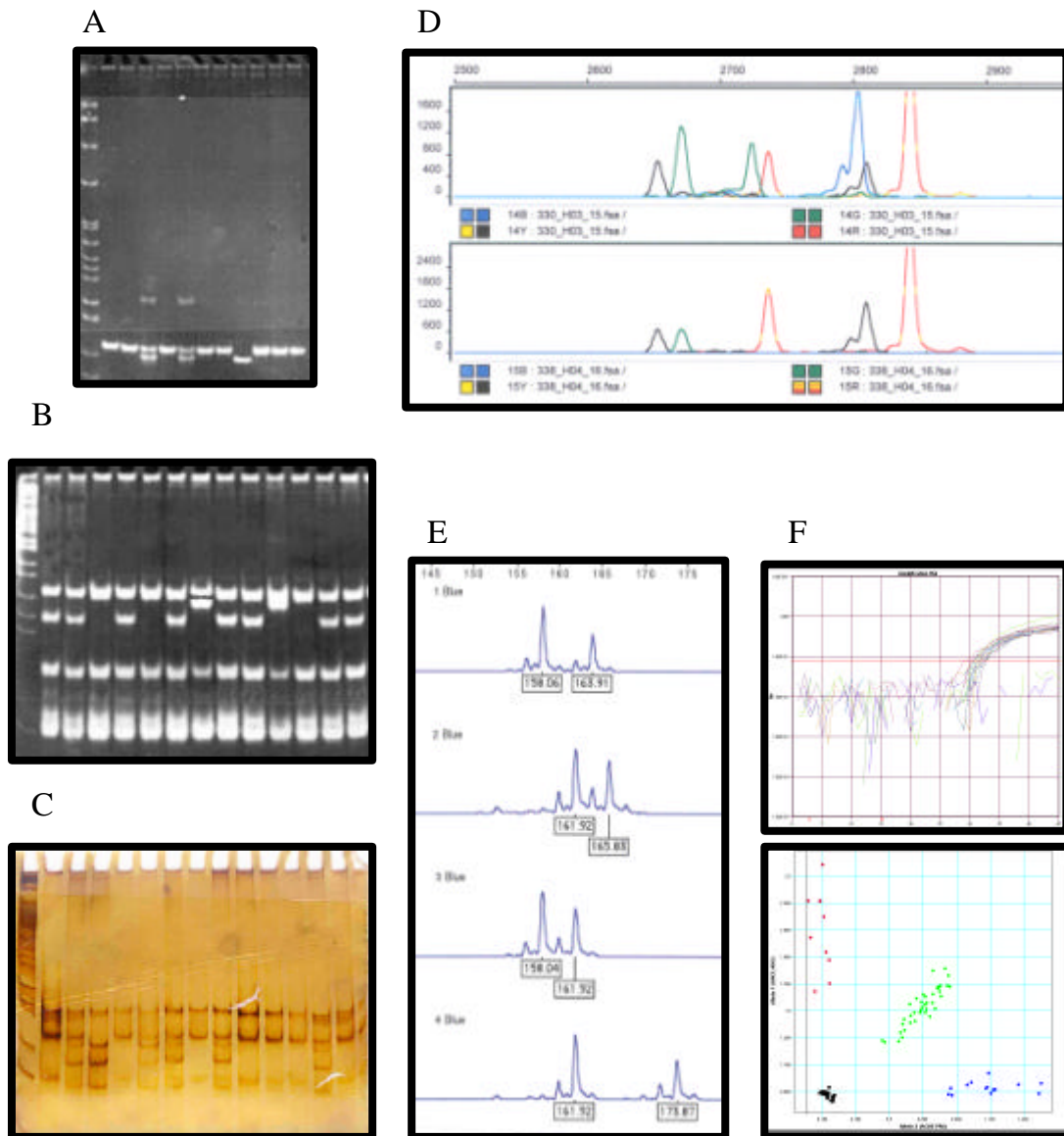
**FIRMA:**

**MÈTODES:**

Les diverses tècniques emprades per al genotipage dels diferents polimorfismes estan representades en la Taula 4. En la Figura 9 es mostren alguns exemples dels resultats obtinguts mitjançant els diversos mètodes.

Gen	Polimorfisme	Mètode	Detecció
Acetilcolinesterase (ACHE)	Pro561Arg	PCR quantitativa	ABI PRISM® 7900HT
Alpha-1-antichymotrypsin (AACT)	Microsatèl·lit bial·lèlic (14q32.1)	Anàlisi de fragments	Seqüenciador automàtic ABI PRISM® 377 i 3100
Alpha-2-macroglobulin (A2M)	Val1000Ile	PCR-RFLP	Agarosa (1%)
	Delecció 5bp (exó 18)	Anàlisi de fragments	Acrilamida (6%)
Apolipoprotein E (APOE)	Al·lels ε2, ε3 i ε4	PCR-RFLP	Acrilamida (10%)
	-491A/T	PCR-RFLP (Nested PCR utilitzant mismatch primer)	Acrilamida (6%)
Bleomycin Hydrolase (BH)	A1450G	SSCP	Acrilamida (12%, tinció en plata)
β-site APP cleaving enzyme (BACE1)	G1239C (exó 5)	SNaPshot™ Multiplex Kit (Applied Biosystems)	Seqüenciador automàtic ABI PRISM® 3100
	T/G (+5 intró 5)	SNaPshot™ Multiplex Kit (Applied Biosystems)	Seqüenciador automàtic ABI PRISM® 3100
	T/A (3'UTR)	SNaPshot™ Multiplex Kit (Applied Biosystems)	Seqüenciador automàtic ABI PRISM® 3100
Heat-Shock Protein 70-2 (HSP70-2)	5 bp ins/del (5'UTR)	Anàlisi de fragments	Acrilamida (6%)
Interleukin 1-α (IL1-A)	-889 C/T	PCR-RFLP	Agarosa (3%)
Neprilysin (NEP)	*159C/T (3'UTR)	PCR-RFLP	Agarosa (3%)
Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1)	-675 G ins/del	SNaPshot™ Multiplex Kit (Applied Biosystems)	Seqüenciador automàtic ABI PRISM® 3100
Tissue Plasminogen Activator (TPA)	Alu ins/del (intró 8)	Anàlisi de fragments	Agarosa (2%)

**Taula 4.** Resum dels marcadors genètics analitzats en el present treball. Les anàlisis de fragments van ser fetes mitjançant electroforesi directe del producte de PCR en agarosa o acrilamida o bé amb tècniques de fluorescència utilitzant seqüenciador automàtic. RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism; SSCP: Single-Strand Conformation Polymorphism.



**Figura 9.** Exemples de resultats del genotipatge de diversos polimorfismes. **A.** Gel d'acrilamida al 6% on s'analitza la presència de delecció de 5 nucleòtids a l'exó 18 del gen A2M. **B.** Genotipatge de les isoformes d'APOE: fragments de restricció que resulten de la digestió del producte de PCR que prové de l'amplificació del fragment de 303 bp situat a l'exó 4 del gen APOE. **C.** Gel d'acrilamida tenyit amb plata per a l'estudi del polimorfisme A1450G del gen BH mitjançant la tècnica de SSCP. **D.** Cromatograma on es representa el genotip de dos individus per a un total de 4 polimorfismes. Els polimorfismes són, per ordre d'aparició: -675 G ins/del situat al gen PAI-1, i els tres polimorfismes estudiats en el gen BACE1, el polimorfisme T/A situat a 3'UTR del gen, la variant intrònica T/G i el polimorfisme G1239C de l'exó 5. **E.** Cromatograma resultant del genotipatge de 4 individus on es mostren els al·lels del microsatèl·lit bial·lèlic que es troba a 5' del gen AACT. **F.** Genotipatge del polimorfisme bial·lèlic Pro561Arg: discriminació al·lèlica utilitzant la tècnica de PCR quantitativa. El panell superior mostra la gràfica d'amplificació de PCR a temps real per a 80 individus. El panell inferior representa la detecció a temps final del producte de PCR, fet que ens permet establir els tres possibles genotips.



## Capítol I

### **Apolipoprotein E Christchurch in a family with Alzheimer's disease and altered lipid values**

J. Clarimón, M. Vallés, M. Boada, L. Tàrraga, J. Bertranpetit, D. Comas

*Alzheimer's Reports* (5)1: 17-20 (2002)

# Apolipoprotein E Christchurch in a family with Alzheimer's disease and altered lipid values

Volume 5, Number 1  
pp 17-20 (2002)

Jordi Clarimón,<sup>1</sup> Mònica Vallés,<sup>1</sup> Mercè Boada,<sup>2</sup>  
Lluís Tàrraga,<sup>2</sup> Jaume Bertranpetit<sup>1</sup> and David  
Comas<sup>1,CA</sup>

<sup>1</sup> Unitat de Biologia Evolutiva, Facultat de Ciències de la Salut i de la Vida, Universitat Pompeu Fabra. Doctor Aiguader 80, 08003 Barcelona; <sup>2</sup> Fundació ACE. I.C. Neurociències Aplicades. Marquès de Sentmenat 35-37, 08014 Barcelona, Spain.

<sup>CA</sup>Corresponding author

E-mail: david.comas@cexs.upf.es

Alzheimer's disease  
Apolipoprotein E  
ApoE2 Christchurch  
Dyslipemia

In the present work we analyze the presence of an unusual apoE variant (apoE2 Christchurch) in a family with clinical history of dementia (Alzheimer's disease and Parkinson's disease) and cerebral haemorrhage. The two probands affected with Alzheimer's disease were carriers of this apoE variant and three out of four heterozygotes had altered lipid values. These results are concordant with previous data supporting the association of this apoE variant with dyslipemia. The present analysis poses the possible implication of the rare apolipoprotein variants in the aetiology of Alzheimer's disease.

## INTRODUCTION

Apolipoprotein E (apoE) (GDB ID:119691) allele  $\epsilon 4$  allele has been consistently associated with increased risk for both familial and sporadic Alzheimer's disease (AD) (Saunders *et al.*, 1993; Strittmatter *et al.*, 1993). Increased frequency of this allele has been found in patients with dietary hypercholesterolemia, cardiovascular disease (Menzel *et al.*, 1983; Tiret *et al.*, 1994), and several different neurodegenerative and psychiatric disorders like Parkinson's disease, vascular dementia (Helisalmi *et al.*, 1998) or schizophrenia (Harrington *et al.*, 1996).

In addition to the three common apoE isoforms, several rare mutations have been described at this gene locus and more than 30 apoE variants have been characterized to date (de Kniff *et al.*, 1994; Minnich *et al.*, 1995). Most of these variants have been associated with different disorders in lipid metabolism such as familial dysbetalipoproteinemia and other dyslipemias (de Kniff *et al.*, 1994; Hoffmann *et al.*, 2001; Yamanouchi *et al.*, 2001). Furthermore, another variant (named

APOE\*4 Pittsburgh) has been associated with late onset Alzheimer's disease (Kamboh *et al.*, 1999).

One of these rare apoE variants results from a C to A substitution at nucleotide 3817, which is the first nucleotide of codon 136. This change yields a missense mutation from Arginine to Serine. The variant was originally named apoE2 Christchurch (E2c) (Wardell *et al.*, 1987) (GDB ID:169889) and has been associated with type III hyperlipoproteinemia and familial dysbetalipoproteinemia (Wardell *et al.*, 1987; Pocovi *et al.*, 1996). However, no relationship has been reported with AD or any other dementia.

In the present work, we report for the first time the presence of the apoE2 (Arg<sub>136</sub>→Ser) in a kindred with Alzheimer's disease and altered lipid values.

## SUBJECTS AND METHODS

### Subjects

The subjects of this study were 6 siblings belonging to a Spanish family with clinical history of dementia and

vascular disease (Fig. 1). Informed consent was obtained from each subject. Two of them (individuals III-3 and III-8) fulfilled the ICD-10 and DSM-IV criteria for probable dementia of the Alzheimer's type. Due to the age of onset of the dementia (54 years), patient III-8 was classified as an early-onset Alzheimer disease case whereas patient III-3 was classified as an late-onset form (onset at 73 years).

**Methods**

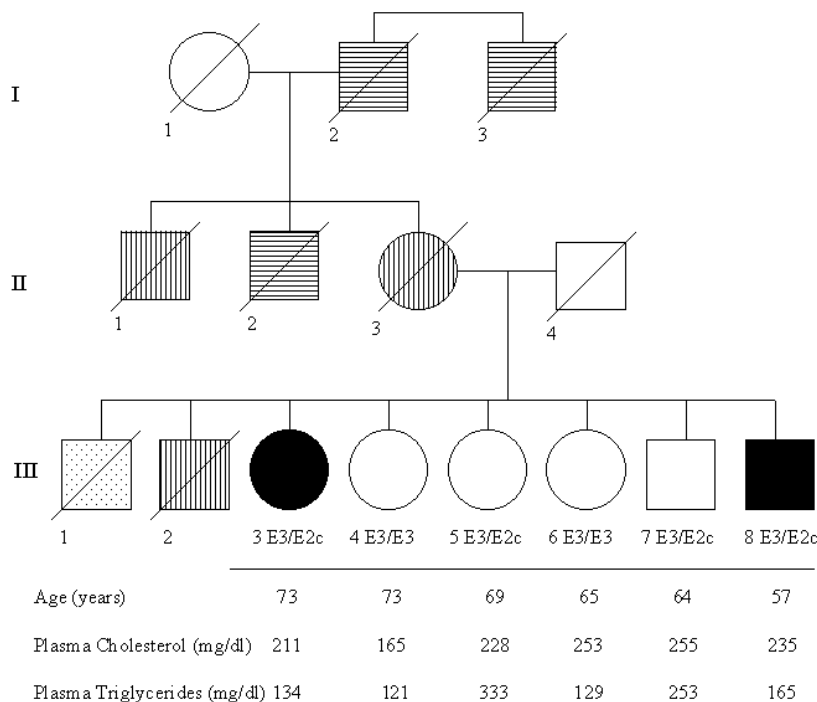
DNA was extracted from fresh blood using a standard phenol-chloroform protocol (Sambrook *et al.*, 1989). For APOE genotyping, DNA was amplified following the PCR conditions described by Tsai and collaborators (1994) and ApoE genotypes were determined by scoring for a unique combination of fragments sizes, as described by Hixson and Vernier (1990). Cycle sequencing using the same primers was performed and the product of the sequence reaction was performed in an ABI PRISM 377 (PE Biosystems) automatic sequencer. Total cholesterol (TC) and triglycerides (TG) in plasma were determined for all 6 individuals by standard enzymatic methods (Allain *et al.*, 1974). TC and TG average levels were compared in carriers versus non-carriers of apoE2c by means of Student's *t*-test.

**RESULTS**

In a family with clinical history of dementia (AD and Parkinson disease) as well as cerebral haemorrhage, an unusual band of 109 base pairs was detected in four out of 6 individuals belonging to this family. When direct sequencing of the PCR amplified DNA was performed, all four individuals were found to be heterozygous for a cytosine to adenine substitution at the first nucleotide of codon 136. This substitution results in an amino acid change Arg<sub>136</sub> to Ser<sub>136</sub> and defines the rare apoE2 Christchurch (Apo E2c) variant previously described (Wardell *et al.*, 1987).

Two of the apoE2c carriers (individuals III-3 and III-8, Fig. 1) suffered from Alzheimer's disease. The respective ages of onset were 73 and 54 years. Therefore, the latter was clearly a case of an early-onset AD. The other two siblings with the ε2c allele (subjects III-5 and III-7) had no signs of AD, being of ages 69 and 64 at the time of the study.

Total cholesterol (TC) and triglycerides (TG) were measured. Probands III-6 (apoE3/E3) and III-7 (apoE3/E2c) were hypercholesterolemic (TC > 250 mg/dl); and APOE ε2c carriers III-3, III-5 and III-8, presented mild hypercholesterolemia (TC within 200–239 mg/dl). Two



**Figure 1** Pedigree of the family in this study. Symbols: circles depict females, squares depict males. Slashes indicate that the subject is deceased. Filled symbols: Alzheimer's disease. Horizontal bars: unspecified dementia. Vertical bars: cerebral haemorrhage. Dots: Parkinson's disease. Roman numbers to the left of the pedigree denote generations. ApoE phenotypes are given beneath the symbols (E3 and E2c are the APOE-ε3 and APOE-ε2-Christchurch alleles, respectively).

apoE2c carriers (subjects III-5 and III-7) had hypertriglyceridemia (with 333 and 253 mgTG/dl respectively). Only individual III-4, with APOE  $\epsilon$ 3/ $\epsilon$ 3 genotype, presented a normal lipid profile. When TC and TG average levels were compared between APOE  $\epsilon$ 2c carriers and non-carriers, slightly higher mean values of both parameters were detected in those presenting the apoE2c variant. However, these differences did not reach statistically significance (Student's *t*-test, TC  $t=0.592$ ,  $p=0.484$ ; TG  $t=2.033$ ,  $p=0.227$ ).

## DISCUSSION

These results show a slightly increased susceptibility to develop alterations in the lipid metabolism and/or dementia for APOE  $\epsilon$ 2c carriers; although given the small sample size, it does not reach statistical significance. Due to the clinical history of cerebral haemorrhage (individuals II-1, II-3 and III-2) and dementia (individuals I-2, I-3, II-2, III-3 and III-8) in this family, the present analysis points out the possible association between apolipoprotein E2 Christchurch variant and altered lipid concentrations, which could cause further problems such as cerebral haemorrhage and may play a role in the pathogenesis of Alzheimer's disease.

Given that the APOE genotype is an important biological marker for AD susceptibility (accounting for between 45% and 60% of AD genetic variability) and that cholesterol may play a role in the pathogenesis of AD (Jarvik et al., 1995; Launer et al., 2001; Simons et al., 2001) polymorphisms in the APOE gene that contribute to alterations in the lipid metabolism, as described in this work, could be related to neurodegenerative disorders such as AD and, perhaps, to other neurodegenerative disorders.

## CONCLUSION

The results of our study suggest that unusual ApoE variants, like ApoE2 Christchurch, could influence not only the lipid metabolism but also the presence of several neurodegenerative disorders.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Direcció General de Investigaci6 Científica y T6cnica in Spain (PB98-1064), and by Direcció General de Recerca, Generalitat de Catalunya (1998SGR0009). We wish to thank all the staff of Fundaci6 ACE I.C. Neuroci6ncies Aplicades and, specially, to Gemma Gràcia for providing the DNA samples, and Isabel Hernàndez for fruitful clinical advice.

## REFERENCES

- Allain CC, Poon LS, Chan CS *et al.* (1974). Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* **20**, 470-475.
- de Kniff P, Van Den Maagdenberg AMJM, Frants R *et al.* (1994). Genetic heterogeneity of apolipoprotein E and its influence on plasma lipid and lipoprotein levels. *Hum Mol Genet* **4**, 178-194.
- Harrington CR, Roth M, Xuereb JH *et al.* (1995). Apolipoprotein E type  $\epsilon$ 4 allele frequency is increased in patients with schizophrenia. *Neurosci Lett* **202**, 101-104.
- Helisalimi S, Linnaranta K, Lehtovirta M *et al.* (1996). Apolipoprotein E polymorphism in patients with different neurodegenerative disorders. *Neurosci Lett* **205**, 61-64.
- Hixson JE and Vernier DT (1990). Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* **31**, 545-548.
- Hoffmann MM, Scharnagl H, Koster W *et al.* (2001). Apolipoprotein E1 Baden (Arg(180)-Cys). A new apolipoprotein E variant associated with hypertriglyceridemia. *Clin Chim Acta* **303**, 41-48.
- Jarvik GP, Wijsman EM, Kukull WA *et al.* (1995). Interaction of apolipoprotein E genotype, total cholesterol level, age, and sex in prediction of Alzheimer's disease: a case-control study. *Neurology* **45**, 1092-1096.
- Kamboh MI, Aston CE, Perez-Tur J, Kokmen E *et al.* (1999). A novel mutation in the apolipoprotein E gene (APOE\*4 Pittsburgh) is associated with the risk of late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **263**, 129-132.
- Menzel HJ, Kladezky RG and Assmann G (1983). Apolipoprotein E polymorphism and coronary artery disease. *Atherosclerosis* **3**, 310-315.
- Launer LJ, White LR, Petrovitch H *et al.* (2001). Cholesterol and neuropathologic markers of AD: a population-based autopsy study. *Neurology* **57**, 1447-1452.
- Minnich A, Weisgraber KH, Newhouse Y *et al.* (1995). Identification and characterization of a novel apolipoprotein E variant, apolipoprotein E3'(Arg136→His): association with mild dyslipidemia and double pre- $\beta$  very low density lipoproteins. *J Lipid Res* **36**, 57-66.
- Pocovi M, Cenarro A, Civeira F *et al.* (1996). Incomplete dominance of type III hyperlipoproteinemia is associated with the rare apolipoprotein E2 (Arg136→Ser) variant in multigenerational pedigree studies. *Atherosclerosis* **122**, 33-46.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2nd ed.
- Saunders AM, Strittmatter MD, Schmechel D *et al.* (1993). Association of apolipoprotein E allele  $\epsilon$ 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* **43**, 1467-1472.
- Simons M, Keller P, Dichgans J and Schulz JB (2001). Cholesterol and Alzheimer's disease: is there a link? *Neurology* **57**, 1089-1093.
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D *et al.* (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to  $\beta$ -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci* **99**, 1977-1981.
- Tiret L, de Kniff P, Menzel HJ *et al.* (1994). ApoE polymorphism and predisposition to coronary heart disease in youths of different european populations. *Arterioscler Thromb* **14**, 1617-1624.
- Tsai MS, Tangalos EG, Petersen RC *et al.* (1994). Apolipoprotein E: risk factor for Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* **54**, 643-649.
- Wardell MR, Brennan SO, Janus ED *et al.* (1987). Apolipoprotein E2-Christchurch (136 Arg→Ser). New variant of human apolipoprotein E in a patient with type III hyperlipoproteinemia. *J Clin Invest* **80**, 483-490.
- Yamanouchi Y, Takano T, Hamaguchi H and Tokunaga K (2001). A novel apolipoprotein E5 variant with a 24-bp insertion causing hyperlipidemia. *J Hum Genet* **46**, 633-639.

RECEIVED 3 APRIL 2002  
ACCEPTED 10 APRIL 2002

### **SUMMARY FOR THE NON-SPECIALIST**

Apolipoprotein E (apoE) is a plasma lipoprotein that plays a central role in the metabolism of cholesterol and triglycerides. There are three main alleles in the general population:  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ , and  $\epsilon 4$ . The  $\epsilon 4$  allele has been consistently associated with increased risk for both familial and sporadic Alzheimer's disease (AD). In addition to three common apoE isoforms, several rare mutations have been described at this gene locus and more than 30 apoE variants have been characterized to date. The majority of these variants have been associated with different disorders of lipid metabolism. In the present work, we report for the first time the presence of the apoE2 (Arg136→Ser) in a kindred with Alzheimer's disease and altered lipid values and we discuss the possible implications of this unusual apolipoprotein (named apoE Cristchurch) in the aetiology of AD and other dementias.

## Capítol II

J. Clarimón, FJ. Muñoz, M. Boada, L. Tàrraga, J. Sunyer, J. Bertranpetit, D. Comas, “*Possible increased risk for Alzheimer's disease associated with neprilysin gene.*”, **Journal of neural transmission**, (2003 Jun; 110 (6), pp. 651-7), © 2003 by Springer-Verlag

Reprinted by Permission of Springer-Verlag

**POSSIBLE INCREASED RISK FOR ALZHEIMER'S DISEASE  
ASSOCIATED WITH NEPRILYSIN GENE**

**Jordi Clarimón,<sup>1</sup> Francisco J. Muñoz,<sup>2</sup> Mercè Boada,<sup>3</sup> Lluís Tàrraga,<sup>3</sup> Jordi  
Sunyer,<sup>4</sup> Jaume Bertranpetit,<sup>1</sup> and David Comas<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Unitat de Biologia Evolutiva, Facultat de Ciències de la Salut i de la Vida,  
Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain*

<sup>2</sup> *Unitat de Senyalització Cel·lular, Facultat de Ciències de la Salut i de la Vida,  
Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain*

<sup>3</sup> *Fundació ACE. I.C. Neurociències Aplicades, Barcelona, Spain*

<sup>4</sup> *Respiratory and Environmental Research Unit, IMIM and Universitat Pompeu  
Fabra, Barcelona, Spain*

Brief running-head title: Neprilysin gene and Alzheimer's disease

## **SUMMARY**

Neprilysin has recently been reported to be the major physiological A $\beta$ -degradating enzyme. In this study we describe a new biallelic polymorphism in the 3'UTR of the neprilysin gene in a representative population sample. The \*159C/C genotype was found to be associated with an increased risk for Alzheimer's disease in an age-dependent manner. Adjusting for sex and APOE status, an odds ratio of 2.74 ( $p < 0.05$ ) was observed among patients under 75 years old.

**KEY WORDS:** Neprilysin, Alzheimer's disease, Apolipoprotein E, Genetic polymorphism, Case-control study.



## INTRODUCTION

The telltale sign of Alzheimer's disease (AD) is the neuronal degeneration associated with senile plaques. Such plaques are composed of the amyloid  $\beta$ -peptide ( $A\beta$ ), which is a 40-43 amino acid peptide (Selkoe et al., 1998).  $A\beta$  is originated by the proteolytic processing of a transmembrane glycoprotein called  $\beta$ -amyloid precursor protein ( $\beta$ -APP). The deposition of soluble  $A\beta$  produces the aggregation of the peptide forming neurotoxic amyloid fibrils (Muñoz and Inestrosa, 1999). For this reason, proteolytic degradation of extracellular  $A\beta$  is a key step for avoiding senile plaque formation. Neprilysin (*NEP*) has been found to be the major  $A\beta$ -degrading enzyme and, therefore, a misfunction of this protein has been postulated in the etiology of AD (Iwata et al., 2001; Mohajeri et al., 2002).

Here we have performed a case-control study in order to detect any possible role of the *NEP* gene in the onset of AD. The analysed subjects comprise elderly healthy controls and AD patients from a representative population of Catalonia (Spain). Since it is well known that Apolipoprotein E (*APOE*)  $\epsilon$ 4-allele status is a well-established risk factor for AD (Corder et al., 1993; Czech et al., 1993; Saunders et al., 1993; Strittmatter et al., 1993), we also perform a cross-analysis of the *NEP* results based on the former risk parameter.

## METHODS

### Population subjects

The sample for our case-control study was recruited in Barcelona (Spain) by Fundació ACE, Institut Català de Neurociències Aplicades. It comprised 91 healthy controls (44 males and 47 females, age at examination  $74.8 \pm 5.2$  years; range 66 to 90 years) and 118 unrelated late onset sporadic AD cases (30 males and 88 females, mean age at onset  $76.4 \pm 5.3$  years; range 66 to 90 years). Control subjects were either patient spouses or non-familial caregivers from the same origin as the AD patients. All of them were screened for the absence of cognitive impairment by a structured interview including neurological mental status examination, category fluency test, and Folstein Mini-Mental Status Examination. All AD patients met National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) criteria for possible and probable AD (McKhann et al., 1984). Written informed consent was obtained for all participants or their respective caretakers in instances where patients were not capable.

### Genotyping

Genomic DNA was extracted from whole blood of each individual. Genotyping was done blinded to phenotype. Genotyping for *NEP*\*159C/T alleles was performed by PCR-based amplification using the primers NEP-F (5'-GTCAGTACTGACTTGAGGG-3') and NEP-R (5'-ACATCAGCAAAGTGGTAGACC-3'). The amplified product (212 base pairs) was digested with 15 units of *Xba*I (Takara) and fragments were resolved by electrophoresis on a 3% agarose gel stained with ethidium bromide. Two fragments of 71 and 141 base pairs appeared when a PCR fragment containing a thymine in the

polymorphic site was present (\*159T). APOE genotyping was performed in a previous study (Clarimón et al., 2002) following the conditions described by Hixson and Vernier (1990).

### **Statistical analysis**

Genotype and allele frequencies were estimated by direct counting, and were compared between patients and controls by means of a chi-square analysis. Hardy-Weinberg equilibrium was tested by Fisher's exact test. Logistic regression analysis was used to estimate the odds ratio between genotype and disease status. Multiple logistic regression models were used to adjust for age, sex and APOE. In order to examine possible interactions between variables, the interaction term was included in the logistic regression models. STATA version 6.0 statistical package was used to perform statistical analyses.

## RESULTS

The Single Nucleotide Polymorphism database generated by the SNP Consortium (<http://snp.cshl.org>), allowed us to find a putative polymorphism in the 3'UTR of NEP gene that was confirmed in the laboratory by typing a set of individuals. This polymorphism consists of a C to T substitution at position 159 downstream of the gene STOP codon.

Allele and genotype frequencies of this polymorphism in controls and AD patients are shown in Table 1. NEP genotype distribution was in Hardy-Weinberg equilibrium (Fisher exact test,  $p = 0.9$ ). Allele and genotype frequencies for the NEP\*159C/T polymorphism showed no significant differences between cases and controls when the entire sample was analysed (Table 1).

In order to detect if the association between the NEP\*159C/T polymorphism and AD was modified according to age, the sample was stratified in two categories (younger and older than 75 years old, the median age) (Table 1). Differences in allele or genotype frequencies were not statistically significant neither between the two groups of controls nor between patient groups. However, the stratification in two age groups revealed an opposite pattern in genotype frequencies among AD patients and controls.

When comparing cases and controls over 75 years old, no differences in allele ( $p = 0.340$ ) and genotype ( $p = 0.574$ ) distributions were observed. Nevertheless, when we focused on the cases aged 75 years and under, a significant increment of the \*159C allele was observed in AD cases compared to controls ( $p = 0.023$ ). Moreover, the C/C genotype was significantly increased in patients (58%) compared to controls (34%,  $p = 0.01$ ). The crude odds ratio (OR) for the genotype C/C compared to C/T and T/T in the under-75 group was 2.7 (95% CI = 1.25-5.85).

As the most important known genetic risk factor for late onset AD is the  $\epsilon 4$  allele of the APOE gene (Corder et al., 1993; Czech et al., 1993; Saunders et al., 1993; Strittmatter et al., 1993), we analysed the APOE allele and genotype frequencies in the population studied (Table 2). As expected, the APOE  $\epsilon 4$ -allele frequency in AD patients was found to be increased compared to controls (30% and 8% respectively). These frequencies did not differ significantly from other Spanish samples (Adroer et al., 1995; Bullido et al., 1998). Logistic regression analysis adjusting for age and sex showed that the OR of being affected as a function of carrying at least one APOE  $\epsilon 4$ -allele was 7.98 (95% CI = 3.9-16.4;  $p < 0.001$ ).

In order to discard confounding effects of the APOE  $\epsilon 4$ -allele on the association of the NEP genotype with AD, we stratified AD cases and controls according to APOE genotype (Table 3). When attention was focused on those individuals aged 75 or below, the frequency of the C/C genotype was higher in the AD cases than in controls, not only in the APOE  $\epsilon 4$  carriers (61% vs. 22%) but also in the non-APOE  $\epsilon 4$  group (54% vs. 36%). These differences did not reach statistical significance probably due to the low number of individuals that resulted from this stratification. Logistic regression showed that APOE  $\epsilon 4$  and \*159C/C were independent risk factors ( $p$  for interaction = 0.34).

The sex- and APOE-adjusted OR of being affected by AD in those individuals aged 75 or below bearing the NEP C/C genotype was 2.74 (95% CI = 1.17-6.46;  $p = 0.02$ ).

## DISCUSSION

The results presented in this study are consistent with physiological data that confers to NEP an important role in the metabolic regulation of the A $\beta$  peptide: it has been proposed to be the major A $\beta$ -degrading enzyme (Shirotani et al., 2001), *in vivo* experiments with NEP-deficient mice exposed to A $\beta$  peptide have demonstrated a significant increase of A $\beta$ <sub>40</sub> and A $\beta$ <sub>42</sub> levels in a gene dose-dependent manner (Iwata et al., 2001), and both NEP mRNA and protein levels have been shown to be selectively reduced in AD brains, particularly in those areas typically affected by plaque (Reilly, 2001; Yasojima et al., 2001 ).

Recently, an age-dependent decline of NEP expression and activity in hippocampus and neocortex has been found to be a natural process in mice (Fukami et al., 2002; Iwata et al., 2002). Extrapolation of the NEP-deficient mouse indicates that only a 1% reduction per year for 50 years in human brains is sufficient to cause A $\beta$  pathology. These observations suggest that certain genetic variants within the NEP gene could result in subtle alterations in the NEP structure or expression. Consequently, this could lead to an earlier decline of its enzymatic activity. In this sense, polymorphisms in the NEP gene could be involved in the aetiology of AD by accelerating the A $\beta$  peptide deposition, senile plaque formation and, consequently, the onset of disease.

In this study, we have identified a polymorphism in the 3'UTR region of the NEP gene which is associated with AD in an age dependent manner. Although it is possible to postulate that a 3'UTR polymorphism could be the cause of subtle change in NEP expression and/or activity, the most plausible explanation would be that polymorphism may be in linkage disequilibrium with another functional variant within the 80 kilobases NEP gene (D'Adamio et al., 1989). Recent reports have not detected any positive association between the NEP gene and AD (Sodeyama et al., 2001; Oda

et al., 2002), however it should be noted that these studies did not analyse SNPs, but rather dinucleotide repeat polymorphisms. The negative results could be due to the number of alleles in STRs loci, which reduces the power of the test, and the high mutation rate (Weber and Wong, 1993), with considerable homoplasy (alleles with the same repeat length which are not identical by descent). The NEP gene is located within the candidate chromosome 3 (region 3q25.2) which has been associated with late-onset AD (Poduslo et al., 1999; Tanzi et al., 1996). The polymorphism analysed in this study is located 10cM from the D3S1569 marker, which reached the highest Lod score in the AD linkage study performed by Poduslo et al. (1999).

Since no association of the NEP gene and AD has been found for the entire sample, we cannot conclude that the NEP gene plays a major role in AD. However, our results point to a possible role in AD pathology of this gene in an age-dependent manner. Exhaustive analyses of the NEP gene, including still-unknown variants and replicating the findings in much larger samples, will be necessary in order to elucidate the role of this gene in Alzheimer's dementia.

## **Acknowledgements**

We would like to thank Aida Andrés, Francesc Calafell (Universitat Pompeu Fabra), and Bru Cormand (Universitat de Barcelona) for useful comments and fruitful discussion. We also thank Mònica Vallés for technical assistance and the ACE staff for their invaluable help.

This study was supported by grants from DGICT (PB98-1064, and BOS2001-0794) and by the Generalitat de Catalunya, Grup de Recerca Consolidat 2001SGR00285.

### **Corresponding author:**

Dr. David Comas

Unitat de Biologia Evolutiva, Universitat Pompeu Fabra,  
C/ Doctor Aiguader 80, Barcelona 08003, Catalonia, Spain.

Phone: +34-93-5422844

Fax: +34-93-5422802

e-mail: [david.comas@cexs.upf.es](mailto:david.comas@cexs.upf.es)



---

**References**

- Adroer R, Santacruz P, Blesa R, Lopez-Pousa S, Ascaso C, Oliva R (1995) Apolipoprotein E4 allele frequency in Spanish Alzheimer and control cases. *Neurosci Lett* 189: 182-186
- Bullido MJ, Artiga MJ, Recuero M, Sastre I, Garcia MA, Aldudo J, Lendon C, Han SW, Morris JC, Frank A, Vazquez J, Goate A, Valdivieso F (1998) A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia. *Nat Genet* 18: 69-71
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261: 921-923
- Clarimón J, Bertranpetit J, Calafell F, Boada M, Tàrraga L, Comas D (2002). Joint analysis of candidate genes related to Alzheimer's disease in a Spanish population. *Psychiat Genet*. In Press.
- Czech C, Monning V, Tienari PJ, Hartmann T, Masters C, Beyreuther K, Forstl H (1993) Apolipoprotein E epsilon 4 allele and Alzheimer's disease. *Lancet* 342: 1309
- D'Adamio L, Shipp MA, Masteller EL, Reinherz EL (1989) Organization of the gene encoding common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 24.11): multiple minixons and separate 5' untranslated regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7103-7107
- Fukami S, Watanabe K, Iwata N, Haraoka J, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Fraser P, Westaway D, St George-Hyslop P, Saido TC (2002) Abeta-degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse brain: synaptic and axonal localization inversely correlating with Abeta pathology. *Neurosci Res* 43: 39-56
- Hixson JE, Vernier DT (1990) Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with *Hha* I. *J Lipid Res* 31: 545-548
- Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Hama E, Lee HJ, Saido TC (2001) Metabolic regulation of brain A $\beta$  by neprilysin. *Science* 292: 1550-1552
- Iwata N, Takaki Y, Fukami S, Tsubuki S, Saido TC (2002) Region-specific reduction of Abeta-degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse hippocampus upon aging. *J Neurosci Res* 70: 493-500

- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology* 34: 939-944
- Mohajeri MH, Wollmer MA, Nitsch RM (2002) Abeta 42-induced increase in neprilysin is associated with prevention of amyloid plaque formation in vivo. *J Biol Chem* 277: 35460-35465
- Muñoz F.J and Inestrosa NC (1999) Neurotoxicity of acetylcholinesterase amyloid beta-peptide aggregates is dependent on the type of Abeta peptide and the AChE concentration present in the complexes. *FEBS Lett* 450: 205-209
- Oda M, Morino H, Maruyama H, Terasawa H, Izumi Y, Torii T, Sasaki K, Nakamura S, Kawakami H (2002) Dinucleotide repeat polymorphisms in the neprilysin gene are not associated with sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 320: 105-107
- Poduslo SE, Yin X, Hargis J, Brumback RA, Mastrianni JA, Schwankhaus JA (1999) A familial case of Alzheimer's disease without tau pathology may be linked with chromosome 3 markers. *Hum Genet* 105: 32-37
- Reilly CE (2001) Neprilysin content is reduced in Alzheimer brain areas. *J Neurol* 248: 159-160
- Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ, Hulette C, Crain B, Goldgaber D, Roses AD (1993) Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43: 1467-1472
- Selkoe DJ (2000) The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* 8: 447-453
- Shirotani K, Tsubuki S, Iwata N, Takaki Y, Harigaya W, Maruyama K, Kiryu-Seo S, Kiyama H, Iwata H, Tomita T, Iwatsubo T, Saido TC (2001) Neprilysin degrades both amyloid  $\beta$  peptides 1-40 and 1-42 most rapidly and efficiently among thiorphan – and phosphoramidon – sensitive endopeptidases. *J Biol Chem* 276: 21895-21901
- Sodeyama N, Mizusawa H, Yamada M, Itoh Y, Otomo E, Matsushita M (2001) Lack of association of neprilysin polymorphism with Alzheimer's disease and Alzheimer's disease-type neuropathological changes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71: 817-818

Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD (1993) Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1977-1981

Tanzi RE, Kovacs DM, Kim TW, Moir RD, Guenette SY, Wasco W (1996) The gene defects responsible for familial Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 3: 159-168

Weber JL, Wong C (1993) Mutation of human short tandem repeats. *Hum Mol Genet* 4: 1123-1128

Yasojima K, Akiyama H, McGeer EG, McGeer PL (2001) Reduced neprilysin in high plaque areas of Alzheimer brain: a possible relationship to deficient degradation of beta-amyloid peptide. *Neurosci Lett* 297: 97-100

**Table 1.** Age stratification and distribution of *NEP*\*159C/T genotype and allele frequencies

		Genotype			Allele	
		CC	CT	TT	C	T
Total sample	Cases	58 (0.49)	49 (0.42)	11 (0.09)	165 (0.70)	71 (0.30)
	Controls	37 (0.41)	44 (0.48)	10 (0.11)	118 (0.65)	64 (0.35)
<75 years	Cases	32 (0.58)	18 (0.33)	5 (0.09)	82 (0.75)	28 (0.25)
	Controls	19 (0.34)	29 (0.52)	8 (0.14)	67 (0.60)	45 (0.40)
>75 years	Cases	26 (0.41)	31 (0.49)	6 (0.10)	83 (0.66)	43 (0.34)
	Controls	18 (0.51)	15 (0.43)	2 (0.06)	51 (0.73)	19 (0.27)

---

Allele frequencies are indicated in parentheses

**Table 2.** Distribution of APOE genotype and allele frequencies

Genotype	<b>e2/e3</b>	<b>e2/e4</b>	<b>e3/e3</b>	<b>e3/e4</b>	<b>e4/e4</b>
Cases	6 (0.05)	1 (0.01)	46 (0.39)	60 (0.51)	5 (0.04)
Controls	11 (0.12)	-	66 (0.73)	13 (0.14)	1 (0.01)
Allele	<b>e2</b>	<b>e3</b>	<b>e4</b>		
Cases	7 (0.03)	158 (0.67)	71 (0.30)		
Controls	11 (0.06)	156 (0.86)	15 (0.08)		

Frequencies are indicated in parentheses

**Table 3.** NEP genotype frequencies stratified by APOE in individuals younger than 75 years old

<u>APOE</u> e4 genotype		C/C	C/T	T/T
<u>APOE</u> e4 -	AD Cases	13 (0.54)	10 (0.42)	1 (0.04)
	Controls	17 (0.36)	24 (0.51)	6 (0.13)
<u>APOE</u> e4 +	AD Cases	19 (0.61)	8 (0.26)	4 (0.13)
	Controls	2 (0.22)	5 (0.56)	2 (0.22)

Allele frequencies are indicated in parentheses. APOEe4+ and APOEe4- denote individuals bearing at least one APOEe4 allele or non-APOEe4 alleles respectively.

## Capítol III

# **JOINT ANALYSIS OF CANDIDATE GENES RELATED TO ALZHEIMER'S DISEASE IN A SPANISH POPULATION**

J. Clarimón, J. Bertranpetit, F. Calafell, M. Boada, L. Tàrraga,  
D. Comas

Podeu consultar l'article a:

J. Clarimón, J. Bertranpetit, F. Calafell, M. Boada, L. Tàrraga, D. Comas, *"Joint analysis of candidate genes related to Alzheimer's disease in a Spanish population"*, **Psychiatric genetics**, 2003 Jun; 13 (2), pp. 85-90.

## Capítol IV

J. Clarimón, FJ. Muñoz, M. Boada, L. Tàrraga, J. Sunyer, J. Bertranpetit, D. Comas, “*Association study between Alzheimer's disease and genes involved in Abeta biosynthesis, aggregation and degradation: suggestive results with BACE1.*”, **Journal of neurology**, (2003 Aug; 250 (8), pp. 956-61),

© 2003 by Springer-Verlag

Reprinted by Permission of Springer-Verlag

**ASSOCIATION STUDY BETWEEN ALZHEIMER'S DISEASE AND  
DIFFERENT GENES INVOLVED IN Ab BIOSYNTHESIS, AGGREGATION  
AND DEGRADATION: POSITIVE RESULTS WITH BACE1**

**Jordi Clarimón,<sup>1</sup> Jaume Bertranpetit,<sup>1</sup> Francesc Calafell,<sup>1</sup> Mercè Boada,<sup>2</sup> Lluís  
Tàrraga<sup>2</sup> and David Comas<sup>1,CA</sup>**

<sup>1</sup> Unitat de Biologia Evolutiva, Facultat de Ciències de la Salut i de la Vida,  
Universitat Pompeu Fabra. Doctor Aiguader, 80. 08003 Barcelona, Spain.

<sup>2</sup> Fundació ACE. I.C. Neurociències Aplicades. Marquès de Sentmenat, 35-37.  
08014 Barcelona, Spain.

<sup>CA</sup>Corresponding author:

Phone: +34-93-5422844

Fax: +34-93-5422802

e-mail: david.comas@cexs.upf.es



## ABSTRACT

Amyloid  $\beta$ -peptide ( $A\beta$ ) biosynthesis, aggregation and degradation constitute three important steps to consider in the study of pathological mechanisms involved in Alzheimer's disease (AD). Several proteins have been suggested to be involved in each of these processes: proteolytic cleavage of the amyloid precursor protein by the  $\beta$ -site APP cleaving enzyme (BACE), increased amyloid fibril formation by the activity of the acetylcholinesterase (ACHE gene), and degradation of  $A\beta$  aggregates by the plasmin system have been exhaustively documented. A case-control design was used to evaluate the possible association between candidate genes involved in these three processes and AD. We analysed three polymorphisms located at the BACE1 gene, one polymorphism at the ACHE gene, and two variants located at the tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 (genes TPA and PAI-1, respectively), both part of the plasmin system. We found an association between BACE1 exon 5 GG genotype and AD (age- and gender-adjusted odds ratio = 2.14,  $P = 0.014$ ). Although a similar association was reported previously by Nowotny and collaborators [17] only in subjects carrying the  $\epsilon 4$ -allele of the Apolipoprotein E gene (APOE), we did not detect this effect. However, when we combined our results with those previously reported, a clear increase of the risk to develop AD appeared in subjects carrying both the BACE1 exon 5 GG genotype and the APOE  $\epsilon 4$ -allele (crude OR = 2.2,  $P = 0.004$ ). These data suggest an important genetic relation between BACE1 and AD.

**Key words:** Alzheimer's disease, BACE, Plasmin, ACHE, Polymorphisms

## INTRODUCTION

One of the hallmarks of Alzheimer's disease (AD) is the deposition of the 39-43 amino acid residue amyloid  $\beta$ -peptide ( $A\beta$ ) as a major constituent of extracellular plaques [8,19]. The presence of  $A\beta$  in AD brains depends not only on the synthesis of the peptide but also on its aggregation and degradation.  $A\beta$  is derived from the proteolytic processing of the  $\beta$ -amyloid precursor protein (APP) by two proteases, referred to as  $\beta$ - and  $\gamma$ - secretases. The  $\beta$ -site APP cleaving enzyme (known as BACE1) has been identified and characterized by several groups [10,13,20,24,25]. Using a case-control methodology, Nowotny and collaborators found a weak association between a polymorphism in exon 5 of BACE1 gene and AD in those individuals carrying the  $\epsilon 4$ -allele of the apolipoprotein E (APOE) gene [17]. However, these results have not been replicated by other studies [4,15,16].

Although the production of  $A\beta$  is a key step for peptide accumulation, its catabolism also determines the steady-state level of this peptide. In this sense, clearance of  $A\beta$  by proteolytic enzymes can be a relevant pathway in preventing its aggregation. Recently, a number of candidate  $A\beta$  peptide-degrading enzymes have emerged. Plasmin, a serine protease that results from the conversion of the inactive zymogen plasminogen, has been found to cleave  $A\beta$  in vitro, thus preventing its aggregation into  $\beta$ -pleated sheet structures, and blocking  $A\beta$  neurotoxicity [7,23]. Plasmin also increases the processing of the APP at the  $\alpha$ -cleavage site, leading to a non-amyloidogenic  $A\beta$  peptide [12]. Furthermore, several studies have shown that levels of plasmin are reduced in brains from AD patients and its enzymatic activity decreases in serum of AD patients compared to healthy non-demented subjects [12,1].

AD is also characterized by profound alterations in the activity of acetylcholinesterase (ACHE). This enzyme, which has been an important therapeutic

target for AD treatment, co-localizes with A $\beta$  deposits of Alzheimer's brains and promotes the assembly of A $\beta$  peptide into amyloid filaments [11,6]. Even though there is a clear relation between ACHE and AD, no genetic association study has been performed between ACHE and dementia of Alzheimer's type.

In order to characterise the role of different genetic variants involved in the deposition of A $\beta$  in AD brains, we have analysed several polymorphisms in genes implicated in A $\beta$  peptide synthesis, accumulation and degradation. In the present work, we have performed a genetic association study analysing three single nucleotide polymorphisms (SNP's) located at BACE1 gene, one SNP at ACHE gene, and two polymorphisms in genes involved in the plasmin system, an *Alu* element insertion/deletion polymorphism located at the tissue plasminogen activator (TPA) and a single base pair insertion/deletion situated at the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1).

## MATERIALS AND METHODS

### Clinical samples:

The sample comprised 136 AD patients (mean age  $76.6 \pm 5.3$  years, 101 females) and 87 cognitively healthy controls (mean age  $74.9 \pm 5.3$  years, 45 females), both groups of Spanish origin. Mean MMSE scores were  $15.7 \pm 5.9$  for AD subjects and  $26.6 \pm 2.5$  for controls. All the participants were recruited at the Fundació ACE, Institut Català de Neurociències Aplicades. Evaluation of each AD patient was performed using the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) criteria for possible or probable AD [14]. Control subjects were either patients' spouses or unrelated caregivers. Written informed consent was obtained from all participants or respective responsible when patients were not capable.

### Polymorphism assays:

Genomic DNA was extracted from fresh blood using standard phenol-chloroform protocols.

Three nucleotide polymorphisms located at the BACE1 gene, a G/C within exon 5, a G/T in intron 5 (both described by Murphy and collaborators [4]), and a T/A at the 3' untranslated region (3'UTR, SNP ID: rs535860); as well as a PAI-1 single base pair insertion/deletion polymorphism located 675 base pairs upstream from the start of transcription (identified by Dawson *et al.* [5]), were genotyped simultaneously after a multiplex PCR amplification. Primer sequences and PCR conditions are presented in Table 1. The three purified PCR products were used as templates for a single-base primer extension process using the SNaPshot™ Multiplex Kit (Applied Biosystems). Four oligonucleotides of different length were designed to test for each polymorphism (see Table 1). The single-base primer extension was performed in the

same reaction following supplier's recommendations. Products were run in an ABI PRISM<sup>®</sup> 3100 (Applied Biosystems) and GeneScan<sup>™</sup> analysis software (version 3.7) was used to measure fragment sizes.

The *Alu* element insertion/deletion polymorphism within the intron 8 of the TPA gene was genotyped following the method reported by Tishkoff *et al.* [21].

Genotyping of the Pro 561 to Arg polymorphism at the ACHE gene [2] was performed using real time PCR (TaqMan<sup>®</sup>) 5'-nuclease assay technology. Sequences of primer pairs and fluorescent-labeled TaqMan<sup>®</sup> probes were designed using Primer Express 2.0 software (Applied Biosystems). Thermal cycling and end-point PCR analysis was performed on an ABI PRISM<sup>®</sup> 7900HT Sequence Detection System.

APOE genotyping was performed in a previous study [3] following the conditions described by Hixson and Vernier [9].

#### Statistical analysis:

Genotype and allele frequencies were estimated by direct counting, and were compared between patients and controls by means of chi-square analysis. Linkage disequilibrium between closely linked markers was assessed by means of a genotype association test, implemented in the Arlequin 2.000 program [8]. Haplotype frequencies were estimated with an expectation-maximization (EM) algorithm, also implemented in Arlequin 2.000. Homogeneity of BACE1 haplotype frequencies between groups was determined with Fisher's exact test. Estimation of odds ratio (OR) was performed using logistic regression analysis. Multiple logistic regression models were used to adjust for age and sex employing the STATA version 6.0 statistical package.

Table 1

## RESULTS

The distribution of the allele and genotype frequencies of the polymorphisms located at the BACE1, PAI-1, TPA, and ACHE genes are presented in Table 2. The frequencies of all the analysed polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium for AD patients and controls. We found no differences in the allelic distributions between AD patients and controls in none of the six polymorphisms analysed. However, when we focused on genotypic frequencies, we found significant differences in the distribution of the BACE1 exon 5 genotypes. The frequency of the GG genotype was 43% in patients and 29% in controls ( $P = 0.036$ ). After controlling for age and gender effects, the BACE1 exon 5 GG genotype conferred a risk for AD compared with the GC and CC genotypes of 2.14 (95% CI = 1.16-3.93,  $P = 0.014$ ) (Table 3). Interestingly, a protective effect against AD was found for the GC genotype (age- and sex- adjusted OR = 0.45,  $P = 0.007$ ).

Table 2

As expected, the APOE  $\epsilon 4$ -allele frequency in AD patients was significantly increased compared to controls (32% and 8% respectively). Logistic regression analysis adjusting for age and sex showed that the OR of being affected as a function of carrying at least one APOE  $\epsilon 4$ -allele was 8.11 (95% CI = 4.1 – 16.3).

Table 3

To investigate possible synergistic effects of the APOE  $\epsilon 4$ -allele with the other polymorphisms, we stratified all the genetic variants according to the APOE  $\epsilon 4$  genotype. An increase of the BACE1 exon 5 GG genotype was found in AD patients carrying the APOE  $\epsilon 4$ -allele compared to controls (50% vs 29% respectively) (Table 4). However, this difference did not reach statistical significance probably due to the low number of controls carrying the APOE  $\epsilon 4$ -allele. For those individuals lacking the APOE  $\epsilon 4$ -allele, genotype frequencies were almost identical between AD patients and controls. It should be noted that BACE1 exon 5 genotypic frequencies in the two

groups (APOE  $\epsilon$ 4+ and APOE  $\epsilon$ 4-) were significantly different between AD patients ( $P < 0.05$ ), whereas they were similar among controls. When we tried to identify if the protective effect of the BACE1 exon 5 GC genotype remained in any of the APOE  $\epsilon$ 4 subgroups, we found that in those individuals carrying the APOE  $\epsilon$ 4-allele the frequency of heterozygotes was much higher in controls than in patients (64% vs. 37%,  $P = 0.06$ ). When we adjusted by gender and age, a weak but statistically significant protective effect was found in heterozygotes compared to homozygotes and carrying at least one APOE  $\epsilon$ 4-allele (OR = 0.27; 95% CI = 0.08-0.94,  $P = 0.041$ , data not shown).

Table 4

Since the genome seems to be composed of blocks of strong linkage disequilibrium (LD), haplotype reconstruction in association studies may be crucial. In this sense, we tested LD for the three polymorphisms located at the BACE1 gene. All pairs of loci presented significant LD independently of the diagnostic group ( $P < 0.001$  in AD patients and controls). Haplotypes for the three BACE1 polymorphisms were estimated on the basis of genotypes observed using an EM-algorithm (Table 5). The comparison of the BACE1 haplotype distributions between study groups revealed a slightly but not statistically significant differences (Fisher's exact test,  $P = 0.06$ ). Although haplotype analysis in genetic association studies are more powerful than single SNP studies, this is not the case of our work. This could be due to the fact that the C allele of the BACE1 exon 5 is found in a single haplotype while allele G is found in four different haplotypes. If susceptibility to AD is mediated by the site at exon 5, or if it is in tighter LD with the causative site than with the SNPs we have typed, then haplotypes do not provide new information.

Table 5

## DISCUSSION

The present association study has been designed to analyse polymorphisms in genes whose products are known to be involved in the dynamic process of A $\beta$  accumulation. To the best of our knowledge, this is the first study in which the possible genetic relationship between AD and acetylcholinesterase or between AD and plasmin cascade enzymes is evaluated. It is important to note that the single base pair insertion/deletion polymorphism at the promoter region of the PAI-1 gene has been reported to have functional importance in the regulation of gene expression [5]. Moreover, a functional modification in the rate of cleavage of acetylcholine has been postulated for the Pro561-to-Arg polymorphism at the ACHE gene [2]. Although a clear association exists between these proteins and the pathophysiological process of AD, we have not found any association between common polymorphisms located at these three genes and Alzheimer's dementia. Taking into account the allele frequencies of the polymorphisms located at these three loci, risks greater than or equal to 2.2 could be detected in our study with 80% power (95% CI). Therefore, it is conceivable that these are not major AD risk loci.

Nonetheless, we have found a genotype association between BACE1 exon5 and AD. These results are somewhat similar to those reported by Nowotny *et al.* [17], who described an association between the GG genotype and AD in those individuals carrying an  $\epsilon$ 4 allele of the APOE gene. It is noteworthy that the protective effect of the GC genotype can be also elicited from the data reported by Nowotny and co-workers, who found a decrease of the GC genotype in AD cases compared to controls harbouring the APOE  $\epsilon$ 4 allele (55% in patients and 40% in controls,  $P = 0.045$ ) Since the AD and control genotypic frequencies reported in the present study do not differ significantly from those frequencies described by Nowotny and collaborators, even if we compare those for each APOE  $\epsilon$ 4 subgroups ( $P > 0.3$  in all comparisons), we have



grouped both data sets in order to obtain additional statistical power. In that case, the risk effect of the GG genotype in individuals carrying the  $\epsilon 4$  allele increases from a reported adjusted OR of 2.05 ( $P = 0.025$ ) to a crude OR of 2.20 (95% CI = 1.27-3.84,  $P = 0.004$ ). The protective effect of the GC genotype is also significant when we join both data, not only for the APOE  $\epsilon 4$ -positive subgroup (crude OR = 0.49; 95% CI = 0.29-0.82,  $P = 0.007$ ), but also for the whole sample (crude OR = 0.74; 95% CI = 0.55-0.98,  $P = 0.036$ ). In summary, taking together our results and those reported by Nowotny *et al.*, it is strongly suggested that genetic variants within the BACE1 gene could modulate the risk to develop AD.

An exhaustive analysis in larger samples and including novel variants will be necessary to elucidate the role of BACE1 gene in AD pathology. In this case (as in many others) it may be necessary a whole screening of the variation in the gene to find variants with functional implications.

#### Acknowledgements:

This project was supported by DGICT grants PB98-1064 , and BOS2001-0794, and by Generalitat de Catalunya, Grup de Recerca Consolidat 2001SGR00285. We thank Francisco J. Muñoz and Pilar Navarro for fruitful suggestions, and Mònica Vallés for technical assistance. We also acknowledge the Fundació ACE staff for their valuous help.

**REFERENCES**

1. Aoyagi T, Wada T, Kojima F, Nagai M, Harada S, Takeuchi T, Isse K, Ogura M, Hamamoto M, Tanaka K (1992) Deficiency of fibrinolytic enzyme activities in the serum of patients with Alzheimer-type dementia. *Experientia* 48 : 656-659
2. Bartels CF, Zelinski T, Lockridge O (1993) Mutation at codon 322 in the human acetylcholinesterase (ACHE) gene accounts for YT blood group polymorphism. *Am J Hum Genet* 52 : 928-936
3. Clarimón J, Bertranpetit J, Calafell F, Boada M, Tàrraga LI, Comas D. Joint analysis of candidate genes related to Alzheimer's disease in a Spanish population. *Psichiatr Genet* (in press).
4. Cruts M, Dermaut B, Rademakers R, Roks G, Van den Broeck M, Munteanu G, van Duijn CM, Van Broeckhoven C (2001) Amyloid beta secretase gene (BACE) is neither mutated in nor associated with early-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 313 : 105-107
5. Dawson SJ, Wiman B, Hamsten A, Green F, Humphries S, Henney AM (1993) The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells. *J Biol Chem* 268 : 10739-10745
6. De Ferrari GV, Canales MA, Shin I, Weiner LM, Silman I, Inestrosa NC (2001) A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid beta-peptide fibril formation. *Biochemistry* 40 : 10447-10457
7. Exley C, Korchazhkina OV (2001) Plasmin cleaves Abeta42 in vitro and prevents its aggregation into beta-pleated sheet structures. *Neuroreport* 12 : 2967-2970
8. Hardy J (1997) Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 20 : 154-159
9. Hixson JE, Vernier DT (1990) Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* 31 : 545-548.
10. Hussain I, Powell D, Howlett DR, Tew DG, Meek TD, Chapman C, Gloger IS, Murphy KE, Southan CD, Ryan DM, Smith TS, Simmons DL, Walsh FS, Dingwall C, Christie G (1999) Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci* 14 : 419-427

11. Inestrosa NC, Alvarez A, Perez CA, Moreno RD, Vicente M, Linker C, Casanueva OI, Soto C, Garrido J (1996) Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron* 16 : 881-891
12. Ledesma MD, Da Silva JS, Crassaerts K, Delacourte A, De Strooper B, Dotti CG (2000) Brain plasmin enhances APP alpha-cleavage and Aβ degradation and is reduced in Alzheimer's disease brains. *EMBO Rep* 1 : 530-535
13. Lin X, Koelsch G, Wu S, Downs D, Dashti A, Tang J (2000) Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : 1456-1460
14. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34 : 939-944
15. Murphy T, Yip A, Brayne C, Easton D, Evans JG, Xuereb J, Cairns N, Esiri MM, Rubinsztein DC (2001) The BACE gene: genomic structure and candidate gene study in late-onset Alzheimer's disease. *Neuroreport* 12 : 631-634
16. Nicolaou M, Song YQ, Sato CA, Orlacchio A, Kawarai T, Medeiros H, Liang Y, Sorbi S, Richard E, Rogaev EI, Moliaka Y, Bruni AC, Jorge R, Percy M, Duara R, Farrer LA, St Georg-Hyslop P, Rogaeva EA (2001) Mutations in the open reading frame of the beta-site APP cleaving enzyme (BACE) locus are not a common cause of Alzheimer's disease. *Neurogenetics* 3 : 203-206
17. Nowotny P, Kwon JM, Chakraverty S, Nowotny V, Morris JC, Goate AM (2001) Association studies using novel polymorphisms in BACE1 and BACE2. *Neuroreport* 12 : 1799-1802
18. Schneider S, Kueffer JM, Roessli D, Excoffier L (2000) Geneva, Genetics Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland (2000).
19. Selkoe DJ (1998) The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* 8 : 447-453
20. Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J, Jacobson-Croak K, Jewett N, Keim P, Knops J, Lieberburg I, Power M, Tan H, Tatsuno G, Tung J, Schenk D, Seubert P, Suomensaaari SM, Wang S, Walker D, Zhao J, McConlogue L, John V (1999) Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402 : 537-540

21. Tishkoff SA, Ruano G, Kidd JR, Kidd KK (1996) Distribution and frequency of a polymorphic Alu insertion at the plasminogen activator locus in humans. *Hum Genet* 97 : 759-764
22. Tucker HM, Kihiko M, Caldwell JN, Wright S, Kawarabayashi T, Price D, Walker D, Scheff S, McGillis JP, Rydel RE, Estus S (2000) The plasmin system is induced by and degrades amyloid-beta aggregates. *J Neurosci* 20 : 3937-3946
23. Van Nostrand WE, Porter M (1999) Plasmin cleavage of the amyloid beta-protein: alteration of secondary structure and stimulation of tissue plasminogen activator activity. *Biochemistry* 38 : 11570-11576
24. Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286 : 735-741
25. Yan R, Bienkowski MJ, Shuck ME, Miao H, Tory MC, Pauley AM, Brashier JR, Stratman NC, Mathews WR, Buhl AE, Carter DB, Tomasselli AG, Parodi LA, Heinrikson RL, Gurney ME (1999) Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402 : 533-537

**Table 1.** Primer sequences used in the study.

Locus	Primer	Sequence	PCR annealing T (°C)	Ref.
BACE1	BACE1F <sup>a</sup>	5'-GGACTCACTCTCCTTCTGTGCC-3'	62	[9]
	BACE1R <sup>a</sup>	5'-CTCTGCCTCATCCTCCCAACATG-3'	62	[9]
	3'UTR-F <sup>a</sup>	5'-TGAACCTTTGTCCACCATTCC-3'	62	*
	3'UTR-R <sup>a</sup>	5'-TGCACCAATGTTAGGCTTGTTT-3'	62	*
	BACE1-3'UTR <sup>b</sup>	5'-TTTTTCGTGTGTCCCT GTGGTACCC-3'		*
	BACE1-Exon5 <sup>b</sup>	5'-TTTTTTTTTGGCGGGAGTGGTATTATG AGGT-3'		*
	BACE1-Intron5 <sup>b</sup>	5'-TTTTTTTTTTTCTGAAAATGGACTGCAAGGAG GTAA-3'		*
PAI-1	PAI-1F <sup>a</sup>	5'-CACGTTGGTCTCCTGTTTCCTT-3'	62	*
	PAI-1R <sup>a</sup>	5'-GGACTCTTGGTCTTTC CCTCATC-3'	62	*
	PAI-1 <sup>b</sup>	5'-TGATACACGGCTGACTCCCC-3'		*
TPA	TPA-F	5'-GTGAAAAGCAAGGTCTACCAG-3'	58	[21]
	TPA-R	5'-GACACCGAGTTCATCTTGAC-3'	58	[21]
ACHE	ACHE-F <sup>c</sup>	5'-CTCAGCGCCACCGGTATG-3'	60	*
	ACHE-R <sup>c</sup>	5'-GTCAGGCTCAGGTTCCAAAAGAT-3'	60	*
	ACHE (Pro) probe <sup>c</sup>	5' VIC -AGGCTGCTCCGAGGCCCG-3'TAMRA		*
	ACHE (Arg) probe <sup>c</sup>	5' FAM -AGGCTGCTCGGAGGCCCG-3'TAMRA		*

**Table 2.** Distribution of genotypes and alleles frequencies of BACE1, PAI-1, TPA, and ACHE genes.

<b>Gene (polymorphism)</b>	<i>BACE1</i> (exon 5)				<i>BACE1</i> (intron 5)				<i>BACE1</i> (3'UTR)			
	Genotypes <sup>a</sup>			Allele	Genotypes			Allele	Genotypes			Allele
	GG	GC	CC	G	GG	GT	TT	G	AA	AT	TT	A
AD patients (n = 136)	0.43	0.42	0.15	0.64	0.14	0.51	0.35	0.40	0.02	0.18	0.80	0.11
Controls (n = 87)	0.29	0.59	0.13	0.58	0.08	0.60	0.32	0.38	0.01	0.23	0.76	0.13

<b>Gene (polymorphism)</b>	<i>PAI-1</i> (insertion/deletion)				<i>TPA</i> ( <i>Alu</i> insertion/deletion)				<i>ACHE</i> (Pro 561 Arg)			
	Genotypes			Allele	Genotypes			Allele	Genotypes			Allele
	II	ID	DD	I	II	ID	DD	I	CC	CG	GG	C (Pro)
AD patients (n = 136)	0.21	0.58	0.21	0.50	0.34	0.47	0.19	0.57	0.25	0.54	0.21	0.52
Controls (n = 87)	0.24	0.55	0.21	0.52	0.37	0.40	0.23	0.57	0.27	0.55	0.17	0.55

<sup>a</sup> $p < 0.05$ ,  $\chi^2$  (2df) test.

**Table 3.** BACE1 exon 5 age- and sex- adjusted OR estimated by multivariate logistic regression.

Alleles	AD patients	Controls	Odds ratio	95% CI	<i>P</i> -value
G	173 (63.6%)	101 (58%)	1.37	0.91-2.06	0.127
C	99 (36.4%)	73 (42%)	0.72	0.48-1.09	0.127
Genotypes					
GG	58 (42.6%)	25 (28.7%)	2.14	1.16-3.93	0.014
GC	57 (41.9%)	51 (58.6%)	0.45	0.25-0.80	0.007
CC	21 (15.4%)	11 (12.6%)	1.19	0.52-2.74	0.674

---

**Table 4.** BACE1 Exon 5 genotypes stratified by APOE  $\epsilon$ 4-allele.

	$\epsilon$ 4+			$\epsilon$ 4-		
	GG	GC	CC	GG	GC	CC
AD cases (%)	40 (50%)	30 (37%)	10 (13%)	18 (32%)	27 (48%)	11 (20%)
Controls (%)	4 (29%)	9 (64%)	1 (7%)	21 (29%)	42 (57%)	10 (14%)
Totals	44	39	11	39	69	21
	$\chi^2(2df) = 3.52, P = 0.172$			$\chi^2(2df) = 1.32, P = 0.561$		

**Table 5.** BACE1 haplotype frequencies distributions.

Exon 5	Intron 5	3'UTR	AD (2n = 272)	Controls (2n = 174)
G	G	T	0.397	0.367
G	T	A	0.107	0.114
G	T	T	0.132	0.087
C	T	T	0.364	0.419
G	G	A	-	0.013



## Capítol V

J. Clarimón, J. Bertranpetit, M. Boada, L. Tàrraga, D. Comas, “HSP70-2 (HSPA1B) is associated with noncognitive symptoms in late-onset Alzheimer's disease”, **Journal of geriatric psychiatry and neurology** (September 2003; 16 (3): 146-150), © 2003 by Sage Publications Inc.

Reprinted by Permission of Sage Publications, Inc.

**HSP70-2 IS ASSOCIATED WITH NONCOGNITIVE SYMPTOMS IN LATE  
ONSET ALZHEIMER'S DISEASE**

**Jordi Clarimón, BSc, Jaume Bertranpetit, PhD, Mercè Boada, PhD, MD, Lluís  
Tàrraga, BSc, and David Comas, PhD**

from

Unitat de Biologia Evolutiva, Facultat de Ciències de la Salut i de la Vida,  
Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain (JC, JB, DC), and Fundació ACE. I.C.  
Neurociències Aplicades, Barcelona, Spain (MB, LT).

- Presented at the 7th International Geneva/Springfield Symposium on Advances in Alzheimer Therapy. Geneva, Switzerland, April 2002.
- Supported by DGICT grants PB98-1064 , and BOS2001-0794, and by Generalitat de Catalunya, Grup de Recerca Consolidat 2001SGR00285.

Corresponding author:

David Comas

Unitat de Biologia Evolutiva. Facultat de Ciències de la Salut i de la Vida

Universitat Pompeu Fabra

Doctor Aiguader 80

08003 Barcelona, Catalonia, Spain.

Phone: +34-93-5422844

Fax: +34-93-5422802

e-mail: [david.comas@cexs.upf.es](mailto:david.comas@cexs.upf.es)

## **ABSTRACT**

Neuropsychiatric manifestations are common in patients with Alzheimer's disease (AD) and have a major impact on their quality of life. On the other hand, oxidative stress is a well established event extended in AD brains. One of the mechanisms to protect cells from oxidative stress is the expression of heat-shock proteins (HSP). In fact, abnormal expression of HSP has been found to be a common phenomenon in AD pathogenesis. HSP70-2, a member of the 70 Kilodaltons family of HSP, has been related to AD pathophysiology. In order to clarify the relationship between the HSP70-2 gene and noncognitive symptoms in AD subjects, we assessed 77 AD patients, classified according to their cognitive status (mild, moderate and severe impaired groups), with the 10-item Neuropsychiatric Inventory (NPI). A pentanucleotide insertion/deletion (A1/A2) polymorphism of the HSP70-2 gene was typed. The A2 allele conferred a significant increase of psychiatric morbidity in an allele-dose manner ( $p < 0.05$ ). This pattern was observed across the three groups of AD patients, which implies that the effect can be attributed to all the stages of Alzheimer's dementia. Finally, the severity of the 10 behavioral disturbances assessed by the NPI was higher for those patients carrying one or two A2 alleles. These results indicate a possible association between the A2 allele of the HSP70-2 gene and an over expression of noncognitive symptoms in AD.

**KEY WORDS:** noncognitive symptomatology, Alzheimer's disease, HSP70 gene.

## INTRODUCTION

Behavioral and psychological symptoms (that is, noncognitive symptoms) are frequently present in patients with Alzheimer's disease (AD). These symptoms, which include depression, euphoria, agitation, aggression, psychosis, disinhibition, irritability, apathy and aberrant motor behavior, are a source of distress for caregivers,<sup>1</sup> one of the main reasons for nursing home placement,<sup>2</sup> and one of the main component of the cost of AD.<sup>3</sup> Although noncognitive behavioral changes are ubiquitous in AD,<sup>4,5</sup> the manifestation of these disturbances is highly heterogeneous across AD patients.<sup>6</sup> Distinct genetic determinants have been hypothesized to be related to several noncognitive symptoms. Association between APOE allele  $\epsilon 4$ , the most important genetic risk factor for AD, and behavior abnormalities has been documented;<sup>7-9</sup> however, other studies have not found any relation.<sup>10-16</sup> Besides APOE, other genes such as dopamine (DRD1 and DRD3) and serotonin receptors (5-HT2A and 5-HT2C) have been related to neuropsychiatric abnormalities in AD patients.<sup>17,18</sup> Recently, a study using a large cohort of AD patients and their siblings has showed a familial aggregation of psychotic symptoms in AD.<sup>19</sup> These data support the hypothesis that genetic factors may play a role in the manifestation of noncognitive symptoms in AD; therefore, the behavioral heterogeneity found in AD patients could be related to an individual genetic background.

One crucial event in the pathological process of AD is oxidative stress.<sup>20,21</sup> Evidences of oxidative damage in AD brains include lipid peroxidation, protein oxidation, and presence of advanced glycation end products, reactive oxygen species and reactive nitrogen species.<sup>22</sup> One of the cellular physiological strategies to counteract oxidative stress is the production of heat shock proteins (HSP). These proteins act as molecular chaperones<sup>23,24</sup> and participate in many biological processes in which protein folding is involved.<sup>25,26</sup> A large amount of evidence relates HSP to

AD pathophysiology: they have been found in senile plaques,<sup>27</sup> they have been related to the protection of tau protein against hyperphosphorylation during heat shock,<sup>28</sup> mRNA expression of HSP is increased in AD patients,<sup>29</sup> and higher levels of these proteins have been also identified in brains of AD patients compared to healthy subjects.<sup>30,31</sup> Within the HSP, the most predominant and highly conserved group is the HSP70 family, whose members have been found to be involved in all the above mentioned processes related to AD pathophysiology.

In order to establish a possible relationship between oxidative stress and noncognitive alterations presented by AD patients, we performed a cross-sectional study using a genetic variant within the HSP70-2 gene and the information about behavioral alterations assessed with the Neuropsychiatric Inventory instrument.

## SUBJECTS AND METHODS

### *Sample*

The subjects consisted of 77 patients from Catalonia (Spain) recruited and assessed by neurologists and neuropsychologists at the Fundació ACE, Institut Català de Neurociències Aplicades. All individuals met National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) criteria for possible or probable AD.<sup>32</sup> None of the patients had a prior history of psychiatric illness. After a complete description of all procedures of this study, written informed consent was obtained from all participants or respective responsible when patients were not competent to consent.

### *Assessment of noncognitive and cognitive status*

In order to obtain behavioral information from all AD patients, caregivers were interviewed using the Neuropsychiatric Inventory (NPI). This instrument, which has a high interrater and test-retest reliability,<sup>33</sup> is a powerful tool to assess 10 behavioral disturbances occurring in dementia. These symptoms include delusions, hallucinations, agitation/aggression, depression, anxiety, euphoria, apathy, disinhibition, irritability, and aberrant motor activity. Multiplication of the frequency (rating from 1 to 4) and severity (rating from 1 to 3) for each symptom and a summation of subscale scores produced the total NPI score.

Besides the noncognitive NPI test, the Mini-Mental State Examination (MMSE)<sup>34</sup> was also administered to all patients on the same day than the NPI interviews in order to assess their cognitive status.

### *Genotyping*

For all patients, DNA was extracted from fresh blood using standard phenol-chloroform protocols.<sup>35</sup> A two-allele pentanucleotid tandem duplication polymorphism in the 3' untranslated region of the heat-shock protein 70-2 (HSP70-2) gene (GenBank accession number M34269) was determined as described previously.<sup>36</sup> The genotypes were determined by size of DNA fragments: the larger allele (named A1) has a length of 188 base pairs and contains a five nucleotide-tandem duplication that is not present in the shorter 183 bp allele (named A2).

### *Data Analysis*

In order to detect any relationship between noncognitive symptoms and the duplication polymorphism at the HSP70-2 gene, NPI mean values were compared according to HSP70-2 genotype with a one-way analysis of the variance (ANOVA). Independently, in order to clarify if the relation between HSP70-2 and noncognitive alterations was present in all the stages of cognitive decline, the comparison was also performed in each of the three groups that resulted from sample stratification. Therefore, patients were divided in three groups according to MMSE scores: those with MMSE scores from 0 to 10 were grouped in the severely impaired group; those with MMSE scores from 11 to 20 were grouped in the moderately impaired group; and finally, patients with scores greater than 20 were grouped in the mild impaired group. Moreover, we compared the mean NPI score of each behavioral symptom (i.e. hallucinations, depression, irritability...) between HSP70-2 genotypes.

Student's *t*-test was used to analyze MMSE and age means with respect to gender, and chi-square test to verify Hardy-Weinberg equilibrium.

## RESULTS

The sample analyzed in the present study consisted of 77 patients with a mean age of 77 years (range from 67 to 90 years), and a mean MMSE score of 16.4 (range from 0 to 26). Fourteen were males with a mean age of 74.3 years (SD = 5) and a mean MMSE score of 16.8 (SD = 7.3); and 63 were females with a mean age of 78 years (SD = 5.2) and a mean MMSE score of 16.4 (SD = 5.4). No significant differences were found between MMSE mean scores by gender (Student's t-Test,  $t = 0.24$ ,  $df = 75$ ,  $p = 0.81$ ). We classified the patients in three groups according to their cognitive deterioration. The mildly ( $n = 21$ ), moderately ( $n = 45$ ), and severely impaired ( $n = 11$ ) groups had mean MMSE scores of 22.9 (SD = 1.42), 16 (SD = 5.59), and 6 (SD = 3.29), respectively.

Descriptive statistics about the patients gender, age, MMSE and NPI scores classified by HSP70-2 genotypes are shown in Table 1. HSP70-2 genotype distribution was in Hardy-Weinberg equilibrium (chi-square = 0.05,  $df = 1$ ,  $p = 0.8$ ).

Distributions of mean MMSE scores, mean age, and gender did not present any statistical difference between the three possible genotypes. Nevertheless, significant differences in noncognitive symptoms, as measured by the mean total NPI scores, were present between HSP 70-2 genotypes ( $F = 4.65$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0.012$ ). Homozygous patients for the A1 allele presented the lowest NPI score (mean NPI = 7.11), heterozygotes presented an intermediate NPI score (mean NPI = 10.19) and homozygotes for the A2 allele presented the highest NPI total score (mean NPI = 16.22). A linearity test showed a significant ( $p = 0.004$ ) linear association between the number of A2 alleles carried and the NPI score. Moreover, when we focused on HSP70-2 alleles, we found a significantly higher mean NPI score for the A2 allele compared to the lower NPI value observed for the A1 allele (14.05 and 9.17 respectively,  $F = 8.39$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.004$ ).



In order to clarify the relationship between noncognitive alterations and cognitive decline, we performed an analysis of the total NPI scores mean values for each MMSE group (mild, moderate, and severe). Significant differences were found in the NPI values comparing the three groups of patients according to their cognitive status ( $F = 3.73$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0.029$ ). These differences are predominantly due to high NPI scores presented by the severe patients. When a stratification according to the HSP70-2 genotype was performed in each of the three groups of cognitive deterioration, NPI score correlated positively with the number of A2 alleles carried by the patient (allele-dosage effect, see Figure 1). Patients homozygous for the A2 allele presented the highest scores, whereas patients homozygous for the A1 allele presented the lowest NPI scores in each of the three MMSE groups. This increase was statistically significant for those patients with mild dementia ( $F = 3.85$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0.05$ ). Although the trend was also very clear in the cases with severe dementia, it did not reach statistical significance, probably due to the low sample size that resulted from the stratification.

Finally, the average of NPI scores were compared for each noncognitive symptom (product of severity and frequency of each symptom) according to HSP70-2 genotypes (Figure 2). In all comparisons, patients homozygous for the A2 allele presented the highest NPI score within each symptom. Again, these results showed an allele-dosage effect: the higher the number of A2 alleles presented by the patient, the higher the NPI subscale scores.

## **DISCUSSION**

Due to the clear evidence of oxidative damage in AD brains,<sup>22</sup> genes involved in stress response may be targets of study. In this sense, we sought to assess the possible relationship between HSP70-2, a gene involved in the stress response, and noncognitive alterations in AD (measured by the NPI test). We have found an association between the presence of the HSP70-2 A2 allele and increased noncognitive abnormalities within a population affected of Alzheimer's dementia. This association was found in all stages of cognitive deterioration as measured by MMSE. Moreover, the increase of noncognitive symptoms was shown to act in an allele-dose manner, being the A2 homozygous patients those who presented the highest total NPI scores. Finally, there was a clear trend for the 10 symptoms assessed to be more severe in those patients carrying one or two copies of the A2 allele, which implies a non-specific behavior alterations related to the HSP70-2 gene.

In summary, the HSP70-2 A2 allele appears to confer an increased liability to noncognitive symptoms in the dementia of Alzheimer's type. Since oxidative stress is extensive in AD pathology and an increased synthesis of HSP has been found in heat-shocked cells,<sup>37</sup> the association between HSP70-2 variation with behavioral alterations in AD patients is feasible under such pathophysiological conditions.

As far as we know, these results represent the most clear relation between a large group of noncognitive alterations presented in AD patients and a genetic polymorphism.

**Acknowledgments:**

We would like to thank Dr. Francisco J. Muñoz for fruitful discussion and suggestions, Dr. Francesc Calafell for useful comments, and Mònica Vallés for excellent technical assistance. We also wish to thank the Fundació ACE staff for their invaluable help.

**REFERENCES**

1. Ballard C, Lowery K, Powell I, et al. Impact of behavioral and psychological symptoms of dementia on caregivers. *Int Psychogeriatr* 2000; 12:93-105.
2. Balesteri L, Grossberg A, Grossberg GT. Behavioral and psychological symptoms of dementia as a risk factor for nursing home placement. *Int Psychogeriatr* 2000; 12:59-63.
3. Beeri MS, Werner P, Adar Z, et al. Economic cost of Alzheimer disease in Israel. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2002; 16:73-80.
4. Petry S, Cummings JL, Hill MA, Shapira J. Personality alterations in dementia of the Alzheimer type. *Arch Neurol* 1988; 45:1187-1190.
5. Rubin EH, Kinscherf DA. Psychopathology of very mild dementia of the Alzheimer type. *Am J Psychiatry* 1989; 146:1017-1021.
6. Mega MS, Cummings JL, Fiorello T, Gornbein J. The spectrum of behavioral changes in Alzheimer's disease. *Neurology* 1996; 46:130-135.
7. Murphy GM, Taylor J, Tinklenberg JR, Yesavage JA. The apolipoprotein E epsilon 4 is associated with increased behavioral disturbance in Alzheimer's disease. *Am J Geriatr Psychiatry* 1997; 5:88-89.
8. Ramachandran G, Marder K, Tang M, et al. A preliminary study of apolipoprotein E genotype and psychiatric manifestations of Alzheimer's disease. *Neurology* 1996; 47:256-259.
9. Weiner MF, Vega G, Risser RC, et al. Apolipoprotein E epsilon 4, other risk factors, and course of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 1999; 45:633-638.
10. Forsell Y, Basun H, Corder EH, et al. Psychotic symptoms and apolipoprotein E genotypes in an elderly population. *Biol Psychiatry* 1998; 44:139-140.
11. Harwood DG, Barker WW, Ownby RL, et al. Apolipoprotein-E (APO-E) genotype and symptoms of psychosis in Alzheimer's disease. *Am J Geriatr Psychiatry* 1999; 7:119-123.
12. Hirono N, Mori E, Yasuda M, et al. Lack of effect of apolipoprotein E E4 allele on neuropsychiatric manifestations in Alzheimer's disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1999; 11:66-70.

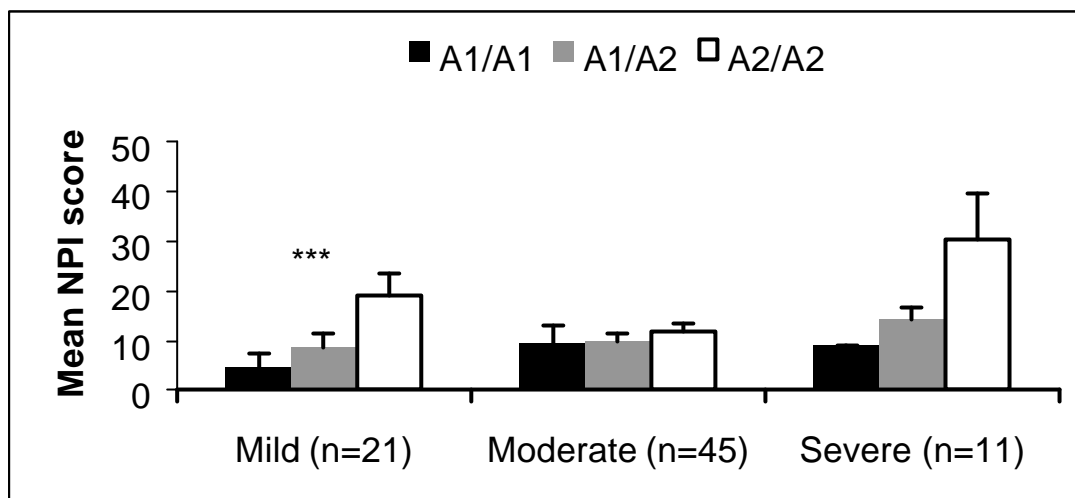
13. Holmes C, Levy R, McLoughlin DM, et al. Apolipoprotein E: noncognitive decline in late onset Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996; 61:580-583.
14. Levy ML, Cummings JL, Fairbanks LA, et al. Apolipoprotein E genotype and noncognitive symptoms in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 1999; 45:422-425.
15. Lopez OL, Kamboh MI, Becker JT, et al. The apolipoprotein E  $\epsilon$ 4 allele is not associated with psychiatric symptoms or extrapyramidal signs in probable Alzheimer's disease. *Neurology* 1997; 49:794-797.
16. Lyketsos CG, Baker L, Warren A, et al. Depression, delusions, and hallucinations in Alzheimer's disease: no relationship to apolipoprotein E genotype. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1997; 9:64-67.
17. Holmes C, Arranz MJ, Powell JF, et al. 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptor polymorphisms and psychopathology in late onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 1998; 7:1507-1509.
18. Sweet RA, Nimgaonkar VL, Kamboh MI, et al. Dopamine receptor genetic variation, psychosis, and aggression in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 1998; 55:1335-1340.
19. Sweet RA, Nimgaonkar VL, Devlin B, et al. Increased familial risk of the psychotic phenotype of Alzheimer disease. *Neurology* 2002; 58:907-911.
20. Papolla MA, Sos M, Omar RA, Sambamurti K. The heat shock/oxidative stress connection. Relevance to Alzheimer disease. *Mol Chem Neuropathol* 1996; 28:21-34.
21. Rottkamp CA, Nunomura A, Raina AK, et al. Oxidative stress, antioxidants, and Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2000; 14:S62-S66.
22. Butterfield DA, Drake J, Pocernich C, Castegna A. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid  $\beta$ -peptide. *Trends Mol Med* 2001; 7:548-553.
23. Beckmann RP, Mizzen LE, Welch WJ. Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implication for protein folding and assembly. *Science* 1990; 248:850-854.
24. Gething MJ, Sambrook J. Protein folding in the cell. *Nature* 1992; 355:33-45.
25. Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 1996; 381:571-579.

- 
26. Salvotinek AM, Biesecker LG. Unfolding the role of chaperones and chaperonins in human disease. *Trends Genet* 2001: 17:528-535.
  27. McGeer PL, Klegeris A, Walker DG, et al. Pathological proteins in senile plaques. *Tohoku J Exp Med* 1994: 174:269-277.
  28. Kirby BA, Merrill CR, Ghanbari H, Wallace WC. Heat shock proteins protect against stress-related phosphorylation of tau in neuronal PC12 cells that have acquired thermotolerance. *J Neurosci* 1994: 14:5687-5693.
  29. Harrison PJ, Procter AW, Exworthy T, et al. Heat shock protein (hsc70) mRNA expression in human brain: effects of neurodegenerative disease and agonal state. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1993: 19:10-21.
  30. Hamos JE, Oblas B, Pulaski-Salo D, et al. Expression of heat shock proteins in Alzheimer's disease. *Neurology* 1991: 41:345-650.
  31. Yoo BC, Seidl R, Cairns N, Lubec G. Heat-shock protein 70 levels in brain of patients with Down Syndrome and Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 1999: 57:315-322.
  32. McKhann G, Drachman D, Folstein M, et al. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology* 1984: 34:939-944.
  33. Cummings JL, Mega M, Gray K, et al. The Neuropsychiatric Inventory: comprehensive assessment of psychopathology in dementia. *Neurology* 1994: 44:2308-2314.
  34. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for clinician. *J Psychiatr Res* 1975: 12:189-198.
  35. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1989.
  36. Dressel R, Günther E. A pentanucleotide tandem duplication polymorphism in the 3' untranslated region of the HLA-linked heat-shock protein 70-2 (HSP70-2) gene. *Hum Genet* 1994: 94:585-586.
  37. Johnson G, Refolo LM, Merrill CR, Wallace W. Altered expression and phosphorylation of amyloid precursor protein in heat shocked neuronal PC12 cells. *Brain Res Mol Brain Res* 1993: 19:140-148.

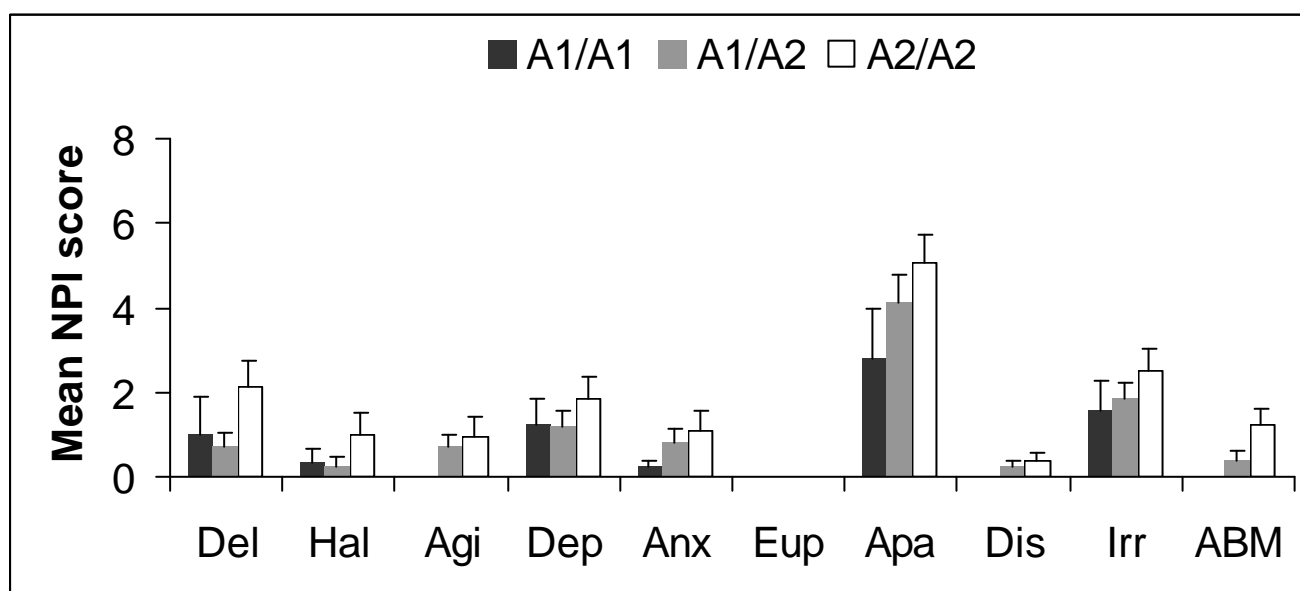
**Table 1.** Demographic and clinical characteristics of Alzheimer’s disease patients sorted by HSP70-2 genotype status.

	Total	Gender		Age in years (SD)	Mean MMSE (SD)	Mean total NPI (SD) <sup>a</sup>
	sample frequency (%)	Men (%)	Women (%)			
HSP70-2 genotypes						
A1/A1	9 (12)	1 (7)	8 (13)	75.6 (5.9)	17.6 (5)	7.11 (6.4)
A1/A2	36 (47)	7 (50)	29 (46)	77.6 (5.3)	15.7 (6)	10.19 (8)
A2/A2	32 (42)	6 (43)	26 (41)	77.5 (5.3)	17.1 (5.7)	16.22 (12.1)

*Note:* MMSE, Mini-Mental State Examination; NPI, Neuropsychiatric Inventory. <sup>a</sup> One-way ANOVA test, p < 0.05



**Figure 1.** Mean Neuropsychiatric Inventory scores across the three Mini-Mental State Examination groups of patients according to their HSP70-2 genotype. \*\*\*  $p < 0.05$



**Figure 2.** Mean Neuropsychiatric Inventory subscale scores for the total sample according to the HSP70-2 genotype. Del = delusions, Hal = hallucinations, Agi = agitation, Dep = depression, Anx = anxiety, Eup = euphoria, Apa = apathy, Dis = disinhibition, Irr = irritability, ABM = aberrant motor behavior.



Capítol VI

**COMPARATIVE ANALYSIS OF THE *ALU* INSERTION  
SEQUENCES IN THE APP 5'FLANKING REGION IN  
PRIMATES**

J. Clarimón, J. Bertranpetit, A. Andrés, D. Comas

*En preparació*

**COMPARATIVE ANALYSIS OF THE *ALU* INSERTION SEQUENCES IN THE APP  
5'FLANKING REGION IN PRIMATES**

**Jordi Clarimón, Jaume Bertranpetit, Aida Andrés, and David Comas**

**From**

Unitat de Biologia Evolutiva, Facultat de Ciències de la Salut i de la Vida, Universitat  
Pompeu Fabra. Barcelona, Spain.

## ABSTRACT

Several observations support the hypothesis that overexpression of the gene encoding the amyloid precursor protein (APP) may play a role in the neuropathology of Alzheimer's disease (AD). Therefore, elucidating the mechanisms involved in the APP gene regulation is of primary importance. Although the 5' promoter region between -500 and +1 is sufficient for APP gene expression, there is currently evidence that various *cis*-acting regulatory elements located in more distal regions can influence the basal transcription level of the gene. In this sense, an upstream regulatory element was reported in humans between position -2257 and -2234. This element is located within an *Alu* insertion (*Alu1*), which is absent in rhesus, and spans from -2432 to -2161. This *Alu*-type sequence is placed 130 bp upstream from another *Alu*-type insertion (*Alu2*) described both in rhesus and humans. Some *Alu* elements residing in the 5'-flanking regions of several genes have been shown to have important gene regulatory functions. Therefore, this *Alu* insertion in a promoter region can be interpreted in terms of recruitment of *cis*-regulatory elements, which may cause differences in gene regulation between primate species.

The present study is a phylogenetic analysis of the region comprising the two *Alu* elements of the APP gene in several primates, including humans. We have found a significant decrease of nucleotide diversity in the *Alu2* element (inserted in all the species analysed) compared to the *Alu1* (inserted only in apes). This finding can be interpreted as a constriction in the *Alu2* sequence variation as a consequence of some functional role of this element in the APP gene expression.

## INTRODUCTION

One of the hallmarks of Alzheimer's disease (AD) is the deposition of the 39-43 amino acid residue amyloid  $\beta$ -peptide ( $A\beta$ ) as a major constituent of extracellular plaques.  $A\beta$  is derived from the proteolytic processing of the  $\beta$ -amyloid precursor protein ( $\beta$ APP), which is encoded by the APP gene. Overexpression of the APP gene has been related to the aetiology of AD. For instance, increased expression of APP has been found in fibroblasts and in certain brain areas of Alzheimer patients (Querfurth et al., 1995), which suggests that this might be an important factor in the neuropathology of AD (Johnson et al., 1990; Rumble et al., 1989; Cohen et al., 1988). Moreover, a marked increase of the APP gene expression appears after head trauma, a well-documented environmental risk factor for AD (Roberts et al., 1991). Furthermore, it has also been reported amyloid deposition in transgenic mice with enhanced APP expression (Quon et al., 1991). These observations illustrate the importance of elucidating the mechanism of APP gene expression. Therefore, the study of the promoter region of the APP gene has attracted attention in the field of AD research.

Due to the evidence that a 5'-upstream regulatory region of around 500bp is sufficient for APP gene expression in cultured cells, most of the studies on APP regulation have been focused on the analysis of this proximal 5'-flanking region (Lahiri and Robakis, 1991; Pollwein et al., 1991; La Fauci et al., 1989; Quitschke and Goldgaber, 1992). However, there is also evidence that gene transcription can be greatly influenced by several positive and negative regulatory elements located upstream from this proximal region (Lahiri et al., 2000). Therefore, alterations in any of these regulatory regions can potentially affect the levels of APP expression and, consequently, led to an increase of the  $A\beta$  peptide.

Deposition of  $A\beta$  is not only found in humans but also in aged monkey brains (Martin et al., 1991; Price et al., 1991; Nakamura et al., 1996; Kanemaru et al., 1996).

These A $\beta$  aggregates are also concurrent with cognitive impairment (Price et al., 1991) and can lead to Alzheimer's disease-like neuropathology. The comparison of rhesus monkey and human APP promoters showed a region of ~270bp (positions -2432 to -2161) of the human sequence that was absent in the rhesus (Song and Lahiri, 1998a). Interestingly, the presence of this sequence was related to a reduced transcription activity. This phenomenon was attributed to a consensus sequence for NF- $\kappa$ B/Rel transcription factor located within this region, from position -2250 to -2241 (Grilli et al., 1995). This 270-bp region containing the NF- $\kappa$ B/Rel regulatory element corresponds to an *Alu* sequence which, in turn, is inserted 130 bp upstream from another *Alu*-type repetitive element that spans in the same orientation from position -2027 to -1727.

*Alu* elements belong to the class of short interspersed repeats (SINEs) that have retrotransposed throughout primate genomes over the past 65 million years of primate evolution (Batzer and Deininger, 2002). In the human genome, there are more than one million copies of *Alu* elements, which represent almost 11% of the genome (Li et al., 2002). Clusters of *Alu* elements from different subfamilies have been described at several loci as a result of retropositional events occurred in the same chromosomal location during different periods of primate evolution (Rowold and Herrera, 2000). Some of the *Alu* copies were inserted in the common branch that led to primates whereas others have retroposed so recently that their insertion at a specific location within the human genome remains polymorphic (Stoneking et al., 1997; Comas et al., 2001). In all cases, the ancestral state corresponds to the lack of the insertion and thus the insertion can be dated according to the specific sequence.

There has long been suggestive evidence that *Alu* insertion elements may play a role in gene transcription modulation by either increasing or decreasing the expression of a nearby gene, as a consequence of the presence of several *cis*-acting elements within the *Alu* sequence (Piedrafita et al., 1996; Apoil et al., 2000; Norris et al., 1995;

Vansant and Reynolds, 1995; Fornasari et al., 1997; Hambor et al., 1993; Brini et al., 1993; McHaffie and Ralston, 1995). Furthermore, mutations within *Alu* elements have been related to disease. A good example is acute myelocytic leukaemia, which is often caused by a single A/G base transition within a hormone response element that is, indeed, located within an *Alu* element preceding the MPO gene (Austin et al. 1993).

The variation due to the presence/absence of this 270-bp *Alu*-related sequence described in two primate species (humans and rhesus monkeys) in the APP promoter region poses some functional and evolutionary questions regarding the possible influence of this element in APP expression. In this sense, an evolutionary approach may shed light to the functional architecture of the APP gene, since new genetic variants have been evaluated through the time (favoured or eliminated) in real *in vivo* experiments, that is, real individuals. In order to better understand the evolution of this region we have performed a phylogenetic study of the *Alu* elements residing in the 5'-flanking region of the APP gene by analysing around one Kb sequence of the APP promoter in several primates, including humans. We also discuss the possible role of this region in the APP gene expression regulation in an attempt to use a comparative approach to understand the functional implications of the variation that has remained after the numerous trials in evolution, leading, after a fine molecular tuning, to the present variation in close related species.

## MATERIAL AND METHODS

Genomic DNA was isolated from whole blood of different species: human (*Homo sapiens*), chimpanzee (*Pan troglodytes*), gorilla (*Gorilla gorilla*), orangutan (*Pongo Pygmaeus*), patas monkey (*Erythrocebus patas*), and drill (*Mandrillus leucophaeus*), using a standard phenol-chloroform method, after digestion with proteinase K.

The amplification of the APP gene promoter region containing the *Alu* sequences was carried out by PCR using the primers ALU-F (5'-ACCAGGGAATGTGTCAGTGTTG-3') and ALU-R (5'-CGGGTCTGCATGAGCAAATAAG-3'). According to the numbering system for humans of Salbaum et al. (1988), the 3' end of these primers were located at positions -2549 and -1616 respectively. The PCR was performed using 100 ng of DNA in a final volume of 25 µl. The reaction contained 20 pmol of each primer, 0.4 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris HCl (pH8.4), 50 mM KCl and 2.5 U of PLATINUM® Taq DNA Polymerase (GIBCO BRL). PCR amplification conditions comprised: initial denaturation step of 1 min at 94°C; followed by 35 cycles of 35 sec at 94°C, 30 sec at 60°C, and 1 min at 72°C; and a final elongation step of 3 min at 72°C. In order to visualise the results, PCR products were run in a 2% agarose gel.

PCR amplified products were purified using Gene Clean (BIO 101). The purified fragments were sequenced separately on both strands using the same PCR primers and the DNA Sequencing Kit, Dye Terminator Cycle-Sequencing with Ampli Taq DNA Polymerase (Applied Biosystems), and the product was subsequently run in an ABI PRISM 377 (Applied Biosystems) automatic sequencer.

Some of the sequenced fragments containing two *Alu* repeats (~ 975 bp in total length) were difficult to read due to the long poly (A) tails presented by the *Alu* insertions. Therefore, internal primers APP1 (5'-TGAGACGGAGTCTCGCTCTG-3') and APP2 (5'-AAGATGGCAATGGCAGAGCG-3') (3' end positions -2401 and -

2063 respectively) were designed in order to overcome this problem. In these cases, the purified 975-bp amplified products were diluted 1:100 and used as a template for a nested PCR using the primers ALU-F and the internal primer APP2 in a PCR reaction performed with the same conditions as described above. The 446-bp PCR product was purified using Gene Clean (BIO 101) and the sequence reaction was performed using the internal primer APP1.

For the analyses, we used the DNA stretch from positions -2520 to -1623 (according to Salbaum et al., 1988). One macaque sequence (*Macaca fuscata*, GenBank number AF067971) was also included in the analysis. Sequences were aligned using CLUSTALW and data was analysed by standard packages, such as PHYLIP 3.5c (Felsenstein, 1989), MEGA version 2.1 (Kumar et al. 2001), and DnaSP software (DNA sequence polymorphism version 3.50; Rozas and Rozas, 1999).

Substitution rate ( $r$ ) was estimated as  $r = K/2T$  (Kimura, 1980), where  $K$  is the number of substitutions per site since the time of divergence between two sequences and  $T$  is the estimated time of divergence between the two sequences.  $K$  and its standard error were calculated according to Kimura's two parameter model (Kimura, 1980).



## RESULTS

The APP upstream promoter region from position  $-2520$  to  $-1623$  in humans contains two *Alu* inserted elements whereas in rhesus monkey only one is present (Salbaum et al.1988). The most upstream *Alu* element (named *Alu1*), which is absent in rhesus monkey, spans from position  $-2432$  to  $-2177$  in humans, with direct flanking repeats of 17 bp in length. The other *Alu* element (named *Alu2*), present in both species, starts at position  $-2027$  and ends at position  $-1727$ , with direct flanking repeats of 16bp. PCR amplification and sequence of the region containing the putative *Alu* insertions was performed in several primates (*Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Gorilla gorilla*, *Pongo pygmaeus*, *Erythrocebus patas* and *Mandrillus leucophaeus*). *Alu2* element was present in all primate species analysed whereas *Alu1* was only inserted in apes and humans. Nucleotide changes and indels compared to the human Genbank sequence are shown in Figure 1. As shown in the Figure, the Genebank sequence presents some incongruence with the present data set, mainly an excess of deletions, that can be attributed to errors in the sequence process.

According to diagnostic base substitutions (Batzer et al., 1996), *Alu1* element was assigned to the young (Y) *Alu* subfamily, while *Alu2* was classified into the intermediate (Sx) subfamily. Kapitonov and Jurka age estimates of *Alu* families (1996) suggested that the *Alu1* element should be inserted 19 million years ago whereas *Alu2* arose 37 million years ago.

Number of substitutions per site since time of divergence (K) were calculated for every pair of complete sequences (data not shown), and also for the *Alu1*, *Alu2* and inter-*Alu* segments separately (values for human and apes are shown in Table 1) according to the Kimura's two-parameter model (Kimura, 1980). As expected, humans presented lower number of substitutions in relation to apes, than to monkeys in all the comparisons performed, in agreement with multiple independent DNA sequence data

sets (Ruvolo, 1997). Focusing in human and apes (Table 1), higher K values are found in comparisons that include orangutans, whereas differences in K values between human, chimpanzee, and gorilla were non-significant.

In order to test any differences in evolutionary rate between both *Alu* elements, their nucleotide substitutions were compared. For all comparisons, *Alu1* element presented higher K values than *Alu2* (Table 1) despite the more recent insertion of *Alu1*. However, these differences did not reach statistical significance except for the comparisons involving orangutans, which presented non-overlapping confidence intervals, probably due to its longer period of divergence to the rest of the species analysed.

Differences among the *Alu* elements and the inter-*Alu* region can also be analysed by comparing the proportion of segregating sites between the three regions in human, chimpanzee, gorilla, and orangutan. *Alu1* do not present any significant differences in number of segregating sites compared to the inter-*Alu* region (chi-squared test 0.58,  $p = 0.445$ ). Nevertheless, *Alu2* presents statistically significant lower number of segregating positions than *Alu1* (chi-squared test 12.53,  $p < 0.001$ ) and the inter-*Alu* region (chi-squared test 6.04,  $p = 0.014$ ). This could indicate a possible constrain in the nucleotide diversity within the *Alu2*, which may be attributed to some functional role of this *Alu* element.

In order to correct the number of substitutions for the estimated age of divergence between each pair of species, rate substitution values ( $r$ ) were calculated. The substitution rate of *Alu2* is lower than the rates presented by the *Alu1* and the inter-*Alu* regions. Again *Alu2* shows a clear evolutive slowdown in all lineages considered.

Because *Alu* elements contain a high presence of CpG dinucleotides, which are known to mutate approximately ten times faster than any other dinucleotide in the nuclear genome (Cooper and Krawczak, 1990; Martínez-Arias *et al.*, 2001),

substitution rates excluding CpG pairs were recalculated to avoid a possible mutational bias. The same general trend of higher nucleotide substitution of *Alu1* was found when compared to *Alu2*.

Consensus sequences for NFκB/Rel transcription factor within each of these *Alu* elements were described by Grilli et al. (1995). One of them spans from position –2250 to –2241 (within *Alu1*), and the other one spans from –1837 to –1828 (within *Alu2*) (Figure1). These two sequences, which are specifically recognized by several transcription factors belonging to the NFκB/Rel family, are identical in all the species analysed, suggesting a strong evolutionary conservation. Furthermore, two AP-2 putative binding sites have been described in the promoter of the rhesus monkey. These two sequences correspond to positions –1989 to –1981 and –1820 to –1814 in humans, both within the *Alu2* insertion (Song and Lahiri, 1998a), and they are conserved among all the species analysed except for a single substitution in the upstream AP-2 element in the drill. Although these results are enticing to be interpreted as the effect of the preservation of a functional activity, the short length of the elements and the high level of identity among all the species analysed could also explain the conservation of these consensus sequences.

Segregating positions in humans, chimpanzees, gorillas and orangutans along the entire sequence, as well as for the *Alu2* in the seven species analysed, is represented in Figure 2. The plot for both *Alu* elements (Figure 2A) denoted a higher divergence along the *Alu1* element and the inter-*Alu* region compared to the *Alu2*.

The analysis of the *Alu 2* element in the seven primate species (Figure 2B) allows to define the most conservative regions within this element, since functional blocks are expected to be maintained even for distant species. Thus, the addition of more divergent sequences highlights regions with higher conservation levels. As expected, a general increase of segregating positions is detected when monkey sequences are included in the plot (Figure 2B). However, several blocks were totally

conserved in all species, including the NFκB/R binding site, the adjacent AP-2 consensus sequence, and a 32-bp region upstream the NFκB/R binding site (positions –1870 to –1838).

## DISCUSSION

In the present study we have analysed the sequence divergence in several primates of two *Alu* elements located in the APP gene promoter, in order to elucidate any possible constraint within the region. We have classified both *Alu* elements into subfamilies according to diagnostic substitutions. On one hand, *Alu2*, the upstream *Alu* element, was assigned to the Sx subfamily. According to previous studies (Kapitonov and Jurka, 1996; Britten et al., 1994a), the age for the insertion of the *Alu* elements belonging to this subfamily can be traced back to retroposition events that occurred more than 30 million years ago. Our results agree with those estimations since this *Alu* element has been found in all the primate species analysed, suggesting an ancient insertion event during primate evolution. On the other hand, *Alu1* belongs to the Y subfamily (also named Sb subfamily), with an estimated average insertion age of 19 million years (Kapitonov and Jurka, 1996). The presence of the *Alu1* element in great apes and humans and its absence in the members of the superfamily *Cercopithecoidea* analysed (Patas monkey, Drill and Macaque), suggest that the retroposition event yielding the insertion of this second *Alu* element occurred within the common lineage that led to great apes and humans. Although some members of the *Alu* Y family have been inserted very recently, the *Alu1* element insertion has preceded the separation between orangutans and the lineage leading to gorillas, chimpanzees and humans, about 12 million years ago.

The comparative analysis has focused on the two *Alu* insertion and the inter *Alu* sequences in a sample set of primates, including three apes. Differences among

species are those expected under the known evolutionary framework, therefore we have focused in the relevant differences among the regions analysed: *Alu1*, the younger insertion, presents more substitutions and a higher substitution rate than the oldest element, *Alu2*, and similar values to the inter *Alu* region. Considering the non-CpG sites, with slow mutation rate, the same pattern is observed. Since both elements analysed are *Alu* elements, the *a priori* expectation was to find a similar evolutionary pattern between them. However, our results point to a significant reduced divergence in the *Alu2* element compared to the *Alu1* and the inter *Alu* regions. Therefore, the most plausible explanation for the low amount of substitutions accumulated in *Alu2* is the influence of selective pressures. As *Alu2* is a non-coding sequence in the promoter region of the APP gene, its selective role has to be explained in terms of its implication in gene expression regulation.

Although *Alu* elements have not been reported as regulatory elements *per se*, they may content regulatory sequences capable to modulate the expression of a nearby gene. In this sense, Lahiri et al. (1999) described an upstream regulatory element (URE) located within *Alu1* in humans (positions -2257 to -2234), which contains a previously described NFκB/Rel consensus sequence (Grilli et al., 1995). When divergence was calculated between pairs of species (human, chimpanzee, gorilla and orangutan), a clear conservation of this NFκB/Rel consensus sequence was observed. This regulatory element is also present in the *Alu2* insertion and, interestingly, it is also conserved between species. Within *Alu2*, another known regulatory consensus sequence, one AP-2 putative binding site element, is also conserved. In addition, many other conserved regions within *Alu2* have been observed, such as the 32-bp sequence upstream the NFκB/Rel site, which are responsible of the divergence reduction of the *Alu2*. Although many of these conserved sequences might have not been involved in the regulation of the nearby gene, we postulate that some unknown regulatory

elements might be located within them. These putative regulatory elements might have been targets of selective pressures, reducing the divergence in the *Alu2* insertion.

Positive regulatory elements located between  $-3416$  and  $-1131$ , which comprises the entire sequence analysed in the present work, have been well documented (Lahiri et al., 2000). Similar data can be also elucidated from a previous work performed by the same authors (Song and Lahiri, 1998b). In that case, the strongest promoter activity was identified in a region of the rhesus APP sequence that comprised the corresponding human region analysed in the present work.

Our study shows how sequences that appear in a given genome position and evolutionary moment, such as Alu elements, can acquire functional properties. In the present analysis, we have employed a molecular evolutionary approach that could shed light into the functional constraints of a region located at 5'-flanking region of the APP gene and the role of Alu insertions. The amount of variation accumulated in apes (where the comparison between the two Alu elements is possible) for Alu2 is approximately 25% that of Alu1, despite its age is nearly double. As a rough measure (as mutation accumulation is not lineal with time), purifying selection seems to have dropped a very high proportion of the substitutions that have occurred along the generations in Alu2. Some of these conserved sites have been described through experimental studies. Nonetheless, they are likely to account for a very small part of the functional constraints suffered by the Alu2 element. Beyond the specific recognized regulatory sequences, other unknown functional constraints might have been assigned to this specific Alu sequence, which clearly does not behave as a pure "junk" sequence.

Since APP is over expressed in Alzheimer's disease (AD) patients, regulation of APP expression is a future goal to understand the aetiology of AD. Putative regulatory sequences inferred from an evolutionary approach, such as the one postulated in the present analysis, can be targets for future functional studies.

## REFERENCES

- Apoil PA, Roubinet F, Despiau S, Mollicone R, Oriol R, Blancher A. Evolution of alpha 2-fucosyltransferase genes in primates: relation between an intronic Alu-Y element and red cell expression of ABH antigens. (2000). *Mol Biol Evol* 17(3):337-51
- Austin GE, Lam L, Zaki SR, Chan WC, Hodge T, Hou J, Swan D, Zhang W, Racine M, Whitsett C. Sequence comparison of putative regulatory DNA of the 5' flanking region of the myeloperoxidase gene in normal and leukemic bone marrow cells. (1993). *Leukemia* 7(9):1445-50
- Batzler MA, Deininger PL. Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet* 2002 (5):370-9
- Brini AT, Lee GM, Kinet JP. Involvement of Alu sequences in the cell-specific regulation of transcription of the gamma chain of Fc and T cell receptors. *J Biol Chem* 1993 Jan 15;268(2):1355-61
- Britten RJ. Evidence that most human Alu sequences were inserted in a process that ceased about 30 million years ago. (1994a). *Proc Natl Acad Sci USA* 91:6148-50
- Britten RJ. Evolutionary selection against change in many Alu repeat sequences interspersed through primate genomes. (1994b). *Proc Natl Acad Sci USA* 91:5992-96
- Cohen ML, Golde TE, Usiak MF, Younkin LH, Younkin SG. In situ hybridization of nucleus basalis neurons shows increased beta-amyloid mRNA in Alzheimer disease. (1988). *Proc Natl Acad Sci USA* 85(4):1227-31
- Comas D, Plaza S, Calafell F, Sajantila A, Bertranpetit J. Recent insertion of an Alu element within a polymorphic human-specific Alu insertion. (2001) *Mol Biol Evol* 18:85-88
- Cooper DN, Krawczak M. Cytosine methylation and the fate of CpG dinucleotides in vertebrate genomes. (1989). *Hum Genet* 83(2):181-88
- Felsenstein J (1989). PHYLIP Phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistic* 5:164-66
- Fornasari D, Battaglioli E, Flora A, Terzano S, Clementi F. Structural and functional characterization of the human alpha3 nicotinic subunit gene promoter. *Mol Pharmacol* 1997 Feb;51(2):250-61

- Grilli M, Ribola M, Alberici A, Valerio A, Memo M, Spano P. Identification and characterization of a kappa B/Rel binding site in the regulatory region of the amyloid precursor protein gene. (1995). *J Biol Chem* 270(45):26774-77
- Hambor JE, Mennone J, Coon ME, Hanke JH, Kavathas P. Identification and characterization of an Alu-containing, T-cell-specific enhancer located in the last intron of the human CD8 alpha gene. *Mol Cell Biol* 1993 Nov;13(11):7056-70
- Johnson SA, McNeill T, Cordell B, Finch CE. Relation of neuronal APP-751/APP-695 mRNA ratio and neuritic plaque density in Alzheimer's disease. (1990). *Science* 248(4957):154-7
- Kanemaru K, Iwatsubo T, Ihara Y. Comparable amyloid beta-protein (A beta) 42(43) and A beta 40 deposition in the aged monkey brain. (1996). *Neurosci Lett* 214(2-3):196-8
- Kapitonov V, Jurka J. The age of Alu subfamilies. (1996). *J Mol Evol* 42:59-65
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. (1980). *J Mol Evol* 16(2):111-20
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, and Nei M(2001) MEGA2: molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- La Fauci G, Lahiri DK, Salton SR, Robakis NK. Characterization of the 5'-end region and the first two exons of the beta-protein precursor gene. (1989). *Biochem Biophys Res Commun* 159(1):297-304
- Lahiri DK, Nall C, Ge YW. Promoter activity of the beta-amyloid precursor protein gene is negatively modulated by an upstream regulatory element. (1999). *Brain Res Mol Brain Res* Jul 23;71(1):32-41
- Lahiri DK, Robakis NK. The promoter activity of the gene encoding Alzheimer beta-amyloid precursor protein (APP) is regulated by two blocks of upstream sequences. (1991). *Brain Res Mol Brain Res* 9(3):253-7
- Lahiri DK, Song W, Ge YW. Analysis of the 5'-flanking region of the beta-amyloid precursor protein gene that contributes to increased promoter activity in differentiated neuronal cells. (2000). *Brain Res Mol Brain Res* 2000 May 5;77(2):185-98
- Li WH, Gu Z, Wang H, Nekrutenko A. Evolutionary analyses of the human genome. (2001) *Nature* 409:847-849



- Martin LJ, Sisodia SS, Koo EH, Cork LC, Dellovade TL, Weidemann A, Beyreuther K, Masters C, Price DL. Amyloid precursor protein in aged nonhuman primates. (1991). *Proc.Nat.Acad.Sci. USA* 88(4):1461-5
- Martinez-Arias R, Calafell F, Mateu E, Comas D, Andres A, Bertranpetit J. Sequence variability of a human pseudogene. (2001) *Genome Res.*11(6):1071-85.
- McHaffie GS, Ralston SH. Origin of a negative calcium response element in an ALU-repeat: implications for regulation of gene expression by extracellular calcium. *Bone* 1995 Jul;17(1):11-4
- Nakamura S, Kiatipattanasakul W, Nakayama H, Ono F, Sakakibara I, Yoshikawa Y, Goto N, Doi K. Immunohistochemical characteristics of the constituents of senile plaques and amyloid angiopathy in aged cynomolgus monkeys.. (1996). *J Med Primatol* 25(4):294-300
- Norris J, Fan D, Aleman C, Marks JR, Futreal PA, Wiseman RW, Iglehart JD, Deininger PL, McDonnell DP. Identification of a new subclass of Alu DNA repeats which can function as estrogen receptor-dependent transcriptional enhancers. *J Biol Chem* 1995 Sep 29;270(39):22777-82
- Piedrafita FJ, Molander RB, Vansant G, Orlova EA, Pfahl M, Reynolds WF. An Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP1-thyroid hormone-retinoic acid response element. (1996). *J Biol Chem* 271(24):14412-20
- Pollwein P, Masters CL, Beyreuther K. The expression of the amyloid precursor protein (APP) is regulated by two GC-elements in the promoter. (1991). *Nucleic Acids Res* 20(2):63-8
- Price DL, Martin LJ, Sisodia SS, Wagster MV, Koo EH, Walker LC, Koliatsos VE, Cork LC. Aged non-human primates: an animal model of age-associated neurodegenerative disease. (1991). *Brain Pathol* 1(4):287-96
- Querfurth HW, Wijsman EM, St George-Hyslop PH, Selkoe DJ. Beta APP mRNA transcription is increased in cultured fibroblasts from the familial Alzheimer's disease-1 family. (1995). *Brain Res Mol Brain Res* 28(2):319-37
- Quitschke WW, Goldgaber D. The amyloid beta-protein precursor promoter. A region essential for transcriptional activity contains a nuclear factor binding domain. (1992). *J Biol Chem* 267(24):17362-68
- Quon D, Wang Y, Catalano R, Scardina JM, Murakami K, Cordell B. Formation of beta-amyloid protein deposits in brains of transgenic mice. (1991). *Nature* 352(6332):239-41

- Roberts GW, Gentleman SM, Lynch A, Graham DI. Beta A4 amyloid protein deposition in brain after head trauma. (1991). *Lancet* 338 (870):1422-3
- Rowold DJ, Herrera RJ. Alu elements and the human genome. (2000). *Genetics* 108:57-72
- Rozas J and Rozas R. DnaSP version 3. An integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* (1999)15 (2):174-175
- Rumble B, Retallack R, Hilbich C, Simms G, Multhaup G, Martins R, Hockey A, Montgomery P, Beyreuther K, Masters CL. Amyloid A4 protein and its precursor in Down's syndrome and Alzheimer's disease. (1989). *N Engl J Med* 320(22):1446-52
- Ruvolo M. Molecular phylogeny of the hominoids: inferences from multiple independent DNA sequence data sets. (1997). *Mol Biol Evol* 14(3):248-65
- Salbaum JM, Weidemann A, Lemaire HG, Masters CL, Beyreuther K. The promoter of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor gene. (1988). *EMBO J* 7(9):2807-13
- Song W, Lahiri DK. Molecular cloning of the promoter of the gene encoding the Rhesus monkey beta-amyloid precursor protein: structural characterization and a comparative study with other species. (1998a). *Gene* 217:151-64
- Song W, Lahiri DK. Functional identification of the promoter of the gene encoding the Rhesus monkey beta-amyloid precursor protein. *Gene* (1998b) Sep 14;217(1-2):165-76
- Stoneking M, Fontius JJ, Clifford SL, Soodyall H, Arcot SS, Saha N, Jenkins T, Tahir MA, Deininger PL, Batzer MA. Alu insertion polymorphisms and human evolution: evidence for a larger population size in Africa. (1997)*Genome Research* 7: 1061-1071
- Vansant G, Reynolds WF. The consensus sequence of a major Alu subfamily contains a functional retinoic acid response element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Aug 29;92(18):8229-33

	Species comparison	Divergence time (million years)	$K$ (SE) All	$K$ (SE) non-CpG	$r$
<i>Alu1</i>	H-C	6	0.0276 (0.010)	0.0315 (0.014)	2.30
	H-G	8	0.0157 (0.008)	0.0125 (0.008)	0.98
	H-O	12	0.0522 (0.014)	0.0318 (0.015)	4.35
	C-G	8	0.0357 (0.012)	0.0315 (0.014)	4.46
	C-O	12	0.0733 (0.172)	0.0579 (0.018)	3.05
	G-O	12	0.0605 (0.016)	0.0381 (0.015)	2.50
<i>Alu2</i>	H-C	6	0.0100 (0.006)	0.0083 (0.006)	0.80
	H-G	8	0.0067 (0.004)	0.0083 (0.006)	0.42
	H-O	12	0.0100 (0.005)	0.0125 (0.007)	0.42
	C-G	8	0.0100 (0.006)	0.0083 (0.006)	0.62
	C-O	12	0.0134 (0.006)	0.0125 (0.007)	0.56
	G-O	12	0.0100 (0.005)	0.0125 (0.007)	0.42
Inter- <i>Alu</i>	H-C	6	0.0135 (0.010)	0.0163 (0.011)	1.12
	H-G	8	0.0067 (0.006)	0.0081 (0.008)	0.42
	H-O	12	0.0480 (0.019)	0.0588 (0.022)	2.00
	C-G	8	0.0200 (0.011)	0.0246 (0.014)	1.25
	C-O	12	0.0627 (0.022)	0.0766 (0.025)	2.61
	G-O	12	0.0554 (0.020)	0.0676 (0.024)	2.30

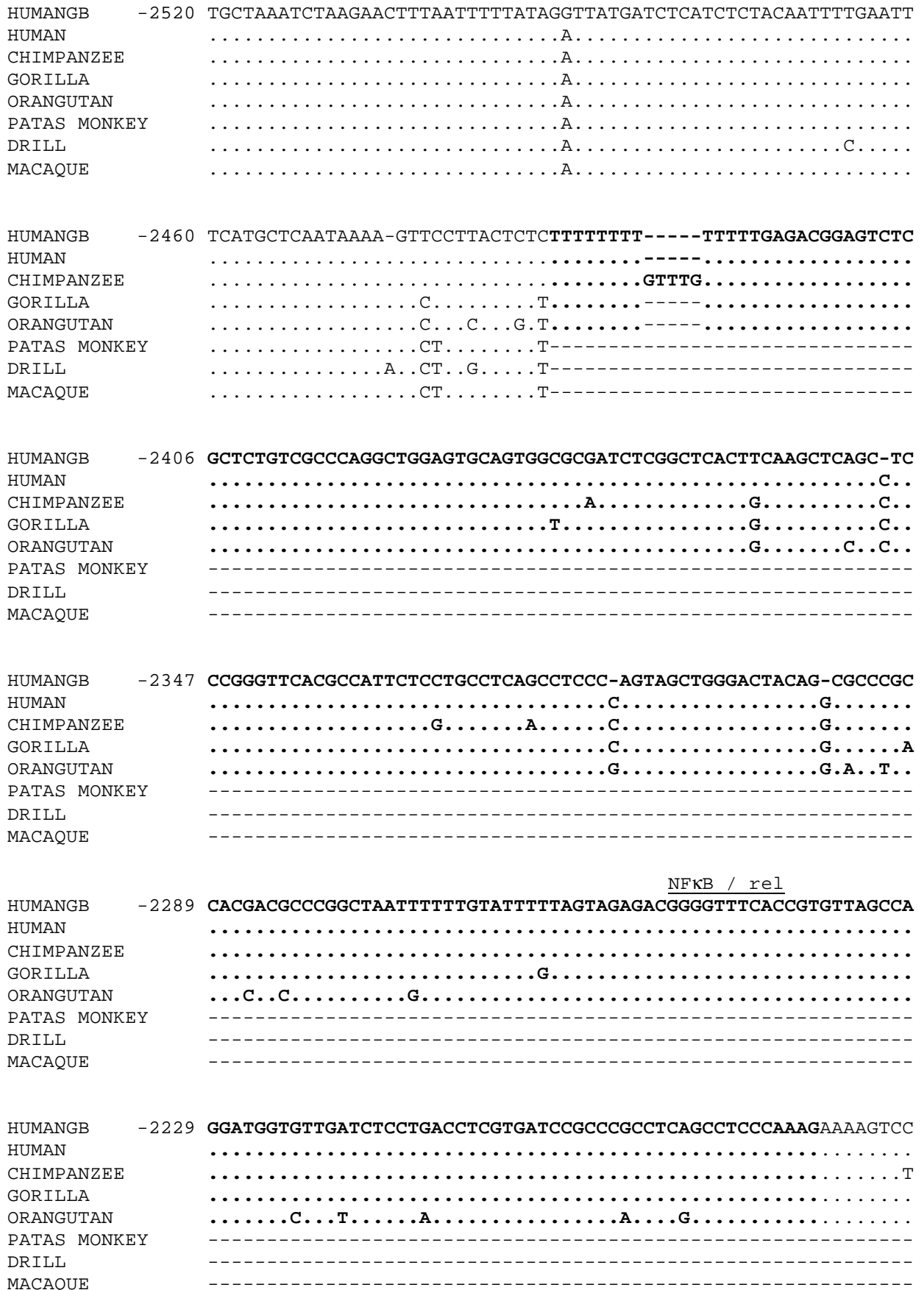
**Table 1.** Number and rates of substitution between species for the two *Alu* elements analysed and inter-*Alu* sequence.  $K$ : Number of substitutions per site since divergence time of two different species.  $r$ : nucleotide substitution rates, expressed as units of substitutions per site per  $10^9$  years.  $K$  and  $r$  were calculated including and excluding CpG dinucleotides. Standard errors (SE) are indicated in parentheses. Species analysed: H (human), C (chimpanzee), G (gorilla), O (orangutan).

## Figure legends

**Figure 1.** Alignments of APP promoter sequences from all species analysed together with the human geneBank sequence (accession number: X12751). Alu sequences are shown in bold. The putative AP-2 and NFκB/Rel consensus sequences for control elements binding sites are upper lined.

**Figure 2.** Segregating positions (S) along (A) Alu1 and Alu2 for human, chimpanzee, gorilla and orangutan sequences, and (B) for Alu2 in the comparison of all the species. Each bar represents a segregating position. Consensus sequences (NFκB and AP-2) are shown in bold.

**Figure 1.**



HUMANGB -2169 CTCACTCTTAAAGT-----TGCCCTCCTCCTTCCCAGGGCTGGCTTCATGGGCATGCAACC  
 HUMAN .....  
 CHIMPANZEE .....G.....  
 GORILLA .....  
 ORANGUTAN .....C.AAAAC.....T.....A.....  
 PATAS MONKEY -----C.AAAAC.....CA.....  
 DRILL -----GC.AAAAC.....A.....CA.....  
 MACAQUE -----C.AAAAC.....CA.....

HUMANGB -2114 CTGGAGAGTCTCACAGGCCCTGCGGTGGGAGGAGCCCCATGCTTGGTTTAAACGCTCTGCC  
 HUMAN .....  
 CHIMPANZEE .....  
 GORILLA .....  
 ORANGUTAN .....GA.....A.....T.....  
 PATAS MONKEY .....GA.....T.....T.....T.....  
 DRILL .....GA.....T.....T.....  
 MACAQUE .....GA.....T.....-----

HUMANGB -2054 ATTGCCATCTTAAAAATTCTTAATTTAATTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTGAGGTGGAGTCTCGC  
 HUMAN .....  
 CHIMPANZEE .....  
 GORILLA .....G.....  
 ORANGUTAN .....T.....A.....  
 PATAS MONKEY ..C.A.....T.....ACA.....  
 DRILL ..C.A.....T.....ACA.....  
 MACAQUE ..C.A.....T.....ACA.....

A P - 2

HUMANGB -1994 TCTGTGCGCCAGGCTGGAGTGCAATGGCACAATCTTGGCTCACTGCAACCTCCGCCTCCC  
 HUMAN .....  
 CHIMPANZEE .....T.....  
 GORILLA .....  
 ORANGUTAN .....  
 PATAS MONKEY ...A.....A.....TG.C.....T.....  
 DRILL ...A.T.....A.....TTG.C.....  
 MACAQUE ...A.....A.....TG.C.....

HUMANGB -1934 AGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCTGGAGTAGCTGGGATTACAGGCAGGAGTAA  
 HUMAN .....  
 CHIMPANZEE .....T.....  
 GORILLA .....T.....  
 ORANGUTAN .....T.....  
 PATAS MONKEY .....C.....T.....  
 DRILL .....T.....C.....C.....T...A..  
 MACAQUE .....T.....

NFkB / rel A P -2

HUMANGB -1874 CCACGCTCGGCTAATTTTTGCATTTTTAGTAGAGATGGGGTTTCACCATGTTGGCCAGG  
 HUMAN .....  
 CHIMPANZEE .....  
 GORILLA .....  
 ORANGUTAN .....  
 PATAS MONKEY ...T.....T.....C.....  
 DRILL .A.G.....C.....  
 MACAQUE ...T.....TC...CA.....

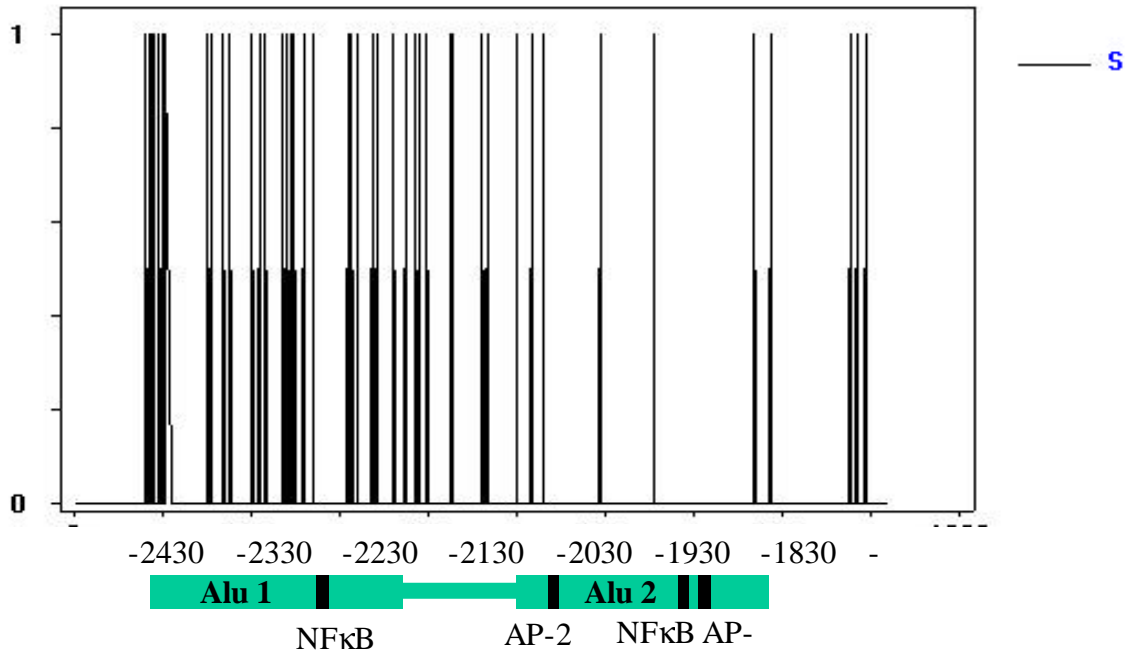
HUMANGB -1814 CTGGTCTAGAACTCCTGACCTCAGGTGATCTCCCACCCTGGGCCTCCTAAAAGTGCTGGGA  
HUMAN .....G..CA.....  
CHIMPANZEE .....G..CA.....A.....  
GORILLA .....G..CA.....  
ORANGUTAN .....G..CA.....  
PATAS MONKEY .....CG.TCA.....C.....  
DRILL .....CG..CA.....C.....  
MACAQUE .....C.....T.....G.TCA.....C.....

HUMANGB -1754 TTACAGGCATGAGCCACCAGGCCCGCCTTAAAATTCTTAATAATG-TAACAAAGGGTCT  
HUMAN .....  
CHIMPANZEE .....  
GORILLA .....T.....  
ORANGUTAN .....  
PATAS MONKEY .....A.....TT..A.....A.....  
DRILL .....A.....TT..A.....A.....  
MACAQUE .....A.....A.....G.....TT..CA.....A.....

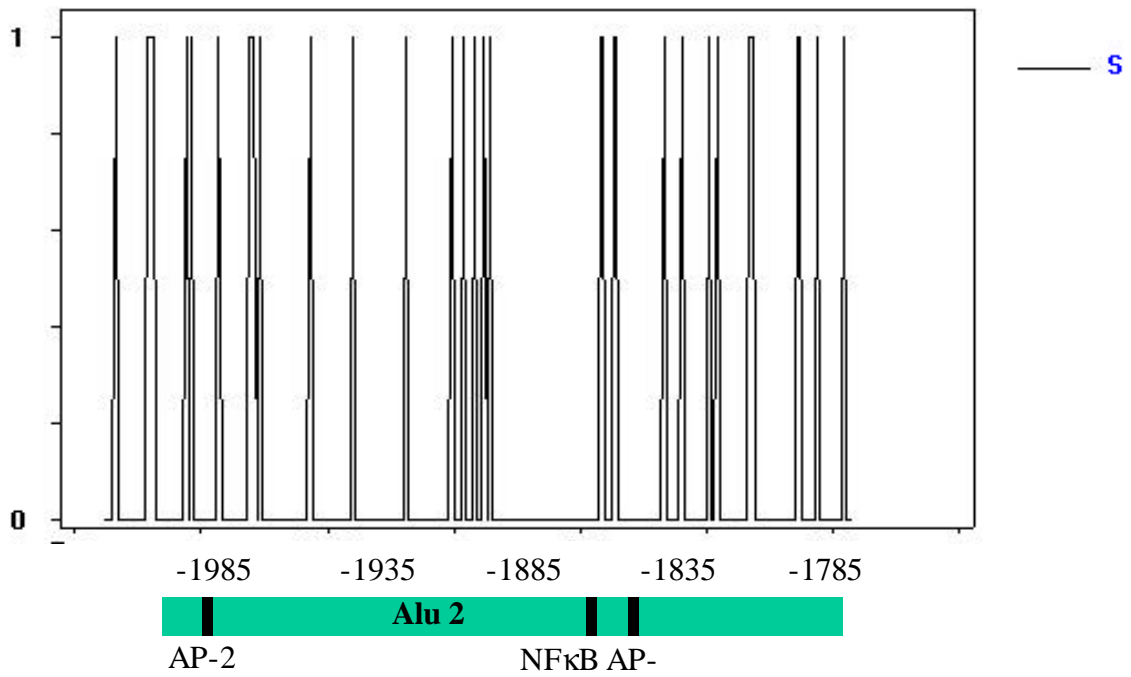
HUMANGB -1695 CACGTTTGCATTTT-GCAGTGGACTCTGCAAGATTGTAGCT-TGGACCACGTT-CTCTT-  
HUMAN .....T.....T.....T.....T.....  
CHIMPANZEE .....T.....T.....C.T.....T.....  
GORILLA .....C.....C.....T.....T.....  
ORANGUTAN .....T.....T.....T.....T.....  
PATAS MONKEY ...A.....A.....A.....T..G...C..T.....T.....  
DRILL ...A.....A.....A.....T..G...C..T.....T.....  
MACAQUE ...A.....A.....A.....T..G...C..T.....T.....

HUMANGB -1639 GCATTTCAGATACCTTCT  
HUMAN .....  
CHIMPANZEE .....  
GORILLA .....  
ORANGUTAN .....  
PATAS MONKEY .....G.....  
DRILL .....G.....  
MACAQUE .....G.....

Figure 2



A



B



*Sobre els estudis d'associació de tipus cas-control:*

En la present tesi s'ha intentat fer una aproximació als factors genètics de risc de la MA en una població espanyola, utilitzant un mètode d'epidemiologia genètica de tipus cas-control. L'estratègia emprada ha estat l'estudi de variants genètiques (polimorfismes) situades en diversos gens candidats, és a dir, gens que codifiquen proteïnes que estan involucrades en algun dels processos fisiopatològics que tenen lloc en la MA. De fet, tots els gens analitzats en els diversos estudis d'associació (Capítols del II al V), es podrien agrupar en tres grans processos: el metabolisme d'APP, els processos oxidatius i els esdeveniments inflamatoris. Tot i així, degut a que la proteïna amiloide és un element cabdal en el procés patològic de la malaltia, la majoria dels gens escollits per a ser analitzats estan involucrats amb el processament de la pròpia proteïna precursora de l'amiloide o bé es relacionen amb el pèptid A $\beta$ . Així, el  $\beta$ -site APP cleaving enzyme (BACE1) i la bleomycina hydrolasa (BH) tindrien funcions de  $\gamma$ -secretassa, l' $\alpha$ -2-macroglobulina (A2M) estaria involucrada en l'endocitosi del pèptid A $\beta$ , la neprilysina (NEP), l'activador del plasminògen tissular (TPA) i l'inhibidor del plasminògen (plasminogen activator inhibitor -1) en la degradació, i, finalment, l'apolipoproteïna E (APOE), l' $\alpha$ -1-antiquimotripsina (AACT) i l'acetilcolinesterasa (ACHE) actuarien a mode de xaperona, és a dir, accelerant el procés d'agregació del pèptid A $\beta$ . A la Taula 5 es mostra un resum dels resultats obtinguts per als diversos polimorfismes analitzats en els estudis de tipus cas-control. En alguns casos, aquests polimorfismes ja havien estat descrits com a factors de risc i, per tant, s'ha intentat replicar els resultats en la nostra mostra. Així, per exemple, en el Capítol III es descriuen els resultats de l'estudi de nou polimorfismes situats en un total de set gens, els quals ja havien estat relacionats amb la MA en estudis previs. Tot i així, a excepció de l'al·lel  $\epsilon$ 4 del gen APOE, no es va replicar cap altre resultat positiu.

Per tal de no centrar-nos únicament en l'intent de replicació de polimorfismes que havien estat estudiats prèviament per d'altres autors, en el present treball també s'han estudiat gens i variants que mai abans havien estat descrites en treballs d'investigació que tinguessin uns objectius iguals als nostres. Aquests loci també es podien considerar gens candidats degut a que els seus productes s'havien relacionat recentment amb la fisiopatologia de la MA. Un exemple clar d'això és l'estudi del polimorfisme \*159C/T, situat a la regió 3' no traduïda del gen NEP (Capítol II). En aquest cas, degut a que dades molt recents demostraven que aquest enzim era el principal responsable de la degradació del pèptid A $\beta$ , es va decidir estudiar la relació entre alguna de les seves variants gèniques i la MA. Un altre fet important a destacar en aquest estudi va ser la utilització de les dades públiques del Projecte Genoma Humà i, en concret, la base de dades de polimorfismes d'un únic nucleòtid (Single Nucleotide Polymorphism Database) per tal de trobar nous polimorfismes en el gen. Aquests dos fets ens van permetre descriure una associació entre aquest gen i la MA, que va resultar ser depenent de l'edat, és a dir, l'associació es presentà tan sols en els individus menors de 75 anys. Una explicació d'aquest patró d'associació depenent de l'edat podria estar relacionat amb l'existència d'un procés biològic que és normal en aquest enzim, que és la reducció tant de l'activitat com de l'expressió de NEP durant l'envelliment normal de l'individu (Iwata et al. 2002). Aquest fet podria veure's alterat per diferents variants del mateix gen. Això significaria que alguns polimorfismes podrien incidir en la velocitat i/o el moment en què l'activitat de la neprilisina comencés a disminuir fins a llindars que resultarien patològics, degut a que serien massa baixos per a poder impedir l'agregació del pèptid amiloide. De fet, si la variant afecta a aquesta disminució de l'expressió o de l'activitat de NEP, es plausible que els efectes tan sols es vegin en edats no molt tardanes, tal i com s'observa en el nostre estudi. Seran necessaris futurs estudis funcionals amb les diverses variants de NEP.

El Capítol IV seria un exemple on s'analitzen tant gens i polimorfismes que ja havien estat associats amb la MA (tres polimorfismes situats en el gen BACE1), com variants gèniques situades en gens que mai abans s'havien investigat en estudis d'associació amb MA (gens TPA, PAI-1 i ACHE). Igualment, aquest Capítol es caracteritza per quelcom que és poc freqüent en aquests tipus d'anàlisis: es va seguir molt clarament un procés fisiològic concret, que és la biosíntesi, la degradació i l'agregació del pèptid A $\beta$ . En aquest cas sí que es va replicar l'associació que havia estat descrita entre el polimorfisme G1239C del gen BACE1 i la MA. Una altra característica d'aquest apartat va ser la utilització del meta-anàlisi. Degut a que l'estudi previ havia descrit l'associació però tan sols en els individus portadors de l'al·lel 4 del gen APOE (Nowotny et al. 2001) i que les freqüències del nostre treball i les del grup de Nowotny eren quasi idèntiques, fins i tot en els dos subgrups que resultaven de l'estratificació segons la presència o absència de l'al·lel  $\epsilon$ 4, la utilització del meta-anàlisi ens va permetre acotar aquesta associació als individus portadors de l'al·lel APOE- $\epsilon$ 4 amb una significació estadística superior a la descrita pel grup de Nowotny.

És important remarcar que en tots els capítols d'estudis d'associació de tipus cas-control (Capítols del II al IV) es descriu la relació entre l'al·lel  $\epsilon$ 4 del gen APOE i la MA. De fet, de tots els polimorfismes analitzats, l'associació més significativa la trobem sempre amb aquesta variant. Això concorda perfectament amb gairebé la totalitat dels estudis previs. Tot i que aquests resultats eren els esperats, cal dir que l'associació trobada (valors d'odds ratio propers a 8 per als individus portadors de, com a mínim, un al·lel  $\epsilon$ 4) indica que la mostra que s'ha utilitzat, tot i no ser molt nombrosa, no està mancada d'una depurada selecció des d'un punt de vista fenotípic, ja sigui per part dels subjectes malalts com dels controls. Això significa que, per exemple, pel que fa a la mostra de malalts, molt probablement no existeixin malalties demenciants diferents a la MA, fet que permet treballar amb una mostra clínicament

molt pura i, per tant, extraordinàriament valuosa per a dur a terme aquests tipus d'estudis, en què és molt important treballar amb individus sense altres malalties concomitants de naturalesa i expressió clínica semblants, les quals podrien interferir enormement amb el significat biològic real del gen analitzat. El fet, doncs, de treballar amb una mostra ben caracteritzada, ens ha permès obtenir uns valors considerables d'associació entre aquest gen, el qual es considera el factor genètic de risc més important descrit, i la MA.

**Taula 5.** Resum dels resultats obtinguts en els estudis d'associació.

<b>Gen</b>	<b>Polimorfisme</b>	<b>Resultat</b>
Acetilcholinesterase (ACHE)	Pro561Arg	No associació.
Alpha-1-antichymotrypsin (AACT)	Microsatèl·lit bial·lèlic (14q32.1)	No associació.
Alpha-2-macroglobulin (A2M)	Val1000Ile	No associació.
	Delecció 5bp (exó 18)	No associació.
Apolipoprotein E (APOE)	Al·lels $\epsilon$ 2, $\epsilon$ 3 i $\epsilon$ 4	Associació amb l'al·lel $\epsilon$ 4: OR ~ 8.
	-491A/T	Efecte protector del genotip A/A en els individus sense l'al·lel APOE- $\epsilon$ 4 (OR=0,43).
Bleomycin Hydrolase (BH)	A1450G	No associació.
$\beta$ -site APP cleaving enzyme (BACE1)	G1239C (exó 5)	Associació amb el genotip GG: OR = 2,14. La meta-anàlisi mostrà una associació entre el genotip GG i la MA només en els individus amb l'al·lel APOE- $\epsilon$ 4 (OR = 2,2).
	T/G (+5 intró 5)	No associació.
	T/A (3'UTR)	No associació.
Heat-Shock Protein 70-2 (HSP70-2)	5 bp ins/del (5'UTR)	No associació.
Interleukin 1- $\alpha$ (IL1-A)	-889 C/T	No associació.
Nepriylsin (NEP)	*159C/T (3'UTR)	Associació en els individus menors de 75 anys (OR = 2,74). Independent del genotip APOE.
Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1)	-675 G ins/del	No associació.
Tissue Plasminogen Activator (TPA)	Alu ins/del (intró 8)	No associació.

*Sobre l'estudi d'associació amb simptomatologia no cognitiva:*

Tot i que la MA es pot definir com una patologia demenciant primària que s'afecta a àrees cognitives tals com la memòria i apareix una síndrome de tipus afaso-apraxo-agnòsic, cal dir que la seva evolució clínica pot diferir molt entre els individus malalts. Així, la comorbiditat psiquiàtrica, els canvis de personalitat que tenen lloc durant el transcurs de la malaltia, és força característic per a cada malalt. Això té una incidència directa molt important amb el tractament, el cost del malalt i la qualitat de vida dels cuidadors i familiars. Estudis recents demostren que la presència de patologia de tipus psicòtic en els malalts d'Alzheimer està determinada, en part, per factors genètics, ja que s'observa un cúmul familiar quan s'analitzen germans de malalts amb aquesta simptomatologia psicòtica acompanyant la MA (Sweet et al. 2002). Els resultats presentats en el Capítol V demostren una associació entre un polimorfisme del gen heat-shock protein 70-2 (HSP70-2) i la presència de simptomatologia no cognitiva en la MA. En aquest cas, el gen analitzat no està relacionat directament amb la proteïna amiloide sinó que forma part d'un dels processos que tenen lloc en la MA: l'estrès oxidatiu. Fins al moment, cap estudi havia intentat relacionar un gen, el producte del qual es relaciona directament amb l'estrès oxidatiu, i la presència d'alteracions en el comportament dels pacients. L'associació que es descriu en aquest capítol podria tenir una gran incidència en el diagnòstic precoç d'un curs clínic sever en un malalt diagnosticat de MA, fet que tindria repercussions immediates en el seguiment del malalt, en la informació al cuidador i, en definitiva, en el model d'atenció mèdica.

*Sobre el desequilibri de lligament:*

Quelcom molt important, no només en el present estudi, sinó en una gran quantitat d'estudis d'associació, és el fet que, sovint, la variant analitzada pot no tenir cap rellevància biològica per se. Això significa que no és la responsable directa de l'associació, tot i que la seva freqüència difereixi significativament entre els malalts i els controls. Un exemple d'això és l'associació trobada entre el polimorfisme G1239C del gen BACE1 i la MA (Capítol IV). En aquest cas el polimorfisme en qüestió, tot i formar part d'un exó (exó 5), no provoca cap canvi en la seqüència aminoacídica de la proteïna. Es tracta, doncs, d'un polimorfisme sinònim. Per tant, esperarem que el fet que en aquesta posició hi hagi un nucleòtid o un altre no tindrà cap rellevància biològica, ja que els dos codificaran pel mateix aminoàcid en la mateixa posició (en aquest cas, valina en la posició 244). Igualment, polimorfismes situats en regions no traduïdes del gen poden no tenir cap significat biològic, com podria ser l'alteració de l'expressió del gen. Això és el que podria succeir amb l'associació entre el gen NEP i la MA: el polimorfisme analitzat es troba a 159 nucleòtids en orientació 3' del codó STOP i, per tant, és possible que no tingui cap rellevància biològica. Igualment, el polimorfisme que s'ha associat a trastorns no cognitius es troba també a la regió 3' no traduïda del gen HSP70-2.

El fet que s'hagin associat variants concretes d'un gen amb la malaltia, no vol dir que la variant sigui la que realment predisposi a l'individu a patir-la, sinó que aquesta es pot trobar en desequilibri de lligament (DL) amb un altre al·lel que sí té una rellevància biològica i sí és responsable directe d'aquesta associació. Aquesta variant, a més, no té perquè trobar-se ubicada en el mateix gen, sinó que pot estar formant part d'un gen situat a prop i que, per tant, s'heretarà conjuntament amb el polimorfisme que hem estudiat.

Estudis recents sobre el DL en el genoma humà reflexen l'existència de grans blocs o haplotips de diversitat limitada interromputs per *hot spots* de recombinació (Goldstein 2001). De fet, actualment existeix un ampli consens entre la comunitat científica que afirma que el DL s'estén en, almenys, unes 10 kilobases (10.000 nucleòtids), i que el genoma consta de blocs d'haplotips que tendeixen a heretar-se conjuntament. Per tant, el fet que trobem una associació entre un polimorfisme que, en principi, no sigui biològicament rellevant i una malaltia complexa com la MA no hauria de suposar cap qüestió o desconfiança sobre el significat real d'aquest polimorfisme concret en la malaltia. Simplement s'hauria d'entendre com l'associació entre un bloc del genoma (el qual podrà ser més o menys gran en funció de factors com la localització cromosòmica o la pròpia història de la població) i la malaltia.

*Sobre la genètica comparativa:*

Una de les conseqüències més immediates de l'obtenció de seqüències de DNA de primats no humans és la identificació precisa de les diferències, a nivell genètic, entre la nostra espècie i la resta de primats. Tot i que *a priori* podríem pensar que les diferències més importants per a ser estudiades serien aquelles que es troben en zones codificants (exons), s'ha de tenir present que els canvis que es troben en seqüències reguladores dels gens i que, per tant, estan directament relacionades amb la seva expressió, tenen una importància cabdal. De fet, avui dia, i gràcies a l'aparició dels micro-arrays, s'estan duent a terme nombrosos estudis on es comparen els perfils d'expressió de mRNA entre diferents teixits per a diverses espècies per tal d'identificar les diferències existents en l'expressió dels gens i així, identificar possibles diferències d'expressió dels diferents gens i en moments concrets. Això ens ajudarà a entendre millor la biologia de diversos processos fisiològics i, fins i tot, de la malaltia.

Per tal de dur a terme aquests tipus d'estudis de genètica comparativa podríem considerar el ximpanzé com el primat més idoni, degut a que és l'espècie més relacionada filogenèticament amb la nostra i, per tant, se'n pot despendre una informació que no seria possible d'obtenir amb genomes d'altres primats, més allunyats filogenèticament. Tot i així, cal remarcar que la comparació amb genomes d'altres primats ens permet identificar millor aquelles seqüències que han estat conservades per la selecció natural.

En el Capítol VI es descriu un estudi en què s'utilitzen les diverses eines de la genètica comparativa per tal d'analitzar, des d'un punt de vista filogenètic, un segment d'aproximadament una kilobase que forma part de la regió promotora del gen que codifica per la proteïna precursora del pèptid  $\beta$ -amiloide (APP). En concret, es van analitzar dues seqüències adjacents de tipus *Alu* que es troben a aproximadament 1.5 kilobases de l'inici de transcripció del gen APP en humans. L'objectiu era esbrinar, a partir de la comparació de seqüències de sis primats diferents, a part de la d'humans, possibles regions que haguessin pogut estar sotmeses a pressions selectives i, per tant, susceptibles de tenir un cert significat biològic. En aquest cas es va poder concloure que la regió *Alu* situada més a prop de l'origen de transcripció del gen APP presentava uns nivells de divergència significativament menors que la resta de la regió promotora analitzada; per tant, molt probablement havia patit algun tipus de constricció selectiva. Això suggereix que aquest element *Alu* podria estar involucrat en l'expressió del gen APP, el qual es troba, alhora, sobre expressat en els malalts d'Alzheimer. En conclusió, l'estudi suggereix que l'anàlisi exhaustiva d'aquesta regió concreta podria conduir a una millor comprensió de com té lloc aquest increment de l'expressió d'APP, un increment que, d'altra banda, s'observa bàsicament en les zones cerebrals típicament afectades per la MA.



*Sobre el futur dels estudis d'associació genètica en la malaltia d'Alzheimer:*

Sembla força clar que els estudis que tindran lloc d'ara endavant en el camp de l'epidemiologia genètica passaran per una fase on els cribatges a gran escala de variants (polimorfismes) nucleotídiques (*Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs*) i utilitzant una gran quantitat de mostres, tant de malalts com de controls, serà la pauta habitual. Aquests estudis es podran dur a terme gràcies a les noves tecnologies d'alta precisió, alt rendiment i cada cop amb un cost més raonable (tecnologies *high throughput*) que estan apareixent en els últims temps. A més, és important destacar que el cribatge del genoma no representarà analitzar els aproximadament deu milions de SNPs que s'estima presenten els nostres cromosomes. Això es deu a que, actualment, ja s'estan realitzant projectes multicèntrics que tenen com a objectiu determinar quins són els SNPs mínims (els "tag SNPs") necessaris per a descriure l'estructura haplotípica d'un genoma sencer. Això significa que, degut a l'existència de desequilibri de lligament, l'anàlisi d'un únic SNP permetrà inferir amb força exactitud el contingut nucleotídic de les posicions variables adjacents. Un cop, doncs, descrites les grans regions o blocs haplotípics que tendeixen a heretar-se conjuntament, es podrà inferir l'arquitectura genòmica que caracteritza una malaltia complexa a partir de la genotipació dels aproximadament 500.000 SNPs altament informantius i sense informació redundant que caldrà analitzar (enlloc dels 10 milions totals que presenta el nostre genoma).

Tot i així, pel que fa a la MA, caldrà reduir la variabilitat fenotípica al màxim. Això vol dir, realitzar cribatges genètics en subgrups de malalts que presentin un mateix endofenotip, és a dir, que tinguin el màxim de característiques clíniques comunes i, per tant, reduir l'heterogeneïtat clínica al mínim per tal d'obtenir una mostra el més homogènia possible. Això significarà tenir molta més cura a l'hora de reclutar els pacients, ja que aquesta mostra no serà únicament representativa de

malaltia, sinó que tindrà unes característiques clíniques particulars que hauran de ser tingudes en compte per a la seva classificació posterior en els diversos subgrups. Un exemple de subdivisió de la mostra podria ser segons la presència o absència de simptomatologia psiquiàtrica. També es podria subdividir la mostra segons la rapidesa en que la malaltia ha progressat en l'individu. Una altra forma de classificar la mostra de malalts podria ser utilitzant criteris neuropsicològics, tals com alteracions importants en els tests d'atenció i fluència verbal, que indiquen unes alteracions en els lòbuls frontals més importants que en la resta de malalts, o bé classificant els individus segons el tipus d'alteracions: eminentment de tipus visual-constructives (quelcom que reflexaria disfuncions en, sobre tot, l'hemisferi dret); principalment de tipus semàntic (per tant, alteracions en l'hemisferi esquerre); o bé, aquells individus amb alteracions més globals de les seves capacitats cognitives i que per tant, tindrien una afectació més bilateral. Aquests patrons neuropsicològics que difereixen entre els pacients, estan directament relacionats amb diversos patrons d'hipometabolisme cerebral que es poden apreciar mitjançant tècniques de neuroimatge com el PET. Així, un altre tipus d'agrupament podria ser atenent a la imatge cerebral, la qual pot variar molt d'un pacient a un altre tot i trobar-se en un mateix estadi de la malaltia.

Tot i així, no hem d'oblidar que la mostra de controls segueix tenint una enorme importància per tal de dur a terme aquests tipus d'estudis. Aquest tipus de mostres poden no provenir d'una consulta mèdica i, per tant, poden estar mancades de dades molt importants, tals com els antecedents personals, familiars o el grau d'escolaritat, les quals sí es recullen sovint per als pacients. L'obtenció d'aquest tipus de dades ens permet incloure en l'estudi quelcom que no s'ha d'oblidar quan es fa l'abordatge genètic d'una malaltia complexa: els factors ambientals. Tal i com s'ha comentat en l'apartat d'introducció de la present tesi, la MA es una malaltia multigènica i multifactorial. Això vol dir que els diversos factors genètics no actuen independentment de l'ambient i, en conseqüència, cal tenir en compte ambdós factors.

Finalment, caldria fer un apunt sobre quelcom que està essent cada vegada més mencionat en el camp de la MA i, de forma més general, en d'altres malalties de tipus neuropsiquiàtric: la farmacogenòmica. En aquest sentit, la resposta de l'individu als nous fàrmacs, cada cop més dirigits cap a noves dianes íntimament relacionades amb els diversos processos fisiopatològics de la MA, dependrà molt possiblement de la pròpia càrrega genètica del pacient. Això suposarà un canvi de comportament molt important per part dels clínics a l'hora de tractar el pacient. Aquest tractament serà, doncs, individualitzat i dependrà enormement, a més de la resposta del malalt al fàrmac, del seu bagatge genètic en gens de predisposició concrets.

En resum, és d'esperar que l'estudi de la MA portarà a un millor enteniment del procés fisiopatològic que té lloc en els malalts. Això oferirà nous gens candidats a ser analitzats utilitzant les diverses estratègies de la genètica epidemiològica i, per tant, portarà a un millor coneixement del risc individual a patir la malaltia. Igualment, també oferirà noves dianes terapèutiques, les quals donaran una millor efectivitat al fàrmac. Això podrà ser utilitzat pel clínic especialista per tal de fer un abordatge diferent de la malaltia, emprant una estratègia de prevenció enlloc de la teràpia actual d'enlentiment del curs clínic. Tot això, en definitiva, portarà a un conjunt de millores, no només a l'individu, sinó a la pròpia família i a la societat en general.

- Alberca, R., and López-Pousa, S. *Enfermedad de Alzheimer y otras demencias*, 1998.
- Alvarez-Arcaya, A.; Combarros, O.; Llorca, J.; Sanchez-Guerra, M.; Berciano, J.; and Fernandez-Luna, J.L. The --491 TT apolipoprotein E promoter polymorphism is associated with reduced risk for sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 304(3):204-8, 2001.
- Armstrong, R.A.; Nochlin, D.; and Bird, T.D. Neuropathological heterogeneity in Alzheimer's disease: a study of 80 cases using principal components analysis. *Neuropathology*, 20(1):31-7, 2000.
- Arriagada, P.V.; Growdon, J.H.; Hedley-Whyte, E.T.; and Hyman, B.T. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*, 42(3 Pt 1):631-9, 1992.
- Bales, K.R.; Verina, T.; Dodel, R.C.; Du, Y.; Altstiel, L.; Bender, M.; Hyslop, P.; Johnstone, E.M.; Little, S.P.; Cummins, D.J.; Piccardo, P.; Ghetti, B.; and Paul, S.M. Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. *Nat Genet*, 17(3):263-4, 1997.
- Baum, L.; Chen, L.; Ng, H.K.; Chan, Y.S.; Mak, Y.T.; Woo, J.; Chiu, H.F.; and Pang, C.P. Low density lipoprotein receptor related protein gene exon 3 polymorphism association with Alzheimer's disease in Chinese. *Neurosci Lett*, 247(1):33-6, 1998.
- Beard, C.M.; Kokmen, E.; Offord, K.P.; and Kurland, L.T. Lack of association between Alzheimer's disease and education, occupation, marital status, or living arrangement. *Neurology*, 42(11):2063-8, 1992.
- Beffert, U.; Cohn, J.S.; Petit-Turcotte, C.; Tremblay, M.; Aumont, N.; Ramassamy, C.; Davignon, J.; and Poirier, J. Apolipoprotein E and beta-amyloid levels in the hippocampus and frontal cortex of Alzheimer's disease subjects are disease-related and apolipoprotein E genotype dependent. *Brain Res*, 843(1-2):87-94, 1999.
- Behl, C.; Davis, J.; Cole, G.M.; and Schubert, D. Vitamin E protects nerve cells from amyloid beta protein toxicity. *Biochem Biophys Res Commun*, 186(2):944-50, 1992.
- Belart, R. El primer Alzheimer. *Revista Española de Geriatria y Gerontología*, 28:178-181, 1993.
- Bertram, L.; Blacker, D.; Crystal, A.; Mullin, K.; Keeney, D.; Jones, J.; Basu, S.; Yhu, S.; Guenette, S.; McInnis, M.; Go, R.; and Tanzi, R. Candidate genes showing no evidence for association or linkage with Alzheimer's disease using family-based methodologies. *Exp Gerontol*, 35(9-10):1353-61, 2000a.
- Bertram, L.; Blacker, D.; Mullin, K.; Keeney, D.; Jones, J.; Basu, S.; Yhu, S.; McInnis, M.G.; Go, R.C.; Vekrellis, K.; Selkoe, D.J.; Saunders, A.J.; and Tanzi, R.E. Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q. *Science*, 290(5500):2302-3, 2000b.
- Bertram, L., and Tanzi, R.E. Dancing in the dark? The status of late-onset Alzheimer's disease genetics. *J Mol Neurosci*, 17(2):127-36, 2001.

- Beyer, K.; Lao, J.I.; Gomez, M.; Riutort, N.; Latorre, P.; Mate, J.L.; and Ariza, A. Alzheimer's disease and the cystatin C gene polymorphism: an association study. *Neurosci Lett*, 315(1-2):17-20, 2001.
- Beyer, K.; Lao, J.I.; Gomez, M.; Riutort, N.; Latorre, P.; Mate, J.L.; and Ariza, A. The Th1/E47cs-G apolipoprotein E (APOE) promoter allele is a risk factor for Alzheimer disease of very later onset. *Neurosci Lett*, 326(3):187-90, 2002.
- Bhojak, T.J.; DeKosky, S.T.; Ganguli, M.; and Kamboh, M.I. Genetic polymorphisms in the cathepsin D and interleukin-6 genes and the risk of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 288(1):21-4, 2000.
- Bird, T.D.; Lampe, T.H.; Nemens, E.J.; Miner, G.W.; Sumi, S.M.; and Schellenberg, G.D. Familial Alzheimer's disease in American descendants of the Volga Germans: probable genetic founder effect. *Ann Neurol*, 23(1):25-31, 1988.
- Blacker, D.; Wilcox, M.A.; Laird, N.M.; Rodes, L.; Horvath, S.M.; Go, R.C.; Perry, R.; Watson, B., Jr.; Bassett, S.S.; McInnis, M.G.; Albert, M.S.; Hyman, B.T.; and Tanzi, R.E. Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet*, 19(4):357-60, 1998.
- Blennow, K.; Ricksten, A.; Prince, J.A.; Brookes, A.J.; Emahazion, T.; Wasslavik, C.; Bogdanovic, N.; Andreasen, N.; Batsman, S.; Marcusson, J.; Nagga, K.; Wallin, A.; Regland, B.; Olofsson, H.; Hesse, C.; Davidsson, P.; Minthon, L.; Jansson, A.; Palmqvist, L.; and Rymo, L. No association between the alpha2-macroglobulin (A2M) deletion and Alzheimer's disease, and no change in A2M mRNA, protein, or protein expression. *J Neural Transm*, 107(8-9):1065-79, 2000.
- Boada, M.; Pena-Casanova, J.; Bermejo, F.; Guillen, F.; Hart, W.M.; Espinosa, C.; and Rovira, J. [Costs of health care resources of ambulatory-care patients diagnosed with Alzheimer's disease in Spain]. *Med Clin (Barc)*, 113(18):690-5, 1999.
- Bondareff, W.; Mountjoy, C.Q.; Roth, M.; Rossor, M.N.; Iversen, L.L.; and Reynolds, G.P. Age and histopathologic heterogeneity in Alzheimer's disease. Evidence for subtypes. *Arch Gen Psychiatry*, 44(5):412-7, 1987.
- Brandi, M.L.; Becherini, L.; Gennari, L.; Racchi, M.; Bianchetti, A.; Nacmias, B.; Sorbi, S.; Mecocci, P.; Senin, U.; and Govoni, S. Association of the estrogen receptor alpha gene polymorphisms with sporadic Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 265(2):335-8, 1999.
- Brindle, N.; Song, Y.; Rogaeva, E.; Premkumar, S.; Levesque, G.; Yu, G.; Ikeda, M.; Nishimura, M.; Paterson, A.; Sorbi, S.; Duara, R.; Farrer, L.; and St George-Hyslop, P. Analysis of the butyrylcholinesterase gene and nearby chromosome 3 markers in Alzheimer disease. *Hum Mol Genet*, 7(5):933-5, 1998.

- Bullido, M.J.; Artiga, M.J.; Recuero, M.; Sastre, I.; Garcia, M.A.; Aldudo, J.; Lendon, C.; Han, S.W.; Morris, J.C.; Frank, A.; Vazquez, J.; Goate, A.; and Valdivieso, F. A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia. *Nat Genet*, 18(1):69-71, 1998.
- Butterfield, D.A.; Drake, J.; Pocernich, C.; and Castegna, A. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol Med*, 7(12):548-54, 2001.
- Casadei, V.M.; Ferri, C.; Veglia, F.; Gavazzi, A.; Salani, G.; Cattaneo, M.; Sorbi, S.; Annoni, G.; Licastro, F.; Mariani, C.; Franceschi, M.; and Grimaldi, L.M. APOE-491 promoter polymorphism is a risk factor for late-onset Alzheimer's disease. *Neurology*, 53(8):1888-9, 1999.
- Chen, L.; Baum, L.; Ng, H.K.; Chan, L.Y.; Sastre, I.; Artiga, M.J.; Valdivieso, F.; Bullido, M.J.; Chiu, H.F.; and Pang, C.P. Apolipoprotein E promoter and alpha2-macroglobulin polymorphisms are not genetically associated with Chinese late onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 269(3):173-7, 1999.
- Cobb, J.L.; Wolf, P.A.; Au, R.; White, R.; and D'Agostino, R.B. The effect of education on the incidence of dementia and Alzheimer's disease in the Framingham Study. *Neurology*, 45(9):1707-12, 1995.
- Combarros, O.; Infante, J.; Llorca, J.; Pena, N.; Fernandez-Viadero, C.; and Berciano, J. The myeloperoxidase gene in Alzheimer's disease: a case-control study and meta-analysis. *Neurosci Lett*, 326(1):33-6, 2002.
- Conde, L. Factores de riesgo y personalidad premórbida en la enfermedad de Alzheimer. *Rev Mult Gerontol*, 9:200-207, 1999.
- Corder, E.H.; Saunders, A.M.; Strittmatter, W.J.; Schmechel, D.E.; Gaskell, P.C.; Small, G.W.; Roses, A.D.; Haines, J.L.; and Pericak-Vance, M.A. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 261(5123):921-3, 1993.
- Corder, E.H.; Saunders, A.M.; Risch, N.J.; Strittmatter, W.J.; Schmechel, D.E.; Gaskell, P.C., Jr.; Rimmler, J.B.; Locke, P.A.; Conneally, P.M.; Schmechel, K.E.; and et al. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet*, 7(2):180-4, 1994.
- Corder, E.H.; Woodbury, M.A.; Volkman, I.; Madsen, D.K.; Bogdanovic, N.; and Winblad, B. Density profiles of Alzheimer disease regional brain pathology for the huddinge brain bank: pattern recognition emulates and expands upon Braak staging. *Exp Gerontol*, 35(6-7):851-64, 2000.
- Crawford, F.; Fallin, D.; Suo, Z.; Abdullah, L.; Gold, M.; Gauntlett, A.; Duara, R.; and Mullan, M. The butyrylcholinesterase gene is neither independently nor synergistically associated with late-onset AD in clinic- and community-based populations. *Neurosci Lett*, 249(2-3):115-8, 1998.

- Crawford, F.; Town, T.; Freeman, M.; Schinka, J.; Gold, M.; Duara, R.; and Mullan, M. The alpha-2 macroglobulin gene is not associated with Alzheimer's disease in a case-control sample. *Neurosci Lett*, 270(3):133-6, 1999.
- Crawford, F.; Abdullah, L.; Schinka, J.; Suo, Z.; Gold, M.; Duara, R.; and Mullan, M. Gender-specific association of the angiotensin converting enzyme gene with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 280(3):215-9, 2000a.
- Crawford, F.; Freeman, M.; Abdullah, L.; Schinka, J.; Gold, M.; Duara, R.; and Mullan, M. No association between the NOS3 codon 298 polymorphism and Alzheimer's disease in a sample from the United States. *Ann Neurol*, 47(5):687, 2000b.
- Crawford, F.C.; Freeman, M.J.; Schinka, J.A.; Abdullah, L.I.; Gold, M.; Hartman, R.; Krivian, K.; Morris, M.D.; Richards, D.; Duara, R.; Anand, R.; and Mullan, M.J. A polymorphism in the cystatin C gene is a novel risk factor for late-onset Alzheimer's disease. *Neurology*, 55(6):763-8, 2000c.
- Crawford, F.C.; Freeman, M.J.; Schinka, J.A.; Morris, M.D.; Abdullah, L.I.; Richards, D.; Sevush, S.; Duara, R.; and Mullan, M.J. Association between Alzheimer's disease and a functional polymorphism in the Myeloperoxidase gene. *Exp Neurol*, 167(2):456-9, 2001.
- Cummings, J.L.; Mega, M.; Gray, K.; Rosenberg-Thompson, S.; Carusi, D.A.; and Gornbein, J. The Neuropsychiatric Inventory: comprehensive assessment of psychopathology in dementia. *Neurology*, 44(12):2308-14, 1994.
- Cupers, P.; Bentahir, M.; Craessaerts, K.; Orlans, I.; Vanderstichele, H.; Saftig, P.; De Strooper, B.; and Annaert, W. The discrepancy between presenilin subcellular localization and gamma-secretase processing of amyloid precursor protein. *J Cell Biol*, 154(4):731-40, 2001.
- Dahiyat, M.; Cumming, A.; Harrington, C.; Wischik, C.; Xuereb, J.; Corrigan, F.; Breen, G.; Shaw, D.; and St Clair, D. Association between Alzheimer's disease and the NOS3 gene. *Ann Neurol*, 46(4):664-7, 1999.
- Dang, Q.; Walker, D.; Taylor, S.; Allan, C.; Chin, P.; Fan, J.; and Taylor, J. Structure of the hepatic control region of the human apolipoprotein E/C-I gene locus. *J Biol Chem*, 270(38):22577-85, 1995.
- Daw, E.W.; Thompson, E.A.; and Wijsman, E.M. Bias in multipoint linkage analysis arising from map misspecification. *Genet Epidemiol*, 19(4):366-80, 2000.
- Dermaut, B.; Theuns, J.; Sleegers, K.; Hasegawa, H.; Van den Broeck, M.; Vennekens, K.; Corsmit, E.; St George-Hyslop, P.; Cruts, M.; van Duijn, C.M.; and Van Broeckhoven, C. The gene encoding nicastrin, a major gamma-secretase component, modifies risk for familial early-onset Alzheimer disease in a Dutch population-based sample. *Am J Hum Genet*, 70(6):1568-74, 2002.

- Dodel, R.C.; Du, Y.; Bales, K.R.; Gao, F.; Eastwood, B.; Glazier, B.; Zimmer, R.; Cordell, B.; Hake, A.; Evans, R.; Gallagher-Thompson, D.; Thompson, L.W.; Tinklenberg, J.R.; Pfefferbaum, A.; Sullivan, E.V.; Yesavage, J.; Alstiel, L.; Gasser, T.; Farlow, M.R.; Murphy, G.M., Jr.; and Paul, S.M. Alpha2 macroglobulin and the risk of Alzheimer's disease. *Neurology*, 54(2):438-42, 2000.
- Dow, D.J.; Lindsey, N.; Cairns, N.J.; Brayne, C.; Robinson, D.; Huppert, F.A.; Paykel, E.S.; Xuereb, J.; Wilcock, G.; Whittaker, J.L.; and Rubinsztein, D.C. Alpha-2 macroglobulin polymorphism and Alzheimer disease risk in the UK. *Nat Genet*, 22(1):16-7; author reply 21-2, 1999.
- Du, Y.; Dodel, R.C.; Eastwood, B.J.; Bales, K.R.; Gao, F.; Lohmuller, F.; Muller, U.; Kurz, A.; Zimmer, R.; Evans, R.M.; Hake, A.; Gasser, T.; Oertel, W.H.; Griffin, W.S.; Paul, S.M.; and Farlow, M.R. Association of an interleukin 1 alpha polymorphism with Alzheimer's disease. *Neurology*, 55(4):480-3, 2000.
- Edland, S.D.; Tobe, V.O.; Rieder, M.J.; Bowen, J.D.; McCormick, W.; Teri, L.; Schellenberg, G.D.; Larson, E.B.; Nickerson, D.A.; and Kukull, W.A. Mitochondrial genetic variants and Alzheimer disease: a case-control study of the T4336C and G5460A variants. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 16(1):1-7, 2002.
- Egensperger, R.; Kosel, S.; Schnopp, N.M.; Mehraein, P.; and Graeber, M.B. Association of the mitochondrial tRNA(A4336G) mutation with Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 23(4):315-21, 1997.
- Ertekin-Taner, N.; Graff-Radford, N.; Younkin, L.H.; Eckman, C.; Baker, M.; Adamson, J.; Ronald, J.; Blangero, J.; Hutton, M.; and Younkin, S.G. Linkage of plasma Abeta42 to a quantitative locus on chromosome 10 in late-onset Alzheimer's disease pedigrees. *Science*, 290(5500):2303-4, 2000.
- Ezquerra, M.; Blesa, R.; Tolosa, E.; Ballesta, F.; and Oliva, R. Alpha-antichymotrypsin gene polymorphism and risk for Alzheimer's disease in the Spanish population. *Neurosci Lett*, 240(2):107-9, 1998.
- Farrer, L.A.; Cupples, L.A.; Haines, J.L.; Hyman, B.; Kukull, W.A.; Mayeux, R.; Myers, R.H.; Pericak-Vance, M.A.; Risch, N.; and van Duijn, C.M. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *Jama*, 278(16):1349-56, 1997.
- Farrer, L.A.; Abraham, C.R.; Haines, J.L.; Rogaeva, E.A.; Song, Y.; McGraw, W.T.; Brindle, N.; Premkumar, S.; Scott, W.K.; Yamaoka, L.H.; Saunders, A.M.; Roses, A.D.; Auerbach, S.A.; Sorbi, S.; Duara, R.; Pericak-Vance, M.A.; and St George-Hyslop, P.H. Association between bleomycin hydrolase and Alzheimer's disease in caucasians. *Ann Neurol*, 44(5):808-11, 1998.



- Farrer, L.A.; Sherbatich, T.; Keryanov, S.A.; Korovaitseva, G.I.; Rogaeva, E.A.; Petruk, S.; Premkumar, S.; Moliaka, Y.; Song, Y.Q.; Pei, Y.; Sato, C.; Selezneva, N.D.; Voskresenskaya, S.; Golimbet, V.; Sorbi, S.; Duara, R.; Gavrilova, S.; St George-Hyslop, P.H.; and Rogaev, E.I. Association between angiotensin-converting enzyme and Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 57(2):210-4, 2000.
- Fidani, L.; Goulas, A.; Mirtsou, V.; Petersen, R.C.; Tangalos, E.; Crook, R.; and Hardy, J. Interleukin-1A polymorphism is not associated with late onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 323(1):81-3, 2002.
- Finckh, U.; von der Kammer, H.; Velden, J.; Michel, T.; Andresen, B.; Deng, A.; Zhang, J.; Muller-Thomsen, T.; Zuchowski, K.; Menzer, G.; Mann, U.; Papassotiropoulos, A.; Heun, R.; Zurdel, J.; Holst, F.; Benussi, L.; Stoppe, G.; Reiss, J.; Miserez, A.R.; Staehelin, H.B.; Rebeck, G.W.; Hyman, B.T.; Binetti, G.; Hock, C.; Growdon, J.H.; and Nitsch, R.M. Genetic association of a cystatin C gene polymorphism with late-onset Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 57(11):1579-83, 2000.
- Fisher, N.J.; Rourke, B.P.; Bieliauskas, L.; Giordani, B.; Berent, S.; and Foster, N.L. Neuropsychological subgroups of patients with Alzheimer's disease. *J Clin Exp Neuropsychol*, 18(3):349-70, 1996.
- Folstein, M.F.; Folstein, S.E.; and McHugh, P.R. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*, 12(3):189-98, 1975.
- Fratiglioni, L.; De Ronchi, D.; and Aguero-Torres, H. Worldwide prevalence and incidence of dementia. *Drugs Aging*, 15(5):365-75, 1999.
- Galasko, D.; Hansen, L.A.; Katzman, R.; Wiederholt, W.; Masliah, E.; Terry, R.; Hill, L.R.; Lessin, P.; and Thal, L.J. Clinical-neuropathological correlations in Alzheimer's disease and related dementias. *Arch Neurol*, 51(9):888-95, 1994.
- Gibson, A.M.; Singleton, A.B.; Smith, G.; Woodward, R.; McKeith, I.G.; Perry, R.H.; Ince, P.G.; Ballard, C.G.; Edwardson, J.A.; and Morris, C.M. Lack of association of the alpha2-macroglobulin locus on chromosome 12 in AD. *Neurology*, 54(2):433-8, 2000.
- Goate, A.; Chartier-Harlin, M.C.; Mullan, M.; Brown, J.; Crawford, F.; Fidani, L.; Giuffra, L.; Haynes, A.; Irving, N.; James, L.; and et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 349(6311):704-6, 1991.
- Goldgaber, D.; Lerman, M.I.; McBride, W.O.; Saffiotti, U.; and Gajdusek, D.C. Isolation, characterization, and chromosomal localization of human brain cDNA clones coding for the precursor of the amyloid of brain in Alzheimer's disease, Down's syndrome and aging. *J Neural Transm Suppl*, 24:23-8, 1987.
- Goldstein, D.B. Islands of linkage disequilibrium. *Nat Genet*, 29(2):109-11, 2001.

- Graves, A.B.; White, E.; Koepsell, T.D.; Reifler, B.V.; van Belle, G.; Larson, E.B.; and Raskind, M. The association between head trauma and Alzheimer's disease. *Am J Epidemiol*, 131(3):491-501, 1990.
- Green, E.K.; Harris, J.M.; Lemmon, H.; Lambert, J.C.; Chartier-Harlin, M.C.; St Clair, D.; Mann, D.M.; Iwatsubo, T.; and Lendon, C.L. Are interleukin-1 gene polymorphisms risk factors or disease modifiers in AD? *Neurology*, 58(10):1566-8, 2002.
- Grimaldi, L.M.; Casadei, V.M.; Ferri, C.; Veglia, F.; Licastro, F.; Annoni, G.; Biunno, I.; De Bellis, G.; Sorbi, S.; Mariani, C.; Canal, N.; Griffin, W.S.; and Franceschi, M. Association of early-onset Alzheimer's disease with an interleukin-1alpha gene polymorphism. *Ann Neurol*, 47(3):361-5, 2000.
- Guenette, S.Y.; Bertram, L.; Crystal, A.; Bakondi, B.; Hyman, B.T.; Rebeck, G.W.; Tanzi, R.E.; and Blacker, D. Evidence against association of the FE65 gene (APBB1) intron 13 polymorphism in Alzheimer's patients. *Neurosci Lett*, 296(1):17-20, 2000.
- Haines, J.L.; Pritchard, M.L.; Saunders, A.M.; Schildkraut, J.M.; Growdon, J.H.; Gaskell, P.C.; Farrer, L.A.; Auerbach, S.A.; Gusella, J.F.; Locke, P.A.; Rosi, B.L.; Yamaoka, L.; Small, G.W.; Conneally, P.M.; Roses, A.D.; and Pericak-Vance, M.A. No genetic effect of alpha1-antichymotrypsin in Alzheimer disease. *Genomics*, 33(1):53-6, 1996.
- Halimi, G.; Duplan, L.; Bideau, C.; Iniesta, D.; Berthezene, P.; Oddeze, C.; Verdier, J.M.; Michel, B.; and Berge-Lefranc, J.L. Association of APOE promoter but not A2M polymorphisms with risk of developing Alzheimer's disease. *Neuroreport*, 11(16):3599-601, 2000.
- Hardy, J., and Allsop, D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci*, 12(10):383-8, 1991.
- Hedley, R.; Hallmayer, J.; Groth, D.M.; Brooks, W.S.; Gandy, S.E.; and Martins, R.N. Association of interleukin-1 polymorphisms with Alzheimer's disease in Australia. *Ann Neurol*, 51(6):795-7, 2002.
- Helisalmi, S.; Hiltunen, M.; Valonen, P.; Mannermaa, A.; Koivisto, A.M.; Lehtovirta, M.; Ryyanen, M.; and Soininen, H. Promoter polymorphism (-491A/T) in the APOE gene of Finnish Alzheimer's disease patients and control individuals. *J Neurol*, 246(9):821-4, 1999.
- Helisalmi, S.; Mannermaa, A.; Lehtovirta, M.; Ryyanen, M.; Riekkinen, P., Sr.; and Soininen, H. No association between alpha1-antichymotrypsin polymorphism, apolipoprotein E and patients with late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 231(1):56-8, 1997.
- Higuchi, S.; Ohta, S.; Matsushita, S.; Matsui, T.; Yuzuriha, T.; Urakami, K.; and Arai, H. NOS3 polymorphism not associated with Alzheimer's disease in Japanese. *Ann Neurol*, 48(4):685, 2000.

- Hiltunen, M.; Mannermaa, A.; Helisalml, S.; Koivisto, A.; Lehtovirta, M.; Ryyanen, M.; Riekkinen, P., Sr.; and Soininen, H. Butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 genes do not act in synergy in Finnish late-onset Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett*, 250(1):69-71, 1998.
- Hollenbach, E.; Ackermann, S.; Hyman, B.T.; and Rebeck, G.W. Confirmation of an association between a polymorphism in exon 3 of the low-density lipoprotein receptor-related protein gene and Alzheimer's disease. *Neurology*, 50(6):1905-7, 1998.
- Hu, J.; Miyatake, F.; Aizu, Y.; Nakagawa, H.; Nakamura, S.; Tamaoka, A.; Takahash, R.; Urakami, K.; and Shoji, M. Angiotensin-converting enzyme genotype is associated with Alzheimer disease in the Japanese population. *Neurosci Lett*, 277(1):65-7, 1999.
- Hu, Q.; Kukull, W.A.; Bressler, S.L.; Gray, M.D.; Cam, J.A.; Larson, E.B.; Martin, G.M.; and Deeb, S.S. The human FE65 gene: genomic structure and an intronic biallelic polymorphism associated with sporadic dementia of the Alzheimer type. *Hum Genet*, 103(3):295-303, 1998.
- Hutchin, T., and Cortopassi, G. A mitochondrial DNA clone is associated with increased risk for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(15):6892-5, 1995.
- Hyman, B.T.; Marzloff, K.; and Arriagada, P.V. The lack of accumulation of senile plaques or amyloid burden in Alzheimer's disease suggests a dynamic balance between amyloid deposition and resolution. *J Neuropathol Exp Neurol*, 52(6):594-600, 1993.
- Itabashi, S.; Arai, H.; Matsui, T.; Matsushita, S.; Muramatsu, T.; Higuchi, S.; Trojanowski, J.Q.; and Sasaki, H. Absence of association of alpha1-antichymotrypsin polymorphisms with Alzheimer's disease: a report on autopsy-confirmed cases. *Exp Neurol*, 151(2):237-40, 1998.
- Iwata, N.; Takaki, Y.; Fukami, S.; Tsubuki, S.; and Saido, T.C. Region-specific reduction of A beta-degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse hippocampus upon aging. *J Neurosci Res*, 70(3):493-500, 2002.
- Janka, Z.; Juhasz, A.; Rimanoczy, A.; Boda, K.; Marki-Zay, J.; Palotas, M.; Kuk, I.; Zollei, M.; Jakab, K.; and Kalman, J. Alpha2-macroglobulin exon 24 (Val-1000-Ile) polymorphism is not associated with late-onset sporadic Alzheimer's dementia in the Hungarian population. *Psychiatr Genet*, 12(1):49-54, 2002.
- Jhoo, J.H.; Kim, K.W.; Lee, D.Y.; Lee, K.U.; Lee, J.H.; Kim, S.Y.; Youn, J.Y.; Youn, J.C.; and Woo, J.I. Association of alpha-2-macroglobulin deletion polymorphism with sporadic Alzheimer's disease in Koreans. *J Neurol Sci*, 184(1):21-5, 2001.
- Ji, Y.; Urakami, K.; Wada-Isoe, K.; Adachi, Y.; and Nakashima, K. Estrogen receptor gene polymorphisms in patients with Alzheimer's disease, vascular dementia and alcohol-associated dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 11(3):119-22, 2000.

- Jones, G.M.; Sahakian, B.J.; Levy, R.; Warburton, D.M.; and Gray, J.A. Effects of acute subcutaneous nicotine on attention, information processing and short-term memory in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology (Berl)*, 108(4):485-94, 1992.
- Kamboh, M.I.; Ferrell, R.E.; and DeKosky, S.T. Genetic association studies between Alzheimer's disease and two polymorphisms in the low density lipoprotein receptor-related protein gene. *Neurosci Lett*, 244(2):65-8, 1998.
- Kamboh, M.I.; Sanghera, D.K.; Ferrell, R.E.; and DeKosky, S.T. APOE\*4-associated Alzheimer's disease risk is modified by alpha 1-antichymotrypsin polymorphism. *Nat Genet*, 10(4):486-8, 1995.
- Kang, D.E.; Saitoh, T.; Chen, X.; Xia, Y.; Masliah, E.; Hansen, L.A.; Thomas, R.G.; Thal, L.J.; and Katzman, R. Genetic association of the low-density lipoprotein receptor-related protein gene (LRP), an apolipoprotein E receptor, with late-onset Alzheimer's disease. *Neurology*, 49(1):56-61, 1997.
- Kehoe, P.; Wavrant-De Vrieze, F.; Crook, R.; Wu, W.S.; Holmans, P.; Fenton, I.; Spurlock, G.; Norton, N.; Williams, H.; Williams, N.; Lovestone, S.; Perez-Tur, J.; Hutton, M.; Chartier-Harlin, M.C.; Shears, S.; Roehl, K.; Booth, J.; Van Voorst, W.; Ramic, D.; Williams, J.; Goate, A.; Hardy, J.; and Owen, M.J. A full genome scan for late onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, 8(2):237-45, 1999a.
- Kehoe, P.G.; Russ, C.; McIlory, S.; Williams, H.; Holmans, P.; Holmes, C.; Liolitsa, D.; Vahidassr, D.; Powell, J.; McGleenon, B.; Liddell, M.; Plomin, R.; Dynan, K.; Williams, N.; Neal, J.; Cairns, N.J.; Wilcock, G.; Passmore, P.; Lovestone, S.; Williams, J.; and Owen, M.J. Variation in DCP1, encoding ACE, is associated with susceptibility to Alzheimer disease. *Nat Genet*, 21(1):71-2, 1999b.
- Kehoe, P.G.; Williams, H.; Holmans, P.; Wilcock, G.; Cairns, N.J.; Neal, J.; and Owen, M.J. The butyrylcholinesterase K variant and susceptibility to Alzheimer's disease. *J Med Genet*, 35(12):1034-5, 1998.
- Khachaturian, Z.S. Diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch Neurol*, 42(11):1097-105, 1985.
- Khachaturian, Z. An overview of scientific issues associated with the heterogeneity of Alzheimer's disease. In: Boller, F., ed. *Heterogeneity of Alzheimer's disease*. Berlin: Springer-Verlag, 1992. pp. 1-3.
- Ki, C.S.; Na, D.L.; Kim, J.W.; Kim, H.J.; Kim, D.K.; and Yoon, B.K. No association between the genes for butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in late-onset Alzheimer's disease. *Am J Med Genet*, 88(2):113-5, 1999.
- Ki, C.S.; Na, D.L.; Kim, H.J.; and Kim, J.W. Alpha-1 antichymotrypsin and alpha-2 macroglobulin gene polymorphisms are not associated with Korean late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 302(2-3):69-72, 2001.

- Kim, K.W.; Jhoo, J.H.; Lee, K.U.; Lee, D.Y.; Lee, J.H.; Youn, J.Y.; Lee, B.J.; Han, S.H.; and Woo, J.I. No association between alpha-1-antichymotrypsin polymorphism and Alzheimer's disease in Koreans. *Am J Med Genet*, 91(5):355-8, 2000.
- Knight, J.A. The process and theories of aging. *Ann Clin Lab Sci*, 25(1):1-12, 1995.
- Korovaitseva, G.I.; Premkumar, S.; Grigorenko, A.; Molyaka, Y.; Galimbet, V.; Selezneva, N.; Gavrilova, S.I.; Farrer, L.A.; and Rogaev, E.I. Alpha-2 macroglobulin gene in early- and late-onset Alzheimer disease. *Neurosci Lett*, 271(2):129-31, 1999.
- Lambert, J.C.; Pasquier, F.; Cotel, D.; Frigard, B.; Amouyel, P.; and Chartier-Harlin, M.C. A new polymorphism in the APOE promoter associated with risk of developing Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, 7(3):533-40, 1998a.
- Lambert, J.C.; Wavrant-De Vrieze, F.; Amouyel, P.; and Chartier-Harlin, M.C. Association at LRP gene locus with sporadic late-onset Alzheimer's disease. *Lancet*, 351(9118):1787-8, 1998b.
- Lambert, J.C.; Mann, D.; Goumidi, L.; Harris, J.; Pasquier, F.; Frigard, B.; Cotel, D.; Lendon, C.; Iwatsubo, T.; Amouyel, P.; and Chartier-Harlin, M.C. A FE65 polymorphism associated with risk of developing sporadic late-onset Alzheimer's disease but not with Abeta loading in brains. *Neurosci Lett*, 293(1):29-32, 2000.
- Lambert, J.C.; Harris, J.M.; Mann, D.; Lemmon, H.; Coates, J.; Cumming, A.; St-Clair, D.; and Lendon, C. Are the estrogen receptors involved in Alzheimer's disease? *Neurosci Lett*, 306(3):193-7, 2001.
- Launer, L.J.; Andersen, K.; Dewey, M.E.; Letenneur, L.; Ott, A.; Amaducci, L.A.; Brayne, C.; Copeland, J.R.; Dartigues, J.F.; Kragh-Sorensen, P.; Lobo, A.; Martinez-Lage, J.M.; Stijnen, T.; and Hofman, A. Rates and risk factors for dementia and Alzheimer's disease: results from EURODEM pooled analyses. EURODEM Incidence Research Group and Work Groups. European Studies of Dementia. *Neurology*, 52(1):78-84, 1999.
- Lautenschlager, N.T.; Cupples, L.A.; Rao, V.S.; Auerbach, S.A.; Becker, R.; Burke, J.; Chui, H.; Duara, R.; Foley, E.J.; Glatt, S.L.; Green, R.C.; Jones, R.; Karlinsky, H.; Kukull, W.A.; Kurz, A.; Larson, E.B.; Martelli, K.; Sadovnick, A.D.; Volicer, L.; Waring, S.C.; Growdon, J.H.; and Farrer, L.A. Risk of dementia among relatives of Alzheimer's disease patients in the MIRAGE study: What is in store for the oldest old? *Neurology*, 46(3):641-50, 1996.
- Lee, D.W.; Liu, H.C.; Liu, T.Y.; Chi, C.W.; and Hong, C.J. No association between butyrylcholinesterase K-variant and Alzheimer disease in Chinese. *Am J Med Genet*, 96(2):167-9, 2000.
- Lehmann, D.J.; Johnston, C.; and Smith, A.D. Synergy between the genes for butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in late-onset confirmed Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, 6(11):1933-6, 1997.

- Lendon, C.L.; Talbot, C.J.; Craddock, N.J.; Han, S.W.; Wragg, M.; Morris, J.C.; and Goate, A.M. Genetic association studies between dementia of the Alzheimer's type and three receptors for apolipoprotein E in a Caucasian population. *Neurosci Lett*, 222(3):187-90, 1997.
- Li, X., and Greenwald, I. Membrane topology of the *C. elegans* SEL-12 presenilin. *Neuron*, 17(5):1015-21, 1996.
- Liao, A.; Nitsch, R.M.; Greenberg, S.M.; Finckh, U.; Blacker, D.; Albert, M.; Rebeck, G.W.; Gomez-Isla, T.; Clatworthy, A.; Binetti, G.; Hock, C.; Mueller-Thomsen, T.; Mann, U.; Zuchowski, K.; Beisiegel, U.; Staehelin, H.; Growdon, J.H.; Tanzi, R.E.; and Hyman, B.T. Genetic association of an alpha2-macroglobulin (Val1000Ile) polymorphism and Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, 7(12):1953-6, 1998.
- Licastro, F.; Pedrini, S.; Govoni, M.; Pession, A.; Ferri, C.; Annoni, G.; Casadei, V.; Veglia, F.; Bertolini, S.; and Grimaldi, L.M. Apolipoprotein E and alpha-1-antichymotrypsin allele polymorphism in sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 270(3):129-32, 1999.
- Lim, A.; Tsuang, D.; Kukull, W.; Nochlin, D.; Leverenz, J.; McCormick, W.; Bowen, J.; Teri, L.; Thompson, J.; Peskind, E.R.; Raskind, M.; and Larson, E.B. Clinico-neuropathological correlation of Alzheimer's disease in a community-based case series. *J Am Geriatr Soc*, 47(5):564-9, 1999.
- Lishman, W. *Organic Psychiatry*. Oxford, 1978.
- Lobo, A.; Ezquerra, J.; Gomez Burgada, F.; Sala, J.M.; and Seva Diaz, A. [Cognitive mini-test (a simple practical test to detect intellectual changes in medical patients)]. *Actas Luso Esp Neurol Psiquiatr Cienc Afines*, 7(3):189-202, 1979.
- Lobo, A.; Launer, L.J.; Fratiglioni, L.; Andersen, K.; Di Carlo, A.; Breteler, M.M.; Copeland, J.R.; Dartigues, J.F.; Jagger, C.; Martinez-Lage, J.; Soininen, H.; and Hofman, A. Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology*, 54(11 Suppl 5):S4-9, 2000.
- Lovell, M.A.; Ehmann, W.D.; Mattson, M.P.; and Markesbery, W.R. Elevated 4-hydroxynonenal in ventricular fluid in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 18(5):457-61, 1997.
- Ma, J.; Yee, A.; Brewer, H.B., Jr.; Das, S.; and Potter, H. Amyloid-associated proteins alpha 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer beta-protein into filaments. *Nature*, 372(6501):92-4, 1994.
- Mahendra, B. *A survey of syndrome of dementia*. Lancaster, 1987.
- Mann, U.M.; Mohr, E.; Gearing, M.; and Chase, T.N. Heterogeneity in Alzheimer's disease: progression rate segregated by distinct neuropsychological and cerebral metabolic profiles. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 55(10):956-9, 1992.

- Martin, A.; Brouwers, P.; Lalonde, F.; Cox, C.; Teleska, P.; Fedio, P.; Foster, N.L.; and Chase, T.N. Towards a behavioral typology of Alzheimer's patients. *J Clin Exp Neuropsychol*, 8(5):594-610, 1986.
- Martínez-Lage, J., and Láinez Andrés, J. *El Alzheimer: teoría y práctica*, 2000.
- Maruyama, H.; Izumi, Y.; Oda, M.; Torii, T.; Morino, H.; Toji, H.; Sasaki, K.; Terasawa, H.; Nakamura, S.; and Kawakami, H. Lack of an association between cystatin C gene polymorphisms in Japanese patients with Alzheimer's disease. *Neurology*, 57(2):337-9, 2001.
- Maruyama, H.; Toji, H.; Harrington, C.R.; Sasaki, K.; Izumi, Y.; Ohnuma, T.; Arai, H.; Yasuda, M.; Tanaka, C.; Emson, P.C.; Nakamura, S.; and Kawakami, H. Lack of an association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms and transcriptional activity with Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 57(2):236-40, 2000.
- Mateo, I.; Sanchez-Guerra, M.; Combarros, O.; Llorca, J.; Infante, J.; Gonzalez-Garcia, J.; del Molino, J.P.; and Berciano, J. Lack of association between cathepsin D genetic polymorphism and Alzheimer disease in a Spanish sample. *Am J Med Genet*, 114(1):31-3, 2002.
- Mattila, K.M.; Axelman, K.; Rinne, J.O.; Blomberg, M.; Lehtimäki, T.; Laippala, P.; Roytta, M.; Viitanen, M.; Wahlund, L.; Winblad, B.; and Lannfelt, L. Interaction between estrogen receptor 1 and the epsilon4 allele of apolipoprotein E increases the risk of familial Alzheimer's disease in women. *Neurosci Lett*, 282(1-2):45-8, 2000.
- Max, W. The cost of Alzheimer's disease. Will drug treatment ease the burden? *Pharmacoeconomics*, 9(1):5-10, 1996.
- McCarty, M.F. Vascular nitric oxide, sex hormone replacement, and fish oil may help to prevent Alzheimer's disease by suppressing synthesis of acute-phase cytokines. *Med Hypotheses*, 53(5):369-74, 1999.
- McGeer, P.L.; Schulzer, M.; and McGeer, E.G. Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies. *Neurology*, 47(2):425-32, 1996.
- McIlroy, S.P.; Dynan, K.B.; McGleenon, B.M.; Lawson, J.T.; and Passmore, A.P. Cathepsin D gene exon 2 polymorphism and sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 273(2):140-1, 1999.
- McIlroy, S.P.; Crawford, V.L.; Dynan, K.B.; McGleenon, B.M.; Vahidassr, M.D.; Lawson, J.T.; and Passmore, A.P. Butyrylcholinesterase K variant is genetically associated with late onset Alzheimer's disease in Northern Ireland. *J Med Genet*, 37(3):182-5, 2000a.
- McIlroy, S.P.; Vahidassr, M.D.; Savage, D.A.; Lloyd, F.; Patterson, C.C.; Lawson, J.T.; and Passmore, A.P. Association of serum AACT levels and AACT signal polymorphism with late-onset Alzheimer's disease in Northern Ireland. *Int J Geriatr Psychiatry*, 15(3):260-6, 2000b.

- McIlroy, S.P.; Dynan, K.B.; Vahidassr, D.J.; Lawson, J.T.; Patterson, C.C.; and Passmore, P. Common polymorphisms in LRP and A2M do not affect genetic risk for Alzheimer disease in Northern Ireland. *Am J Med Genet*, 105(6):502-6, 2001.
- McLachlan, D.R.; Bergeron, C.; Smith, J.E.; Boomer, D.; and Rifat, S.L. Risk for neuropathologically confirmed Alzheimer's disease and residual aluminum in municipal drinking water employing weighted residential histories. *Neurology*, 46(2):401-5, 1996.
- Mecocci, P.; MacGarvey, U.; and Beal, M.F. Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 36(5):747-51, 1994.
- Mega, M.S.; Cummings, J.L.; Fiorello, T.; and Gornbein, J. The spectrum of behavioral changes in Alzheimer's disease. *Neurology*, 46(1):130-5, 1996.
- Menzer, G.; Muller-Thomsen, T.; Meins, W.; Alberici, A.; Binetti, G.; Hock, C.; Nitsch, R.M.; Stoppe, G.; Reiss, J.; and Finckh, U. Non-replication of association between cathepsin D genotype and late onset Alzheimer disease. *Am J Med Genet*, 105(2):179-82, 2001.
- Meyer, J.S.; Rauch, G.M.; Rauch, R.A.; Haque, A.; and Crawford, K. Cardiovascular and other risk factors for Alzheimer's disease and vascular dementia. *Ann N Y Acad Sci*, 903:411-23, 2000.
- Miller, M.M., and Franklin, K.B. Theoretical basis for the benefit of postmenopausal estrogen substitution. *Exp Gerontol*, 34(5):587-604, 1999.
- Miller, T.P.; Tinklenberg, J.R.; Brooks, J.O., 3rd; and Yesavage, J.A. Cognitive decline in patients with Alzheimer disease: differences in patients with and without extrapyramidal signs. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 5(4):251-6, 1991.
- Minster, R.L.; DeKosky, S.T.; Ganguli, M.; Belle, S.; and Kamboh, M.I. Genetic association studies of interleukin-1 (IL-1A and IL-1B) and interleukin-1 receptor antagonist genes and the risk of Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 48(5):817-9, 2000.
- Miyata, M., and Smith, J.D. Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. *Nat Genet*, 14(1):55-61, 1996.
- Montoya, S.E.; Aston, C.E.; DeKosky, S.T.; Kamboh, M.I.; Lazo, J.S.; and Ferrell, R.E. Bleomycin hydrolase is associated with risk of sporadic Alzheimer's disease. *Nat Genet*, 18(3):211-2, 1998.
- Morgan, K.; Morgan, L.; Carpenter, K.; Lowe, J.; Lam, L.; Cave, S.; Xuereb, J.; Wischik, C.; Harrington, C.; and Kalsheker, N.A. Microsatellite polymorphism of the alpha 1-antichymotrypsin gene locus associated with sporadic Alzheimer's disease. *Hum Genet*, 99(1):27-31, 1997.



- Muller, U.; Bodeker, R.H.; Gerundt, I.; and Kurz, A. Lack of association between alpha 1-antichymotrypsin polymorphism, Alzheimer's disease, and allele epsilon 4 of apolipoprotein E. *Neurology*, 47(6):1575-7, 1996.
- Muramatsu, T.; Matsushita, S.; Arai, H.; Sasaki, H.; and Higuchi, S. Alpha 1-antichymotrypsin gene polymorphism and risk for Alzheimer's disease. *J Neural Transm*, 103(10):1205-10, 1996.
- Myers, A.; Holmans, P.; Marshall, H.; Kwon, J.; Meyer, D.; Ramic, D.; Shears, S.; Booth, J.; DeVrieze, F.W.; Crook, R.; Hamshere, M.; Abraham, R.; Tunstall, N.; Rice, F.; Carty, S.; Lillystone, S.; Kehoe, P.; Rudrasingham, V.; Jones, L.; Lovestone, S.; Perez-Tur, J.; Williams, J.; Owen, M.J.; Hardy, J.; and Goate, A.M. Susceptibility locus for Alzheimer's disease on chromosome 10. *Science*, 290(5500):2304-5, 2000.
- Myllykangas, L.; Polvikoski, T.; Sulkava, R.; Verkkoniemi, A.; Crook, R.; Tienari, P.J.; Pusa, A.K.; Niinisto, L.; O'Brien, P.; Kontula, K.; Hardy, J.; Haltia, M.; and Perez-Tur, J. Genetic association of alpha2-macroglobulin with Alzheimer's disease in a Finnish elderly population. *Ann Neurol*, 46(3):382-90, 1999.
- Myllykangas, L.; Polvikoski, T.; Sulkava, R.; Verkkoniemi, A.; Tienari, P.; Niinisto, L.; Kontula, K.; Hardy, J.; Haltia, M.; and Perez-Tur, J. Cardiovascular risk factors and Alzheimer's disease: a genetic association study in a population aged 85 or over. *Neurosci Lett*, 292(3):195-8, 2000.
- Nacmias, B.; Marcon, G.; Tedde, A.; Forleo, P.; Latorraca, S.; Piacentini, S.; Amaducci, L.; and Sorbi, S. Implication of alpha1-antichymotrypsin polymorphism in familial Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 244(2):85-8, 1998.
- Nacmias, B.; Tedde, A.; Cellini, E.; Forleo, P.; Orlacchio, A.; Guarnieri, B.M.; Petruzzi, C.; D'Andrea, F.; Serio, A.; and Sorbi, S. Alpha2-macroglobulin polymorphisms in Italian sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 299(1-2):9-12, 2001.
- Nathan, B.P.; Bellosta, S.; Sanan, D.A.; Weisgraber, K.H.; Mahley, R.W.; and Pitas, R.E. Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Science*, 264(5160):850-2, 1994.
- Nicoll, J.A.; Mrazek, R.E.; Graham, D.I.; Stewart, J.; Wilcock, G.; MacGowan, S.; Esiri, M.M.; Murray, L.S.; Dewar, D.; Love, S.; Moss, T.; and Griffin, W.S. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 47(3):365-8, 2000.
- Nowotny, P.; Kwon, J.M.; Chakraverty, S.; Nowotny, V.; Morris, J.C.; and Goate, A.M. Association studies using novel polymorphisms in BACE1 and BACE2. *Neuroreport*, 12(9):1799-802, 2001.
- Olanow, C.W., and Arendash, G.W. Metals and free radicals in neurodegeneration. *Curr Opin Neurol*, 7(6):548-58, 1994.
- Olshansky, S.J.; Carnes, B.A.; and Cassel, C.K. The aging of the human species. *Sci Am*, 268(4):46-52, 1993.

- Olson, J.M.; Goddard, K.A.; and Dudek, D.M. A second locus for very-late-onset Alzheimer disease: a genome scan reveals linkage to 20p and epistasis between 20p and the amyloid precursor protein region. *Am J Hum Genet*, 71(1):154-61, 2002.
- Orlacchio, A.; Kawarai, T.; Polidoro, M.; Stefani, A.; St George-Hyslop, P.H.; and Bernardi, G. Association analysis between Alzheimer's disease and the Nicastrin gene polymorphisms. *Neurosci Lett*, 333(2):115-8, 2002.
- Ott, A.; Stolk, R.P.; Hofman, A.; van Harskamp, F.; Grobbee, D.E.; and Breteler, M.M. Association of diabetes mellitus and dementia: the Rotterdam Study. *Diabetologia*, 39(11):1392-7, 1996.
- Palumbo, B.; Cadini, D.; Nocentini, G.; Filipponi, E.; Fravolini, M.L.; and Senin, U. Angiotensin converting enzyme deletion allele in different kinds of dementia disorders. *Neurosci Lett*, 267(2):97-100, 1999.
- Papassotiropoulos, A.; Bagli, M.; Feder, O.; Jessen, F.; Maier, W.; Rao, M.L.; Ludwig, M.; Schwab, S.G.; and Heun, R. Genetic polymorphism of cathepsin D is strongly associated with the risk for developing sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 262(3):171-4, 1999.
- Papassotiropoulos, A.; Bagli, M.; Becker, K.; Jessen, F.; Maier, W.; Rao, M.L.; Ludwig, M.; and Heun, R. No association between an intronic biallelic polymorphism of the FE65 gene and Alzheimer's disease. *Int J Mol Med*, 6(5):587-9, 2000a.
- Papassotiropoulos, A.; Bagli, M.; Jessen, F.; Frahnert, C.; Rao, M.L.; Maier, W.; and Heun, R. Confirmation of the association between bleomycin hydrolase genotype and Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*, 5(2):213-5, 2000b.
- Papassotiropoulos, A.; Bagli, M.; Kurz, A.; Kornhuber, J.; Forstl, H.; Maier, W.; Pauls, J.; Lautenschlager, N.; and Heun, R. A genetic variation of cathepsin D is a major risk factor for Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 47(3):399-403, 2000c.
- Pasinetti, G.M. Inflammatory mechanisms in neurodegeneration and Alzheimer's disease: the role of the complement system. *Neurobiol Aging*, 17(5):707-16, 1996.
- Peña, J.; Juncadella, M.; and Sabidó, F. Introducción a los síndromes de deterioro neuropsicológico. In: Peña-Casanova, J., and Barraquer Bordas, L., eds. *Neuropsicología*: Toray ed, 1983. pp. 407-433.
- Pericak-Vance, M.A., and Haines, J.L. Genetic susceptibility to Alzheimer disease. *Trends Genet*, 11(12):504-8, 1995.
- Pericak-Vance, M.A.; Bass, M.P.; Yamaoka, L.H.; Gaskell, P.C.; Scott, W.K.; Terwedow, H.A.; Menold, M.M.; Conneally, P.M.; Small, G.W.; Vance, J.M.; Saunders, A.M.; Roses, A.D.; and Haines, J.L. Complete genomic screen in late-onset familial Alzheimer disease. Evidence for a new locus on chromosome 12. *Jama*, 278(15):1237-41, 1997.

- Pericak-Vance, M.A.; Bebout, J.L.; Gaskell, P.C., Jr.; Yamaoka, L.H.; Hung, W.Y.; Alberts, M.J.; Walker, A.P.; Bartlett, R.J.; Haynes, C.A.; Welsh, K.A.; and et al. Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage. *Am J Hum Genet*, 48(6):1034-50, 1991.
- Pirkanen, M.; Hiltunen, M.; Mannermaa, A.; Iivonen, S.; Helisalml, S.; Lehtovirta, M.; Koivisto, A.M.; Laakso, M.; Soininen, H.; and Alafuzoff, I. Interleukin 1 alpha gene polymorphism as a susceptibility factor in Alzheimer's disease and its influence on the extent of histopathological hallmark lesions of Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 14(3):123-7, 2002.
- Plassman, B.L.; Havlik, R.J.; Steffens, D.C.; Helms, M.J.; Newman, T.N.; Drosdick, D.; Phillips, C.; Gau, B.A.; Welsh-Bohmer, K.A.; Burke, J.R.; Guralnik, J.M.; and Breitner, J.C. Documented head injury in early adulthood and risk of Alzheimer's disease and other dementias. *Neurology*, 55(8):1158-66, 2000.
- Poduslo, S.E.; Shook, B.; Drigalenko, E.; and Yin, X. Lack of association of the two polymorphisms in alpha-2 macroglobulin with Alzheimer disease. *Am J Med Genet*, 110(1):30-5, 2002.
- Prince, J.A.; Feuk, L.; Sawyer, S.L.; Gottfries, J.; Ricksten, A.; Nagga, K.; Bogdanovic, N.; Blennow, K.; and Brookes, A.J. Lack of replication of association findings in complex disease: an analysis of 15 polymorphisms in prior candidate genes for sporadic Alzheimer's disease. *Eur J Hum Genet*, 9(6):437-44, 2001.
- Qiu, C.; Backman, L.; Winblad, B.; Aguero-Torres, H.; and Fratiglioni, L. The influence of education on clinically diagnosed dementia incidence and mortality data from the Kungsholmen Project. *Arch Neurol*, 58(12):2034-9, 2001.
- Rebeck, G.W.; Perls, T.T.; West, H.L.; Sodhi, P.; Lipsitz, L.A.; and Hyman, B.T. Reduced apolipoprotein epsilon 4 allele frequency in the oldest old Alzheimer's patients and cognitively normal individuals. *Neurology*, 44(8):1513-6, 1994.
- Rebeck, G.W.; Cheung, B.S.; Growdon, W.B.; Deng, A.; Akuthota, P.; Locascio, J.; Greenberg, S.M.; and Hyman, B.T. Lack of independent associations of apolipoprotein E promoter and intron 1 polymorphisms with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 272(3):155-8, 1999.
- Rebeck, G.W. Confirmation of the genetic association of interleukin-1A with early onset sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 293(1):75-7, 2000.
- Reynolds, W.F.; Hiltunen, M.; Pirkanen, M.; Mannermaa, A.; Helisalml, S.; Lehtovirta, M.; Alafuzoff, I.; and Soininen, H. MPO and APOEepsilon4 polymorphisms interact to increase risk for AD in Finnish males. *Neurology*, 55(9):1284-90, 2000.
- Risch, N., and Merikangas, K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*, 273(5281):1516-7, 1996.

- Rogaev, E.I.; Sherrington, R.; Rogaeva, E.A.; Levesque, G.; Ikeda, M.; Liang, Y.; Chi, H.; Lin, C.; Holman, K.; Tsuda, T.; and et al. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature*, 376(6543):775-8, 1995.
- Rogaeva, E.A.; Premkumar, S.; Grubber, J.; Serneels, L.; Scott, W.K.; Kawarai, T.; Song, Y.; Hill, D.L.; Abou-Donia, S.M.; Martin, E.R.; Vance, J.J.; Yu, G.; Orlicchio, A.; Pei, Y.; Nishimura, M.; Supala, A.; Roberge, B.; Saunders, A.M.; Roses, A.D.; Schmechel, D.; Crane-Gatherum, A.; Sorbi, S.; Bruni, A.; Small, G.W.; Pericak-Vance, M.A.; and et al. An alpha-2-macroglobulin insertion-deletion polymorphism in Alzheimer disease. *Nat Genet*, 22(1):19-22, 1999.
- Roks, G.; Cruts, M.; Bullido, M.J.; Backhovens, H.; Artiga, M.J.; Hofman, A.; Valdivieso, F.; Van Broeckhoven, C.; and Van Duijn, C.M. The -491 A/T polymorphism in the regulatory region of the apolipoprotein E gene and early-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 258(2):65-8, 1998.
- Roks, G.; Cruts, M.; Slooter, A.J.; Dermaut, B.; Hofman, A.; Van Broeckhoven, C.; and Van Duijn, C.M. The cystatin C polymorphism is not associated with early onset Alzheimer's disease. *Neurology*, 57(2):366-7, 2001.
- Rossor, M.N.; Iversen, L.L.; Reynolds, G.P.; Mountjoy, C.Q.; and Roth, M. Neurochemical characteristics of early and late onset types of Alzheimer's disease. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 288(6422):961-4, 1984.
- Rudrasingham, V.; Wavrant-De Vrieze, F.; Lambert, J.C.; Chakraverty, S.; Kehoe, P.; Crook, R.; Amouyel, P.; Wu, W.; Rice, F.; Perez-Tur, J.; Frigard, B.; Morris, J.C.; Carty, S.; Petersen, R.; Cotel, D.; Tunstall, N.; Holmans, P.; Lovestone, S.; Chartier-Harlin, M.C.; Goate, A.; Hardy, J.; Owen, M.J.; and Williams, J. Alpha-2 macroglobulin gene and Alzheimer disease. *Nat Genet*, 22(1):17-9; author reply 21-2, 1999.
- Sanchez-Guerra, M.; Combarros, O.; Alvarez-Arcaya, A.; Mateo, I.; Berciano, J.; Gonzalez-Garcia, J.; and Llorca, J. The Glu298Asp polymorphism in the NOS3 gene is not associated with sporadic Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 70(4):566-7, 2001a.
- Sanchez-Guerra, M.; Combarros, O.; Infante, J.; Llorca, J.; Berciano, J.; Fontalba, A.; Fernandez-Luna, J.L.; Pena, N.; and Fernandez-Viadero, C. Case-control study and meta-analysis of low density lipoprotein receptor-related protein gene exon 3 polymorphism in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 316(1):17-20, 2001b.
- Saunders, A.M.; Strittmatter, W.J.; Schmechel, D.; George-Hyslop, P.H.; Pericak-Vance, M.A.; Joo, S.H.; Rosi, B.L.; Gusella, J.F.; Crapper-MacLachlan, D.R.; Alberts, M.J.; and et al. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*, 43(8):1467-72, 1993.
- Sawada, H.; Ibi, M.; Kihara, T.; Urushitani, M.; Akaike, A.; and Shimohama, S. Estradiol protects mesencephalic dopaminergic neurons from oxidative stress-induced neuronal death. *J Neurosci Res*, 54(5):707-19, 1998.

- Schellenberg, G.D.; Bird, T.D.; Wijsman, E.M.; Orr, H.T.; Anderson, L.; Nemens, E.; White, J.A.; Bonnycastle, L.; Weber, J.L.; Alonso, M.E.; and et al. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science*, 258(5082):668-71, 1992.
- Schupf, N.; Kapell, D.; Nightingale, B.; Lee, J.H.; Mohlenhoff, J.; Bewley, S.; Ottman, R.; and Mayeux, R. Specificity of the fivefold increase in AD in mothers of adults with Down syndrome. *Neurology*, 57(6):979-84, 2001.
- Schwab, S.G.; Bagli, M.; Papassotiropoulos, A.; Jessen, F.; Maier, W.; Rao, M.L.; and Heun, R. Alpha-1-antichymotrypsin gene polymorphism and risk for sporadic Alzheimer's disease in a German population. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 10(6):469-72, 1999.
- Scott, W.K.; Yamaoka, L.H.; Bass, M.P.; Gaskell, P.C.; Conneally, P.M.; Small, G.W.; Farrer, L.A.; Auerbach, S.A.; Saunders, A.M.; Roses, A.D.; Haines, J.L.; and Pericak-Vance, M.A. No genetic association between the LRP receptor and sporadic or late-onset familial Alzheimer disease. *Neurogenetics*, 1(3):179-83, 1998.
- Shastry, B.S., and Giblin, F.J. Genes and susceptible loci of Alzheimer's disease. *Brain Res Bull*, 48(2):121-7, 1999.
- Sherrington, R.; Rogaev, E.I.; Liang, Y.; Rogaeva, E.A.; Levesque, G.; Ikeda, M.; Chi, H.; Lin, C.; Li, G.; Holman, K.; and et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*, 375(6534):754-60, 1995.
- Sherrington, R.; Froelich, S.; Sorbi, S.; Campion, D.; Chi, H.; Rogaeva, E.A.; Levesque, G.; Rogaev, E.I.; Lin, C.; Liang, Y.; Ikeda, M.; Mar, L.; Brice, A.; Agid, Y.; Percy, M.E.; Clerget-Darpoux, F.; Piacentini, S.; Marcon, G.; Nacmias, B.; Amaducci, L.; Frebourg, T.; Lannfelt, L.; Rommens, J.M.; and St George-Hyslop, P.H. Alzheimer's disease associated with mutations in presenilin 2 is rare and variably penetrant. *Hum Mol Genet*, 5(7):985-8, 1996.
- Shibata, N.; Ohnuma, T.; Takahashi, T.; Ohtsuka, E.; Ueki, A.; Nagao, M.; and Arai, H. No genetic association between alpha-2 macroglobulin I1000V polymorphism and Japanese sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 290(2):154-6, 2000.
- Shoffner, J.M.; Brown, M.D.; Torroni, A.; Lott, M.T.; Cabell, M.F.; Mirra, S.S.; Beal, M.F.; Yang, C.C.; Gearing, M.; Salvo, R.; and et al. Mitochondrial DNA variants observed in Alzheimer disease and Parkinson disease patients. *Genomics*, 17(1):171-84, 1993.
- Singleton, A.B.; Gibson, A.M.; McKeith, I.G.; Ballard, C.G.; Edwardson, J.A.; and Morris, C.M. Nitric oxide synthase gene polymorphisms in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurosci Lett*, 303(1):33-6, 2001.
- Singleton, A.B.; Smith, G.; Gibson, A.M.; Woodward, R.; Perry, R.H.; Ince, P.G.; Edwardson, J.A.; and Morris, C.M. No association between the K variant of the butyrylcholinesterase gene and pathologically confirmed Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, 7(5):937-9, 1998.

- Sisodia, S.S., and St George-Hyslop, P.H. gamma-Secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in? *Nat Rev Neurosci*, 3(4):281-90, 2002.
- Skoog, I.; Lernfelt, B.; Landahl, S.; Palmertz, B.; Andreasson, L.A.; Nilsson, L.; Persson, G.; Oden, A.; and Svanborg, A. 15-year longitudinal study of blood pressure and dementia. *Lancet*, 347(9009):1141-5, 1996.
- Small, D.H. The role of the amyloid protein precursor (APP) in Alzheimer's disease: does the normal function of APP explain the topography of neurodegeneration? *Neurochem Res*, 23(5):795-806, 1998.
- Smith, M.A.; Perry, G.; Richey, P.L.; Sayre, L.M.; Anderson, V.E.; Beal, M.F.; and Kowall, N. Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature*, 382(6587):120-1, 1996.
- Sodeyama, N.; Yamada, M.; Itoh, Y.; Suematsu, N.; Matsushita, M.; Otomo, E.; and Mizusawa, H. Alpha2-macroglobulin polymorphism is not associated with AD or AD-type neuropathology in the Japanese. *Neurology*, 54(2):443-6, 2000.
- St George-Hyslop, P.H.; Tanzi, R.E.; Polinsky, R.J.; Haines, J.L.; Nee, L.; Watkins, P.C.; Myers, R.H.; Feldman, R.G.; Pollen, D.; Drachman, D.; and et al. The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science*, 235(4791):885-90, 1987.
- Stern, Y.; Gurland, B.; Tatemichi, T.K.; Tang, M.X.; Wilder, D.; and Mayeux, R. Influence of education and occupation on the incidence of Alzheimer's disease. *Jama*, 271(13):1004-10, 1994.
- Strite, D.; Massman, P.J.; Cooke, N.; and Doody, R.S. Neuropsychological asymmetry in Alzheimer's disease: verbal versus visuoconstructional deficits across stages of dementia. *J Int Neuropsychol Soc*, 3(5):420-7, 1997.
- Strittmatter, W.J.; Saunders, A.M.; Schmechel, D.; Pericak-Vance, M.; Enghild, J.; Salvesen, G.S.; and Roses, A.D. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(5):1977-81, 1993.
- Strittmatter, W.J.; Saunders, A.M.; Goedert, M.; Weisgraber, K.H.; Dong, L.M.; Jakes, R.; Huang, D.Y.; Pericak-Vance, M.; Schmechel, D.; and Roses, A.D. Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau: implications for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(23):11183-6, 1994.
- Sweet, R.A.; Nimgaonkar, V.L.; Devlin, B.; Lopez, O.L.; and DeKosky, S.T. Increased familial risk of the psychotic phenotype of Alzheimer disease. *Neurology*, 58(6):907-11, 2002.
- Tang, G.; Jiang, S.; Zhang, M.; Lin, S.; Qian, Y.; Wu, X.; Wang, D.; Jin, T.; and Gu, N. Genetic association study between alpha 1-antichymotrypsin polymorphism and Alzheimer disease in Chinese Han population. *Am J Med Genet*, 96(2):133-5, 2000.

- Tang, M.X.; Maestre, G.; Tsai, W.Y.; Liu, X.H.; Feng, L.; Chung, W.Y.; Chun, M.; Schofield, P.; Stern, Y.; Tycko, B.; and Mayeux, R. Relative risk of Alzheimer disease and age-at-onset distributions, based on APOE genotypes among elderly African Americans, Caucasians, and Hispanics in New York City. *Am J Hum Genet*, 58(3):574-84, 1996.
- Tang, G.; Zhang, M.; Xie, H.; Jiang, S.; Wang, Z.; Xu, L.; Hao, Y.; Lin, D.; Lan, H.; Wang, Y.; Chen, L.; and Ren, D. Alpha-2 macroglobulin I1000 V polymorphism in Chinese sporadic Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 328(2):195-7, 2002.
- Thome, J.; Baumer, A.; Kornhuber, J.; Rosler, M.; and Riederer, P. Alpha-1-antichymotrypsin bi-allele polymorphism, apolipoprotein-E tri-allele polymorphism and genetic risk of Alzheimer's syndrome. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect*, 10(2-3):207-12, 1995.
- Thome, J.; Gewirtz, J.C.; Sakai, N.; Zachariou, V.; Retz-Junginger, P.; Retz, W.; Duman, R.S.; and Rosler, M. Polymorphisms of the human apolipoprotein E promoter and bleomycin hydrolase gene: risk factors for Alzheimer's dementia? *Neurosci Lett*, 274(1):37-40, 1999.
- Tilley, L.; Morgan, K.; Grainger, J.; Marsters, P.; Morgan, L.; Lowe, J.; Xuereb, J.; Wischik, C.; Harrington, C.; and Kalsheker, N. Evaluation of polymorphisms in the presenilin-1 gene and the butyrylcholinesterase gene as risk factors in sporadic Alzheimer's disease. *Eur J Hum Genet*, 7(6):659-63, 1999.
- Toji, H.; Maruyama, H.; Sasaki, K.; Nakamura, S.; and Kawakami, H. Apolipoprotein E promoter polymorphism and sporadic Alzheimer's disease in a Japanese population. *Neurosci Lett*, 259(1):56-8, 1999.
- Town, T.; Paris, D.; Fallin, D.; Duara, R.; Barker, W.; Gold, M.; Crawford, F.; and Mullan, M. The -491A/T apolipoprotein E promoter polymorphism association with Alzheimer's disease: independent risk and linkage disequilibrium with the known APOE polymorphism. *Neurosci Lett*, 252(2):95-8, 1998.
- Utermann, G.; Langenbeck, U.; Beisiegel, U.; and Weber, W. Genetics of the apolipoprotein E system in man. *Am J Hum Genet*, 32(3):339-47, 1980.
- van Duijn, C.M.; Stijnen, T.; and Hofman, A. Risk factors for Alzheimer's disease: overview of the EURODEM collaborative re-analysis of case-control studies. EURODEM Risk Factors Research Group. *Int J Epidemiol*, 20 Suppl 2:S4-12, 1991.
- van Duijn, C.M., and Hofman, A. Risk factors for Alzheimer's disease: the EURODEM collaborative re-analysis of case-control studies. *Neuroepidemiology*, 11 Suppl 1:106-13, 1992.
- van Duijn, C.M.; de Knijff, P.; Cruts, M.; Wehnert, A.; Havekes, L.M.; Hofman, A.; and Van Broeckhoven, C. Apolipoprotein E4 allele in a population-based study of early-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet*, 7(1):74-8, 1994.
- Vandenabeele, P., and Fiers, W. Is amyloidogenesis during Alzheimer's disease due to an IL-1-/IL-6-mediated 'acute phase response' in the brain? *Immunol Today*, 12(7):217-9, 1991.

- Verpillat, P.; Bouley, S.; Campion, D.; Hannequin, D.; Dubois, B.; Belliard, S.; Puel, M.; Thomas-Anterion, C.; Agid, Y.; Brice, A.; and Clerget-Darpoux, F. Use of haplotype information to test involvement of the LRP gene in Alzheimer's disease in the French population. *Eur J Hum Genet*, 9(6):464-8, 2001.
- Wang, J.C.; Kwon, J.M.; Shah, P.; Morris, J.C.; and Goate, A. Effect of APOE genotype and promoter polymorphism on risk of Alzheimer's disease. *Neurology*, 55(11):1644-9, 2000.
- Wang, X.; Luedeking, E.K.; Minster, R.L.; Ganguli, M.; DeKosky, S.T.; and Kamboh, M.I. Lack of association between alpha2-macroglobulin polymorphisms and Alzheimer's disease. *Hum Genet*, 108(2):105-8, 2001.
- Wang, Y.C.; Liu, T.Y.; Liu, H.C.; Chi, C.W.; Sim, C.B.; Tsai, S.J.; and Hong, C.J. No association between alpha-1-antichymotrypsin polymorphism and Alzheimer's disease in Chinese. *Neuropsychobiology*, 40(2):67-70, 1999.
- Wavrant-DeVrieze, F.; Perez-Tur, J.; Lambert, J.C.; Frigard, B.; Pasquier, F.; Delacourte, A.; Amouyel, P.; Hardy, J.; and Chartier-Harlin, M.C. Association between the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 227(1):68-70, 1997.
- Weeks, D.E., and Lathrop, G.M. Polygenic disease: methods for mapping complex disease traits. *Trends Genet*, 11(12):513-9, 1995.
- Wenham, P.R.; Price, W.H.; and Blandell, G. Apolipoprotein E genotyping by one-stage PCR. *Lancet*, 337(8750):1158-9, 1991.
- Wickelgren, I. For the cortex, neuron loss may be less than thought. *Science*, 273(5271):48-50, 1996.
- Wiebusch, H.; Poirier, J.; Sevigny, P.; and Schappert, K. Further evidence for a synergistic association between APOE epsilon4 and BCHE-K in confirmed Alzheimer's disease. *Hum Genet*, 104(2):158-63, 1999.
- Wolfe, M.S.; Xia, W.; Ostaszewski, B.L.; Diehl, T.S.; Kimberly, W.T.; and Selkoe, D.J. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature*, 398(6727):513-7, 1999.
- Woodward, R.; Singleton, A.B.; Gibson, A.M.; Edwardson, J.A.; and Morris, C.M. LRP gene and late-onset Alzheimer's disease. *Lancet*, 352(9123):239-40, 1998.
- Wragg, M.A.; Talbot, C.J.; Morris, J.C.; Lendon, C.L.; and Goate, A.M. No association found between Alzheimer's disease and a mitochondrial tRNA glutamine gene variant. *Neurosci Lett*, 201(2):107-10, 1995.



- Yamaguchi, H.; Ishiguro, K.; Sugihara, S.; Nakazato, Y.; Kawarabayashi, T.; Sun, X.; and Hirai, S. Presence of apolipoprotein E on extracellular neurofibrillary tangles and on meningeal blood vessels precedes the Alzheimer beta-amyloid deposition. *Acta Neuropathol (Berl)*, 88(5):413-9, 1994.
- Zappia, M.; Cittadella, R.; Manna, I.; Nicoletti, G.; Andreoli, V.; Bonavita, S.; Gambardella, A.; and Quattrone, A. Genetic association of alpha2-macroglobulin polymorphisms with AD in southern Italy. *Neurology*, 59(5):756-8, 2002.
- Zill, P.; Engel, R.; Hampel, H.; Behrens, S.; Burger, K.; Padberg, F.; Stubner, S.; Moller, H.J.; Ackenheil, M.; and Bondy, B. Polymorphisms in the apolipoprotein E (APOE) gene in gerontopsychiatric patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 251(1):24-8, 2001.
- Zubenko, G.S.; Stiffler, J.S.; Hughes, H.B.; Hurtt, M.R.; and Kaplan, B.B. Initial results of a genome survey for novel Alzheimer's disease risk genes: association with a locus on the X chromosome. *Am J Med Genet*, 81(2):196-205, 1998.
- Zurutuza, L.; Verpillat, P.; Raux, G.; Hannequin, D.; Puel, M.; Belliard, S.; Michon, A.; Pothin, Y.; Camuzat, A.; Penet, C.; Martin, C.; Brice, A.; Campion, D.; Clerget-Darpoux, F.; and Frebourg, T. APOE promoter polymorphisms do not confer independent risk for Alzheimer's disease in a French population. *Eur J Hum Genet*, 8(9):713-6, 2000.