

La enfermedad de Alzheimer

Drs. Román Arreaza Cardier, Román Arreaza Padilla

Parte II

Aproximación a su genética molecular

Proyecciones de orden terapéutico

La enfermedad de Alzheimer (EA): Genes que contribuyen a su desarrollo

Las mutaciones en por lo menos tres genes diferentes son responsables del ataque temprano de la EA y muestran casi el 100% en la penetración con la herencia autosómica dominante. (Figura 1).

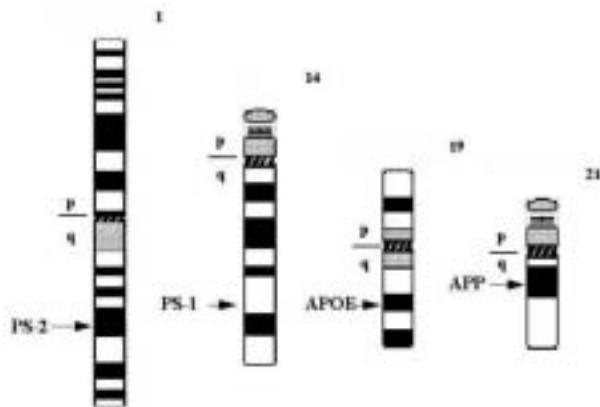


Figura 1. Ideogramas de los cromosomas humanos 1, 14, 19, y 21 que exhiben las situaciones citogenéticas de los genes para presenilina-2 (PS-2), presenilina-1 (PS-1); apolipoproteína-E (Apo-E) y precursor proteína del β -amiloido (APP).

El gen precursor de la proteína β -amiloido (APP) se localiza en el cromosoma 21. Un total de seis mutaciones patogénicas se ha descrito. Las mutaciones del APP son responsables de aproximadamente el 2% de los casos descritos hasta ahora, del ataque tardío y aproximadamente del 5-20% de los de ataque temprano (1-3).

Hasta 41 mutaciones diferentes se han encontrado en el gen PS-1, en el cromosoma 14. Todas las mutaciones, excepto una, son mutaciones patogénicas. Las mutaciones del PS-1 se encuentran en el 30-50% de los ataques tempranos (4,5), pueden actuar además como factores que alteran el riesgo, en asociación al gen PS-2 en el cromosoma 1, el cual se halló mediante la acostumbrada estrategia de homología de sucesión en los PS-1 (6); las mutaciones del gen PS-2 producen el 2% de toda la EA de ataque temprano; son causa mucho menos frecuente que las mutaciones en los PS-1. Se han encontrado hasta ahora sólo dos mutaciones patogénicas del PS-2, y con penetración incompleta (7).

El polimorfismo del gen ApoE se localiza en el cromosoma 19. ApoE, alelo e4, se ha identificado sobre todo como un factor de riesgo en el ataque tardío. No siempre los individuos con ApoE, alelo e4, son atacados por la EA, incluso a edades muy avanzadas.

También se han propuesto varios otros factores de riesgo: la alfa-1-antitripsina y los polimorfismos del PS-1 intron 8 en el cromosoma 14 que pueden actuar como factores de riesgo de demencia asociados con la ApoE alelo e4, en el ataque tardío de EA (8,9).

Antígenos de histocompatibilidad (HLA), el mayor complejo de histocompatibilidad en los seres humanos: se han acumulado evidencias del HLA-

alelo A2 en el cromosoma 6, consistente de varios genes polimórficos que están relacionados con la regulación de la respuesta inmunológica que codifica, en pacientes con ataque temprano o tardío de EA (10). El gen de la lipoproteína de baja densidad relacionada con el gen receptor de ApoE (LRP), que reside en el cromosoma 12, puede asociarse con la EA de aparición tardía (11).

En el gen de la mitocondria del citocromo-c-oxidasa (C-c-O), se puede asociar con la expresión del ataque tardío. Células que expresan el mutante de la mitocondria de las moléculas de ADN exhibieron una disminución específica en la actividad de C-c-O y la producción aumentada de las especies oxígeno reactivo. Además, un reciente estudio ha evidenciado un nuevo locus en el cromosoma 12 en relación con el ataque tardío y con el C-c-O (12).

Una pantalla del genoma completo reveló cuatro regiones de interés, en los cromosomas 4, 6, 12 y 20, pero el cromosoma 12 dio el resultado más consistente en el análisis de la relación (13).

El precursor proteína del β-amiloide y el péptido β-amiloide

La primera pista que apuntaba al cromosoma 21 en la EA, vino de la observación de que los sujetos con síndrome de Down tienen trisomía del cromosoma 21 e invariablemente desarrollan los rasgos clínicos y patológicos de EA, después de 30 años (14,15). Esto apoyó la teoría de que en el cromosoma 21 puede estar el fenotipo de la EA (16).

El código genético para el APP fue aislado y localizado en el cromosoma 21 (17,18); en la región 21q11.2-q21.1 (AD-1) (19). Finalmente, la secuencia del gen de APP reveló las mutaciones en el β-amiloide (bA4), y se comenzaron así los estudios para la protección contra las mutaciones (20-23).

El APP original es una proteína transmembrana de 110 a 135 kDa, con un segmento largo extracelular con NH2 terminal y un segmento más corto con un COOH terminal intracelular en la cola (Figura 2). El producto de la fragmentación más importante del APP es un péptido de 39-43 aminoácidos, el péptido 4kDa βA4 (24,25). Dos tercios de la secuencia del péptido βA4 (una parte de los exones 16 y 17) se localizan en la región de la NH2 terminal de la región de la APP mientras que la porción remanente del péptido βA4 se continúa dentro de la membrana y está contenida en el área de la transmembrana (Figura 2) (26,27).

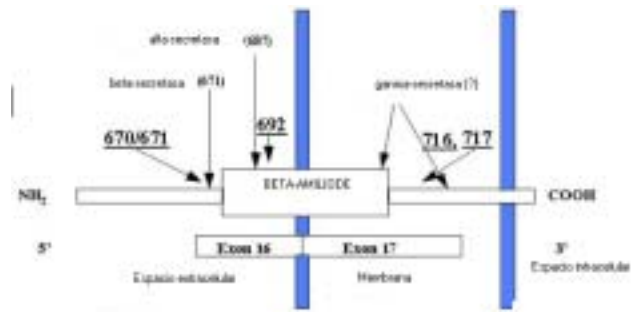


Figura 2. Áreas de la estructura del gen APP que muestra la posición de las mutaciones causantes de la enfermedad de Alzheimer (números subrayados) dentro del beta-amiloide (BA4) y los sitios de fragmentación de las secretasas.

El gen APP contiene 18 exones y probablemente representa una familia de por lo menos 8 diferentes isoformas de transmembrana, las cuales llegarían por particiones de los exones 7, 8 y 15. Las isoformas del APP se expresan mayormente en las neuronas (formas 695, 714, 751 y 770), contenidas en el exon 15, son amiloides genéticos y secretan mucho más péptido βA4 que las formas no neuronales (formas 677, 693, 733 y 752) (28,29). Las formas APP751 y APP770 están ampliamente expresadas en diferentes tejidos, mientras que la forma APP695 se expresa, mayormente, en el cerebro (30,31). En general, el APP se expresa en tejidos de los mamíferos, incluidos el sistema nervioso central y tejidos periféricos como el corazón, músculos, hígado y bazo (32,33).

La APP es procesada por, al menos, dos vías metabólicas en todas las células. El sitio de fragmentación de la vía-a (llamada proceso de la α-secretasa) está dentro del área del βA4 entre los codones 687 y 688 del APP y entonces, no es parte del βA4-péptido. El sitio de fragmentación de la vía-b (llamada proceso de la β-secretasa) está entre los codones 671 y 672 del APP y sí forma parte del βA4. Además, la vía-g (llamada proceso de la γ-secretasa) involucra una fragmentación en la vecindad del codón 712 del COOH terminal. En la vía-b el sitio de fragmentación es de vital importancia. Un βA4-péptido contiene 1-40 aminoácidos resultantes del sitio de fragmentación entre los residuos 712-713, y si el sitio de fragmentación está situado en el COOH terminal en el residuo 714, se

produce un β A4-péptido largo que contiene 1-42/43 aminoácidos. Entonces, la vía-g puede ser fundamental en la producción de un β A4-péptido largo.

Mutaciones del gen β -APP

La primera mutación por sustitución de un aminoácido glutamato (Glu) por glutamina (Gln) fue encontrada en 1990, dentro del área del β A4-péptido de la APP en el codón 693 (“*mutación alemana*”). Esta mutación es responsable de la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis tipo alemana (HCHWA-D) (34,35). En esta enfermedad, existen depósitos amiloides contenidos en el β A4-péptido que se encuentran en las paredes de los vasos cerebrales y en placas difusas en el parénquima cerebral (36).

En una familia alemana se ha encontrado una mutación en el codón 692 del APP (“*mutación ‘Flemish’*”), resultante de la sustitución de un aminoácido alanina (Ala) por glicina (Gly) que causa un fenotipo intermedio entre una angiopatía amiloidea y EA (37).

En un estudio del axon 17 del gen 21 APP, se encontró una mutación citosina-timina (Cyt-Tym) en individuos con EA de una familia inglesa, la mutación resultante del cambio por sustitución de valina (Val) por isoleucina (Ile) en el codón 717 (“*mutación Londres*”) que se secreta en EA, no ha sido encontrada en varios centenares de casos esporádicos, ni en controles normales (38,40). Después del descubrimiento de la primera mutación relacionada con EA en el axon 17, han sido secuenciados en otras familias con EA presenil, muchas de éstas han mostrado tener mutaciones con variaciones de los alelos en el codón 717, se han revelado por secuenciación y sustituciones de Val por Ile, Val por fenilalanina (Phe) y Val por Gly (41,42). La más frecuente mutación suele ser Val por Ile (43,44).

Mutaciones clínicamente silentes han sido ampliamente reportadas en el codón 716 en sujetos de control sin historia de perturbaciones cognitivas ni demencia primaria (45). No se han encontrado sustituciones de aminoácidos en estas mutaciones. Una mutación patogénica en el codón 716 (“*mutación Florida*”) ha sido recientemente identificada (46).

Dos familias suecas con EA temprana han sido identificadas, en las cuales los síntomas son causados por dos pares de mutaciones, de guanina-timina y adenina-citosina, además resulta en lisina (Lys) y

metionina (Met) siendo remplazados por ácido aspartico (Asp) y leucina (Leu) en los codones 670 y 671, respectivamente (“*mutación sueca*”). Estos cambios ocurren en dos aminoácidos inmediatamente antes de la NH₂ terminal del aminoácido β A4-péptido (47).

Una posible mutación patogénica, esporádica, en el condón 713 (Ala por treonina) y una mutación silente en el codón 715 se encontró en un paciente con EA aparecida a los 59 años de edad (48). Esta mutación no ha sido hallada en la población en general, pero estaba presente en su hermana gemela no afectada, y en un pariente de 88 años de edad no afectado. Estos hechos ponen en duda la verdadera naturaleza patogénica de estas mutaciones en la EA.

Una mutación en el codón 665 (Glu a Asp) se encontró en un sujeto anciano con demencia senil de aparición tardía que reunía los criterios diagnósticos neuropatológicos. Este es, hasta el presente, el único caso publicado sobre mutaciones del APP en el que se encuentre envuelto el diagnóstico de EA de aparición tardía. No está claro si ésta es una mutación patogénica o representa un polimorfismo normal (49). Mutaciones del APP o relacionados al cromosoma 21, no habían sido publicadas en pacientes con EA familiar (EAF) de aparición tardía (50,51).

Patogenicidad en las mutaciones del APP

La mutación del APP en el codón 693 puede alterar la estructura secundaria del β A4-péptido en la membrana celular, de ello resultan precipitaciones con depósitos prematuros (52). La congregación de residuos de mutaciones patológicas del gen APP en pacientes con EA, de algunas familias con EAF, sugiere que estas mutaciones han sido patogénicas (53,54). Mutaciones en los codones 670/671 y 717 no se adosan con el β A4 pero lo flanquean muy cerca de los sitios de fragmentación de la secretasa. (Figura 2). Estudios *in vitro* han dilucidado el efecto de las mutaciones sobre el APP. El péptido soluble β A4 (predominantemente el β A4 1-40) es de cadenas cortas, producto del metabolismo celular y es rápidamente clarificado, evitándose la formación de placas en el cerebro, como ocurre con los péptidos de cadenas largas como es el β A4 1-42 o el 43 que se agregan rápidamente a las fibrillas neuronales (55,56).

Fibroblastos transferidos a los codones 670/671 en la mutación sueca del APP producen niveles elevados del péptido β A4 soluble comparado con

otros tipos de células (57-59). Las mutaciones APP 717 (Val a Ile y Val a Phe) producen hasta dos veces formas más largas y más insolubles del péptido β A4 el cual es secretado más rápidamente y promueve la formación de depósitos (60). Las mutaciones APP 717 (Val a Ile) y APP 693 no causan ningún incremento en la secreción del péptido β A4 (61,62). La mutación APP 692 lleva a la formación de una molécula de APP que contiene un péptido β A4 truncado y sobreproducción del β A4 péptido (63).

Una neuropatología tipo EA ha sido demostrada en ratas transgénicas con mutaciones del APP en los codones 670/671 y 717 (Val a Phe) lo que promueve depósitos del péptido β A4 y provoca trastornos en la memoria pero no degeneración neuronal (64,65).

El presenilin-1

Dado el hecho que en familias con EA temprana no suelen encontrarse mutaciones en el gene APP, se esperaba que otros locus tenían que existir en relación con la EA. En 1992, algunos grupos presentaron evidencias sobre un segundo locus (S182, PS-1, AD3) responsable de EAF temprana, en el brazo largo del cromosoma 14 (66,67). Una clonación estratégica en posición se utilizó para definir y aislar el gen que, en familias con EA, está codificado para mutaciones patogénicas. El gen PS-1 contiene 10 exones codificados (limitados por los exones 3-12 aproximadamente a 75 kb y 2 ó 3 exones adicionales que codifican la región 5'-no trasladada. El gen PS-1 sufre divisiones alternas, las cuales han sido descritas en el exon 8 (68-70); la inclusión/exclusión de los codones 26-29 (Val-Arg-Ser-Gln) en el 3' terminal del exon 3, también ha sido comunicado (71).

La mayor transcripción de RNA en el gen PS-1 está a 2,7 y 7,5 kb, y se expresa en diferentes regiones del cerebro humano, músculos, esqueleto, hígado, páncreas, placenta y corazón. El gen PS-1 es una proteína de estructura serpenteada con 467 aminoácidos con seis a nueve exones transmembrana (TM) (Figura 3). Al igual que el gen PS-2 está localizado en la solapa nuclear del retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi en células de mamíferos (72).

Por lo menos 41 diferentes mutaciones en el gen PS-1 han sido identificadas en más de 50 familias no relacionadas (73-75). La mayor parte en los exones 5 (TM 1-2) y 8 (TM 6-7), las mutaciones en estos dos

grupos del gen PS-1, dieron una significativa diferencia en las edades de aparición cuando se comparó con cualquiera otra. Pacientes con mutaciones en los grupos TM 6 y 7 tienen un mayor promedio en la edad de aparición que las mutaciones en TM 1 y 2 (76). En todas, excepto en una, de las mutaciones patológicas del gen PS-1, el cambio es de un solo aminoácido. El sitio del cambio por accesión, está en el exon 9 del gen PS-1 el cual resulta en una deformación de este exon; causa una sustitución de serina por cistina en el codón 280 y la partición entre los exones 8 y 10. Fue descrita una mutación más amplia en el gen PS-1, con penetración incompleta, en una familia inglesa; este cambio resulta de la mutación de una molécula de isoleucina por una de valina en el codón 141 del gen PS-1. El promedio de la edad de aparición fue de 55 años en dos pacientes de la familia. Esta mutación también se encontró presente en un individuo sano con 68 años de edad, de la misma familia (77).

Las mutaciones conocidas en la EAF están distribuidas por todo el gen PS-1, la mayor parte de ellas en las zonas predichas TM. Sobre todo, las mutaciones patológicas ocurren en aminoácidos que están comprendidos en los genes PS-1 y PS-2 (78).

El presenilin-2

El gen presenilin-2 (PS-2, STM2, AD4) fue encontrado y aislado en trabajos basados en su homología con el gen PS-1 (79). La relación genética de EA con el marcador D1S479 y una mutación patogénica causada por la sustitución de aspargina por isoleucina en el codón 141 (Asn141Ile) fueron identificadas en el cromosoma 1 de las familias "*Volga alemanas*" (80). Estas familias (siete en total) se originan de una primera familia alemana emigrada al valle del Volga en Rusia en la década de los 1760 y posteriormente a Estados Unidos (81). La relación de EA con los cromosomas 14 y 21 ha sido descartada en estas familias (82). El origen étnico común de estas familias ha sugerido que la EAF en este grupo ha sido el resultado de la común ascendencia.

El gen PS-2 contiene 10 exones (proteínas codificadas) y dos exones adicionales en la región 5'-intrasladable. Las transcripciones del gen PS-2 (2,4 a 2,8 kb) son extensamente expresadas en muchos tejidos humanos y mucho más que el gen PS-1. La isoforma patogénica PS-2 exon 8 ha sido descrita. Cambios en sitios "*in-frame acceptor*" en los intrones 9 y 10 e "*in-frame omissions*" del exon 8 y omisiones simultáneas en los exones 3 y 4 se han

reportado (83).

Dos mutaciones patogénicas en EAF de PS-2 (Asn141Ile) y sustitución de metionina por valina (Met239Val) han sido reportadas en ocho familias no relacionadas. Las mutaciones del gen PS-2 están localizadas en diferentes codones de los encontrados en el gen PS-1. La única característica de las mutaciones del gen PS-2 es su penetración incompleta. Individuos portadores de esta mutación pueden permanecer sanos, incluso a edades avanzadas (PS-2 es también una proteína serpentina (448 aminoácidos) con seis a nueve TM). La estructura intron-exon es muy similar a PS-1 y el 67% de los aminoácidos se encuentran al mismo nivel, por lo que posiblemente tengan una función similar. Evidencias de la especificidad de la función de ambos presenilines derivan de la presencia de regiones no-homólogas en las moléculas: hidrófila NH₂-terminal y el lazo hidrófilo largo (HL-6), dentro del área transmembrana seis y siete en un modelo TM-7. Estas regiones están localizadas del mismo lado de la membrana y no son divergentes, pero el lazo HL-6 en PS-2 es más pequeño que en PS-1 (84).

Efectos de la APP sobre los PS

En las familias con EAF y mutaciones en el gen PS-1, el promedio de edad de aparición es más precoz, en las formas tempranas es de 45 años, dentro del rango 29 a 62 años de edad. En las familias con mutaciones en el gen PS-2, el promedio de edad de aparición es de 45 años dentro del rango de 40 a 88 años de edad y, por último, en las familias con mutaciones del gen APP, el promedio de la edad de aparición es de 50 años dentro del rango de 43 a 62 años de edad. Cantidades aumentadas del péptido β A4 secretado, se encuentran *in vitro* en células transferidas con las mutaciones de PS-1 y PS-2 (85).

Basado en los estudios sobre la familia Volga alemana, el aumento total de péptidos β A4, tanto cortos como largos, es significativamente más bajo en las mutaciones de PS-2 que en PS-1 (86). Experimentos *in vivo* han sugerido que mutaciones del PS-1 alteran el proceso proteolítico del APP en el COOH-terminal del β A4 en favor de la deposición de β A4-largos. Ratones transgénicos portadores del PS-1 humano mutado, tienen por lo menos el doble del péptido β A4 largo en sus cerebros en comparación con ratones normales (87,88).

Apolipoproteína E (ApoE)

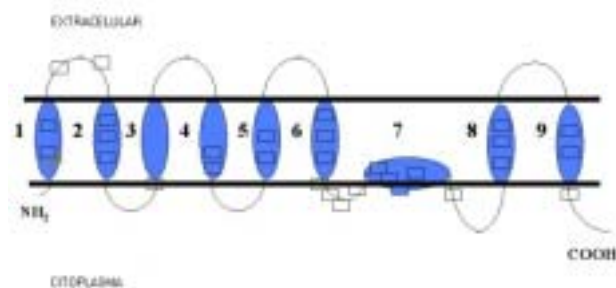


Figura 3. Área de estructura putativa, transmembrana (TM), del gen PS-1 (modificación de Li y Greenwald, 1996). Los grupos de mutaciones (cuadriláteros) entre y en el área (1-9) (símbolos elípticos) están distribuidos a través del gen PS-1, la mayoría de ellos dentro TM 1, 2, 6 y 7. El número de mutaciones no es definitivo, solamente muestra aproximadamente, los sitios de las mutaciones.

La ausencia de relación con el cromosoma 21, pero su estrecha relación con el cromosoma 19, fue el primer estudio genético que se realizó sobre EAF tardía. Posteriormente, se han publicado numerosos estudios que reportan una asociación entre el locus ApoE y EA en casos familiares y esporádicos. El método de la información recogida en los individuos enfermos (APM), ha sido utilizado para aclarar la incertidumbre acerca del modo exacto de herencia y la variabilidad en la edad de aparición de EA en los miembros de las familias afectadas (APM). El método APM detecta desviaciones desde segregaciones independientes del fenotipo de la enfermedad, hasta alelos marcadores.

Eventualmente, estudios relacionados, mediante el análisis multipunto, han configurado el gen de la EA tardía (denominado gen locus-AD2) en el cromosoma 19. En la asociación de EAF con el gen ApoCII, que también se encuentra localizado en la misma región del cromosoma 19 que el ApoE, quedó establecido que su efecto es más un factor de riesgo, que un gen de causa primaria.

El gen ApoE es una glucoproteína de 299 aminoácidos con una masa molecular relativa de 34 200 Da. Posee tres isoformas de mayor importancia: E2, E3 y E4 que son el producto de tres formas alélicas: e2, e3 y e4, de este gen impar que está localizado en el brazo largo del cromosoma 19 (89,90). De las combinaciones de estos alelos se forman hasta seis diferentes genotipos, de los cuales, el más común es ApoE E3/3 (91,92). Las tres isoformas difieren por el intercambio de residuos cistina (Cys) y arginina (Arg) en las posiciones 112

E2 NH₂—Cys112—Cys158—COOH
 E3 NH₂—Cys112—Arg158—COOH
 E4 NH₂—Arg112—Arg158—COOH

Figura 4. Genética molecular. Enfermedad de Alzheimer. Polimorfismos en ApoE.

Apo-E; Gluco 209 NH₂—COOH 34,2 kDa 3 if impar 19c RANH₂ y 216-299 RCOOH; e-4 > AchE y <ChAT

y 158 del ApoE maduro.

ApoE consiste en dos plegaduras estructuralmente independientes en las que la localización del radical amino terminal (NH₂) contiene el receptor de acoplamiento (residuos 1-191). Es estable y estructuralmente globular. La situación del carboxidrilo (COOH)- terminal (residuos 216-299) es helicoidal, menos estable y contiene, también, las funciones de acoplamiento del receptor (93,94).

ApoE está relacionada con la movilización y redistribución del colesterol durante el crecimiento neuronal y regeneración, después de lesiones (95). También se relaciona con muchas otras funciones en el humano (regeneración de nervios) (96); inmunoregulación, y la activación de varias enzimas lipolíticas (97).

ApoE se sintetiza mayormente en el hígado y en el cerebro, pero también en otros tejidos, incluidos astrocitos, macrófagos y monocitos. El genotipo ApoE se relaciona con el transporte de los lípidos en el líquido cefalorraquídeo y sus concentraciones (98,99). Las neuronas no producen ApoE, pero expresan el receptor relacionado con las lipoproteínas de baja densidad (LRP) (*ApoE-binding receptor*), mediante el cual ApoE puede cruzar la membrana (100). Cuando ApoE forma complejos con otras lipoproteínas estimulan el crecimiento de las neuronas secretando colesterol. En adición, ApoE libre y ApoE conjugada compleja, incrementan la división celular y promueven la extensión hacia fuera del cuerpo celular. En general, ApoE-HDL promueve la formación de complejos con LRP y estimula el crecimiento extramembrana (101,102).

La capacidad para ligarse del ApoE y sintetizar un péptido β A4 soluble, en el fluido cerebro espinal fue descrita en 1993 (103). Acoplamientos, mediatizados por el oxidrilo del péptido β A4, al área de acoplamiento de E4 ApoE producen un sulfatododecil sódico (SDS)- complejo resistente. En particular, E4 ApoE se liga a β A4-péptido más

rápido y más estrechamente al rango de pH que E3 ApoE E4. ApoE también se asocia con β A4-péptido para formar nuevas monofibrillas que precipitan y forman densas estructuras (104,105). E4 ApoE no se liga a la proteína tau *in vitro*, a diferencia de E2 y E3 ApoE. Es posible que la interacción mediatizada entre E3 ApoE y la proteína tau sirva como protección contra la fosforilización de tau y formación de marañas precipitadas (106).

Landen y col. (107) han demostrado en una muestra de 44 pacientes de EA con manifestaciones neuropatológicas, controlados durante 29 años, que el alelo e4 ApoE no está correlacionado con el número de placas seniles o de marañas neurofibrilares en pacientes con EA. Otros estudios sugieren que el alelo e4 ApoE está asociado con el incremento de cúmulos del β A4-péptido en el cerebro de EA (108) e igual en el cerebro de ancianos no dementes (109). Además, el alelo e4 ApoE ha sido, también, asociado con la capacidad de incremento en el β A4 en pacientes con demencia senil no EA (110). Hay evidencias del papel de ApoE en la patogénesis de EA. ApoE es detectable por inmunohistoquímica en las placas seniles, entramado de neurofibrillas y amiloides cerebro-vasculares en el cerebro en la EA (111). Distintas propiedades de acoplamiento de isoformas de ApoE al péptido β A4 y a la proteína tau, sugieren las vías por las cuales ApoE puede mediatizar esta acción (112).

La frecuencia de los alelos ApoE es muy variable de unas poblaciones a otras. Chinos, japoneses e hindúes malayos tienen mayor frecuencia de alelos e3 (0,81-0,91%) y menor de e4 (0,07-0,09%) que otras poblaciones (113,114). Negros africanos, norteamericanos, y habitantes de Nueva Guinea tienen más bajas frecuencias de alelos e3 (0,49-0,71%) y más altas de e4 (0,21-0,40%) (115-117). La frecuencia de alelos e4 es, también, más alta en las poblaciones de Europa nor-oriental que en las del sudeste europeo (118). Las frecuencias del alelo e2 ApoE es de 0,04, e3 es de 0,77 y e4 es 0,19% en los jóvenes finlandeses entre los 3 y 18 años de edad y 0,04, 0,73 y 0,23%, respectivamente, en la población entre los 20 y 55 años de edad (119).

Polimorfismos de Apo E y la enfermedad de Alzheimer

La primera asociación entre demencia y el alelo e4 ApoE fue observada en 1989 por Shimano y col.(120), quienes encontraron incremento en la frecuencia del alelo e4 en pacientes con demencia

por microinfartos cerebrales, comparados con los controles. La relación entre EA de aparición tardía y la frecuencia del alelo e4 fue encontrada en 1993 (121). Posteriormente, algunos estudios han reportado incremento en la frecuencia del alelo e4 en EA de aparición tardía y en algunos casos esporádicos de EA, pero la asociación es más fuerte en los casos de EA familiares (122-125). Un incremento en la frecuencia del alelo e4 ApoE puede también, demostrarse en EA de aparición temprana (126). El riesgo de desarrollar EA tiene que ver con las concentraciones, es decir, es dosis dependiente. Individuos portadores de dos alelos e4 tienen un mayor riesgo que los que tienen uno o no tienen alelos e4. En familias con EA portadoras de una mutación de APP y un incremento en el número de alelos e4, disminuye la edad de aparición de la enfermedad (127-129). Siempre, en EAF, familias con encadenamiento en los cromosomas 1 ó 14, la presencia del alelo e4 no afecta la edad de aparición de la enfermedad (130). En general, el alelo e2 en el locus ApoE puede proteger contra la EA. Estudios sobre pacientes centenarios han revelado que el alelo e2 tiene impacto sobre la longevidad y que la frecuencia del alelo e4 es menor en estos individuos (131-135). Entonces, el riesgo asociado con el alelo e4 ApoE en la EA puede apreciarse como edad dependiente (136,137). Se ha observado una diferencia significativa entre ambos sexos: el alelo e4 ApoE tiene una frecuencia más alta en mujeres que en hombres, especialmente entre los 60 y 70 años de edad (138).

La reorganización neuronal (degeneración de las neuronas y la remodelación plástica de las dendritas) se afecta severamente en numerosas áreas subcorticales de pacientes de EA portadores del alelo e4 ApoE (139).

Metabolismo colinérgico y ApoE

La acetilcolina (ACh), es el transmisor secretado por las neuronas colinérgicas, es sintetizada por la colina-acetil-transferasa (ChAT) y catabolizada por la acetil-colinesterasa (AChE), el mayor componente de la colinesterasa (ChE) (Figura 5). La colinesterasa no específica, butiril-colinesterasa (BChE), que se encuentra a menores concentraciones en el tejido cerebral que AChE, puede tener también la capacidad para hidrolizar ACh (140). Muchos subtipos diferentes de receptores muscarínicos por ejemplo: M1 y M2, también se han descrito. El receptor subtipo M2 es un receptor presináptico y el subtipo

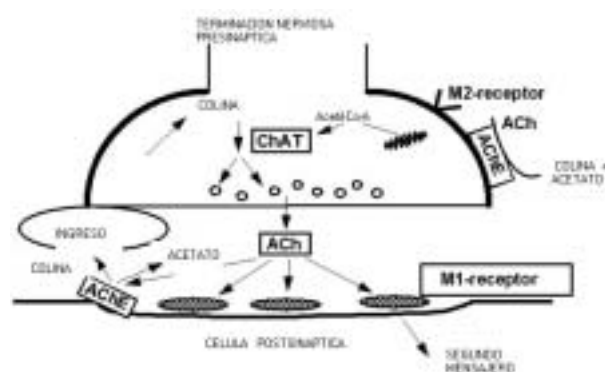


Figura 5. Sinapsis colinérgica. AChE=acetil-colinesterasa AcetilCoA=acetilcoenzima A; ChAT=colino-acetil-transferasa.

M1 es un receptor postsináptico (141).

Los cambios mejor documentados en las actividades de las enzimas transmisoras en pacientes con EA se encuentran en el sistema colinérgico. El primer cambio reportado en las reducciones de actividad de ChAT y AChE se ha observado en el neocórtex, hipocámpus y algunas otras regiones del cerebro, en muestras de material de autopsia de EA (142-144). Un significativo déficit de ChAT en EA se ha encontrado en las regiones corticales frontales, parietales y temporales, así como en los hipocámpus y amígdala, la disminución es más severa en los pacientes con menor edad (145,146). La reducción de la actividad en ChAT y el número de placas seniles en el córtex se correlacionan con la pérdida de neuronas en el nucleus de Meynert (147-149). Demostraciones por métodos inmuno-histoquímicos, de ambos, ChAT y AChE, en las placas seniles ponen énfasis en la intervención de las neuronas colinérgicas en la EA (150,151). En adición, las propiedades de histo-tinción de AChE en el córtex se han observado profundamente reducidas en pacientes con EA.

Cambios en ChE, y particularmente en AChE, en el ámbito molecular en el cerebro de EA son mayormente debidos a la pérdida de la forma molecular de la membrana-asociada predominante G4 (152,153). La forma tetraédrica G4 es el mayor componente de AChE tanto en el tejido cerebral como en el LCR. En el cerebro, en EA, la pérdida de AChE se limita a la forma de acoplamiento de membrana G4 mientras las formas solubles permanecen inalteradas (154). El LCR refleja la secreción de la forma soluble de G4 desde el cerebro al LCR

(155). Entonces resulta comprensible que, AChE en LCR de pacientes con EA permanezca inalterado o reducido en comparación con los cambios en el tejido cerebral (156). La disminución es, siempre, mayor en los casos más severos (157).

El tejido cerebral *post mortem* es a menudo utilizado para estudiar el sistema neuro-transmisor en las enfermedades neurodegenerativas. El tejido cerebral puede ser utilizado para ensayos tanto cualitativos como cuantitativos, toda vez que la actividad funcional del neurotransmisor en las neuronas no puede ser activado en muestras de tejidos *post mortem* (158). Exámenes del LCR se usan ampliamente para determinar antecedentes bioquímicos de enfermedades del sistema nervioso central. Algunos marcadores muestran cambios relacionados con la edad; por ejemplo: AChE, puede incrementarse con la edad (159). Además, los niveles de ApoE en LCR son más bajos en pacientes con EA que en sujetos control.

Relación del déficit colinérgico con ApoE

Dos estudios han demostrado que el grado de déficit neuronal en el contenido de ACh en pacientes con EA se relaciona con el número de alelos e4 presentes (160,161). Estos estudios *post mortem*, sugieren que pacientes de EA portadores del alelo e4, pueden representar un subgrupo con severo déficit colinérgico. El déficit de ChAT ha sido reportado como más pronunciado en la corteza frontal de pacientes con EA con el genotipo ApoE e4/e4 y han comunicado una disminución proporcional de ChAT al número de alelos e4 en el hipocampo y corteza temporal en pacientes EA *post mortem*. También se ha demostrado, en un estudio clínico, que la respuesta a la *tacrine* (un inhibidor de la acetil-colinesterasa) sugiere una respuesta diferente a las cantidades de la droga en pacientes con EA portadores del alelo e4 ApoE, comparados con los que no son portadores del alelo e4. Registros patológicos también han demostrado que el número de alelos e4 ApoE están en relación inversa con la actividad residual cerebral de la colina-acetil-transferasa y los sitios de acoplamiento del receptor nicotínico en pacientes con EA. Se ha sugerido que pacientes con EA con el alelo e4, responden diferencialmente a la terapia basada en colinomiméticos semejantes a tacrina, y están a mayor riesgo por perder su capacidad de sintetizar ACh y por tanto, menor capacidad de responder a la droga (162).

Otros factores de susceptibilidad en EA Polimorfismo alpha-1-antiquimotripsina

Factores genéticos adicionales pueden estar relacionados con la manifestación de la enfermedad. Niveles elevados de la proteína α 1-antiquimotripsina (ACT) han sido observados en pacientes con EA, tanto en el plasma como en el LCR, por lo cual, la proteína ACT ha sido propuesta como un marcador para EA (163,164). ACT está íntimamente asociada, funcionalmente, al péptido β A4 en el cerebro de pacientes con EA (165,166). ACT contribuye a la formación de fibrillas del péptido β A4 y a la deposición del β -amiloide (167-169).

ACT está incluida en la clase de los inhibidores de las proteinasas-serinas (serpinas) y codificadas como un gen en el cromosoma 14 (170) a unos 30 cM desde el gen PS-1 (171). Un polimorfismo ha sido descrito en la secuencia de la señal péptido de ACT, aproximadamente igual en la población general (172). Este polimorfismo bi-alélico del gen ACT se ha descrito como consecuencia del intercambio de un aminoácido Ala por un Thr en el codón 15 en la señal de la región péptido del gen. Esta mutación ha sido señalada de conferir un riesgo significativo para EA (173).

Pacientes con la combinación del fenotipo ACT/AA y el alelo ApoE e4 fueron reportados para incrementar de dos a tres veces el riesgo para EA en comparación con controles. Otros estudios han confirmado estos hallazgos (174,175), no obstante, otros autores no han podido confirmarlo (176-180). Además del sexo y edad, en las asociaciones de ACT y mutaciones de ApoE, han sido identificados en poblaciones de caucásicos y negros nigerianos. En mujeres caucásicas y negras nigerianas, la frecuencia de ApoE alelo e4 es significativamente más baja que en el fenotipo ACT/AA en hombres de las mismas razas.

El polimorfismo presenilín-1 intrón 8

En la mayoría de los casos de EA familiares de aparición precoz, las mutaciones en el gen PS-1 están presentes, por el contrario, su rol es opuesto al polimorfismo del gen PS-1 intrón 8 en la EA de aparición tardía. La asociación de un polimorfismo intrónico situado en 3' del exon 8 del gene PS-1 se ha propuesto como asociado a la EA de aparición tardía. Homocigotos del polimorfismo alelo 1 del intrón 8 se han descrito asociados a un doble riesgo para la

EA de aparición tardía comparada con los heterocigotes de los alelos 1 y 2 o los homocigotes del alelo 2 (181). Esta asociación se ha observado en ambos casos, esporádico y familiar de EA de aparición tardía (182,183); no obstante, otros estudios no han encontrado ninguna asociación entre el polimorfismo PS-1 intron 8 y la EA de aparición tardía (184,188). Resultados opuestos han descrito en España, en pacientes con EA de aparición tardía (189). Homocigotes del alelo 2 han sido asociados con un incremento de hasta tres veces el riesgo para EA, el que aumenta hasta 4,5 veces en portadores de ApoE alelo e4. Además, un incremento en la frecuencia del alelo 1 se ha encontrado asociado con el polimorfismo PS-1 intron 8 en familias con EA con mutaciones de los genes PS-1 o PS-2, pero no con mutaciones de APP o en pacientes con la forma de aparición tardía de EA (190).

Este polimorfismo ocurre dentro del intron entre los exones 8 y 9 del gen PS-1 y se considera improbable que cause algún efecto biológico. Tres explicaciones diferentes han sido sugeridas para esta asociación; primera: el polimorfismo puede ser biológicamente relevante para la enfermedad; segundo: es una asociación desequilibrada, biológicamente relevante en cualquier sitio del gen PS-1; o tercero: el polimorfismo está en desequilibrio, con variabilidad genética en otro gen adyacente.

El exón 8 del gen PS-1 es compartido alternativamente en algunos tejidos mientras una mutación en el sitio del aceptor en el mismo intron es asociada con EA de aparición temprana en familias con pérdida del exon. Además, en el exon 8 está el grupos más prominente para las mutaciones de la EA de aparición temprana (191).

Hallazgos más recientes

Guo Q (192) reporta que la proteína Par-4 (*prostate apoptosis response-4*) la cual originalmente fue descubierta en células cancerosas de próstata que crece bajo apoptosis (muerte programada), sujetas a la acción de agentes quimioterapéuticos. Cuando los investigadores expusieron neuronas del hipocampo, cultivadas, al β A-péptido, los niveles de Par-4 se incrementaron rápidamente y cuando fue bloqueada la expresión de Par-4 por antígenos DNA inducidos, las neuronas detuvieron la apoptosis. Los mismos autores también observaron que los cultivos de neuronas que contienen las mutaciones descritas del PS-1 contienen niveles

más altos de Par-4 que los cultivos control. Este estudio experimental sugiere que Par-4 es un eslabón crítico en la cadena de eventos que lleva a la muerte programada de las neuronas en la EA. Los mecanismos de acción son aún oscuros, pero los autores esperan clarificarlos con experimentos *in vivo* que están en curso en modelos de ratones transgénicos.

Otro potencial inductor de apoptosis en las neuronas en la EA, incluye la familia de las enzimas llamadas *caspases*. Un grupo de investigadores de la Universidad de Yale y de la *Vertex Pharmaceutical* (Mass. EE.UU.), han demostrado *in vivo*, que caspase-9 induce apoptosis. Modelos experimentales sometidos a la acción de anticuerpos DNA específicos, detienen la apoptosis inducida, en etapas tempranas de desarrollo (193).

Par-4 y caspase-9 son blancos actualmente de estudios experimentales para iniciar la terapia genética preventiva en seres humanos.

En los últimos meses han aparecido otros trabajos que demuestran que mutaciones en la proteína tau causan formas hereditarias de demencias frontotemporales relacionadas con EA (194). Este hallazgo afecta las investigaciones sobre EA porque es la primera vez que se demuestra que las mutaciones de tau conducen a la muerte de las neuronas.

Finalmente, Hardy (195) sostiene que APP y las mutaciones de los presenilines aumentan las cantidades de β A que inducen la disfunción de tau y la formación de marañas en las neurofibrillas.

Conclusiones

La búsqueda continúa por la senda bioquímica que lleve a la prevención de la enfermedad de Alzheimer. Igual que los exploradores que buscan la fuente de un río largo y expansivo, en la enfermedad de Alzheimer los investigadores buscan los orígenes de una senda bioquímica sumamente compleja, que culmine en el ataque de una condición debilitante que aflige a más de 40 millones de personas en todo el mundo. Por el camino, los investigadores se han encontrado con numerosos afluentes, factores que, aunque se ha demostrado contribuyen en la patogénesis, de algún modo, pueden o no conectarse o causalmente pueden relacionarse entre sí. Aunque los recientes hallazgos en el campo han sido sumamente animados, los científicos están lejos de poder precisar, trazar y unificar estos factores en una síntesis que con precisión describa qué está pasando exactamente y por qué.

REFERENCIAS

1. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with: familial Alzheimer's disease. *Nature* 1991;349:704-706.
2. Tanzi RE, Vaula G, Romano DM, Mortilla M, Huang TL, Tupler RG, et al. Assessment of amyloid b-protein precursor gene mutations in a large set of familial and sporadic Alzheimer's disease cases. *Am J Hum Genet* 1992;51:273-282.
3. Tanzi RE, Bush AI, Wasco W. Genetic studies of Alzheimer's disease: Lessons learned and future imperatives. *Neurobiol Aging* 1994;15:145-148.
4. Hardy J. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 1997;20:154-159.
5. Hutton M, Busfield F, Wragg M, Crook R, Perez-Tur J, Clark RF, et al. Complete analysis of the presenilin 1 gene in early onset Alzheimer's disease. *NeuroReport* 1996;7:801-805.
6. Levy-Lahad E, Poorkaj P, Wang K, Fu YH, Oshima J, Mulligan J, Schellenberg GD. Genomic structure and expression of STM2, the chromosome 1 familial Alzheimer disease gene. *Genomics* 1996;34:198-204.
7. Da Silva HAR, Patel AJ. Presenilins and early-onset familial Alzheimer's disease. *Neuroreport* 1997;8:1-12.
8. Kamboh MI, Sanghera DK, Ferrell RE, DeKosky ST. APOE*4-associated Alzheimer's disease risk is modified by a1-antichymotrypsin polymorphism. *Nature Genet* 1995;10:486-488.
9. Wragg M, Hutton M, Talbot C. The Alzheimer's disease collaborative group: Genetic association between intronic polymorphism in presenilin-1 gene and late-onset Alzheimer's disease. *Lancet* 1996;347:509-512.
10. Payami H, Schellenberg GD, Zarepari S, Kaye J, Sexton GJ, Head MA, et al. Evidence for association of HLA-A2 allele with onset age of Alzheimer's disease. *Neurology* 1997;49:512-518
11. Kang DE, Saitoh T, Chen X, Xia Y, Masliah E, Hansen LA, et al. Genetic association of the low-density lipoprotein receptor-related protein gene (LRP), an apolipoprotein E receptor, with late-onset Alzheimer's disease. *Neurology* 1997;49:56-61.
12. Davies RE, Miller S, Herrnstadt C, Ghosh SS, Fahy E, Shinobu LA, et al. Mutations in mitochondrial cytochrome-c-oxidase genes segregate with late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:4526-4531.
13. Pericak-Vance MA, Bass MP, Yamaoka LH, Gaskell PC, Scott WK, Terwedow HA, et al. Complete genomic screen in late-onset familial Alzheimer disease. Evidence for a new locus on chromosome 12. *JAMA* 1997;278:1237-1241.
14. Wisniewski KE, Dalton AJ, Crapper-McLachlan DR, Wen GY, Wisniewski HM. Alzheimer's disease in Down's syndrome: Clinicopathologic studies. *Neurology* 1985;35:957-961.
15. Mann DAM. The pathological association between Down syndrome and Alzheimer's disease. *Mech Age Dev* 1985;43:99-136.
16. St George-Hyslop PH, Tanzi RE, Polinsky PJ, Haines JL, Nee L, Watkins PC, et al. The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science* 1987;235:885-890.
17. Kang J, Lemaire H-G, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschnik K-H, et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 1987;325:733-736.
18. Goldgaber D, Lerman MI, McBride OW, Saffiotti U, Gajdusek DC. Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* 1987;235:877-880.
19. Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, Bruns GAP, St George-Hyslop P, Van Keuren ML, et al. Amyloid-b protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* 1987;235:880-884. /www.coa.uky.edu./ADReview/tanzi.htm(separatas)
20. Chartier-Harlin MC, Crawford F, Hamandi K, Mullan M, Goate A, Hardy J, et al. Screening for the beta-amyloid precursor protein mutation (APP717:Val-Ile) in extended pedigrees with early onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1991(a);129:134-135.
21. Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houldon H, Warren A, Hughes D, Fidani L, et al. Early -onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the b-amyloid precursor protein gene. *Nature* 1991(b);353:844-846.
22. Hendriks L, van Duijn CM, Cras P, Cruts M, van Hul W, van Harskamp F. Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the b-amyloid precursor protein gene. *Nature Genet* 1992;1:218-221.
23. Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of b-amyloid. *Naturegenet* 1992;1:345-347.
24. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem*

- Biophys Res Comm 1984;120:885-890.
25. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci* 1985;82:4245-4249.
 26. Selkoe DJ, Polisny MB, Joachim CL, Vickers EA, Lee G, Fritz LC, Oltersdorf T. B-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proc Natl Acad Sci* 1988;85:7341-7345.
 27. Lemaire HG, Salbaum JM, Multhaup G, Kang J, Bayney RM, Unterbeck A. The PreA4 (695) precursor protein of Alzheimer's disease A4 amyloid is encoded by 16 exons. *Nucleic Acids Res* 1989;17:517-522.
 28. Hartmann T, Bergsdorf C, Sandbrink R, Multhaup G, Ida N, Bieger S, et al. Alzheimer's disease bA4 protein release and APP sorting are regulated by alternative splicing. *J Biol Chem* 1996;271:13208-13214.
 29. Sandbrink R, Zhang D, Schaeffer S, Masters CL, Bauer J, Förstl H, Beyreuther K. Missense mutations of the PS-1/S182 gene in German early-onset Alzheimer's disease patients. *Ann Neurol* 1996;40:265-266.
 30. Golde TE, Estus S, Usiak M, Younkin LH, Younkin SG. Expression of beta amyloid protein precursor mRNAs: Recognition of a novel alternatively spliced form and quantitation in Alzheimer's disease using PCR. *Neuron* 1990;4:253-267.
 31. 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. *Science* 1990;248:854-857.
 32. Goedert M. Neuronal localization of amyloid beta protein precursor mRNA in normal human brain and Alzheimer's disease. *EMBO* 1987;6:3627-3632.
 33. Oltersdorf T, Fritz LC, Schenk DB, Lieberburg I, Johnson-Wood KL, Beattie EC, et al. The secreted form of the Alzheimer's amyloid precursor protein with the Kunitz domain is protease nexin-II. *Nature* 1989;341:144-147.
 34. Levy E, Carman MD, Fernandez-Madrid IJ, Power MD, Lieberburg I, van Duinen SG, et al. Mutations of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science* 1990;248:1124-1126.
 35. Bakker E, van Broeckhoven C, Haan J, Voorhoeve E, van Hul W, Levy E, et al. DNA diagnosis for hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch type). *Am J Hum Genet* 1991;49:518-521.
 36. Van Broeckhoven C, Haan J, Bakker E, Hardy JA, van Hul W, Wehnert A, et al. Amyloid beta protein precursor gene and hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch). *Science* 1990;248:1120-1122.
 37. Hendriks L, van Duijn CM, Cras P, Cruts M, van Hul W, van Harskamp F, et al. Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the b-amyloid precursor protein gene. *Nature Genet* 1992;1:218-221.
 38. Van Duijn CM, Hendriks L, Cruts M, Hardy JA, Hofman A, van Broeckhoven C. Amyloid precursor protein gene mutation in early-onset Alzheimer's disease. *Lancet* 1991;333:978.
 39. Schellenberg GD, Anderson L, O'dahl S, Wisjman EM, Sadovnick AD, Ball MJ, et al. APP717, APP693, and PRIP gene mutations are rare in Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* 1991;49:511-517.
 40. Kamino K, Orr HT, Payami H, Wijsman EM, Alonso ME, Pulst SM, et al. Linkage and mutational analysis of familial Alzheimer's disease kindreds for the APP gene region. *Am J Hum Genet* 1992;51:998-1014.
 41. Murrell J, Farlow M, Ghetti B, Benson MD. A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science* 1991;254:97-99.
 42. Fujigasaki H, Naruse S, Kaneko K, Hirasawa H, Tsuji S, Miyatake T. Mutational analysis of the amyloid precursor protein gene in Japanese familial Alzheimer's kindreds. *Hum Genet* 1994;93:460-462.
 43. Almqvist E, Lake S, Axelman K, Johansson K, Winblad B. Screening of amyloid precursor gene mutation (APP 717 Val[®]Ile) in Swedish families with Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 1993;6:151-156.
 44. Lendon CL, Myers A, Cumming A, Goate AM, St Clair D. A polymorphism in the presenilin 1 gene does not modify risk for Alzheimer's disease in a cohort with sporadic early onset. *Neurosci Lett* 1997;228:212-214.
 45. Zubenko GS, Farr J, Stiffler JS, Hughes HB, Kaplan BB. Clinically-silent mutation in the putative iron-responsive element in exon 17 of the b-amyloid precursor protein gene. *J Neuropathol Exp Neurology* 1992;51:459-463.
 46. Hutton M, Hardy J. The presenilins and Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 1997;6:1639-1646.
 47. Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of b-amyloid. *Nature Genet* 1992;1:345-347.
 48. Carter DA, Desmarais E, Bellis M, Campion D, Clerget-Darpoux F, Brice A, et al. More missense in amyloid gene. *Nature Genet* 1992;2:255-256.
 49. Peacock ML, Murman DL, Sima AA, Warren JT, Roses AT, Fink JK. Novel amyloid precursor protein gene mutation (codon 665Asp) in a patient with late-onset

- Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1994;35:432-438.
50. Schellenberg GD, Deeb SS, Boehnke M, Bryant EM, Martin GM, Lampe TM, Bird TD. Association of an apolipoprotein CII allele with familial dementia of the Alzheimer type. *J Neurogenet* 1987;4:97-108.
 51. Van Duijn CM, Hendriks L, Cruts M, Hardy JA, Hofman A, van Broeckhoven C. Amyloid precursor protein gene mutation in early-onset Alzheimer's disease. *Lancet* 1991;333:978.
 52. Fabian H, Szendrei GI, Mantsch HH, Otvos L Jr. Comparative analysis of human and Dutch-type Alzheimer b-amyloid peptides by infrared spectroscopy and circular dichroism. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;191:232-239.
 53. Van Broeckhoven C. Genes in early onset Alzheimer's disease: Implications for AD research. *Neurobiol Aging* 1994;15:149-153.
 54. Van Broeckhoven C. Molecular genetics of Alzheimer's disease: Identification of genes and gene mutations. *Eur Neurol* 1995;35:8-19.
 55. Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, et al. Amyloid b-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 1992;359:322-325.
 56. Jarrett J, Berger E, Lansbury P. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 1993;32:4693-4697.
 57. Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, et al. Mutation of the b-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases b-protein production. *Nature* 1992;360:672-674.
 58. Cai XD, Golde TE, Younkin SG. Release of excess amyloid b protein from a mutant amyloid b protein precursor. *Science* 1993;259:514-516.
 59. Johnston JA, Cowburn RF, Norgren S, Wiehager B, Venizelos N, Winblad B, et al. Increased beta-amyloid release and levels of amyloid precursor protein (APP) in fibroblast cell lines from family members with the Swedish Alzheimer's disease APP670/671 mutation. *FEBS Lett* 1994;354:274-278.
 60. Suzuki N, Cheung TT, Cai X-D, Okada A, Otvos L Jr, Eckman C, et al. An increased percentage of long amyloid b protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (bAPP717) mutants. *Science* 1994;264:1336-1340.
 61. Murayama K, Usami M, Yamao-Harigaya W, Tagawa K, Ishiura S. Mutation of Glu693 to Gln or Val717 to Ile has no effect on the processing of Alzheimer amyloid precursor protein expressed in COS-1 cells by cDNA transfection. *Neurosci Lett* 1991;132:97-100.
 62. Felsenstein KM, Lewis-Higgins LL. Processing of the b-amyloid precursor protein carrying the familial, Dutch-type, and a novel recombinant C-terminal mutation. *Neurosci Lett* 1993;152:185-189.
 63. Haass C, Hung AY, Selkoe DJ, Teplow DB. Mutation associated with a locus for Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid b-protein precursor. *J Biol Chem* 1994;269:17741-17748.
 64. Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, et al. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F b-amyloid precursor protein. *Nature* 1995;373:523-527.
 65. Hsiao KK, Borchelt DR, Olson K, Johannsdottir R, Kitt C, Yunis W, et al. Age-related CNS disorder and early death in transgenic FVB/N mice overexpressing Alzheimer amyloid precursor proteins. *Neuron* 1995;15:1203-1218.
 66. St George-Hyslop P, Haines J, Rogaev E, Mortilla M, Vaula G, Pericak-Vance M, et al. Genetic evidence for a novel familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Nature Genet* 1992;2:330-334.
 67. Van Broeckhoven C, Backhovens H, Cruts M. Mapping of a gene predisposing to early onset Alzheimer's disease to chromosome 14q24.3. *Nature Genet* 1992;2:335-339.
 68. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 1995;375:754-760.
 69. Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, 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* 1995;376:775-778.
 70. Clark RF, Cruts M, Korenblat KM, He C, Talbot C, Van Broeckhoven C, Goate AM. A yeast artificial chromosome contig from human chromosome 14q24 spanning the Alzheimer's disease locus AD3. *Hum Mol Genet* 1995a;4:1347-1354.
 71. Clark RF, Hutton M, Fuldner RA, Froelich S, Karran E, Talbot C. The structure of the presenilin1 (S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD families. *Nature Genet* 1995b;11:219-222.
 72. Kovacs DM, Fausett HJ, Page KJ, Kim TW, Moir RD, Merriam DE, et al. Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: Neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nat Med* 1996;2:224-229.
 73. Cruts M, Hendriks L, Van Broeckhoven C. The

- presenilin genes: A new gene family involved in Alzheimer's disease pathology. *Hum Mol Genet* 1996;5:1449-1455.
74. Hardy J. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 1997;20:154-159.
 75. Lendon CL, Ashall F, Goate AM. Exploring the etiology of Alzheimer's disease using molecular genetics. *JAMA* 1997;277:825-831.
 76. Rossor MN, Fox NC, Beck J, Campell TC, Collinge J. Incomplete penetrance of familial Alzheimer's disease in a pedigree with a novel presenilin-1 gene mutation. *Lancet* 1996;347:1560.
 77. Pérez-Tur J, Wavrant-De Vrieze F, Lambert JC, Chartier-Harlin M-C. The Alzheimer's study group. Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 1996;347:1560-1561.
 78. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettigell WH, et al. Candidate gene for chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 1995b;269:973-977.
 79. Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, 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* 1995;376:775-778.
 80. Levy-Lahad E, Wijsman EM, Nemens E, Anderson L, Goddard KAB, Weber JL, et al. A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science* 1995c;269:970-973.
 81. Bird TD, Lampe TH, Nemens EJ, Miner GW, Sumi SM, Schellenberg GD. Familial Alzheimer's disease in American descendants of the Volga Germans: Probable genetic founder effect. *Ann Neurol* 1988;23:25-31.
 82. Levy-Lahad E, Poorkaj P, Wang K, Fu YH, Oshima J, Mulligan J, Schellenberg GD. Genomic structure and expression of STM2, the chromosome 1 familial Alzheimer disease gene. *Genomics* 1996;34:198-204.
 83. Prihar G, Fuldner RA, Perez-Tur J, Lincoln S, Duff K, Crook R, et al. Structure and alternative splicing of the presenilin-2 gene. *NeuroReport* 1996;7:1680-1684.
 84. Sherrington R, Froelich S, Sorbi S, Campion D, Chi H, Rogaeva EA, et al. Alzheimer's disease associated with mutations in presenilin 2 is rare and variably penetrant. *Hum Mol Genet* 1996;5:985-988.
 85. Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, et al. Secreted amyloid β -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Med* 1996;8:864-870.
 86. Mann DM, Iwatsubo T, Nochlin D, Sumi SM, Levy-Lahad E, Bird TD. Amyloid (abeta) deposition in chromosome 1-linked Alzheimer's disease: The Volga German families. *Ann Neurol* 1997;41:52-57.
 87. Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, et al. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 1996;17:1005-1013.
 88. Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-Tur J, et al. Increased amyloid- β 42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 1996;358:710-713.
 89. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988;240:622-630.
 90. Emi M, Wu LL, Robertson MA, Myers RL, Hegele RA, Williams RR, White R, Lalouel JM. Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoforms. *Genomics* 1988;3:373-379.
 91. Lehtimäki T, Moilanen T, Viikari J, Åkerblom HK, Ehnholm C, Rönnemaa T, et al. Apolipoprotein E phenotypes in Finnish youths: A cross-sectional and six-year follow-up study. *J Lipid Res* 1990;31:487-495.
 92. Hallman DM, Boerwinkle E, Saha N, Sandholzer C, Menzel HJ, Csazar A, Utermann G. The apolipoprotein E polymorphism: Comparison of allele frequencies and effects in nine populations. *Am J Hum Genet* 1991;49:338-349.
 93. Wiesgraber KH. Apolipoprotein E: Structure-function relationships. *Adv Prot Chem* 1994a;45:249-320.
 94. Wiesgraber KH, Roses AD, Strittmatter WJ. The role of apolipoprotein E in the nervous system. *Curr Opin Lipidol* 1994b;5:110-116.
 95. Poirier J, Hess M, May PC, Finch CE. Astrocytic apolipoprotein E mRNA and GFAP mRNA in hippocampus after entorhinal cortex lesioning. *Mol Brain Res* 1991;11:97-106.
 96. Handelmann GE, Boyles JK, Weisgraber KH, Mahley RW, Pitas RE. Effects of apolipoprotein E, b-very low density lipoproteins, and cholesterol on the extension of neurites by rabbit dorsal root ganglion neurons in vitro. *J Lipid Res* 1992;33:1677-1688.
 97. Siest G, Pillot G, Régis-Bailly A, Leininger-Muller B, Steinmetz J, Galteau M-M, Visvikis S. Apolipoprotein E: An important gene and protein to follow in laboratory medicine. *Clin Chem* 1995;41:1068-1086.
 98. Lehtimäki T, Pirttilä T, Mehta PD, Wisniewski HM, Frey H, Nikkari T. Apolipoprotein E (apoE) polymorphism and its influence on apoE concentrations in the cerebrospinal fluid in Finnish patients with Alzheimer's

- disease. *Hum Genet* 1995;95:39-42.
99. Pirttilä T, Mehta PD, Soininen H, Kim KS, Heinonen O, Paljärvi L, et al. Cerebrospinal fluid concentrations of soluble amyloid beta-protein and apolipoprotein E in patients with Alzheimer's disease: Correlations with amyloid load in the brain. *Arch Neurol* 1996;53:189-193.
 100. Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK, Hyman BT. Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: Allelic variation and receptor interactions. *Neuron* 1993;11:575-580.
 101. Fagan AM, Bu G, Sun Y, Daugherty A, Holtzman DM. Apolipoprotein E-containing high density lipoprotein promotes neurite outgrowth and is a ligand for the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 1996;271:30121-30125.
 102. Narita M, Bu G, Holtzman DM, Schwartz AL. The low-density lipoprotein receptor-related protein, a multifunctional apolipoprotein E receptor, modulates hippocampal neurite development. *J Neurochem* 1997;68:587-595.
 103. Wisniewski T, Golabek A, Matsubara E, Ghiso J, Frangione B. Apolipoprotein E: Binding to soluble Alzheimer's b-amyloid. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;192:359-365.
 104. Sanan DA, Weisgreber KH, Russell SJ, Mahley RW, Huang D, Saunders A, et al. Apolipoprotein E associates with b-amyloid peptide of Alzheimer's disease to form novel monofibrils. Isoform apoE4 associates more efficiently than apoE3. *J Clin Invest* 1994;94:860-869.
 105. Yamada T, Kakihara T, Gejyo F, Okada M. A monoclonal antibody recognizing apolipoprotein E peptides in systemic amyloid deposits. *Ann Clin Lab Sci* 1994;24:243-249.
 106. Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Goedert M, Saunders AM, Huang D, Corder EH, et al. Microtubule instability and paired helical filament formation in the Alzheimer disease brain are related to apolipoprotein E genotype. *Exp Neurol* 1994;125:163-171.
 107. Landen M, Thorsell A, Wallin A, Blennow K. The apolipoprotein E allele epsilon 4 does not correlate with the number of senile plaques or neurofibrillary tangles in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996;61:352-356.
 108. Pirttilä T, Soininen H, Mehta PD, Heinonen O, Lehtimäki T, Bogdanovic N, et al. Apolipoprotein E genotype and amyloid load in Alzheimer disease and control brains. *Neurobiol Aging* 1997;18:121-127.
 109. Polvikoski T, Sulkava R, Haltia M, Kainulainen K, Vuorio A, Verkkoniemi A, et al. Apolipoprotein E, dementia, and cortical deposition of b-amyloid protein. *N Engl J Med* 1995;333:1242-1247.
 110. Hyman BT, West HL, Rebeck GW, Buldyrev SV, Mantegna RN, Ukleja M, et al. Quantitative analysis of senile plaques in Alzheimer's disease: Observation of log-normal size distribution and molecular epidemiology of differences associated with ApoE genotype and trisomy 21 (Down syndrome). *Proc Natl Acad Sci* 1995;92:3586-3590.
 111. Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, Otomo E, Ikeda K. Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res* 1995;541:163-166.
 112. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. Apolipoprotein E: high avidity binding to b-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:1977-1981.
 113. Hallman DM, Boerwinkle E, Saha N, Sandholzer C, Menzel HJ, Csazar A, Utermann G. The apolipoprotein E polymorphism: Comparison of allele frequencies and effects in nine populations. *Am J Hum Genet* 1991;49:338-349.
 114. Kamboh MI, Sepehrnia B, Ferrell RE. Genetic studies of human apolipoproteins. VI. Common polymorphism of apolipoprotein E in blacks. *Disease Markers* 1989;7:49-55.
 115. Kamboh MI, Weiss KM, Ferrell RE. Genetic studies of human apolipoproteins. XVI. APOE polymorphism and cholesterol levels in the Mayans of the Yucatan peninsula, Mexico. *Clin Genet* 1991;39:26-32.
 116. Kamboh MI, Bhatia KK, Ferrell RE. Genetic studies of human apolipoproteins. XII. Population genetics of apolipoprotein polymorphism in Papua New Guinea. *Am J Hum Biol* 1990;2:17-23.
 117. Hendrie HC, Hall KS, Hui S, Unverzagt FW, Yu CE, Lahiri DK, et al. Apolipoprotein E genotypes and Alzheimer's disease in a community study of elderly African Americans. *Ann Neurol* 1995;37:118-120.
 118. Gerdes LU, Klausen IB, Sihm I, Faergeman O. Apolipoprotein E polymorphism in a Danish population compared to findings in 45 other study populations around the world. *Genet Epidemiol* 1992;9:155-167.
 119. Louhija J, Miettinen HE, Kontula K, Tikkanen MJ, Miettinen TA, Tilvis RS. Aging and genetic variation of plasma apolipoproteins. Relative loss of the apolipoprotein e4 phenotype in centenarians. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1084-1089.
 120. Shimano H, Ishibashi S, Murase T, Gotohda T, Yamada N, Takaku F, Ohtomo E. Plasma apolipoproteins in

- patients with multi-infarct dementia. *Atherosclerosis* 1989;79:257-260.
121. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, et al. Gene dose of apolipoprotein E type e4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993;261:921-923.
 122. Payami H, Kaye J, Heston LL, Bird TD, Schellenberg GD. Apolipoprotein E genotypes and Alzheimer's disease. *Lancet* 1993; 342:737-738.
 123. Saunders AM, Roses AD. Apolipoprotein allele frequency, ischemic cerebrovascular disease, and Alzheimer's disease. *Stroke* 1993b;24:1416.
 124. Saunders AM, Schmechel K, Breitner JC, Benson MD, Brown WT, Goldfarb L, et al. Apolipoprotein E e4 allele distributions in late-onset Alzheimer's disease and in other amyloid-forming diseases. *Lancet* 1993a;342:710-711.
 125. Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, et al. Association of apolipoprotein E allele e4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 1993c;43:1467-1472.
 126. Van Duijn CM, de Knijff P, Cruts M, Wehnert A, Havekes LM, Hofman A, Van Broeckhoven C. Apolipoprotein e4 allele in a population-based study of early-onset Alzheimer's disease. *Nature Genet* 1994;7:74-77.
 127. Hardy J. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *Lancet* 1993;342:737-738.
 128. St George-Hyslop P, Crapper McLachlan D, Tuda T, Rogaeve E, Karlinsky H, Lippa C, Pollen D. Alzheimer's disease and possible gene interaction. *Science* 1994;263:537.
 129. Levy-Lahad E, Lahad A, Wijsman EM, Bird TD, Schellenberg GD. Apolipoprotein E genotypes and age of onset in early-onset familial Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1995;38:678-680.
 130. Van Broeckhoven C, Backhovens H, Cruts M, Martin J, Crook R, Houlden H, Hardy J. APOE genotype does not modulate age of onset in families with chromosome 14 encoded Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1994;169:179-180.
 131. Corder E, Saunders A, Risch N, Strittmatter W, Schmechel D, Gaskell P, et al. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nature Genet* 1994;7:180-184.
 132. Talbot C, Lendon C, Craddock N, Shears S, Morris J, Goate A. Protection against Alzheimer's disease with apoE e2. *Lancet* 1994;343:1432-1433.
 133. Schächter F, Faure-Delanef L, Gue'not F, Rouger H, Froguel P, Lesueur-Ginot L, Cohen D. Genetic associations with human longevity at the APOE and ACE loci. *Nature Genet* 1994;6:8-10.
 134. Louhija J, Miettinen HE, Kontula K, Tikkanen MJ, Miettinen TA, Tilvis RS. Aging and genetic variation of plasma apolipoproteins. Relative loss of the apolipoprotein e4 phenotype in centenarians. *Arterioscler Tromb* 1994;14:1084-1089.
 135. Van Bockxmeer FM. ApoE and ACE genes: Impact on human longevity. *Nature Genet* 1994;6:4-5.
 136. Sobel E, Louhija J, Sulkava R, Davanipour Z, Kontula K, Miettinen H. Lack of association of apolipoprotein E allele e4 with late-onset Alzheimer's disease among Finnish centenarians. *Neurology* 1995;45:903-907.
 137. Rebeck GW, Perls T, West H, Sodhi P, Lipsitz L, Hyman B. Reduced apolipoprotein e4 allele frequency in the oldest old Alzheimer's patients and cognitively normal individuals. *Neurology* 1994;44:1513-1516.
 138. Payami H, Zarepari S, Montee KR, Sexton GJ, Kaye JA, Bird TD, et al. Gender difference in apolipoprotein E-associated risk for Alzheimer disease: A possible due to the higher incidence of Alzheimer disease in women. *Am J Hum Genet* 1996;58:803-811.
 139. Arendt T, Schindler C, Brückner MK, Eschrich K, Bigl V, Zedlick D, Marcova L. Plastic neuronal remodeling is impaired in patients with Alzheimer's disease carrying apolipoprotein e4 allele. *J Neurosci* 1997;17:516-529.
 140. Atack JR, Perry EK, Bonham JR, Perry RH. Molecular forms of acetylcholinesterase and 1140. Butyrylcholinesterase in the aged human central nervous system. *J Neurochem* 1986;47:263-277.
 141. Mash DC, Flynn DD, Potter LT. Loss of M2 muscarine receptors in the cerebral cortex in Alzheimer's disease and experimental cholinergic denervation. *Science* 1985;228:1115-1117.
 142. Bowen DM, Smith CP, White P, Davison AN. Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain* 1976;99:459-496.
 143. Davies P, Maloney AJ. Selective loss of cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* ii: 1976:1403-1405.
 144. Perry EK, Gibson PH, Blessed G, Perry RH, Tomlinson BE. Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. *J Neurol Sci* 1977;34:247-265.
 145. D'Amato RJ, Zweig RM, Whitehouse PJ, Wenk GL, Singer HS, Mayeux R, et al. Aminergic systems in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1987;22:229-236.

146. Reinikainen KJ, Riekkinen PJ, Paljärvi L, Soininen H, Helkala E-L, Jolkkonen J, Laakso M. Cholinergic deficit in Alzheimer's disease: A study based on CSF and autopsy data. *Neurochem Res* 1981;3:135-146.
147. Candy JM, Perry RH, Perry EK, Irving D, Blessed G, Fairbairn AF, Tomlinson BE. Pathological changes in the nucleus of Meynert in Alzheimer's and Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 1983;59:277-289.
148. Arendt T, Bigl V, Tennstedt A, Arendt A. Neuronal loss in different parts of the nucleus basalis is related to neuritic plaque formation in cortical target areas in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 1985;14:1-14.
149. Rinne JO, Paljärvi L, Rinne UK. Neuronal size and density in the nucleus of Meynert in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 1987;79:67-76.
150. Perry EK, Perry RH, Smith CJ, Puhorit D, Bonham J, Dick DJ, et al. Cholinergic receptors in cognitive disorders. *Can J Neurol Sci* 1986;13:521-527.
151. Armstrong DM, Bruce G, Hersh LB, Terry RD. Choline acetyltransferase immunoreactivity in neuritic plaques of Alzheimer brain. *Neurosci Lett* 1986;71:229-234.
152. Fishman EB, Siek GC, MacCallum RD. Distribution of the molecular forms of acetylcholinesterase in human brain: Alterations in dementia of the Alzheimer type. *Ann Neurol* 1986;19:246-252.
153. Sirviö J, Soininen HS, Kutvonen R, Hyttinen JM, Helkala E-L, Riekkinen P S. Acetyl- and butyrylcholinesterase activity in the cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 1987;81:273-279.
154. Younkin SG, Goodridge B, Katz J, Lockett G, Nafziger D, Usiak MF, Younkin LH. Molecular forms of acetylcholinesterases in Alzheimer's disease. *Federation Proc* 1986;45:2982-2988.
155. Greenfield S. Acetylcholinesterase may have novel functions in the brain. *Trends Neurosci* 1984;7:364-368.
156. Soininen HS, Halonen T, Riekkinen PJ. Acetylcholinesterase activities in cerebrospinal fluid of patients with senile dementia of Alzheimer type. *Acta Neurol Scand* 1981;64:217-224.
157. Elble R, Giacobini E, Scarsella GF. Cholinesterases in cerebrospinal fluid. A longitudinal study in Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 1987;44:403-407.
158. Neary D, Snowden JS, Mann DMA, Bowen DM, Sims NR, Northen B, et al. Alzheimer's disease: A correlative study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1986;49:229-237.
159. Palmer A, Sims NR, Bowen DM, Neary D, Palo J, Wikström J, Davison AN. Monoamine metabolite concentrations in lumbar cerebrospinal fluid of patients in histologically verified Alzheimer's dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1984;47:481-484.
160. Poirier J. Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 1994;17:525-530.
161. Soininen H, Kosunen O, Helisalmi S, Mannermaa A, Paljärvi L, Talasniemi S, et al. A severe loss of choline acetyltransferase in the frontal cortex of Alzheimer patients carrying apolipoprotein e4 allele. *Neurosci Lett* 1995;187:79-82.
162. Poirier J, Delisle M-L, Quirion R, Aubert I, Farlow M, Lahiri D. Apolipoprotein E4 allele as a predictor of cholinergic deficits and treatment outcome in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995;92:12260-12264.
163. Randall LL, Hardy SJS. Unity in function in the absence of consequence in sequence: Role of leader peptides in export. *Science* 1989;243:1156-1159.
164. Matsubara E, Hirai S, Amari M, Shoji M, Yamaguchi H, Okamoto K, et al. Alpha 1-antichymotrypsin as a possible biochemical marker for Alzheimer-type dementia. *Ann Neurol* 1990;28:561-567.
165. Abraham CR, Selkoe DJ, Potter H. Immunochemical identification of the serine protease inhibitor alpha 1-antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's. *Cell* 1988;52:487-501.
166. Abraham CR, Shirahama T, Potter H. Alpha 1-antichymotrypsin is associated solely with amyloid deposits containing the beta-protein. *Neurobiol Aging* 1990;11:123-129.
167. Ma J, Yee A, Brewer HB Jr, Das S, Potter H. Amyloid-associated proteins a1 -antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer b-protein into filaments. *Nature* 1994;372:92-94.
168. Eriksson S, Janciauskiene S, Lannfelt L. A1 -antichymotrypsin regulates Alzheimer b-amyloid peptide fibril formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995;92:2313-2317.
169. Das S, Potter H. Expression of the Alzheimer amyloid-promoting factor a1 -antichymotrypsin is induced in human astrocytes by IL-1. *Neuron* 1995;14:447-456.
170. Rabin M, Watson M, Kidd V, Woo SL, Breg WR, Ruddle FH. Regional location of alpha 1-antichymotrypsin and alpha 1-antitrypsin genes on human chromosome 14. *Somat Cell Mol Genet* 1986;12:209-214.
171. Haines JL, Pritchard ML, Saunders AM, Schildkraut JM, Growdon JH, Gaskell PC, et al. No genetic effect of a1 -antichymotrypsin in Alzheimer disease. *Genomics* 1996;33:53-56.

172. Kamboh MI, Sanghera DK, Ferrell RE, DeKosky ST. APOE*4-associated Alzheimer's disease risk is modified by α 1-antichymotrypsin polymorphism. *Nature Genet* 1995;10:486-488.
173. Faber H, Szendrei GI, Mantsch HH, Otvos L Jr. Comparative analysis of human and Dutch-type Alzheimer b-amyloid peptides by infrared spectroscopy and circular dichroism. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;191:232-239.
174. Thome J, Baumer A, Kornhuber J, Rösler M, Riederer P. Alpha-1-antichymotrypsin bi-allele polymorphism, apolipoprotein-E tri-allele polymorphism and genetic risk of Alzheimer's syndrome. *J Neural Transm* 1995;10:207-212.
175. Yoshiiwa A, Kamino K, Nishiwaki Y, Yamamoto H, Kobayashi T, Miki T, Ogihara T. A-1-antichymotrypsin gene as a risk factor for late-onset Alzheimer's disease in Alzheimer disease in Japanese population. *Am J Hum Genet* 1996;59(Suppl):244-249.
176. Haines JL, Pritchard ML, Saunders AM, Schildkraut JM, Growdon JH, Gaskell PC, et al. No genetic effect of α 1-antichymotrypsin in Alzheimer disease. *Genomics* 1996;33:53-56.
177. Muller U, Bödeker R-H, Gerundt I, Kurz A. Lack of association between α 1-antichymotrypsin polymorphism, Alzheimer's disease, and allele e4 of apolipoprotein E. *Neurology* 1996;47:1575-1577.
178. Nacmias B, Tedde A, Latorraca S, Piacentini S, Bracco L, Amaducci L, et al. Apolipoprotein E and α 1-antichymotrypsin polymorphism in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol* 1996;4:678-680.
179. Fallin D, Reading S, Schinka J, Hoyne J, Scibelli P, Gold M, et al. No interaction between the APOE and the alpha-1-antichymotrypsin genes on risk for Alzheimer's disease. *Am J Med Genet* 1997;74:192-194.
180. Didierjean O, Martinez M, Campion D, Hannequin D, Dubois B, Martin C, et al. No effect of the alpha 1-antichymotrypsin A allele in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997;63:103-105.
181. Wragg M, Hutton M, Talbot C. The Alzheimer's disease collaborative group: Genetic association between intronic polymorphism in presenilin-1 gene and late-onset Alzheimer's disease. *Lancet* 1996;347:509-512.
182. Higuchi S, Muramatsu S, Arai H, Sasaki H. Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 1996;347:1186.
183. Kehoe P, Williams J, Lovestone S, Wilcock G, Owen MJ. The UK Alzheimer's disease collaborative group: Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 1996;347:1185.
184. Kehoe P, Williams J, Lovestone S, Wilcock G, Owen MJ. The UK Alzheimer's disease collaborative group: Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 1996;347:1585-1587.
185. Scott WK, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 1996;347:1561-1562.
186. Pérez-Tur J, Wavrant-De Vrieze F, Lambert JC, Chartier-Harlin M-C. The Alzheimer's study group. Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 1996;347:1560-1561.
187. Tysoe C, Whittaker J, Cairns NJ, Atkinson PF, Harrington CR, Xuereb J, et al. Presenilin-1 intron 8 polymorphism is not associated with autopsy-confirmed late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1997;222:68-69.
188. Cai X, Stanton J, Fallin D, Hoyne J, Duare R, Gold M, et al. No association between the intronic presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease in clinic and population-based samples. *Am J Med Genet* 1997;74:202-203.
189. Aldudo Jesús, Bullido MJ, Frank A, Valdivieso F. Presenilin-1 genotype (2/2) is associated with late-onset Alzheimer's disease in Spanish patients. *Alzheimer's Res* 1997;3:141-144.
190. Sorbi S, Nacmias B, Tedde A, Forleo P, Piacentini S, Latorraca S, Amaducci L. Presenilin-1 gene intronic polymorphism in sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1997;222:132-134.
191. Pérez-Tur J, Froelich S, Prihar G, Crook R, Baker M, Duff K, et al. A mutation in Alzheimer's disease destroying a splice acceptor site in the presenilin -1 gene. *NeuroReport* 1995;7:297-301.
192. Guo Q. Par-4 may contribute to cell death in persons sufferin from AD and other neurodegenerative disorders. *Nature Medicine* 1998;4:957-962.
193. Kuida K. The first *in vivo* evidence of Caspase-9 related apoptosis in AD. *Cell* 1998;94:327-337.
194. Hutton M. The tau pathology in Alzheimer's disease is not just a secondary effect, but it's actually part of the pathogenic cascade. *Nature* 1998;393:702-705.
195. Hardy J. APP and presenilins mutations cause increased amounts of $A\beta$, which lead to tau dysfunction and the formation of tangles. *Nature Neuroscience* 1998;1:335-338.