

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**

TESIS DOCTORAL

Estudio de los polimorfismos:
rs165932 (intron 8), apoe ϵ 2/3/4 y rs669 (V1000I) y
la Enfermedad de Alzheimer de Comienzo Tardío
en la región del Noroeste Murciano.

MEMORIA PRESENTADA POR:

D. MIGUEL RODRÍGUEZ MANOTAS

PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR POR ESTA UNIVERSIDAD

Los Directores del presente trabajo: **Dr. D. Pedro Martínez Hernández** Profesor asociado de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de Murcia y el **Dr. D. Francisco Cañizares Hernández** Presidente del Comité de Publicaciones de la revista *Laboratorio Clínico*, CERTIFICAN:

Que **D. Miguel Rodríguez Manotas** ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado: **Estudio de los polimorfismos: rs165932 (intron 8), apoe ϵ 2/3/4 y rs669 (V1000I) y la Enfermedad de Alzheimer de Comienzo Tardío en la región del Noroeste Murciano** para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Murcia, Octubre de 2009

Fdo.:

Dr. D. Pedro Martínez Hernández

Fdo.:

Dr. D. Francisco Cañizares Hernández

“A la larga siempre acierta el que se fía del genio”.

Leopoldo

Alas

Clarín

Es mi deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

Al Dr. D. Pedro Martínez Hernández por permitirme el ingreso en su Departamento y darme la oportunidad de participar en su labor científica, así como por el interés mostrado en el seguimiento de mi actividad investigadora.

Al Dr. D. Francisco Cañizares Hernández, Dr. D. Juan Cabezas Herrera, Dr. D. Jose María Díaz Mínguez y especialmente a D. Manuel Amorín Díaz por la paciencia que han mostrado hacia mi persona enseñándome los pequeños secretos de la investigación en el campo de la Genética.

A los Compañeros de los Laboratorios del Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia y Vega Baja de Orihuela por su ayuda y los momentos que hemos compartido.

A la Dra. Dña. Purificación Corchete Sanchez por hacer posible la lectura de este trabajo en la Universidad de Salamanca.

Al Dr. D. Rogelio González Sarmiento por sus múltiples y acertados consejos como Tutor, y por haber sido tan gentil en la conexión de Salamanca con Murcia.

Nuevamente agradezco a D. Manuel Amorín Díaz, Compañero y Amigo, su desinteresada ayuda sin la cual nada de esto habría sido posible.

Especialmente doy las gracias a mi Esposa Inma por haber ayudado en todo y estado siempre a mi lado animándome en los momentos más difíciles de este trabajo, junto a mis hijas Carmen e Inés.

A mis Padres Miguel y Aurea por haber cimentado mi trayectoria académica y profesional.

A mis Hermanos y Amigos por haber confiado en que algún día culminaría este trabajo.

TABLA DE CONTENIDOS

1. ABREVIATURAS.....	1
2. INTRODUCCION	4
2.1. ANTECEDENTES HISTORICOS	4
2.2. EPIDEMIOLOGÍA	6
2.2.1. Prevalencia.....	6
2.2.2. Incidencia.....	6
2.2.3. Factores de riesgo.....	7
2.2.4. Mortalidad	7
2.3. FENOTIPO NEUROPATOLOGICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	8
2.3.1. Placas neuríticas.....	8
2.3.2. Placas difusas, preamiloideas.....	8
2.3.3. Ovillos neuro-fibrilares	9
2.3.4. Neuritas corticales distróficas	10
2.3.5. Placas tipo “cotton wool”	10
2.3.6. Microangiopatía Amiloidea.....	10
2.4. PROTEÍNA PRECURSORA DE β-AMILOIDE (APP).....	12
2.4.1. Función. Procesamiento postraduccional	13
2.4.2. Mutaciones en la APP: una causa muy rara de AD familiar	15
2.4.3. Mutaciones de la APP: causan un aumento de Aβ	16
2.5. LAS PRESENILINAS	17
2.5.1. Una aspartil proteasa embebida en la membrana	19
2.5.2. Colaboradores de las Presenilinas	25
2.5.3. Reconocimiento de sustrato	29

2.5.4. Papel en la producción de A β	31
2.5.5. Papel en la vía de señalización Notch.....	35
2.5.6. Interacción con Cadherinas y β -Catenina	37
2.5.7. La Hipótesis de la Presenilina	43
2.5.7.1. Las mutaciones de la Presenilina ligadas a FAD afectan a las actividades de la Presenilina γ -secretasa dependiente e independiente.....	45
2.5.7.2. Los inhibidores de la γ -secretasa mimetizan los efectos de las mutaciones patogénicas de Presenilina.....	50
2.5.7.3. Las mutaciones de la Presenilina pueden causar demencia neurodegenerativa en ausencia de acumulación A β	51
2.5.7.4. La distribución difusa de las mutaciones de Presenilina es más compatible con una pérdida de función	52
2.5.8. Polimorfismo del intrón 8.....	53
2.6. Apolipoproteína E (ApoE)	55
2.6.1. Apoe y AD	56
2.6.1.1. Neuropatología de la ApoE4 en el contexto de la A β	56
2.6.1.2. Neuropatología de ApoE4 independiente de A β : escisión de ApoE en neuronas.....	59
2.7. α -2-MACROGLOBULINA (A2M).....	60
2.7.1. Deficiencia de A2M	60
2.7.2. Asociación con AD	61
2.7.3. Polimorfismo [A2M, V1000I (rs669)] y susceptibilidad a padecer AD.....	63
3. OBJETO DEL ESTUDIO	65

4. SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS.....	66
4.1. Descripción general de los sujetos estudiados.....	66
4.1.1. Subpoblaciones del presente estudio	67
4.1.1.1. Estudio II.a.....	67
4.1.1.2. Estudio II.b	67
4.1.1.3. Estudio del polimorfismo V1000I (rs669) en el gen de la α-2-Macroglobulina	71
4.2. Análisis Genético	72
4.2.1. Análisis de genotipado de las formas alélicas de ApoE.....	72
4.2.2. Determinación de las formas alélicas del polimorfismo intrónico del extremo 3' del exón 8 de PS-1	72
4.2.3. Determinación de las formas alélicas del polimorfismo V1000I (rs669) del gen de la α-2-Macroglobulina.....	73
4.3. Cálculos estadísticos	74
5. RESULTADOS.....	76
5.1. Automatización del análisis de las formas alélicas del polimorfismo intrónico del extremo 3' del exón 8 de PS-1	76
5.2. Estudios de epidemiología genética.....	76
5.2.1. Estudio del alelo ϵ4 del gen de la ApoE	76
5.2.2. Estudio del genotipo PS-1 [2/2] ([CC/CC])	76
5.2.3. Relación entre el genotipo PS-1 [2/2] y el alelo ApoE ϵ4	77
5.2.4. Metanálisis de la literatura.....	78
5.2.5. Estudio del alelo V del polimorfismo V1000I (rs669) del gen de la α-2-Macroglobulina	80

6. DISCUSION.....	81
6.1. Genotipo [2/2] de PS-1.....	81
6.2. Relación del genotipo [2/2] de PS-1 con el alelo ϵ4.....	81
6.3. Genotipo [V/V] del polimorfismo V1000I (rs669) del gen de la α-2-Macroglobulina	83
7. CONCLUSIONES.....	87
8. BIBLIOGRAFÍA.....	88
9. APENDICE.....	127

ABREVIATURAS

1. ABREVIATURAS

A2M α -2-macroglobulina

ABC1 “ATP-binding cassette transporter”

AD enfermedad de Alzheimer

AICD fragmento del dominio intracelular del amiloide

APLPs “amyloid beta precursor-like protein”

ApoE apolipoproteína E

APP proteína precursora de amiloide

A β proteína β amiloide

A β 40 proteína β amiloide, fragmento de 40 residuos

A β 42 proteína β amiloide, fragmento de 42 residuos

BACE1 enzima convertora de β amiloide (“ β -site of APP cleaving enzyme”)

C99 fragmento remanente después de la escisión de BACE1 sobre APP

CBP proteína de unión a CREB

CDH1 componentes de las uniones adherentes basadas en cadherina

CK-1 α axina/casein quinasa

CREB factor de transcripción de cAMP “phosphorylation of cAMP response element-binding protein”

CTF fragmento carboxi terminal de la presenilina

CTNNA1 componentes de las uniones adherentes basadas en β -Catenina y α -Catenina)

EOAD enfermedad de Alzheimer de comienzo temprano

FAD enfermedad de Alzheimer familiar

FL presenilina completa sin sufrir endoproteólisis “full length”

FTD demencia frontotemporal

GSK3 α quinasa de la sintetasa del glucógeno 3 α

GSK3 β quinasa de la sintetasa del glucógeno 3 β 40

HL-6 gran bucle citoplasmático del dominio transmembrana 6 de presenilina

HCHWA-D hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis “hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis”

HWE equilibrio de Hardy-Weinberg

IC intervalo de confianza

Ide enzimas que degradan la insulina

JICD dominio intracelular de Jagged-2

KPI serín proteasas tipo Kunitz

LEF1 factor promotor linfoide

LOAD enfermedad de Alzheimer de comienzo tardío

LRP1 proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad.

LXRs receptores hepáticos X

Nep neprilisina

NICD fragmento del dominio intracelular de la proteína NOTCH

NTF fragmento amino terminal de presenilina

OGT “C-linked N-acetylglucosaminyltransferase”

OR “odds ratio”

PHF pares de filamentos helicoidales

PS presenilina

PS-1 presenilina 1

PS-2 presenilina 2

RE retículo endoplasmático

SPP peptidasa del péptido señal

TM transmembrana

Wnt señalización *wingless*

α -APPs fragmentos de ectodominio soluble después de escisión α secretasa

β -APPs fragmentos de ectodominio soluble después de escisión β secretasa

INTRODUCCION

2. INTRODUCCION

2.1. ANTECEDENTES HISTORICOS

La enfermedad de Alzheimer (AD) es una de las pocas cuestiones que surgen como interesantes para la comunidad científica en el siglo pasado. A ello han contribuido el dramático incremento en la expectativa de vida que permite a un gran número de individuos alcanzar la edad en la que aparecen este tipo de desórdenes degenerativos, siendo la AD el deterioro cognitivo más prevalente[1].

Un psiquiatra alemán, Alois Alzheimer, describió el síndrome en 1906 como un cuadro progresivo de deterioro cognitivo, cambios en la personalidad, pérdida acentuada de memoria, confusión y desorientación crecientes. La AD parecía una rara demencia que se producía en el periodo presenil (comienzo de la enfermedad por debajo de los 65 años) pero indistinguible de aquella que se produce en la edad senil, donde los casos se acrecientan con la edad.

El estudio de la enfermedad avanzó poco hasta el advenimiento de la microscopía electrónica, momento en el que se describen los cambios ultraestructurales subyacentes a las dos lesiones clásicas de la AD: placas seniles o neuríticas y ovillos neuro-fibrilares.

La primera clave neuroquímica clara surgió de las neuronas liberadoras de acetilcolina. Estas neuronas sufrían una degeneración progresiva y a menudo grave. El primer intento de tratamiento farmacológico surgió paralelamente para intentar mejorar los niveles de acetilcolina en la hendidura sináptica, principalmente mediante la inhibición de las enzimas degradativas.

En las décadas de los setenta y ochenta, se identificaron los déficits de otros sistemas neurotransmisores en los tejidos cerebrales de pacientes de AD, lo que parecía explicar la falta de un beneficio clínico robusto de la mayoría de los pacientes tratados con fármacos anticolinérgicos.

La patología bioquímica ha permitido posteriormente, mediante el uso de análisis composicionales e inmuno-citoquímicos, definir la composición subunitaria

de placas y ovillos; mientras que la genética molecular ha validado el papel crítico de las subunidades protéicas en los mecanismos fundamentales de la AD esclareciendo las relaciones genotipo-fenotipo para cada alteración genética ligada a las formas familiares de AD. Todo ello se ha visto reforzado a través del desarrollo de modelos celulares y animales de los mecanismos presuntivos en la AD.

2.2. EPIDEMIOLOGÍA

2.2.1. Prevalencia

La prevalencia de la AD presenta disparidad de valores entre diferentes estudios oscilando entre el 0,5 y el 24,6%[2], al igual que ocurre con los estudios observacionales aplicados a la demencia en general. En estos estudios encontramos, como causantes de estas discrepancias, diferentes errores entre los que se encuentran: la inclusión o adhesión de sujetos al estudio, la exclusión de los casos leves, la interconurrencia de otras patologías en el mismo sujeto, no utilizar las mismas pruebas para la selección de casos y en los estudios de incidencia la omisión de los sujetos fallecidos[3].

El conjunto de estudios europeos recogidos por EURODEM (*the European Community Concerted Action on the Epidemiology and Prevention of Dementia Group*) calculaba tasas de prevalencia basándose únicamente en los casos diagnosticados de AD y excluía los casos de demencia en estadio inicial todavía por diagnosticar, ofreciendo cifras de prevalencia estratificada por grupos de edad: 0,02% entre los 30 y los 59 años, 0,3% entre los 60 y los 69 años, 3,2% entre los 70 y los 79 años, y 10,8% entre los 80 y los 89 años[4]. Del mismo grupo existe otro trabajo en el que se aprecia un aumento en la tasa de prevalencia entorno al 2% para la población entre 65 y 69 años y del 22% para la franja de los 85 a los 89 años[5]. La prevalencia global para la última revisión europea fue del 4.4 %[6].

En nuestro país encontramos tres trabajos importantes[7-9] con prevalencias del 4.3, 5.7 y 4.7% respectivamente.

2.2.2. Incidencia

Se considera en términos generales que la incidencia de la AD aumenta exponencialmente con la edad y a partir de los 65 años se multiplica por 3 cada 10 años[10], considerándose del 1% en la franja de los 70 a 79 años y del 3% entre los 80 y 84 años[11].

En el grupo de estudio europeo EURODEM se detectaron diferencias en la tasa de incidencia respecto al género a partir de los 85 años, siendo la tasa de incidencia a los 90 años del 81.7 por cada mil mujeres y de 24.0 por cada mil hombres[12]

En un estudio publicado recientemente en nuestro país[13] se realizó una segunda revisión para 3891 participantes, diagnosticándose AD de debut en 117 sujetos, 71.4% de todas las demencias observadas. La tasa de incidencia anual para la franja de edad por encima de los 65 años fue de 7.4 personas por cada mil habitantes.

2.2.3. Factores de riesgo

El factor de riesgo más importante en la AD es la edad. Se observa que el riesgo se duplica cada 5 años[14].

En cuanto al resto de factores como el género (femenino)[15;16], poseer un familiar afecto de primer grado[17], o el nivel cultural, existen discrepancias en la literatura dependiendo del tipo de estudio (transversal/longitudinal) empleado a la hora de confirmar estos factores de riesgo o protectores en otros casos[18], debido probablemente a la confluencia de otros factores que no se han tenido en cuenta en dichos estudios.

2.2.4. Mortalidad

La esperanza de vida de los pacientes con EA es cada vez mayor (5.9 años[19]), incluyendo a los que tienen un inicio precoz, que aunque tienen una esperanza de vida mayor mueren antes que las demencias de inicio tardío[20]. El riesgo relativo a morir de un paciente diagnosticado entre los 65 años y los 74 es de 5,4% a los cinco años y por encima de los 75 años de edad el riesgo es de un 20,5%[11].

2.3. FENOTIPO NEUROPATOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la pérdida de neuronas y sinapsis en la corteza cerebral y en ciertas regiones subcorticales. Esta pérdida resulta en una atrofia de las regiones afectadas, incluyendo una degeneración en el lóbulo temporal, parietal, partes de la corteza frontal y la circunvolución cingulada[21]. A nivel microscópico se observan dos tipos de estructura: las placas y los ovillos neurofibrilares

2.3.1. Placas neuríticas

Son focos microscópicos de depósitos amiloideos extracelulares y daño dendrítico y axonal asociado, que generalmente se encuentran en un elevado número en el cortex límbico y de asociación[22]. Tales placas contienen depósitos extracelulares de β amiloide (**A β**) de forma filamentosa, formando masas estrelladas de fibrillas amiloideas. Generalmente se encuentran rodeadas por astrocitos reactivos que ostentan abundantes filamentos de la glia. Estas lesiones probablemente se desarrollan muy gradualmente sobre un periodo substancial de tiempo, quizá años. La mayoría de la A β fibrilar encontrada en las placas neuríticas son especies acabadas en el aminoácido 42 (**A β 42**), ligeramente más largas, más hidrofóbicas y que se encuentran particularmente propensas a la agregación[23]. Las especies de A β acabadas en el aminoácido 40 (**A β 40**), normalmente más abundantes que las de A β 42, se colocalizan con éstas en las placas neuríticas.

2.3.2. Placas difusas, preamiloideas

Muestran una inmuno-reactividad A β relativamente ligera y amorfa, con un patrón granular fino, sin un centro compacto claramente fibrilar.

Se encuentran virtualmente en todas aquellas regiones del cerebro claramente implicadas en la sintomatología típica de la AD (tálamo, caudado, putamen, cerebelo), con muy poca o no detectable distrofia neurítica.

Los estudios inmuno-histoquímicos en pacientes con síndrome de Down[24] sirvieron para confirmar la hipótesis de que las placas difusas representaban lesiones inmaduras precursoras de las placas neuríticas maduras. Tales individuos a menudo presentan depósitos difusos a edades tan tempranas como la adolescencia pero no muestran placas neuríticas-gliales hasta dos décadas después, momento en el que presentan por primera vez abundantes ovillos neuro-fibrilares.

2.3.3. Ovillos neurofibrilares

Los ovillos neurofibrilares consisten en amplias madejas de fibras anormales que ocupan la mayoría del citoplasma perinuclear. La microscopía electrónica revela que la mayoría de estas fibras consiste en pares de filamentos de aproximadamente 10 nm estructurados en hélices (filamentos helicoidales apareados o **PHF**). Los análisis inmuno-histoquímicos y bioquímicos de los ovillos neuro-fibrilares sugirieron que están compuestos de una proteína (**Tau**) asociada al microtúbulo[25]. La proteína Tau es una fosfoproteína cerebral que se une a la tubulina de los microtúbulos promoviendo su ensamblaje y estabilidad. En la AD la proteína Tau desarrolla una excesiva fosforilación irreversible induciendo su agregación en filamentos, perdiendo su capacidad para aglutinar a los microtúbulos[26]. La glicosilación de Tau, probablemente[27] a través de la acetilglucosaminiltransferasa (**OGT**)), lleva a la formación de pares de filamentos estructurados en hélices[28].

Las dos lesiones clásicas de la AD, las placas neuríticas y los ovillos neurofibrilares, pueden ocurrir independientemente uno de otro. Han sido descritos ovillos compuestos de agregados de Tau, que son bioquímicamente similares a aquellos que se presentan en la AD, en más de una docena de enfermedades neurodegenerativas. En casi todos estos casos no se han encontrado depósitos de A β

y placas neuríticas. Por el contrario, los depósitos de A β se pueden ver en cerebros de humanos ancianos sin deterioro cognitivo en total ausencia de ovillos.

También existen algunos casos infrecuentes de AD los cuales son pobres en ovillos, esto es, sólo unos pocos ovillos neurofibrilares se encuentran en el neocortex a pesar de las abundantes placas de A β [29].

2.3.4. Neuritas corticales distróficas

Muchas de las neuritas dilatadas y tortuosas encontradas dentro e inmediatamente rodeando a las placas amiloideas contienen PHF que son estructural, bioquímica e inmunocitoquímicamente indistinguibles de aquellos que comprenden los ovillos neurofibrilares, aunque estas placas a menudo contienen numerosas neuritas distróficas que no son inmunoreactivas para la proteína Tau.

2.3.5. Placas tipo “cotton wool”

Son grandes placas con forma de bola, carentes de núcleo amiloideo denso, que presenta una mayor respuesta inflamatoria. Este tipo de placas se encuentra asociada a angiopatía amiloidea grave y leucoencefalopatía, así como paraparesis espástica[30].

2.3.6. Microangiopatía Amiloidea

La proteína A β fue aislada originalmente a partir de las arteriolas y vénulas meníngicas cargadas de proteína amiloide, de los cerebros de pacientes de AD o síndrome de Down[31;32] . Los péptidos A β , que se presentan como filamentos en las membranas del basamento de los microvasos, aparecen en base a la inmunoreactividad principalmente como especies A β 40, aunque algunas evidencias apuntan a que las especies depositadas inicialmente en los vasos destinados a desarrollar angiopatía amiloidea podrían ser A β 42[33] . La extensión de la angiopatía

amiloidea varía ampliamente en la AD, incluso para un número similar de placas amiloidéas asociadas a la enfermedad.

Los vasos amiloidóticos, compuestos por depósitos de A β , son esencialmente indistinguibles de aquellos que se presentan en la AD. Estos depósitos vasculares pueden aparecer en ausencia de depósitos de A β en el parénquima cerebral de sujetos ancianos con **HCHWA-D** (hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis, Dutch type: CEREBRAL AMYLOID ANGIOPATHY, APP-RELATED, sin AD)[34]. Aunque los depósitos amiloideos en el parénquima pueden observarse en este tipo de pacientes, la degeneración neurofibrilar de neuronas es infrecuente y no se correlaciona con la severidad de la deposición de A β tanto microvascular como del parénquima.

2.4. PROTEÍNA PRECURSORA DE β -AMILOIDE (APP)

En 1997 Robakis et al.[35] aislaron los clones correspondientes al gen de la APP de una genoteca de cDNA en humanos. La proteína de 412 residuos deducida de esta forma contiene una secuencia de 28 aminoácidos que se corresponde con la proteína A β localizada cerca del extremo amino terminal. Esto sugiere que A β sufre escisión postraduccional a partir de su precursor de mayor tamaño lo que se confirmó mediante análisis de RNA en cerebros de individuos normales, pacientes con AD y con síndrome de Down[36].

La APP comprende un grupo heterogéneo de polipéptidos expresados ubicuamente y que migran entre 110 y 140 kDa sobre geles electroforéticos[37]. Esta heterogeneidad se deriva tanto del *splicing* alternativo[38], (dando lugar a 3 formas principales de 695, 751 y 770 residuos) como de una amplia variedad de modificaciones postraduccionales[39], incluyendo los azúcares unidos a los extremos N- y C- terminales, sulfonación y fosforilación. Las formas escindidas de la APP que contienen 751 o 770 amino ácidos se encuentran ampliamente expresadas en las células no neuronales y neuronas[38] . Sin embargo son las neuronas las que expresan mayores niveles de isoforma de residuo 695. La diferencia entre las formas residuales 751/770 y la 695 consiste en la presencia de un exón que codifica por una secuencia de 56 amino ácidos, en los dos primeros, que es homóloga de inhibidores de serín proteasas tipo Kunitz (**KPI**)[40;41] , lo que indica una función potencial de estas isoformas de APP de mayor tamaño. De hecho, las formas de APP que contienen KPI (751/770) encontradas en las plaquetas humanas funcionan como inhibidores del factor XIa, el cual es una serín proteasa en la cascada de la coagulación[42] . La APP se encuentra muy conservada en la evolución y se expresa en todos los mamíferos en los que se ha buscado. APP es miembro de una gran familia de genes, la familia de las proteínas parecidas a la precursora de amiloide (**APLPs**)[43;44], que presenta una homología sustancial, tanto dentro del gran ectodominio y particularmente dentro de la cola citoplasmática, pero que presenta una gran divergencia en la región A β .

2.4.1. Función. Procesamiento postraducciona

La APP es un polipéptido transmembrana sencillo que se traduce e inserta dentro del retículo endoplasmático vía su péptido señal y después postraduccionalmente se modifica a través de una vía secretoria. La incorporación de azúcares unidos al extremo N- y C- terminal ocurre rápidamente después de la biosíntesis. Su vida media es relativamente breve, de 45 a 60 minutos en la mayoría de las estirpes celulares examinadas[45].

La APP sufre procesamiento proteolítico postraducciona mediante las secretasas α -, β - y γ -. La α secretasa genera una proteína amiloide soluble, mientras que la β secretasa genera derivados de APP con características amiloidogénicas. Estas dos vías de procesamiento de la APP son mutuamente excluyentes[46].

La primera escisión proteolítica constitutiva identificada, producida mediante una actividad designada como α -secretasa, se produce en el aminoácido 12 del extremo N- terminal sobre el dominio transmembrana sencillo de la APP[47;48] y se identifica con la Catepsina B[49]. Este procesamiento resulta en la liberación de grandes fragmentos de ectodominio soluble (α -APPs) dentro del lumen o el espacio extracelular y la retención del residuo-83 fragmento carboxi terminal (CTF) en la membrana. Alternativamente, algunas moléculas de APP que no están sujetas a la escisión proteolítica α -secretasa pueden ser escindidas mediante una actividad β -secretasa identificada y caracterizada como **BACE1**[50;51]. BACE1 principalmente corta 16 residuos del fragmento N-terminal hacia el sitio de escisión α , generando un derivado ectodominio ligeramente inferior (β -APPs)[52] y retiene un residuo-99 CTF (C99) en la membrana que comienza en el residuo 1 de la región β .

Una porción sustancial de la α -APPs está generada mediante la α -secretasa actuando sobre la APP insertada en la membrana plasmática[53]. Con respecto a la escisión β -secretasa parece ocurrir más tarde a nivel de membrana axonal[54], en la secuencia del procesamiento secretorio de la APP, respecto a la α -secretasa[55]. El sitio de escisión γ -secretasa se sitúa centrado dentro del dominio transmembrana[56] y se realiza en parte durante la internalización y el procesamiento endosomal de la APP[57].

Existen datos conflictivos acerca de si la mayoría de la A β se genera tempranamente en el tráfico secretorio de la APP (esto es, en el retículo endoplasmático, compartimento intermedio, Golgi temprano) o principalmente después de que APP alcance la superficie celular. Los experimentos de electroforesis de campo pulsante han demostrado que la mayoría de los fragmentos C88 y C99 (sustratos inmediatos de la γ secretasa) son generados de las moléculas que han sufrido glicosilación ligada al extremo N- y C- terminal completa, esto es, dentro o posterior a su paso por el aparato de Golgi[45].

En las neuronas, la APP695 puede ser transportada anterogradamente por el rápido componente del transporte axonal[58]. La APP está presente, aunque no específicamente, en las vesículas de las terminales axonales y en las vesículas sinápticas. Las terminales axonales de la APP podrían ser el principal lugar para la generación de A β . La APP que se recicla en el endosoma y puede sufrir escisión secuencial β - y γ -secretasa en varios sitios neuronales subsidiarios para liberar el péptido A β . Aunque la APP se expresa con particular abundancia en las neuronas, otras células cerebrales también pueden expresar y liberar cantidades variables de A β , incluyendo los astrocitos, la microglia y las células endoteliales y del músculo liso y todo ello puede contribuir al *pool* de secreción de la A β que eventualmente daría lugar a deposición extracelular. A β puede atravesar la barrera hematoencefálica en pequeñas cantidades utilizando un mecanismo compatible con una endocitosis mediada por receptores[59].

Algunos investigadores han supuesto que la APP podría jugar un papel importante en el crecimiento celular y la respuesta metabólica a suero y a factores de crecimiento, bajo ciertas condiciones fisiológicas y patológicas[60]. La delección del gen de la APP en ratones no resulta en una apreciable morbi-mortalidad; en la gliosis cerebral y los cambios en el comportamiento locomotor (que se manifiestan más tarde en la vida adulta[61] y en las neuronas cultivadas a partir del nacimiento) se observa una disminución de la viabilidad y retardado el desarrollo axonal[62]. Esta falta de consecuencias vitales de la delección de la APP podría tener su origen en el hecho de que los mamíferos expresan también proteínas íntimamente

homólogas[43]. Una forma secretada de APP, como se comentó anteriormente, podría actuar como inhibidor plaquetario del factor de coagulación, XI, actuando como un anticoagulante cerebral[63]. Se la ha relacionado con mecanismos de reducción del cobre[64] y se le ha atribuido una función inhibitoria in vitro de la actividad hemo oxigenasa, de un 25 a un 35%, mediante su unión a HMOX1 y HMOX2 en el retículo endoplasmático (RE)[65]. Se ha postulado que la acumulación (relacionada con un cambio en el marco de lectura, y el aumento en un aminoácido hacia el extremo C-terminal) de proteínas como APP y la ubiquitina-B contribuye a la aparición de varias formas de demencia[66].

2.4.2. Mutaciones *missense* en la APP: una causa muy rara de AD familiar

La primera mutación específica que causaba AD identificada fue la prevalencia de las mutaciones *missense* en la APP[67]. A pesar de la extensa vigilancia genética se han confirmado en muy pocas familias a lo largo del planeta. Las mutaciones se encuentran situadas estratégicamente cerca de sus puntos de escisión. Las familias portadoras de mutaciones APP *missense* que causan AD generalmente tienen la edad de comienzo antes de los 65 años, generalmente a los cincuenta.

Existe otra vía por la cual las alteraciones del gen de la APP pueden predisponer al desarrollo de la AD. La sobreexpresión de una APP estructuralmente normal debida a una elevada dotación genética en la trisomía del 21 (síndrome de Down) casi invariablemente da lugar a la aparición prematura de neuropatología de AD clásica (placas neuríticas y ovillos neurofibrilares) durante la segunda mitad de la edad adulta. Un incremento a lo largo de la vida en la expresión de la APP debida a la duplicación de la totalidad del cromosoma 21 o, en el caso de la translocación en el síndrome de Down, cuya porción 21q contiene el gen de la APP resultando en la sobreproducción de péptidos A β 40 y A β 42 desde el momento del nacimiento. Se supone que este hecho es el responsable de la aparición de muchas de las placas difusas compuestas de A β 42, que pueden aparecer a la temprana edad de 12 años[24]. Los sujetos con síndrome de Down a menudo presentan placas difusas compuestas solamente de A β 42. A veces sobre estas placas ocurre una acumulación

de péptidos A β 40 asociada a microgliosis, astrocitosis y distrofia neurítica envolvente, que comienza a finales de los veinte y los treinta años[68].

2.4.3. Mutaciones de la APP: causan un aumento de A β

Las mutaciones de la APP parecen actuar mediante un mecanismo citotóxico de incremento de la producción del fragmento A β 42, el cual tendría la virtud de formar placa aún en ausencia de A β 40[69]. En general todas las mutaciones *missense* de la APP, tanto en el sitio de escisión β -secretasa como γ -secretasa, aumentan la cantidad de A β total (como en el caso de la doble mutación en el sitio de escisión β -secretasa, K670N/M671L, mutación sueca[70]) o específicamente la A β 42 (para todas las mutaciones en el sitio de escisión γ -secretasa de la APP). También puede resultar en un aumento en la cantidad total de A β como resultado de un efecto dosis dependiente del gen de la APP (como se observa en los pacientes con síndrome de Down o en las duplicaciones del gen de la APP que causan AD[71;72]). Más aún, en los polimorfismos del promotor de la APP ligados a la AD también se ha visto un aumento en la expresión de la APP[73;74].

No siempre se produce un aumento de A β . Se ha demostrado que algunas mutaciones de la APP, como la mutación austriaca T714I[75] y la mutación francesa V715M[76], también producen una disminución de la producción de A β 40.

Se sabe que las mutaciones en el sitio α -secretasa de la APP alteran la secuencia primaria de la A β y por consiguiente las propiedades fibrilogénicas de la A β [77], sin embargo la mayoría de estas mutaciones presenta un fenotipo adicional de amiloidosis que se diferencia claramente de la AD en la cual predominan las placas de A β . Estas presentan resistencia a la digestión proteolítica y se depositan alrededor de los vasos sanguíneos dañando las paredes de los vasos dando lugar a angiopatía amiloidea[78-80].

2.5. LAS PRESENILINAS

El descubrimiento de las mutaciones genéticas en el gen de la APP que causan AD de comienzo temprano (**EOAD**) sugería fuertemente que la A β era una pieza patológica clave: estas mutaciones se encontraban dentro de la región que codificaba por la A β o inmediatamente adyacente a las zonas de escisión β - y γ -secretasas[81]. Así mismo, cerca del extremo N-terminal de la región A β de la APP incrementan la extensión de la escisión por la β -secretasa, resultando en un aumento de los niveles de A β [82]. Aquellas cerca del sitio de escisión γ -secretasa, sin embargo, tiene unos efectos bastante más sutiles, cambiando las proporciones de las formas con 40- hacia 42- residuos de A β [83].

Otra clave principal de la patogénesis de la AD provino del descubrimiento de dos genes relacionados, Presenilina-1 (**PS-1**) en el brazo largo del cromosoma 14[84-86] y Presenilina-2 (**PS-2**) en el cromosoma 1[87], también asociados con la EOAD[87-89]. Las dos proteínas presentan una elevada homología (67% de identidad a nivel de amino ácidos) así como elevadas similitudes en la estructura intrón-exón (figuras 1. y 2.). La evidencia de la especificidad de función de ambas Presenilinas deriva de la presencia de regiones no homólogas en estas moléculas: la región hidrofílica terminal y el gran bucle citoplasmático (**HL-6**) entre los dominios transmembrana seis y siete del modelo transmembrana. Estas dos regiones se encuentran localizadas en el mismo lado de la membrana y son divergentes, pero el bucle HL-6 de PS-2 es más pequeño que el correspondiente en PS-1[90].

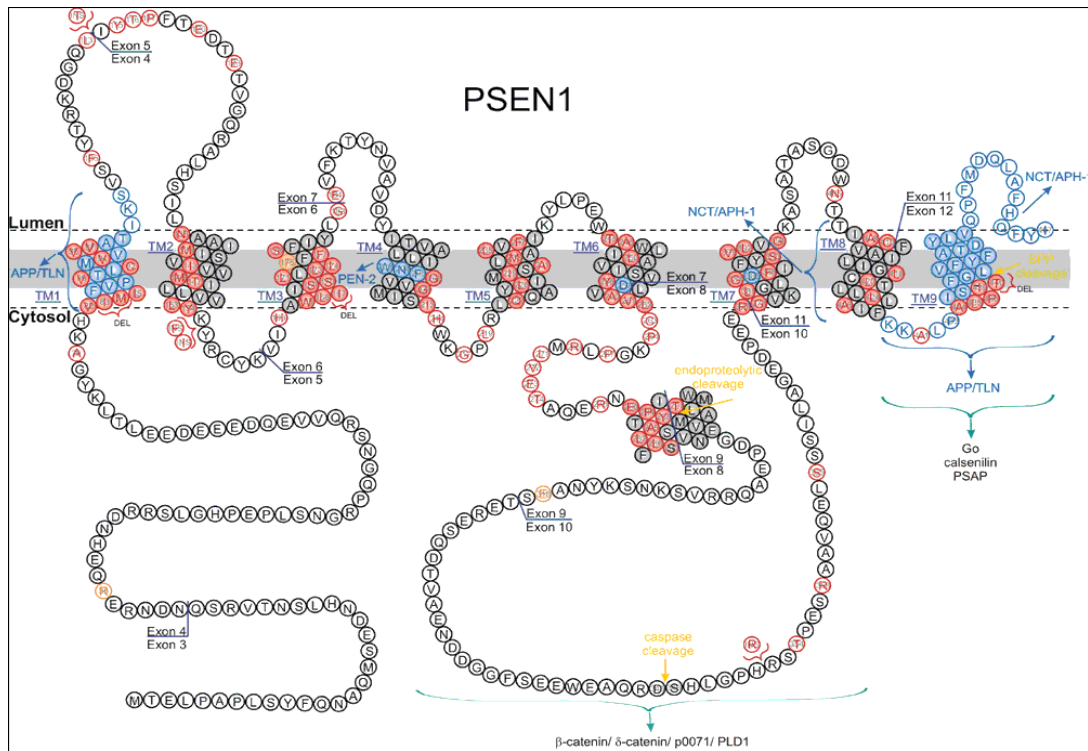


Figura 1. Representación de los aminoácidos integrantes de la topología de los 9 dominios transmembrana de PS-1, incluyendo los límites de los exones y algunas de las mutaciones documentadas asociadas a AD, version de K. Dillen y W. Annaert[91].

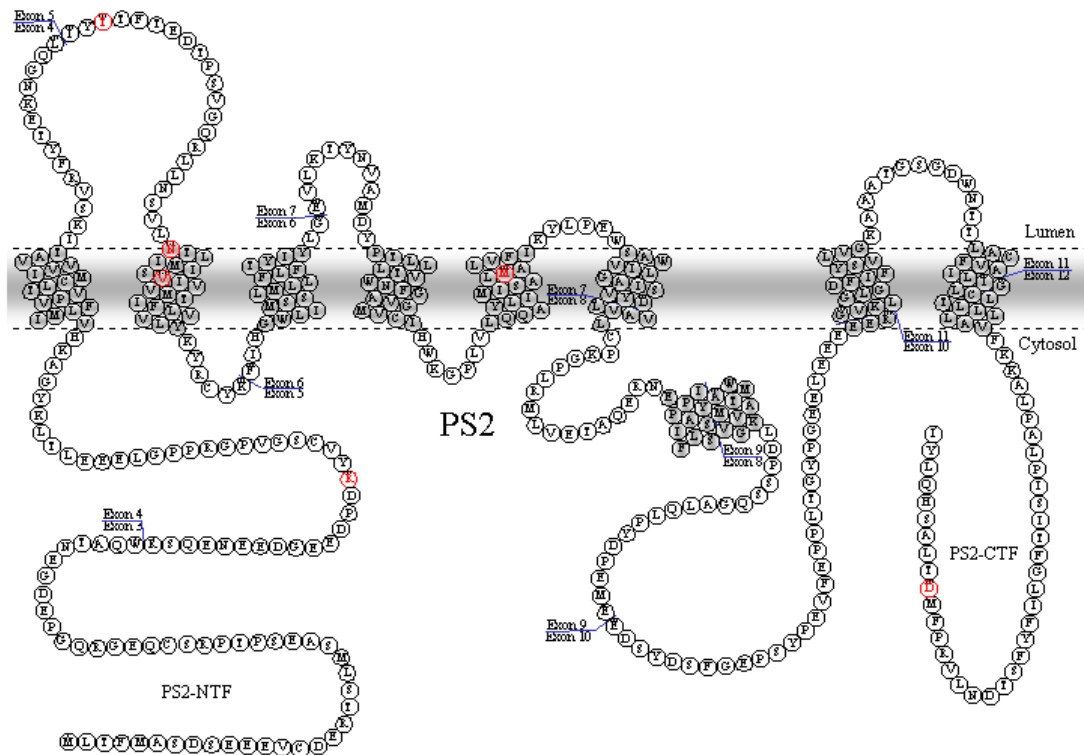


Figura 2. Representación gráfica de la PS-2, algunas de las mutaciones documentadas asociadas a AD y las nueve estructuras correctas de los correspondientes dominios transmembrana[92].

2.5.1. Una aspartil proteasa embebida en la membrana

Los experimentos de topología de membrana sobre la Presenilina dieron lugar a algunos resultados conflictivos, que sugerían seis, siete, e incluso ocho dominios transmembrana y con el extremo C-terminal pudiendo ser tanto luminal/extracelular como citosólico[93].

Sin embargo, la mayor parte de los estudios favorecía la existencia de ocho dominios transmembrana, incluyendo el término N-terminal, gran bucle citoplasmático y el extremo C-terminal, todos ellos ubicados en la parte citosólica[94;95]. Más recientemente, esta topología ha sido actualizada y refinada,

con nueve dominios transmembrana[96;97] y el extremo C-terminal en la parte luminal/extracelular pero plegada hacia el interior de la proteína o de sus partes.

Una clave bioquímica acerca de la función de las Presenilinas provino de la observación de que la proteína se endoproteolizaba en dos partes, un fragmento N-terminal (**NTF**) y uno C-terminal (**CTF**) que permanecen asociados, tienen una larga vida biológica juntos y están fuertemente regulados por factores celulares[98]. Estos hallazgos sugirieron que los dímeros NTF-CTF son la forma madura, cualesquiera que sea su función.

Mientras tanto, el diseño de inhibidores peptidomiméticos (figura 3.), basados en el sustrato para la γ -secretasa, sugirió que la enzima era una aspartil proteasa. Una parte que mimetiza el estado de transición podría bloquear el procesamiento de la APP a nivel de la γ -secretasa en la célula[99;100]. Dada la evidencia de que la γ -secretasa es una aspartil proteasa y que la Presenilina es crítica para la actividad γ -secretasa, se buscó en la Presenilina la presencia de dos aspartatos que podrían formar parte de la nueva proteasa. Se identificaron dos aspartatos transmembrana completamente conservados, uno en el dominio NTF y otro en el CTF y se encontró que eran esenciales e independientes tanto para la endoproteólisis como para la escisión proteolítica de la APP[101;102]. Este descubrimiento sugirió que la Presenilina era de hecho una nueva aspartil proteasa y una enzima activada por autoproteólisis. Después de la maduración a NTF y CTF, el sitio activo de la γ -secretasa se propuso que se encontraría entre las dos subunidades, cada una de las cuales contribuiría con uno de los aspartatos al sitio catalítico. La hipótesis fue respaldada mediante el uso de reactivos de afinidad diseñados a partir de análogos de estado de transición inhibidores de la γ -secretasa, los cuales se unen directamente a los fragmentos NTF y CTF[103;104]. Los reactivos marcados, dirigidos contra el sitio activo de la γ -secretasa, marcan a su vez la Presenilina heterodimérica, identificando esta interfaz como el sitio catalítico de la proteasa.

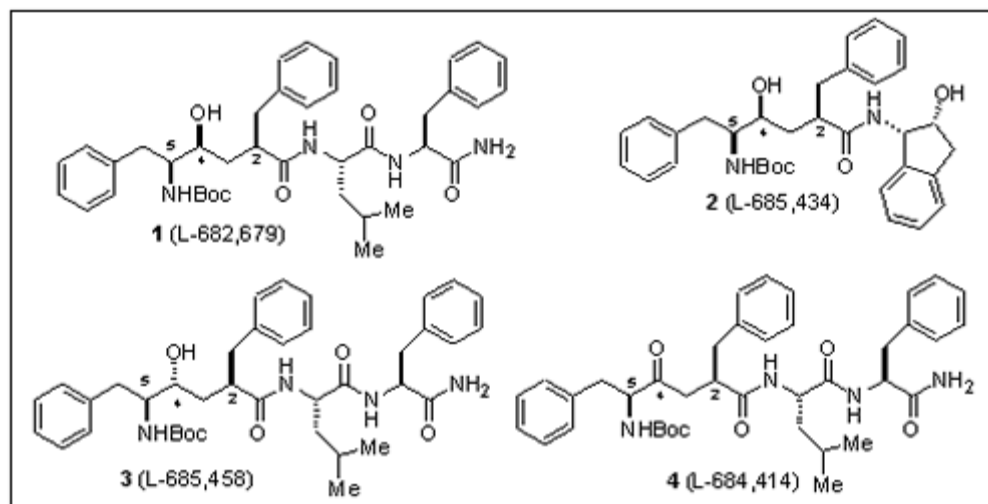


Figura 3. Inhibidores peptidomiméticos de la Presenilina.

La Presenilina por sí sola, claramente no constituía el conjunto de la γ -secretasa. Consistente con la necesidad de factores celulares limitantes para acotar la endoproteólisis de la Presenilina, se descubrió que la proteína y sus fragmentos se incluían en complejos de peso molecular mayor [105;106]. Más aún, la Presenilina por sí sola no se puede escindir a sí misma y una Presenilina mutante que no requiere endoproteólisis para sostener la actividad γ -secretasa en las células no muestra actividad proteolítica por sí misma (es decir, son necesarios factores celulares limitantes).

El apoyo fundamental para el papel proteasa de la Presenilina vino del descubrimiento de la peptidasa del péptido señal (**SPP**). Esta enzima, que escinde péptidos señal remanentes en la membrana después de su liberación mediante la peptidasa señal, fue descubierta utilizando marcado de afinidad mediante inhibidores análogos de estado de transición. La proteína responsable era claramente similar a la Presenilina, incluyendo dos fragmentos transmembrana conservados, cada uno de los cuales conteniendo un aspartato [107]. A diferencia de la Presenilina, SPP sí sufre aparentemente actividad proteolítica sobre sí misma, sin necesidad de factores celulares limitantes o endoproteólisis. Así, si

una proteína del estilo de la SPP es una proteasa, la Presenilina sería probablemente la componente catalítica proteásica de la γ -secretasa.

Además de su papel como γ -secretasa, se ha demostrado que la Presenilina posee otras funciones, independientes de la actividad γ -secretasa[108;109]. Los efectos patogénicos de las mutaciones missense inherentes a la AD se asocian a una función proteolítica de la Presenilina alterada. Las mutaciones de la Presenilina asociadas a la enfermedad tienden a inhibir la función proteolítica global[110], produciendo incluso menor cantidad de $A\beta$ en algunos casos, mientras incrementan la relación del residuo $A\beta_{42}$ frente al $A\beta_{40}$ [111]. Este aumento de la proporción de la fracción $A\beta_{42}$, más dispuesta para la agregación, se cree desencadenante del proceso patológico.

La γ -secretasa escinde más allá del dominio transmembrana, en el denominado sitio ϵ [112], para liberar el dominio intracelular de la APP (AICD). Se ha visto que las mutaciones de la Presenilina asociadas a la AD modulan también la posición de corte de esta escisión ϵ . De forma sorprendente, la proteólisis de las posiciones γ y ϵ está afectada por las mutaciones en la APP y las Presenilinas que causan AD, lo que da lugar a un aumento en el cociente $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ junto con un incremento en un residuo de la AICD (51 residuos) respecto al producto de 50 residuos aminoácidos[113]. Estas dos posibilidades proteolíticas parecen, por consiguiente, ser interdependientes: un cambio en el sitio de escisión de uno de ellos se correlaciona con un cambio en el sitio de escisión del otro. Debe mencionarse la existencia de un estudio donde se refiere que mutaciones artificiales en Lys166 de la PS-1 aumentan la producción de $A\beta_{42}$ sin afectar los niveles de AICD[114] y otro expone que la inhibición de la endocitosis altera la formación de AICD sin cambios concomitantes en el cociente $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ [115].

Una brillante teoría de Ihara[116] y colaboradores propone que la escisión ϵ podría ocurrir incluso antes de la escisión en el sitio γ .

Desde el punto de escisión ϵ progresivamente, cada tres aminoácidos, se producirían escisiones ζ hasta llegar al sitio de escisión γ (figuras 4. y 5.).

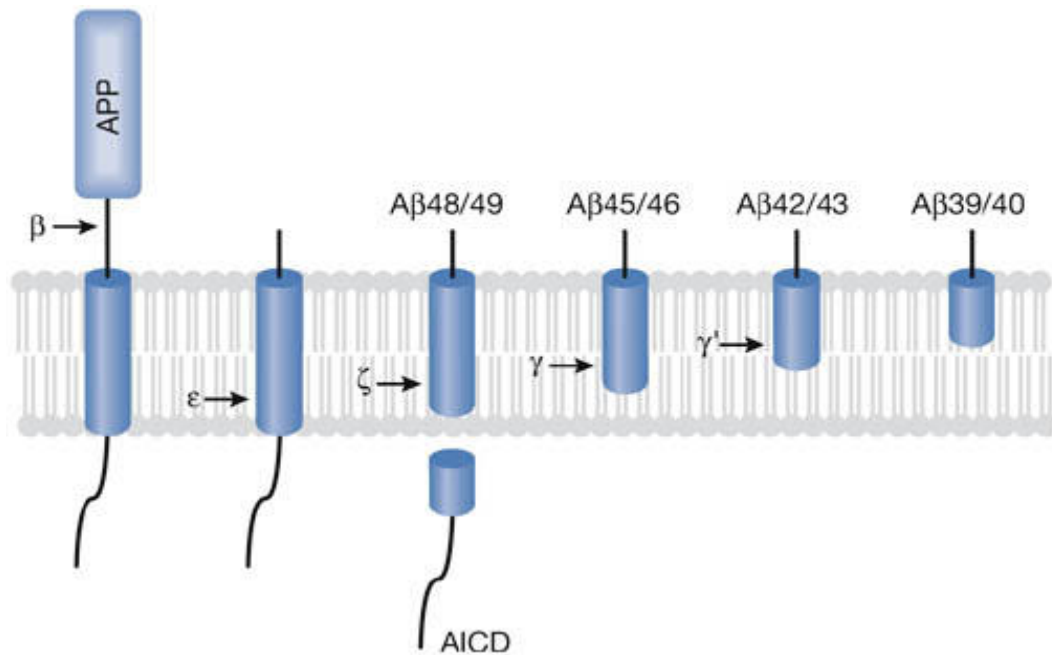


Figura 4. Modelo de Ihara de proteólisis progresiva del dominio transmembrana de la APP mediante la γ -secretasa, comenzando en el sitio de escisión ϵ y escindiendo cada tres residuos. Este modelo explica como la reducción de la función proteolítica debida a las mutaciones de la presenilina harían descender los niveles de producción de A β pero aumentarían la ratio A β 42 frente a A β 40 y las formas más largas de péptido A β . Las mutaciones de la presenilina causantes de AD cambian el sitio de escisión inicial ϵ para producir mayor cantidad de A β 48, que podría dar lugar a A β 42[117].

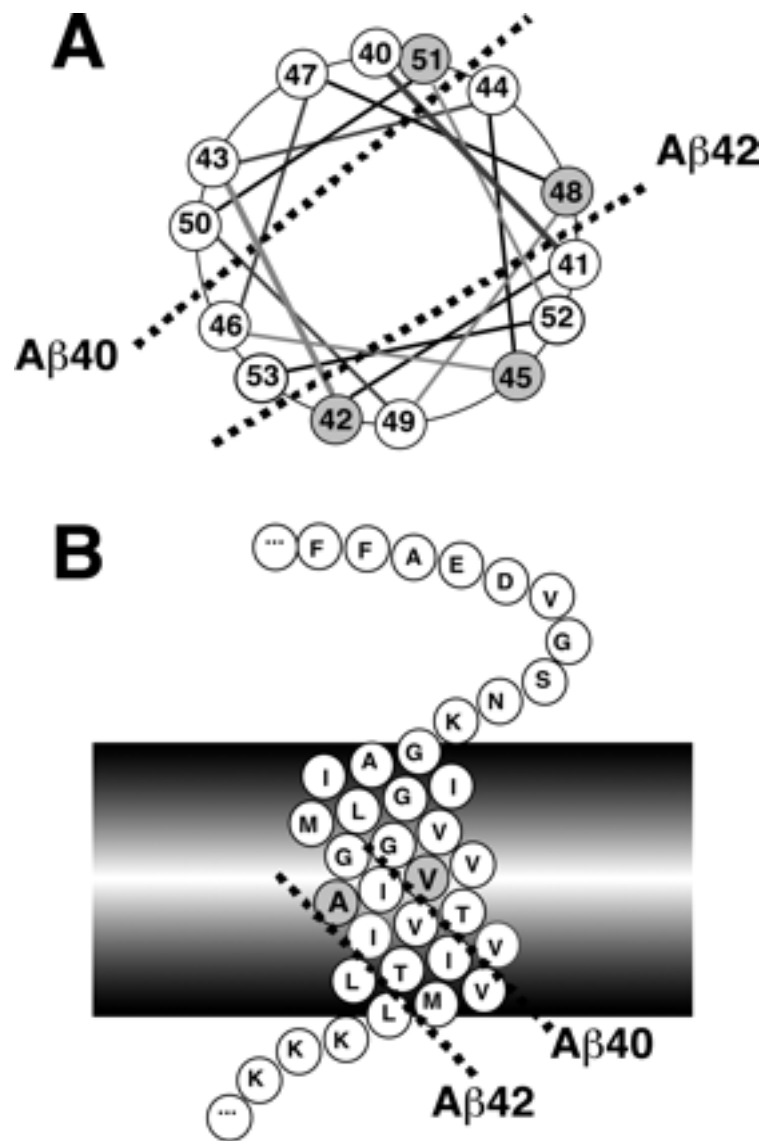


Figura 5. El modelo helicoidal de Ihara muestra el procesamiento de fragmentos largos Aβ hasta llegar a los fragmentos Aβ40 y 42[116].

Parece probable, al margen de cuales sean los mecanismos de formación de AICD, que los cambios en extremo N-terminal de los dominios intracelulares liberados de la APP, especialmente los implicados en la señalización intracelular, podrían contribuir en los procesos de la enfermedad.

2.5.2. Colaboradores de las Presenilinas

Con las Presenilinas identificadas como las componentes catalíticas, la investigación para identificar otros miembros de lo que se podría llegar a conocer como complejo γ -secretasa había dado comienzo.

La primera en ser descubierta fue la nicastrina, una proteína que interactuaba con la Presenilina que se encontró por coaislamiento bajo purificación de inmunoafinidad[106]. La nicastrina es una proteína integral de membrana tipo I de 120 a 140 kDa que se encuentra altamente glicosilada, siendo la casi totalidad de la proteína luminal/extracelular. Los experimentos de RNAi *knockdown* demostraron que la nicastrina era esencial para la escisión γ -secretasa. Utilizando un inhibidor análogo de estado de transición inmovilizado, la copurificación de la nicastrina sugería que la nicastrina era de hecho un miembro fidedigno del complejo γ -secretasa[118]. La nicastrina se encuentra primariamente como dos bandas en los geles electroforéticos SDS-PAGE, estando la banda superior compuesta por la forma altamente glicosilada que se asocia especialmente a las subunidades NTF y CTF de la Presenilina y a la γ -secretasa activa[119;120]. Como ocurría con la Presenilina, los *knockout* de nicastrina de diferentes especies resultaron en fenotipos letales, parecidos a aquellos que presentaban deficiencias en Notch[121].

Sin embargo, la sobreexpresión de la Presenilina y la nicastrina no resulta en un incremento de la endoproteólisis de la Presenilina o de la actividad γ -secretasa, lo que implicaría que existirían otras proteínas asociadas que aún no habían sido descubiertas. Los estudios genéticos en *Caenorbitis elegans* para identificar nuevos modificadores Notch revelaron dos nuevos genes, Aph-1 y Pen-2, las cuales codifican proteínas de siete y dos dominios transmembrana predichos, respectivamente[122]. Los experimentos RNAi *knockout* de estos genes, como con la nicastrina y Presenilina, bloquean la escisión γ -secretasa de la APP y de Notch. Los estudios de seguimiento demostraron que la sobreexpresión de las cuatro proteínas a la vez (Presenilina, nicastrina, Aph-1, Pen-2) resultó en el incremento de los niveles de NTF y CTF, nicastrina madura y actividad γ -secretasa[123]. Un estudio incluso demostró esto mismo en *S. cerevisiae*[124], el genoma del cual no

codifica por ninguna de estas cuatro proteínas. La expresión de todas las proteínas (Presenilina, nicastrina, Aph-1, Pen-2) era necesaria para estos efectos. Además, la coimmunoprecipitación de cualquiera de las cinco proteínas (considerando NTF y CTF separadamente) disminuía el resto, indicando que interactúan con cada uno de los otros. La purificación parcial de la γ -secretasa a través de varios pasos resultó en el aislamiento de las cinco proteínas[123]. Otros grupos citan esta misma purificación hasta llegar a la homogeneidad de la proteína[125], aportando una prueba definitiva de que estas proteínas forman un complejo sencillo y que son componentes esenciales de la γ -secretasa.

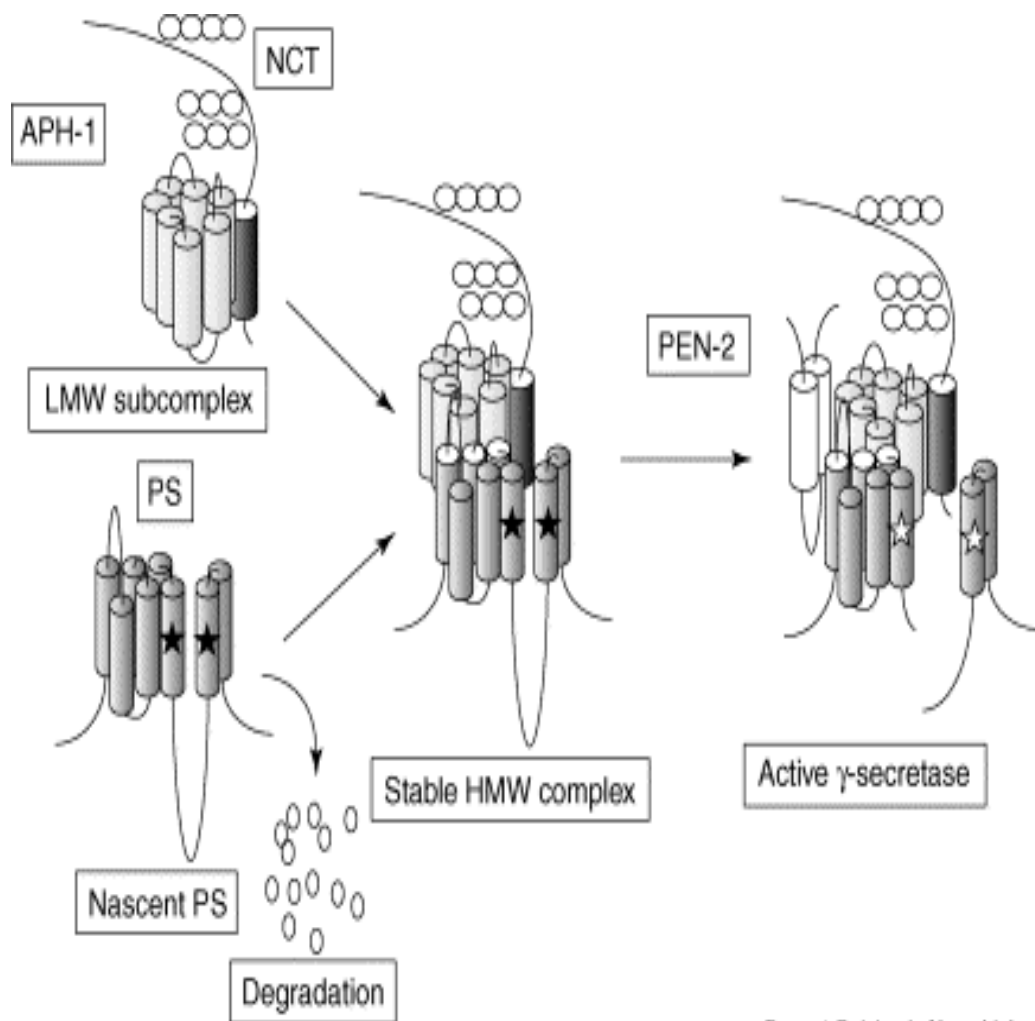
A pesar de la total identificación, purificación y determinación de la estructura de baja resolución, la estequiometría del complejo proteasa permanece sin resolver; mientras que el core catalítico del complejo activo proteasa contiene una molécula de Presenilina por complejo[126].

Otra complicación es que aparentemente existen seis variantes del complejo γ -secretasa, debido a las diferentes combinaciones de las dos Presenilinas y las tres Aph-1 diferentes. Existen diferencias bioquímicas entre estos complejos, de hecho, los complejos que están constituidos por PS-2 muestran menor actividad proteolítica que los que contienen PS-1[127].

El ensamblado del complejo γ -secretasa comienza en el retículo citoplasmático, justo después del traslado e inserción en la membrana; la nicastrina y Aph-1 se ensamblan en un subcomplejo, con la nicastrina todavía inmadura y sin glicosilar[128]. La Presenilina y Pen-2 se unen al complejo con posterioridad. Antes de unirse al subcomplejo nicastrina-Aph-1, los *knockdown* de Pen-2 todavía dan lugar al subcomplejo nicastrina-Aph-1 en la cual la Presenilina permanece como holoproteína[129]. La adición de Pen-2 da lugar a la formación de los fragmentos NTF-CTF, la maduración de la nicastrina y la activación de la γ -secretasa.

El dominio transmembrana (TM) de la nicastrina se requiere para el ensamblado del complejo. La sustitución entre diferentes dominios transmembrana impide la incorporación de nicastrina, siendo su región N-terminal especialmente importante[130]. La función del gran ectodominio citoplasmático parece jugar un

papel esencial en el reconocimiento del sustrato[131]. El papel bioquímico específico de la pequeña proteína en forma de horquilla Pen-2 es desconocido, pero la Aph-1 de siete dominios transmembrana parece ser una proteína de andamiaje sobre el que se sostiene el resto del complejo[132]. Las topologías del posible ensamblado y activación de estas moléculas se muestran en la figura 6.



Current Opinion in Neurobiology

Figura 6. Representación gráfica del acoplamiento y activación secuencial del complejo γ -secretasa. La holoproteína nascente se degrada rápidamente mientras que una fracción de la presenilina se estabiliza a la forma de complejo HMW mediante el acoplamiento del subcomplejo formado por APH-1 y NCT. PEN-2 brinda el último paso de la maduración de complejo γ -secretasa, facilitando la endoproteólisis de la presenilina y confiriéndole la actividad γ -secretasa. Los tubos representan los dominios transmembrana probables (TMD) de cada proteína y las estrellas dentro de los dominios 6° y 7° de la presenilina simbolizan residuos apartato activos (vacío) e inactivo (negro) relacionados con las actividades γ -secretasa[133].

La evidencia científica sugiere específicamente que el extremo C-terminal de la Presenilina podría interactuar con el dominio transmembrana de la nicastrina penetrando dentro de la membrana[134]. La delección del aminoácido del extremo carboxílico de la PS-1 bloqueaba completamente el ensamblado γ -secretasa liberando PS-1 del RE, lo que sugiere que la PS-1 que no se incorpora al complejo es retenida activamente por el RE. Aparte del sitio de unión a nicastrina, se identificó un alargamiento hidrofóbico de aminoácidos en el extremo C-terminal, capaz de retener a PS-1. La delección de esta secuencia de retención daba lugar a la liberación de la PS-1 del retículo y, al mismo tiempo, a la formación de un complejo γ -secretasa no funcional, sugiriendo que al menos en parte el fragmento de retención se requería para la funcionalidad.

Se demostró que PS-1 se unía a la fosfolipasa D1 (**PLD1**) via la región del gran bucle citoplasmático y la capturaba para la red Golgi/trans-Golgi (**TGN**). La sobreexpresión de PLD1 en células de neuroblastoma de ratón (**N2a**) hacía descender la generación de A β mediada por la γ -secretasa, mientras que la regulación negativa de la expresión de PLD1 aumentaba la producción de A β [135]. La asociación de PLD1 producía la ruptura del complejo γ -secretasa, independientemente de la actividad catalítica de PLD1. La sobreexpresión de PLD1 catalíticamente activa promovía la generación de vesículas conteniendo A β a partir de la TGN[136]. Aunque en la actividad enzimática PLD1 en las células N2a (con mutaciones FAD en PS-1) estaba disminuida, la sobreexpresión del tipo silvestre (catalíticamente activo) en estas células hizo aumentar la liberación a nivel de superficie celular de A β en las terminaciones axonales y rescató el crecimiento axonal y la ramificación neurítica. Estos hallazgos mostraban que la PLD1 regula el tráfico intracelular de A β , a través de un proceso que difiere de su efecto sobre la actividad γ -secretasa.

2.5.3. Reconocimiento de sustrato

Debido a su presumible contenido en agua y a que utiliza residuos hidrofílicos, el sitio activo embebido en la membrana podría estar apartado del ambiente hidrofóbico que conforman las colas lipídicas del entorno. El sitio activo podía

imaginarse como parte de un poro o canal que podría permitir la entrada de agua. El sustrato pasa a través de la membrana y no puede entrar a través de tal poro directamente; se requeriría una apertura lateral anclada en la superficie externa de la proteasa para llevar al sustrato dentro del sitio activo[102]. La evidencia inicial de tal mecanismo se produjo a través del aislamiento del complejo γ -secretasa utilizando inhibidores análogos de estado de transición inmovilizados[118]. Se hizo posible copurificar un sustrato endógeno junto al complejo γ -secretasa, mientras que por otra parte se bloqueaba el sitio activo de la proteasa mediante inhibidores análogos de estado de transición inmovilizados, lo que sugería la existencia de un sitio de unión a sustrato separado del sitio activo. El sustrato se une a este tipo especial de sitio externo, denominado sitio de anclaje, el cual podía ser purificado sin estar sujeto a proteolisis.

Los péptidos diseñados basados en el dominio transmembrana de la APP limitados a la conformación helicoidal inhiben potentemente la γ -secretasa, aparentemente a través de su interacción con este sitio de anclaje[137]. La conversión de estos péptidos helicoidales inhibidores a reactivos marcadores de afinidad dio lugar a la localización del sitio de anclaje del sustrato en límite NTF-CTF de la Presenilina[138]. Los inhibidores análogos del estado de transición también se unen directamente a la interfaz NTF-CTF, pero en un sitio diferente de estos inhibidores peptídicos helicoidales. Estos hallazgos sugieren una vía de transporte para los sustratos de la γ -secretasa desde el sitio de anclaje al sitio activo: una vez unida a la superficie exterior de la Presenilina en el límite NTF-CTF, el sustrato puede pasar, tanto en parte o como un todo, a través de estas dos subunidades de la Presenilina hasta acceder al sitio activo interno. La extensión en sólo tres residuos de un inhibidor peptídico helicoidal de 10 residuos resulta en un potente inhibidor[139] aparentemente capaz de unirse tanto al sitio de anclaje como al sitio activo[138], lo que sugiere que estos dos sitios de unión de sustrato se encuentran relativamente cercanos el uno del otro.

La expresión de PS-1 en células de insectos que también expresaban el fragmento C-terminal de la APP humana (C99) aumentaba la producción de A β y

concomitantemente los niveles intracelulares de C99[140]. Utilizando experimentos de electroforesis en campo pulsante, se demostró que la acumulación de C99 resultó ser consecuencia de un aumento en la vida media de C99. La inhibición de la actividad γ -secretasa no altera la habilidad de la PS-1 para aumentar los niveles intracelulares de C99, lo que sugiere que la unión PS-1 a C99 no da lugar necesariamente a su procesamiento inmediato. PS-1 debería contener un sitio de anclaje y el procesamiento de C99 estaría regulado espacio-temporalmente.

Hasta hace poco, toda la acción parecía recaer en la Presenilina. Sin embargo, un estudio citado subraya que la nicastrina también juega un papel crítico en el reconocimiento de sustrato[131].

2.5.4. Papel en la producción de A β

Algunos trabajos en ratones transgénicos probaron que la sobreexpresión de la PS-1 mutante mostraba un aumento selectivo de A β 42 en cerebro[141]. Estos resultados indicaban que las mutaciones de la Presenilina probablemente causarían AD a través de una ganancia nociva de función que aumenta la cantidad de A β depositada en cerebro. Otros, sin embargo, encontraron[142] que no existía diferencia entre la deposición de amiloide entre la especie silvestre de ratón y aquellos transgénicos sólo con pérdida de un alelo funcional PS-1. Se hizo evidente, que los ratones portadores de la mutación A246E mostraban niveles aumentados de A β 42[143], lo que apoyaba también la hipótesis de ganancia de función.

Aparecieron algunas líneas de evidencia que apoyaban poderosamente la conclusión de que la deposición cerebral progresiva de la proteína A β era el suceso desencadenante en la patogénesis de la FAD[144]. Se comprobó la hipótesis de que las mutaciones FAD promovían la deposición de proteína A β particularmente la forma amiloidogénica de 42 residuos[23]. Las líneas celulares transfectadas por PS-1 y PS-2 mutantes resultaban sufrir un incremento altamente significativo de A β 42. La mutación del Volga en PS-2 (N141I[89;145]) daba lugar a un aumento de 6 a 8 veces en la producción total de A β 42; ninguna de las mutaciones de PS-1 daba lugar a un

aumento tan espectacular, lo que sugería una diferencia intrínseca en los efectos de las mutaciones de PS-1 y PS-2. Los ratones transgénicos portadores de mutaciones en el gen de la PS-1 sobreproducían A β 42 en el cerebro, haciéndose detectable desde segundo al cuarto mes de vida. Los datos combinados in vitro e in vivo claramente demostraban que las mutaciones ligadas a FAD alteraban directa o indirectamente los niveles de γ -secretasa, pero no los de las α o β secretasas, resultando en un aumento de la producción de A β 42 lo que derivaría en amiloidosis cerebral y AD[144].

Los medios acondicionados a partir de fibroblastos o plasma de miembros afectados de mutaciones ligadas a PS-1/PS-2 mostraban un aumento significativo de la relación A β 42/A β 40 respecto a individuos no afectados de dichas familias[146]. Este cociente crecía uniformemente en medios acondicionados de línea de células N2a (neuroblastoma estable de ratón), transfectadas con 3 variantes de PS-1 asociadas a FAD, respecto a las células que expresan niveles de PS-1 similares a los del tipo silvestre[147]. De modo similar, el cociente se encontraba elevado en cerebros de ratones transgénicos jóvenes y que o expresaban APP quimera o bien coexpresaban una variante de PS-1 asociada a FAD comparado con cerebros de ratones transgénicos que bien expresaban sólo APP o bien coexpresaban PS-1 tipo silvestre junto con APP. Estos resultados apoyaban la idea de que las mutaciones de la PS-1 causaban AD aumentando la concentración extracelular de peptidos A β 42, promoviendo la deposición de A β .

Algunas mutaciones puntuales en el gen de la PS-1 resultan en un aumento selectivo en la producción de A β 42 amiloidogénico mediante procesamiento proteolítico de la APP. A partir del estudio del posible papel de la PS-1 en el procesamiento normal de la APP[148] en cultivos de neurona derivados de embriones de ratón deficientes en PS-1, se encontró que las esciones α y β secretasa del dominio extracelular de la APP no se afectaba por la ausencia de PS-1, aunque si se evitaba la escisión γ secretasa del dominio transmembrana de la APP, lo que daba lugar a la acumulación del fragmento C terminal de la APP (C99) y a una disminución de 5 veces en A β . Los experimentos de electroforesis de campo pulsante indicaron que la deficiencia de PS-1 específicamente disminuía el recambio de

fragmentos de APP asociados a la membrana. Así la PS-1 parecía facilitar la actividad proteolítica que escinde el dominio membrana de la APP totalmente. Estos resultados indicaban que algunas las mutaciones de la PS-1, con manifestaciones clínicas, producía ganancia de función.

Siendo la acumulación de A β en el cortex cerebral un suceso constante y temprano en la patogénesis de la AD, el hito en la generación de la molécula a partir de la APP es su proteólisis final por la γ -secretasa. La causa más frecuente de FAD es la mutación de los genes PS-1 y PS-2, que alteran la actividad γ -secretasa. La delección de PS-1 en ratones reduce ampliamente la actividad γ -secretasa, indicando que la Presenilina media las proteólisis. Como ya se indicó, las mutaciones alternativas en los residuos aspartato de los dos dominios transmembrana conservados, Asp257(TM6) y Asp385(TM7), reducían sustancialmente la producción de A β e incrementaban las cantidades del fragmento C terminal de la APP (C99), sustratos de la γ -secretasa[101]. Se observaron estos efectos en 3 líneas celulares diferentes así como en células libres de los microsomas. Cada una de las mutaciones aspartico por alanina también evitaba la endoproteólisis normal de la PS-1 en el bucle citoplasmático entre TM6 y TM7. En una variante funcional de un mutante PS-1 (portadora de una delección del exon 9) que se asocia a FAD y no requiere esta escisión interna, la introducción de una mutación asp385 todavía inhibía la actividad γ -secretasa. Estos resultados indicaron que los dos residuos aspartato transmembrana eran críticos tanto para la actividad endoproteolítica sobre PS-1 como para la actividad γ -secretasa.

Una forma peculiar de A β privada de los 10 primeros residuos aminoácidos se acumula en pacientes de portadores de la mutación S170F de PS-1. La sobreexpresión de esta especie truncada no sólo indicaba que la escisión por parte de la γ -secretasa estaba afectada por la mutación, sino que también lo estaba la escisión β -secretasa[149].

La Quinasa de la sintetasa del glucógeno 3 α (GSK3 α) resulta ser necesaria para una producción máxima de A β 40 y A β 42, generadas a partir de la γ -secretasa[150]. In Vitro, el litio, un inhibidor de esta enzima, bloquea la producción de A β

interfiriendo en la actividad γ -secretasa. En ratones que expresan mutaciones en APP y PS-1 asociadas a la AD, el litio reducía los niveles de A β . Esta misma enzima también fosforila la proteína Tau.

Para analizar los efectos de las diferentes mutaciones sobre APP y otros sustratos en la producción de A β se emplearon células deficientes en Presenilina, observándose que unas mutaciones disminuían la cantidad de A β 40 (pérdida de función) mientras que otras aumentaban los niveles de A β 42 (ganancia de función)[111].

De un conjunto de 9 mutaciones clínicas de la Presenilina, todas las mutaciones aumentaban significativamente la relación A β 42/A β 40 in Vitro disminuyendo significativamente los niveles de A β 40 con acumulación del fragmento C terminal de la APP (C99), un signo del descenso de actividad de la Presenilina. Se observó un aumento significativo de la cantidad de A β 42 sólo en la mitad de las mutaciones estudiadas y que la edad de comienzo de la FAD asociada a PS-1 se correlacionaba inversamente con el cociente A β 42/A β 40 y niveles absolutos de A β 42, pero directamente con los niveles de A β 40. Estos datos en conjunto sugieren que A β 40 podría tener un papel protector quizá secuestrando la fracción más tóxica A β 42 y facilitando su aclaramiento[151]. En la misma línea otro estudio[152] informa de que una reducción en la producción de A β 40 acelera la formación de placas en un modelo de animales transgénicos para la APP de FAD. Se ha visto que el bucle citoplasmático entre TM6 y TM7, a través de la creación de ratones *knockin* con una delección en el exón 10 de PS-1, juega un papel regulador en el procesamiento de la γ -secretasa disminuyendo la producción de A β 40, sin aumentar la de A β 42, siendo ésta la causa probable del aumento de la deposición acelerada de placas en estos animales.

El modelo expuesto con anterioridad de proteólisis progresiva de la APP mediante la γ -secretasa[116] apunta hacia un mecanismo bioquímico mediante el cual una proteasa menos eficiente (pérdida de función del producto menos tóxico) puede dar lugar a un aumento del cociente A β 42/A β 40 (ganancia de función hacia un producto tóxico).

Aunque no se han encontrado mutaciones asociadas a AD en cualquiera de los otros sustratos encontrados para el complejo γ -secretasa, aparte de la APP, a continuación se describen dos de estos sustratos en atención a su relación con el complejo γ -secretasa y sus efectos sobre la producción de A β respecto a la AD.

2.5.5. Papel en la vía de señalización Notch

La señalización a través de las proteínas receptoras de Notch, implicadas en decisiones sobre el destino celular, cruciales para la célula durante su desarrollo, requiere la escisión inducida sobre Notch. Esta escisión ocurre dentro del dominio transmembrana predicho, liberando el dominio intracelular de Notch (**NICD**) y recuerda la escisión de la APP mediada por la γ -secretasa. Las deficiencias en la PS-1, que inhiben el procesamiento de la APP mediante la γ -secretasa en células de mamífero, y las interacciones genéticas entre Notch y los homólogos de PS-1 en *C. elegans* (**SEL-12**) indican que las Presenilinas podrían modular la vía de señalización Notch[153]. Las deficiencias de PS-1 en células de mamíferos también reducen la liberación proteolítica de NICD de estructuras de Notch truncadas, de este modo se identificó el paso bioquímico específico de la vía de señalización Notch que dependía de PS-1[154]. Más aún, varios inhibidores de la γ -secretasa bloquean el mismo paso en el procesamiento de Notch, indicando que las actividades relacionadas con la proteasa son responsables de la escisión dentro del dominio transmembrana predicho de Notch y APP.

A través de mutaciones inactivantes (*null*) en el gen de Presenilina en Drosófila se logró eliminar la señal de transducción de Notch y evitar que su dominio intracelular penetrara en el núcleo[155]. Más aún, se proporcionó la evidencia de que se requería la Presenilina para la liberación proteolítica del dominio intracelular a partir de las membranas que siguen la activación de Notch por el ligando. En Drosófila se probaron los requerimientos de sustrato[156] para el procesamiento dependiente de Presenilina de Notch y otros tipos de proteínas transmembrana tipo I en vivo. Se encontró que la escisión dependiente de Presenilina de Notch no dependía críticamente del reconocimiento de secuencias particulares en estas

proteínas, pero en su lugar sí dependía del tamaño del dominio extracelular: cuanto menor era el tamaño, mayor la eficiencia de la escisión (*vs* S170F). Por lo tanto, Notch, A β y quizá otras proteínas podrían ser el objetivo para la escisión transmembrana mediada por Presenilina mediante un procesamiento aguas arriba que separaría el dominio extracelular del resto de la proteína.

Ciertas mutaciones del gen de la Presenilina en *Drosófila* mostraban pérdida de función causante de fenotipos Notch-like tales como defectos neurogenicos durante la embriogénesis (pérdida de inhibición lateral dentro del cluster de células proneurales y la ausencia de formación de alas marginales)[157]. La Presenilina era requerida para la producción proteolítica normal de los fragmentos Notch carboxi terminales necesarios para la maduración del receptor y señalización y genéticamente actúa aguas arriba tanto sobre las formas ancladas en la membrana así como la forma nuclear activa de Notch.

Se observó que Mesp2, controlando 2 vías de señalización Notch, iniciaba el establecimiento de polaridad retrocaudal. Inicialmente, Mesp2 activaba la cascada de señalización Notch, independiente de PS-1, para suprimir la expresión de Dll1 en la mitad rostral de las somitas[158]. Por consiguiente, la activación de la vía de señalización Notch dependiente de Mesp2 y PS-1 podría regular de distintos modos la expresión de Dll1, lo que resulta en el establecimiento de la polaridad rostro-caudal en somitas.

Otros ligandos de Notch: Delta-1 y Jagged-2, también estarían sujetos a procesamiento intermembranoso por la γ -secretasa, dependiente de Presenilina, lo que resulta en la producción de derivados intracelulares solubles[159]. El dominio intracelular de Delta-1 (**DICD**), que se generaba mediante la escisión γ -secretasa, sería transportado hasta el núcleo donde jugaría probablemente algún papel en la transcripción. El dominio intracelular de Jagged-2 (**JICD**) podría jugar un papel similar.

2.5.6. Interacción con Cadherinas y β -Catenina

La β -Catenina es una proteína multifuncional que forma complejos de adhesión con E-Cadherina, α -Catenina y actina. Así mismo juega un papel principal en la señalización *wingless* (**Wnt**) en embriología a través de su translocación nuclear.

PS-1 forma complejos con β -Catenina in vivo; parece funcionar como un andamiaje sobre el que rápidamente se acopla la fosforilación de β -Catenina a través de dos actividades quinasa secuenciales axina/casein quinasa (**CK-1 α**) e independientes de la vía regulada por Wnt (figura 7a.)[108]. La deficiencia de Presenilina resultaba en un incremento de la estabilidad de β -Catenina in vitro e in vivo a través de la desconexión de los pasos de fosforilación de β -Catenina, tanto en presencia como en ausencia de estimulación Wnt. Estos hallazgos subrayan un aspecto de la regulación de la β -Catenina en ausencia de la vía reguladora Wnt y constituye una función de la Presenilina distinta de la proteólisis intramembranosa (figura). La fosforilación de las serinas 353 y 357 por la quinasa de la sintetasa del glucógeno 3 β (**GSK3 β**)[160](figura 7b.) induce un cambio estructural en el bucle citoplasmático entre TM6 y TM7, que se puede mimetizar mediante sustitución (in vitro y en células cultivadas) de los sitios fosforilados por aminoácidos cargados negativamente. Los cambios estructurales de la PS-1 reducen su interacción con β -Catenina dando lugar a un descenso de su fosforilación, ubiquitinación de la β -Catenina lo que se traduce en una estabilización y el consiguiente aumento de los niveles nucleares de la misma: aumentando la señalización nuclear y la transcripción de los genes diana. Los mutantes que mimetizan la fosforilación de PS-1 aumentan la proliferación celular (pero no la diferenciación, veasé más adelante) respecto al tipo silvestre.

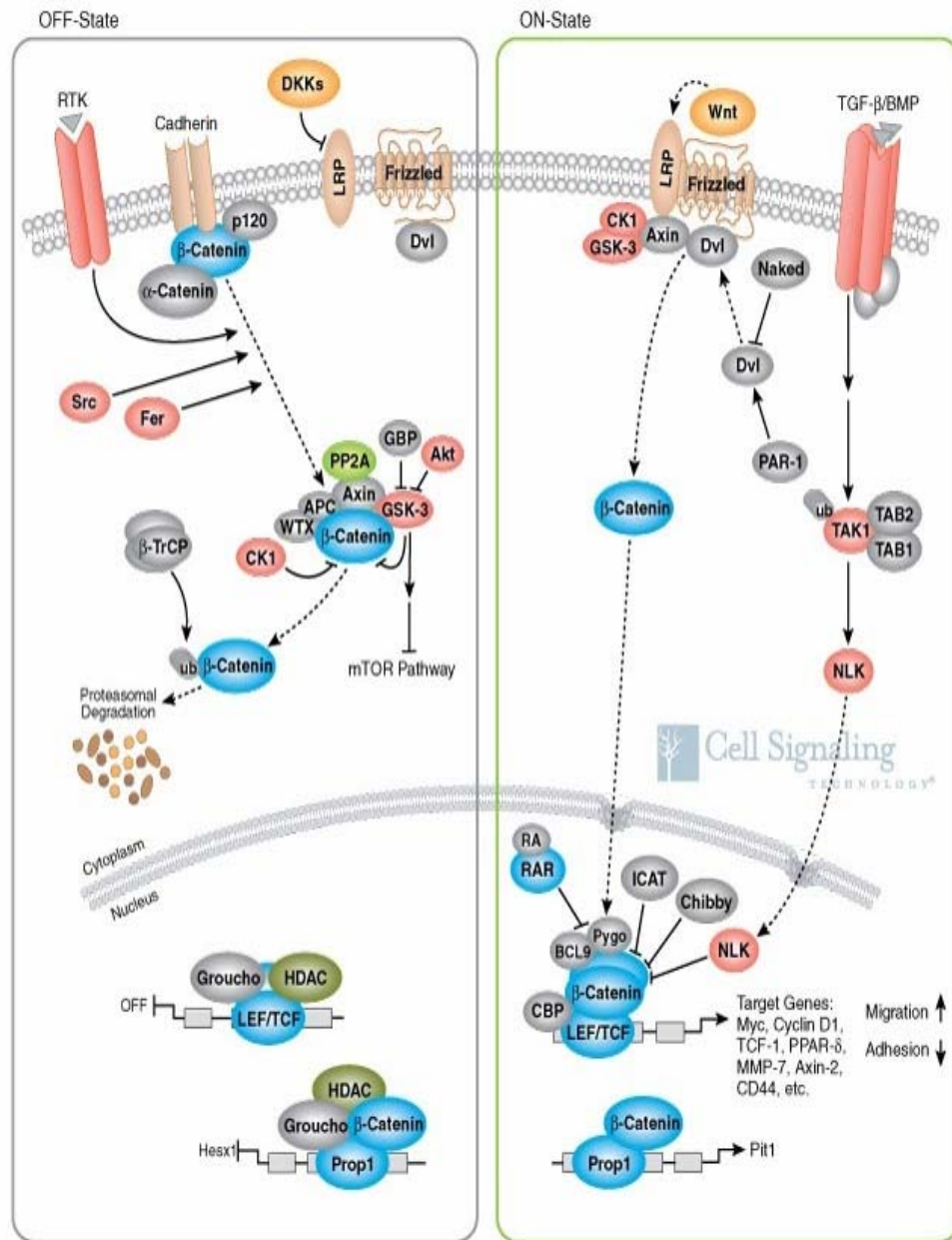


Figura 7a. La vía Wnt/β-catenina regula las decisiones de destino de las células durante el desarrollo de vertebrados e invertebrados. El ligando-Wnt es una glucoproteína que une a los receptores Frizzled y desencadena una cascada que resulta en el desplazamiento de la quinasa GSK-3β del complejo multifuncional β-APC/Axin/GSK-3 tal y como aparece en: http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Wnt_beta_Catenin.html.

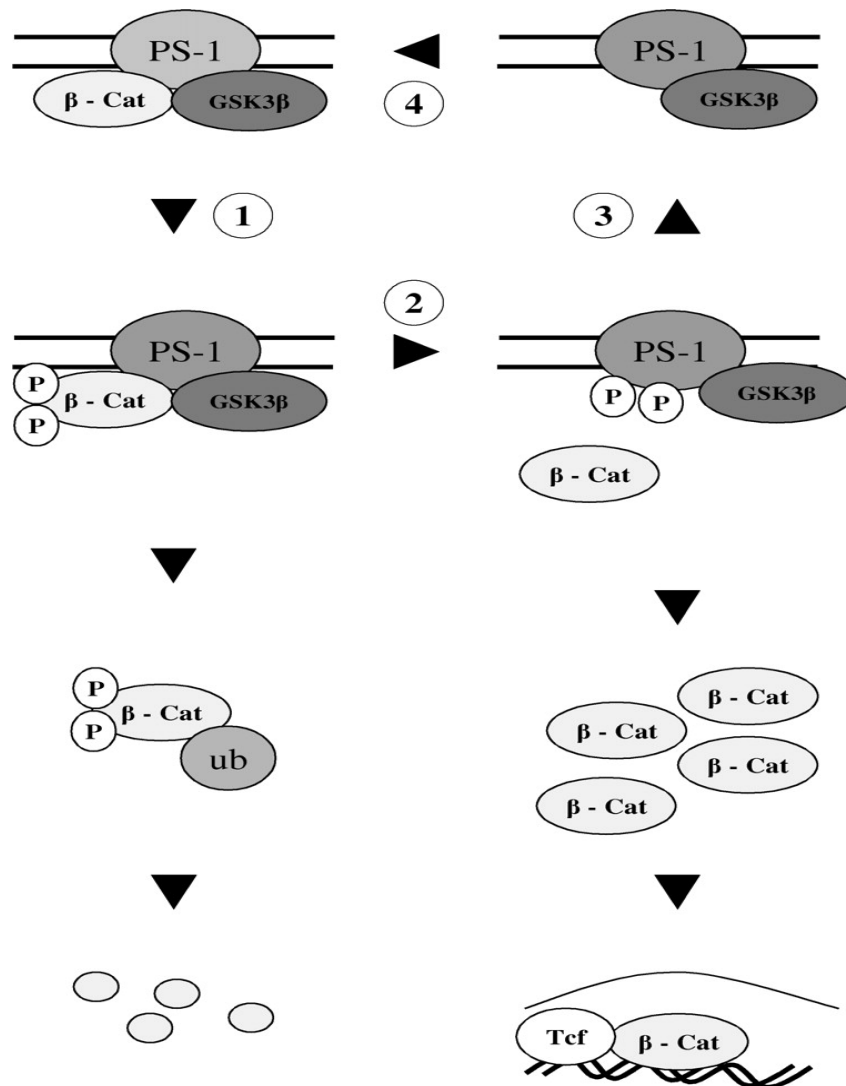


Figura 7b. Modelo de fosforilación dependiente de la vía de señalización de la β -catenina: PS1, β -catenina y GSK3 forman un complejo que ayuda a la fosforilación de la β -catenina y su subsiguiente degradación mediante el proteosoma (1). El bucle hidrofílico de PS1 puede fosforilarse mediante GSK3 β después de la liberación de β -catenina induciendo un cambio estructural que impide la unión de la β -catenina libre (2). Esto da lugar a la estabilización de la β -catenina y a un aumento de la señalización nuclear vía regulación de la transcripción mediada por Tcf/Lef. PS1 puede desfosforilarse (3) restableciéndose el complejo ternario y dando lugar a la unión de la β -catenina libre (4)[160].

El potencial neurogénico de las células progenitoras gliales del cortex cerebral (GPCs) de sujetos con AD sufre una interrupción de la señalización de la β -Catenina dependiente de GSK-3 β . Esta interrupción esta inducida por A β y produce un aumento de la fosforilación de la β -Catenina en células GPCs de controles sanos sometidos a tratamiento con A β . El aumento fue similar al observado en células GPCs de pacientes AD que habían sido expuestas a elevados niveles GSK-3 β [161].

En células Madin-Darby de riñon canino (**MDCK**) se encontró que la PS-1 se acumulaba en los contactos intercelulares donde se colocalizaba con ciertos componentes de las uniones adherentes basadas en la Cadherina (**CDH1**), β -Catenina y α -Catenina (**CTNNA1**), todos ellos componentes de las uniones de adherencia celular[162]. En células MDCK confluyentes, PS-1 formaba complejos con E-Cadherina de la superficie celular; La disolución de los contactos célula-célula dependientes de Ca(2+) redujo la superficie de PS-1 y los niveles del complejo PS-1/E-Cadherina. La sobreexpresión de PS-1 en células de riñon humano permitía la adhesión célula-célula. La PS-1 se concentraba en los contactos intercelulares en el tejido epitelial; en el cerebro, formaba complejos con E- y N-Cadherina y se concentraba en las adhesiones sinápticas. El hecho de que PS-1 sea constituyente del complejo Cadherina/Catenina hace al complejo diana potencial para las mutaciones de PS-1 asociadas a AD.

La PS-1 interactúa con la β -Catenina y promueve su recambio a través de un mecanismo independiente. De acuerdo con esto PS-1 es importante en el control de la proliferación de células epidérmicas in vivo. Los ratones *knockout* de PS-1, cuya función fue rescatada a través de PS-1 humana transgénica, desarrollaban cancer de piel espontáneamente[163]. En queratinocitos PS-1 *null* (mutación inactivante) se vió una mayor señalización citosólica mediada por β -Catenina y β -Catenina/factor promotor linfoide (**LEF1**). Este efecto podría ser reversible mediante la re inserción del tipo silvestre PS-1; aunque no lo sería para la función de la PS-1 mutante: activa en el procesamiento de Notch, pero defectuosa para la unión a β -Catenina. La PS-1 había pasado de ser una simple proteína asociada a AD, a un sitio multifuncional en el corazón de un número creciente de mecanismos celulares de señalización[164].

En cultivos de células neuronales de roedor, la PS-1 promovía la escisión ϵ de la N-Cadherina, resultando en la producción de fragmentos citosólicos solubles (**N-cad/CTF2**). Estos fragmentos se unen a la proteína de unión (**CBP**) del factor de transcripción de cAMP (**CREB**) en el citosol y promovía su degradación a través del sistema proteasoma-ubiquitina y de esta forma se hacía descender la transcripción mediada por CREB[165]. En cultivos de células humanas, los mutantes de PS-1 parecían estar asociados a FAD inhibiendo la escisión ϵ (las proteínas mutantes serían incapaces de suprimir la transcripción mediada por CREB). Los mutantes de PS-1 asociados a FAD podrían dar lugar a una ganancia en la función de transcripción o al menos a una “desregulación transcripcional”.

Al incluir mutaciones PS-1 (L286V) en células precursoras neuronales de ratas se producía el sobrecrecimiento y no la diferenciación neuronal causando un aumento en la señalización y transcripción mediada por β -Catenina/TCF (*T cell factor*). La inhibición molecular de la transcripción mediada por el sistema β -Catenina/CBP corregía estos efectos[166](figura 8). Las células mutantes L286V contenían elevados niveles de N-Cadherina *full length* (**FL**) y esencialmente N-Cadherina no procesada, lo que reflejaba un descenso de la escisión ϵ -secretasa mediada por PS-1. El descenso de los niveles de N-Cadherina procesada se asoció a un incremento de los niveles de CBP y no al aumento de p300 (una proteína similar que forma parte del complejo transcripcional) (figura 8.). Los hallazgos sugirieron que CBP y p300 jugaban roles distintos y únicos en la regulación celular. La carencia de procesamiento de la N-Cadherina en las células mutantes de PS-1 daba lugar a un aumento de la transcripción mediada por el sistema β -Catenina/CBP a costa del sistema de transcripción mediado por β -Catenina/p300, con el resultado de bloqueo de la diferenciación neuronal. Este incremento en la transcripción podría hacer descender la velocidad a la cual los precursores de las células neuronales se diferencian en neuronas en cerebros con AD, lo que podría exacerbar el descenso en la plasticidad neuronal de la enfermedad.

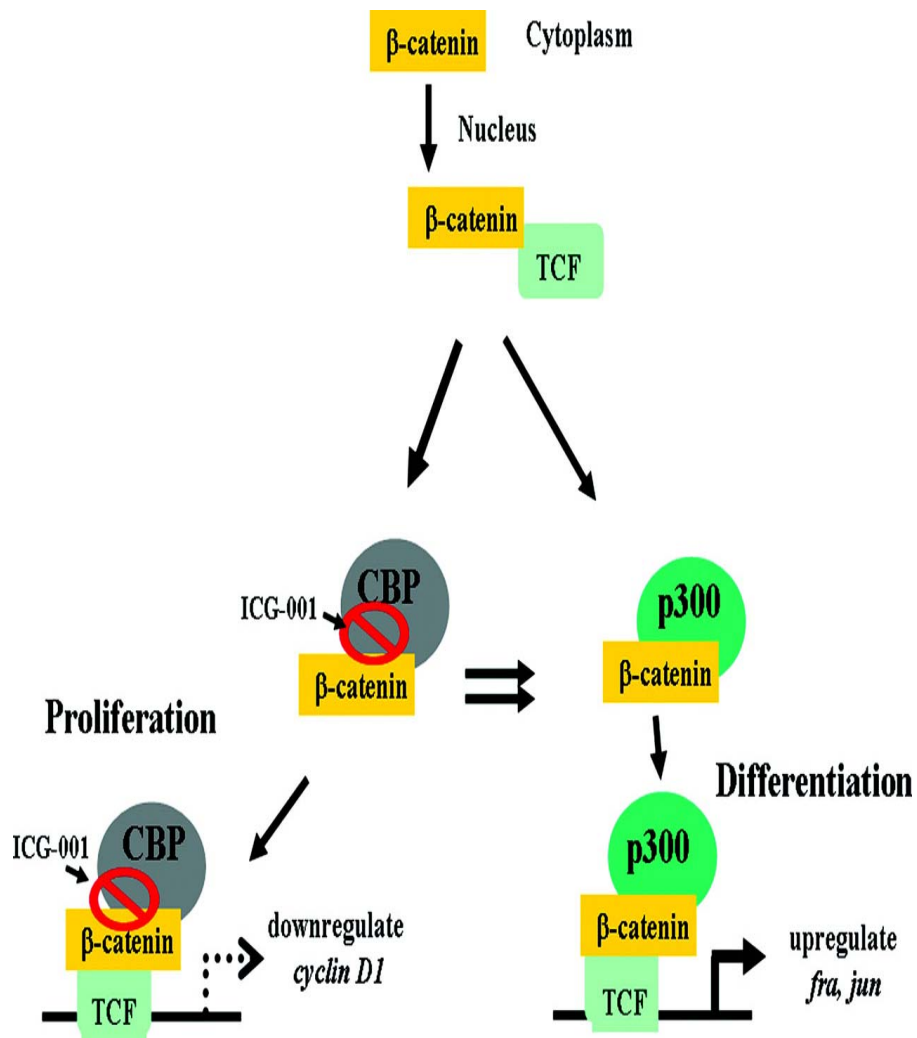


Figura 8. Modelo disyuntivo del funcionamiento del complejo coactivador de la transcripción TCF/β-catenina y su papel en la iniciación de la diferenciación frente a la proliferación celular[166].

2.5.7. La Hipótesis de la Presenilina

La investigación sobre la AD ha sido impulsada enormemente gracias a la identificación de las mutaciones causales en los genes que codifican por la APP y las Presenilinas (PS-1 y PS-2). Las mutaciones *missense*, heredadas de manera dominante, en la APP aumentan la producción de A β y cuenta por aproximadamente el 10% de las mutaciones identificadas en AD de origen familiar (**FAD**). Las Presenilinas son portadores de aproximadamente el 90% de las mutaciones de FAD identificadas y muchas de estas mutaciones aumentan la producción relativa de A β 42. La popular hipótesis amiloidea postula que la acumulación de péptidos A β , particularmente el más hidrofóbico y dispuesto a agregación A β 42, desencadena una cascada patogénica, dando lugar a neurodegeneración en la AD[167]. Sin embargo la acumulación de amiloide no es un hecho obligado de la demencia o neurodegeneración ya que han sido descritas demencias neurodegenerativas que carecen de patología amiloidea (por ejemplo la demencia frontotemporal, **FTD**). De acuerdo con esto, la distribución regional de las placas amiloideas se correlaciona pobremente con el patrón y la gravedad de la demencia en la AD, mientras que la pérdida de sinapsis se correlaciona bien con estas manifestaciones clínicas[168]. Por otra parte, los modelos de ratones sobreexpresando la APP humana mutante han reproducido la sobreproducción de péptidos A β y la progresiva deposición amiloidea, pero han fracasado a la hora de reproducir la neurodegeneración[169].

La hipótesis de la Presenilina postula una cascada de eventos similar a la hipótesis amiloidéa que dan lugar a neurodegeneración y demencia en la AD. Las mutaciones patogénicas en la Presenilina afectan parcialmente las actividades de la γ -secretasa dependientes e independientes de Presenilina a través de un efecto dominante negativo (la inserción de un gen defectuoso interfiere con la acción del alelo normal).

Los elevados niveles de A β , particularmente de A β 42, que resultan de las mutaciones patogénicas en la APP, Presenilina o en asociación con AD esporádica, podrían resultar de la inhibición de la función de la Presenilina, mimetizando los efectos de las mutaciones de la Presenilina. Debido a que la producción de A β 42

aumenta a expensas de una pérdida parcial de actividad de la Presenilina y por ende de la γ -secretasa, la inhibición mediada por A β 42 podría crear un círculo vicioso dando lugar a una afectación progresiva de la función de la Presenilina.

La pérdida de actividad de la Presenilina tiene como consecuencia disfunciones sinápticas, como el déficit en la plasticidad sináptica y las alteraciones en los procesos de señalización molecular, incluyendo la afectación de las funciones mediadas por el receptor NMDA y la reducción de la expresión génica dependientes de CREB/CBP. La pérdida de función de la Presenilina finalmente da lugar a neurodegeneración edad dependiente y progresiva, caracterizada por una pérdida de sinapsis, dendritas y neuronas; astrogliosis; e hiperfosforilación Tau.

Esta teoría tiene su origen en recientes estudios con ratones de *knockout* espacialmente restringida en los cuales las Presenilinas son inactivadas selectivamente en el cortex cerebral del adulto[170]. Estos ratones desarrollan, en relación con la edad, una neurodegeneración progresiva caracterizada por la impronta de la neuropatología de la AD, incluyendo la pérdida sináptica, muerte celular neuronal, astrogliosis e hiperfosforilación Tau. En estos ratones de mutación restringida, la inactivación de las Presenilinas ocurre en cuarta semana después del nacimiento y la neurodegeneración se hace evidente a los cuatro meses de edad. A la edad de nueve meses, el 24% de las neuronas corticales y el 25% del volumen cortical se han perdido. La neurodegeneración viene precedida por pérdida de memoria, entorpecimiento de la plasticidad sináptica, reducción de la respuesta sináptica mediada por receptores del NMDA y una reducción de los elementos de respuesta a cAMP, que dependen de la expresión gen dependiente de CREB/CBP, lo que sugiere que estos defectos moleculares median la neurodegeneración subsiguiente. Sobre los modelos murinos de la AD, el de los ratones con *knockout* de Presenilina son los únicos derivados de la manipulación genética de los genes de AD que reproducen las características centrales de la AD: neurodegeneración y demencia.

El hecho de que la pérdida de función de Presenilina en cerebros de ratón semeje las manifestaciones esenciales de la AD brindó la posibilidad de que las

mutaciones de PS asociadas a FAD pudieran causar la enfermedad por medio de la pérdida parcial de funciones esenciales de la Presenilina. De hecho, la evidencia experimental sustancial apoya al punto de vista de que las mutaciones patogénicas de la Presenilina produzcan un deterioro de las actividades mediadas por Presenilina. Estos hallazgos proporcionaron el impulso inicial para replantear cómo la Presenilina y la APP podrían estar involucradas en la AD.

2.5.7.1. Las mutaciones de la Presenilina ligadas a FAD afectan a las actividades de la Presenilina γ -secretasa dependiente e independiente

Un hecho inusual de la γ -secretasa es la relajación de su especificidad de secuencia, como una evidencia de su falta de una fuerte similaridad de secuencia en sus sustratos y su tendencia a escindir algunos sustratos en una serie de residuos intermembranosos vecinos. Las Presenilinas además poseen actividades γ -secretasa independientes, como la regulación negativa de la señalización Wnt, mediada por GSK3, a través de la desestabilización de la β -Catenina.

Las mutaciones por pérdida de función en mutaciones en SEL-12 que exhiben cerca de un 50% de identidad en la secuencia con PS-1 y PS-2, reducen la actividad de LIN-12 (de la vía de señalización Notch) y confieren un fenotipo de puesta de huevos defectuosos (*Egg laying*, **Egl**). La expresión transgénica del tipo silvestre de las Presenilinas humanas rescatan el fenotipo causado por una mutación de SEL-12, fuertemente hipomórfica, hasta niveles comparables al tipo silvestre de SEL-12[153;171]. Por el contrario, seis mutaciones asociadas a FAD redujeron gradualmente la habilidad de PS-1 para sustituir funcionalmente a SEL-12. La habilidad de los mutantes de Presenilina para suprimir el fenotipo Egl es dosis dependiente[172]. Algunos estudios en *Drosophila* también recogen que las mutaciones asociadas a FAD reducen la habilidad que presenta la Presenilina de las moscas para complementar los fenotipos relacionados con Notch en los individuos PS -/[173].

Aunque la investigación inicial de las mutaciones en sistemas de mamíferos se ha centrado en el aumento en la producción de A β 42, un gran número de mutaciones patogénicas causan deterioro en otras actividades de la Presenilina. Con respecto al sitio de escisión de la APP por γ -secretasa, las mutaciones de la Presenilina típicamente incrementan la producción de A β 42 (y/o A β 43), pero pueden también afectar al sitio de escisión predominante de la γ -secretasa que da lugar a una A β de 40 residuos y la más distal, la escisión en ϵ , dando lugar a 49 residuos, lo que resulta en una reducción significativa en la generación de A β 40 y AICD, respectivamente.

Paralelamente, la afectación de la escisión S3 de Notch dependiente de γ -secretasa y la consiguiente producción de NICD han sido documentadas suficientemente con una variedad de mutaciones de la Presenilina. El primer estudio en un sistema vertebrado para demostrar la reducción de la actividad Presenilina mediante mutaciones patogénicas analizaba los efectos de la generación de NICD en seis mutaciones en PS-1 asociadas a FAD distribuidas a lo largo de la secuencia codificante (Y115H, I143T, M146V, G209V, G384A y C410Y)[110]. La totalidad de las seis mutaciones causaron la reducción de la liberación proteolítica de NICD desde un 40 a un 90% relativo al tipo silvestre de PS-1. Subsiguiente estudios confirmaron que la reducción en la generación de NICD conferida por estas mutaciones, e identificaron un número de mutaciones adicionales ligadas a FAD tanto en PS-1 (V96F, L166P, L166R, G206A, Δ exon9 y L392V) como PS-2 (T122P y N141I) que reducían sustancialmente la producción de NICD[114;174-176].

La gran mayoría de mutaciones de PS-1 que afectaban a la producción de NICD también lo hacían sobre AICD, lo que indicaba una afectación general sobre las funciones dependientes de γ -secretasa que no se limitaba a un solo sustrato[114;174;176-178]. Esta correspondencia de los efectos de las mutaciones sobre la liberación de NICD y AICD podría reflejar similitudes mecanicistas entre las escisiones S3 y ϵ de Notch y APP, respectivamente, las cuales ocurren a posiciones intermembrana similares cerca de la cara citoplasmática de la membrana plasmática.

De manera recíproca, la mayoría de las mutaciones que interfieren con la generación normal de AICD también reducen la generación de NICD.

Quizá lo más sorprendente es que numerosas mutaciones en la PS-1 (N135D, L166P, M233T, P264L, G384A y C410Y) y PS-2 (T122P, N141I, M239V y M239I) puedan causar reducciones significativas en la producción de A β 40, a menudo a pesar del aumento concomitante en la producción de A β 42[111;114;151;176;177;179;180]. El efecto diferenciador de las mutaciones de la Presenilina sobre las posiciones de escisión alternativa en el dominio transmembrana de la APP no parece representar un simple cambio en la preferencia o especificidad de sustrato: ya que el grado de elevación en los niveles de A β 42, para algunas mutaciones, no se correlaciona con el grado de disminución en los niveles de A β 40 o AICD[176]. Así, un efecto concertado de muchas de las mutaciones de la Presenilina asociadas a FAD sobre la actividad γ -secretasa parecen ser: el aumento de la escisión que sigue al residuo 42 de la A β y la inhibición de otras posibles posiciones de escisión en el dominio transmembrana de la APP.

Las mutaciones de la Presenilina asociados a FAD también afectan a la proteólisis dependiente de γ -secretasa de otros sustratos (además de Notch y APP). La N-Cadherina sufre escisión γ - y ϵ -secretasa dependiente de Presenilina, análoga a la de APP. Una serie de mutaciones asociadas a FAD (Y115H, M146L, A246E, E280A, E280G, G384A y Δ exon9) suprimen esta escisión[181].

Las mutaciones asociadas a FAD se han relacionado como causantes de una afectación variable pero general de la actividad *Presenilinas*. Uno de los primeros documentos que describían la endoproteólisis de PS-1 observaba la inhibición de esta actividad en dos mutaciones asociadas a FAD (M146V y A246E)[143]. En una revisión de 29 familias con distintas mutaciones de PS-1 asociadas a FAD, se observó una reducción de la endoproteólisis en todos los casos, con mayores afectaciones (>80%) en las mutaciones V96F, E280G y C410Y[182]. La endoproteólisis disminuida de la PS-1 también fue observada en ratones portadores de una mutación *missense* dirigida en la línea germinal P264L[183]. El significado funcional de una actividad presenilasa deficiente no está claro ya que los mutantes

de PS-1 (Δ exon9), refractarios a la endoproteólisis, todavía muestran actividad γ -secretasa. Si PS-1 sufre endoproteólisis autocatalítica es un hecho por resolver[184;185].

La Presenilina posee actividad independiente de la γ -secretasa, como la regulación negativa de la vía de señalización Wnt a través de la interacción y desestabilización de la β -Catenina. Sorprendentemente, se ha visto que las mutaciones asociadas a FAD (M146L, Δ exon9, C263R, and P246L) afectan a esta actividad lo que resulta en un aumento de la estabilidad de la β -Catenina y de la señalización dependiente de β -Catenina[186;187].

Recientemente, se ha visto que la holoproteína Presenilina funciona como un canal de fuga pasiva del calcio en el RE independiente de la actividad γ -secretasa y que dos mutaciones asociadas a FAD (PS-1 M146V y PS-2 N141L) afectan a esta función[188]. Colectivamente, estas observaciones sugieren fuertemente que las mutaciones patogénicas causan una afectación general de la función de la Presenilina: tanto de las actividades dependientes de γ -secretasa como de las independientes. Dado el gran número de mutaciones patogénicas que no se localizan en ningún dominio en particular, el impacto funcional nocivo de las mutaciones patogénicas podría reflejar una desestabilización general de la estructura de la Presenilina.

La habilidad de la PS-1 portadora de la mutación A246E asociada a FAD para rescatar los defectos fenotípicos de ratones *PS-1*^{-/-} se ha tomado como evidencia de que los mutantes poseen una actividad biológica normal y que las mutaciones patogénicas de PS-1 no actúan a través de un mecanismo de pérdida de función[142;143]. Sin embargo, los ratones *PS-1*^{+/-} con sólo un alelo funcional de PS-1 son fenotípicamente normales, lo que indica que el 50% del total de PS-1 es suficiente para rescatar el fenotipo *PS-1*^{-/-} de ratón[189]. Por consiguiente, incluso si la mutación A246E causaba una reducción del 50% de la actividad, la expresión a un nivel igual a la expresión de la PS-1 normal podría resultar en un rescate fenotípico; mayores niveles de sobreexpresión podrían compensar mayores disminuciones en la actividad. Consistente con este punto de vista, se observó que el

análisis de los niveles de expresión transgénica en embriones revelaba que el grado de rescate fenotípico se correlacionaba con la extensión de la sobreexpresión de PS-1 mutante[143]. Más aún, la mutación A246E exhibe una habilidad reducida para rescatar los fenotipos causados por la deficiencia del homólogo de Presenilina en *C. elegans* y *Drosophila*, lo que refuerza el argumento de que esta mutación de hecho no compromete la actividad biológica de PS-1[171;173].

Así, los estudios de las mutaciones patogénicas de la Presenilina han revelado que un gran número de mutaciones confieren una pérdida parcial de función. De hecho, tales análisis han demostrado que la afectación de la actividad de Presenilina en las mutaciones patogénicas es la regla en lugar de la excepción. A causa de que estos estudios típicamente implican la sobreexpresión de la proteína mutante de Presenilina, las reducciones observadas en actividades dependientes de Presenilina es probable que representen subestimaciones; en los casos en los que las actividades dependientes de Presenilina no estuvieran aparentemente afectadas por las mutaciones, la sobreexpresión podría haber enmascarado la pérdida parcial de actividad, como se observó en los estudios anteriormente descritos para *C. elegans*. En concreto, existe un trabajo en el que se hace uso de esta sobreexpresión de proteína mutante para demostrar categóricamente que el defecto de actividad *Presenilinas* en la mutación Δ exon9 es independiente de la función patológica y biológica de PS-1[184]. La comparación de los efectos de las mutaciones patogénicas de la Presenilina con aquellas mutaciones inactivantes o *null mutation* ha confirmado que las reducciones de las actividades dependientes e independientes de γ -secretasa representan una pérdida parcial de función. La única discrepancia es el aumento relativo en la producción de A β 42 causado por las mutaciones patogénicas, las cuales han sido generalmente interpretadas como de ganancia de función ya que la inactivación genética de la Presenilina afecta a todas las escisiones mediadas por la γ -secretasa del dominio transmembrana de la APP. Algunos análisis de una serie de mutaciones de Presenilina asociados a FAD en cultivos de células humanas y *Drosophila* han demostrado posteriormente que el grado de reducción de la actividad de la Presenilina dependiente se correlaciona bien con la correspondiente gravedad clínica, como indicaba la edad de inicio[151;173]. Estas

observaciones permitieron un apoyo adicional para ver que la afectación de la función de la Presenilina juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad.

2.5.7.2. Los inhibidores de la γ -secretasa mimetizan los efectos de las mutaciones patogénicas de Presenilina

Los compuestos peptido-miméticos de varias clases estructurales actúan como pequeñas moléculas inhibitoras de la γ -secretasa[190]. Estos compuestos, muchos de los cuales están basados en la secuencia del APP como sustrato, actúan rodeando al sitio de escisión de la A β 42, ocupando el sitio activo de la enzima y funcionando como un análogo de intermedio de estado de transición en la catálisis de la aspartil proteasa.

Una fascinante propiedad compartida por los inhibidores de la γ -secretasa es su paradójica habilidad para aumentar la producción de A β 42 mientras bloquean otra escisión dependiente de γ -secretasa mimetizando de esta manera los efectos de las mutaciones de la Presenilina[99;191-196]. Se ha observado que bastan dosis de moderadas a bajas de cualquier inhibidor de la γ -secretasa (utilizados generalmente para aumentar la producción de A β 42) mientras que dosis mayores producen la inhibición esperada para la producción de A β 42. A diferencia de este efecto bifásico sobre la A β 42, los inhibidores de la γ -secretasa causan una inhibición progresiva sobre la producción de A β 40. El aumento de la producción de A β 42 a menudo ocurre incluso a concentraciones subinhibitorias, en contra de la teoría de que el aumento de los niveles de A β 42 simplemente es una consecuencia del aumento de la disponibilidad del sustrato debido a una reducción en la generación de A β 40. Además, la observación de este fenómeno tanto en sistemas de cultivos celulares como en membranas parcialmente purificadas hace improbable que el aumento de la producción de A β 42 sea resultado de los efectos inhibitorios de otros procesos intracelulares[196]. Sorprendentemente, el grado de aumento de la producción de A β 42 debido a los inhibidores de la γ -secretasa se correlaciona fuertemente con sus potencias de inhibición[197], lo que sugiere que el incremento de la generación de

A β 42 está mecanísticamente relacionado con la inhibición dirigida contra el sitio activo.

El hecho de que los inhibidores de la γ -secretasa puedan mimetizar los efectos de las mutaciones patogénicas de la Presenilina (aumento de la producción de A β 42 con inhibición de otras actividades γ -secretasa) apoya la hipótesis de que las mutaciones patogénicas causan una pérdida parcial de función de la Presenilina, equivalente a los efectos de bajas a moderadas dosis de inhibidores de γ -secretasa. Así, la elevada producción de A β 42 causada por las mutaciones de la Presenilina podría representar un síntoma de enfermedad o de otro modo afectación de la γ -secretasa. El efecto divergente sobre la producción de A β 42 relativo a las otras escisiones de sustratos ejercida por los inhibidores de la γ -secretasa y las mutaciones de la Presenilina no se puede reconciliar fácilmente con la una estructura enzimática monomérica y sugiere por el contrario una enzima multimérica sujeta a regulación alostérica. Este punto de vista es consistente con la evidencia para la dimerización de la Presenilina y los efectos dominantes negativos de las mutaciones de la Presenilina[176]. Sorprendentemente, el sustrato o los análogos del estado de transición pueden tener efectos bifásicos sobre la actividad de los enzimas alostéricos, similares a los efectos de la γ -secretasa sobre la producción de A β 42. Este fenómeno está perfectamente documentado con el modelo clásico de enzima alostérico de la aspartato transcarbamilasa: los análogos del L-aspartato (ácidos dicarboxílicos tales como el maleato) se comportan como activadores a bajas concentraciones y como inhibidores a mayores concentraciones[198;199].

2.5.7.3. Las mutaciones de la Presenilina pueden causar demencia neurodegenerativa en ausencia de acumulación A β

Tres mutaciones de la Presenilina (L113P, G183V y insR352) han sido identificadas familias con FTD, una demencia neurodegenerativa común en ausencia de patología amiloidea[200-202]. La ausencia de acumulación A β en FTD implica que estas mutaciones de PS-1 podrían conferir una mayor pérdida de función que aquellas que causan FAD, equivalente a mayores dosis de inhibidor de γ -secretasa.

De hecho, una de estas mutaciones de la PS-1 asociadas a FTD (insR352) afecta fuertemente a la actividad γ -secretasa de forma dominante negativa. Las dos mutaciones restantes ocurren en el límite exon-intrón, probablemente dando lugar a un aumento de tanto de los transcritos que codifican por la proteína tamaño completo *full-length* de PS-1 (sin endoproteólisis) que son portadores de la mutación *missense* así como el transcritos con *splicing* aberrante que codifican por fragmentos de Presenilina truncados. Así, las mutaciones de la Presenilina pueden causar demencia y neurodegeneración en humanos sin aumentar la producción de A β , seguramente por imposición de una reducción generalizada en la actividad de la Presenilina. Más aún, las mutaciones de la Presenilina también se producen en familias en la cual EOAD está asociada con cuerpos de Lewy en la corteza cerebral, conteniendo agregados de α -sinucleína[203-205]. Colectivamente, estas observaciones llevan a sugerir que los agregados de proteína variable (en composición) que se asocian con las mutaciones de Presenilina no juegan un papel esencial en el mecanismo patogénico que da lugar a neurodegeneración y demencia.

Recientemente se ha creado un modelo que contempla tanto funciones dependientes como independientes de la Presenilina en la γ -secretasa[206]. Se ha visto que la ausencia de bucle hidrofílico lleva a la detección prematura de proteínas relacionadas con el ciclo celular (ciclinas A, B y D) en los primeros estadios de la AD (lo que se denomina “eventos del ciclo celular”)[207;208] y a la acumulación de p53 citoplasmática, lo que lleva a una probable sensibilización neuronal frente a daño tanto exógeno como endógeno llevando a una muerte celular inducida por estrés[209].

2.5.7.4. La distribución difusa de las mutaciones de Presenilina es más compatible con una pérdida de función

Frente a las mutaciones patogénicas de la APP, que se concentran alrededor de los sitios de escisión proteolítica, las mutaciones de la Presenilina se encuentran dispersas a lo largo de los dominios extracelular, citosólico y transmembrana de la

proteína, teniendo lugar en alrededor del 20% de los residuos aminoácidos (figura Presenilina) Esto sugiere que las alteraciones “aleatorias” de un único residuo aminoácido en la Presenilina es suficiente para causar AD, subrayando la importancia de la función normal de la Presenilina en la patogénesis de la AD. El gran número (>150) y la distribución difusa de las mutaciones de la Presenilina se compatibiliza más con una pérdida de función de la proteína, como la que podría estar causada por una desestabilización de la estructura proteica plegada. La ausencia de mutaciones patológicas que podrían resultar en la pérdida completa de proteína funcional (*non-sense and frame-shift mutations*) lo que sugiere que es poco probable que las mutaciones de la Presenilina actúen simplemente como mutaciones de pérdida de función. En lugar de esto, estas observaciones colectivamente sugieren que las mutaciones patogénicas de la Presenilina podrían actuar a través de un mecanismo dominante negativo, en el cual la proteína Presenilina mutante con una actividad y/o estabilidad reducida interfiere con la función de la proteína de tipo silvestre. Tales mecanismos podrían ser consistentes con la herencia dominante de las mutaciones de Presenilina, se discute más adelante.

2.5.8. Polimorfismo del intrón 8

Las mutaciones en el gen de la PS-1 explican la mayoría de los FAD. Se ha propuesto la asociación del polimorfismo intrónico situado 3' respecto del exón 8 del gen de la PS-1 con la AD[210], con referencia de cluster SNP: rs165932[211].

Los estudios iniciales comenzaron hace más de 10 años[210;212]. Más tarde se realizaron estudios clínicos[213-248] y anatomopatológicos[228;229;248-252] que no fueron capaces de confirmar estos resultados, incluso algunos autores describieron cambios anatomopatológicos relacionados con el polimorfismo intrónico[253], mientras que otros no encontraron esta relación[250]. Se han publicado algunos metanálisis sobre el genotipo 1/1[236;245] o sobre las frecuencias alélicas[254], analizando tanto el establecimiento de EOAD como del LOAD, aunque sólo se ha encontrado una relación significativa para el LOAD[236]. Más aún, algunos estudios clínicos han sugerido que el genotipo 2/2 podría estar

relacionado con la enfermedad[218;219;226]. La homocigosidad del alelo 2 se encontraba asociado a un incremento del riesgo de AD de tres veces y de 4.5 en los pacientes que no eran portadores del alelo ApoE ϵ 4. Lo mismo ocurre en otras poblaciones europeas[238].

Hasta la fecha se han formulado algunas hipótesis para explicar esta asociación: una mala selección de pacientes, el trasfondo genético de las diferencias étnicas entre las poblaciones a analizar, la existencia de un desequilibrio de ligamiento entre el intrón 8 y otro segmento codificante del resto de la PS-1 u otros genes[210].

El exón 8 del gen de PS-1 se escinde alternativamente en algunos tejidos y una mutación en sitio del aceptor de escisión en el mismo intrón se ha asociado con FAD por la pérdida del exón 9[255].

2.6. Apolipoproteína E (ApoE)

La ApoE es una de las principales apolipoproteínas constituyentes de los quilomicrones, esencial para el catabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos. El gen ApoE se encuentra en el cromosoma 19 formando un cluster con ApoC1 y ApoC2. Presenta pleomorfismo alélico donde las 3 principales isoformas de apolipoproteína E humana: ApoE2, -E3 y -E4 están codificadas por tres alelos diferentes ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$). Las tres isoformas difieren en secuencia de aminoácidos en dos sitios diferentes, el residuo 112 (llamado sitio A) y el residuo 158 (llamado sitio B). En los sitios A y B ApoE2, E3 y E4 contienen [C/C], [C/R] y [R/R] respectivamente[256;257]. Las 3 formas poseen 0, 1+ y 2+ cargas que responden de sus diferencias electroforéticas. ApoE3 es la isoforma más frecuente (tipo silvestre). Hasta la fecha se han caracterizado hasta 30 variantes de ApoE[258].

La participación de la lipoproteína ApoE4 en neuropatología está bien documentada[259;260] siendo el factor de riesgo genético conocido más importante para AD en muchas poblaciones[261-264]. Del 40 al 80% de los pacientes con AD poseen al menos un alelo ApoE4[265;266]. Así mismo, la ApoE4 está asociada con un comienzo temprano, progresión y gravedad del traumatismo craneoencefálico[267-269], choque[270], complicaciones después de cirugía de bypass arteriocoronario[271], enfermedad de Parkinson[272], esclerosis lateral amiotrófica[273], esclerosis múltiple[274;275], neuropatía diabética[276], apnea del sueño[277] y desórdenes de cuerpos de Lewy[278].

A lo largo de la vida y con el aumento de edad, las neuronas requieren ser remodeladas y reparadas para mantener las conexiones dendritico sinápticas.

A través de su función de transporte de lípidos, la ApoE es un factor importante en estos procesos. La ApoE3 y la ApoE2 son efectivas para mantener y reparar las células neuronales[279], pero ApoE4 lo es mucho menos. Las agresiones o agentes nocivos podrían incluir el stress oxidativo, la isquemia, el exceso de producción de A β , las mutaciones SOD1, la inflamación y los procesos de envejecimiento en sí mismos. El deterioro cognitivo en individuos normales portadores del alelo ApoE4 empeora con la edad, sugiriendo un efecto desfavorable global sobre el SNC[280].

La ApoE4 también se asocia con un declive en la utilización de la glucosa por parte del SNC en sujetos normales y pacientes con AD[281;282]. Tanto en individuos de 65 a 75 años como en sujetos jóvenes, el alelo de ApoE4 se asoció con una menor utilización de la glucosa respecto al alelo ApoE3 e implicaba al hipocampo y cortex, las mismas áreas que se encontraban afectadas en AD[282;283]. De acuerdo con estas observaciones el efecto de la ApoE sobre el metabolismo mitocondrial se considera un objetivo crítico para el deterioro cognitivo en la AD[284].

2.6.1. Apoe y AD

2.6.1.1. Neuropatología de la ApoE4 en el contexto de la A β

La ApoE juega un papel esencial a la hora de regular los niveles de péptido A β cerebrales, así como su deposición y aclaramiento[285;286]. De este modo, los procesos que regulan la expresión y estado funcional de ApoE podrían afectar a su capacidad para influir sobre la homeostasis de A β . La ApoE es la principal lipoproteína del cerebro siendo sintetizada y secretada principalmente por los astrocitos, pero también por la microglia[287] dentro de partículas lipídicas de tipo alta densidad (**HDL**) unilaminares[288]. Aunque la ApoE4 se encuentra fuertemente ligada a la patología de AD, su modo de actuación resulta desconocido. Se han propuesto algunos mecanismos[288-312].

A través de sus interacciones con el péptido A β , la ApoE4 podría aumentar la deposición de esta proteína en placas y disminuir su aclaramiento. La ApoE se une a lípidos principalmente a través de la acción de la *ATP-binding cassette transporter* (**ABC1**) (y otros transportadores relacionados, que actúan en una variedad de tipos celulares para transferir tanto lípidos como colesterol a ApoE)[313;314] y de esta forma ApoE actúa en el intercambio de lípidos a través del cerebro. El estado lipídico es un parámetro funcional importante, que gobierna su conformación[315], la estabilidad intrínseca[313;314] y las interacciones con los receptores de membrana[316;317]. ApoE se une a A β y este punto también está influido por el

estado lipídico de ApoE[318]. Los estudios con ratones transgénicos para APP han demostrado los efectos específicos de isoforma de ApoE sobre la propensión del depósito de A β a ser depositado en el cerebro (E4 > E3 > E2), la naturaleza de los depósitos y una influencia relacionada con la dosificación del gen sobre la magnitud de estos efectos[319]. El estado lipídico de ApoE constituye también un determinante significativo de que su interacción con A β da lugar a la liberación de péptidos del cerebro o, alternativamente, a la formación de fibrillas y a su deposición en placas[318;320-322]. Tres estudios independientes han informado que la inactivación del gen de ABCA1 en ratones transgénicos que expresan APP resultaba en la reducción de niveles de ApoE. Estos ratones exhiben una elevación aparentemente paradójica de los niveles de péptido A β doblando la carga de placas A β sin efecto significativo sobre la generación de A β [323-325]. Las formas lipidadas de la ApoE actúan para aumentar el aclaramiento de los péptidos A β del cerebro. Los receptores hepáticos X (**LXRs**) son factores de transcripción activados mediante ligando que inducen la expresión de ApoE, ABCA1 y otros genes del metabolismo lipídico[326].

La LOAD esporádica es la forma más común de la enfermedad y el único factor genético establecido es poseer uno o más alelos ApoE ϵ 4[327;328]. La ApoE está implicada como un regulador crítico respecto a la propensión de A β a depositarse dentro del cerebro. La expresión de APP en ratones con ausencia del gen apoE murino tiene como resultado una incapacidad para desarrollar placas amiloideas compactas pero exhiben niveles elevados de péptido A β dentro del cerebro[329]. Sorprendentemente, cuando se obliga la expresión de isoformas de ApoE en estos animales, se produce un retraso en el comienzo de la deposición de placas y una reducción significativa en la carga de placa con manifestación isoforma específica (E2 > E3 > E4) y gen dosis dependiente[330]. Estos datos sugieren que ApoE influye sobre la deposición de A β y promueve el aclaramiento de A β , con la isoforma ApoE4 la menos efectiva de las tres para facilitar el recambio de estos péptidos del cerebro. La afectación edad-dependiente de los mecanismos de homeostasis de A β se han propuesto como determinantes críticos para el riesgo de la enfermedad. Los péptidos A β se generan normalmente a niveles altos en el cerebro y

son aclarados a una velocidad equivalente tanto en humanos como en ratones[331]. Así, incluso reducciones modestas en el aclaramiento de A β soluble podrían resultar en una elevación de los niveles de péptidos A β y finalmente su deposición dentro del cerebro. El aclaramiento de los péptidos A β del cerebro se lleva a cabo a través de su degradación proteolítica dentro del cerebro y con su eliminación a través de la barrera hematoenzimática[332]. ApoE promueve el aclaramiento de A β del cerebro principalmente a través de mecanismos proteolíticos intrínsecos. La importancia fisiológica de la proteólisis intrínseca de A β se ha demostrado in vivo.

El cerebro posee un aclaramiento intrínseco robusto de A β [332]. Los péptidos A β se degradan proteolíticamente dentro del cerebro principalmente mediante la neprilisina (**Nep**)[333] y enzimas que degradan la insulina (**Ide**)[334]. Los ratones en los que se han inactivado genéticamente Nep o Ide exhiben mayores niveles de A β y un aumento de la deposición de placas en el cerebro[333;335;336]. La inactivación genética de estos genes[335;337] o la administración de inhibidores de estas proteinasas dentro del cerebro resultan en una elevación sustancial de los niveles de A β en el cerebro y la inducción de la deposición de placa[338]. Por otra parte, la sobreexpresión de Ide o neprilisina hacen descender los niveles de A β y reducen la formación de placa[339;340]. Se ha argumentado que la vía predominante de aclaramiento de A β del cerebro es a través de degradación proteolítica ya que este péptido no se exporta eficientemente a través de la red de vascularización[341]. La microglía, macrófagos residentes en el cerebro, juegan un papel esencial en el aclaramiento de A β a través de su habilidad para atrapar y degradar formas fibrilares y solubles de A β [342]. Tanto la microglia como los astrocitos secretan proteinasas, incluyendo Ide, que median la degradación de péptidos A β en el entorno extracelular[343].

A pesar de los considerables esfuerzos realizados, los mecanismos celulares a través de los cuales la ApoE influye en el aclaramiento de A β permanecen sin resolver. Parece que la ApoE actúa para facilitar la degradación proteolítica de A β . Sin embargo, la ApoE podría actuar a través de otras vías que podrían implicar o no a A β .

2.6.1.2. Neuropatología de ApoE4 independiente de A β : escisión de ApoE en neuronas

La inducción de la síntesis de ApoE en neuronas se ha sugerido que protege a las neuronas del daño o promueve la reparación intraneuronal y el mantenimiento de las conexiones sinaptodendríticas[344;345]. Sin embargo, cuando es sintetizada por las neuronas, la ApoE puede ser escindida mediante una proteasa y los fragmentos son desfavorables para los procesos de mantenimiento y reparación[346;347]. Los cerebros de los pacientes de AD y los ratones transgénicos que expresan ApoE en las neuronas del SNC poseen fragmentos truncados del extremo C-terminal (29 y 15–20 kDa) de ApoE. En ratones, la acumulación de fragmentos de ApoE4 hace pico en a los 6-7 meses de edad, coincidiendo con la aparición de cambios neurodegenerativos en el cerebro y déficits significativos de aprendizaje y memoria[347].

La expresión de ApoE4 (1-272) en neuronas posee varios efectos: neurotoxicidad[305;348], translocación de los fragmentos dentro del citosol[349] y acumulación de los fragmentos en estructuras citoplasmáticas filamentosas (Tau fosforilada y ovillos neurofibrilares) y en la mitocondria[349;350].

2.7. α -2-MACROGLOBULINA (A2M)

La A2M, una glicoproteína sérica, es el principal inhibidor de proteinasas plasmáticas con una gran especificidad[351]. A2M es, como la α -1-Antitripsina, α -2-Antiplasmina y Antitrombina III, un inhibidor de proteasa. Inhibe a una gran cantidad de proteasas, incluyendo a tripsina, trombina y colagenasa[352].

La secuencia codificante predice un polipéptido de 1.451 aminoácidos. La A2M humana es un tetrámero de 4 subunidades idénticas organizadas como pares de dímeros, cada uno de los cuales consiste en 2 monómeros ligados mediante puentes disulfuro. La proteína posee una región atractora para proteasas plasmáticas compuesta por enlaces peptídicos y un enlace ester-tiol el cual, una vez hidrolizado, da lugar a un enlace covalente entre las proteasas y la A2M.

De la comparación de secuencias de las subunidades de A2M humana con los de las proteínas C3 y C4[353]concluyeron que estas 3 proteínas, que poseen un ester tiol β cisteinil γ glutamil activable, poseen un origen evolutivo común. C5 también presenta homología de secuencia con A2M.

El gen de A2M se expande aproximadamente 48 kb y está compuesta por 36 exones. Los rangos de tamaño de los intrones varían de 125 a 7.5 bp. El gen de A2M está presente en una única copia en el genoma haploide. El homólogo en ratón con 36 exones, codifica por una secuencia de DNA de 4.8 kb en cDNA[354].

2.7.1. Deficiencia de A2M

Se identificó deficiencia en A2M, mediante electroinmunoensayo[352], en un hombre de 37 años, su madre y una hija. Las personas deficientes eran, aparentemente, heterocigotos. No existía ninguna desventaja clínica de esta deficiencia.

2.6.2. Asociación con AD

A2M ha sido implicado con AD basándose en su habilidad para mediar el aclaramiento y degradación de A β a través de su receptor, el receptor de lipoproteína de baja densidad (**LRP**)[355]. Se ha sugerido[356] que la LRP podría mediar la endocitosis y degradación del APP secretada lo que sugería una relación en la vía metabólica de las dos moléculas implicada en la AD.

In vivo se demostraba que LRP1 era necesario para el aclaramiento de A β 40 y A β 42, via mecanismo de captación celular mediado por receptor[357]. El análisis post-mortem de tejidos cerebrales humanos demostró que la expresión de LRP decrece normalmente con la edad y que la expresión de LRP en cerebros con AD fue significativamente menor en pacientes con AD. Dentro del grupo AD, los mayores niveles de LRP se correlacionaron con una edad de inicio para AD posterior y exitus. La expresión reducida de LRP resultaba en un factor de riesgo para padecer AD, posiblemente impidiendo el aclaramiento de A β soluble. Así LRP y sus ligandos, la ApoE y α -2-Macroglobulina, se encontraban todos genéticamente asociados a AD.

Analizando una delección en el gen de A2M en la posición 5' del sitio de escisión del exón 18[358] y se encontró que la transmisión de la delección, designada A2M-2, confería aumento en el riesgo de padecer AD (Mantel-Haenzel *odds ratio*=3.56, *p*=0.001). El test de desequilibrio de portadores (*sibship disequilibrium test (SDT)*) también reveló una asociación significativa entre A2M y AD. Estos valores fueron comparables a los obtenidos con el alelo de ApoE4 para la misma muestra, pero al contrario que con ApoE4, A2M-2 no afectaba a la edad de comienzo. La observación que asociaba a A2M con AD no parecía contribuir al ligamiento previamente publicado con AD respecto al cromosoma 12. Así, la A2M, el receptor de A2M (**LRP1**) y los genes de otros 2 ligandos de LRPs: ApoE y APP, habían sido vinculados genéticamente a AD, sugiriendo que estas proteínas podrían participar de la vía neuropatológica común que da lugar a la enfermedad. Se encontró asociación entre el polimorfismo V1000I (**rs669**) y AD[359].

En una muestra robusta de casos y controles no se encontró asociación entre AD y A2M-2, o genotipos que contengan A2M-2[360].

Utilizando los mismos métodos de asociación basados en familias algunos autores[361;362] no pudieron replicar la asociación. Más aún, fueron incapaces de documentar cualquier efecto biológico del alelo A2M-2 sobre: el splicing del RNA de A2M, la masa molecular de la proteína monomérica, los niveles de proteína en el cerebro, o los portadores plasmáticos de A2M-2[363]. Concluyeron que, en la anterior evidencia genética para una susceptibilidad del locus para AD en el cromosoma 12, objeto del estudio, posiblemente se partirían de otras variaciones genéticas distintas a la del alelo A2M-2 concurrentes en la misma vía (LRP, ApoE).

En un editorial el editor de la revista *Nature Genetics* apuntaba a las dificultades para evaluar los resultados de los estudios de asociación[364] y dejaba sin resolver temas fundamentales: el umbral de significación para una verdadera asociación (especialmente a la luz de los test para múltiples hipótesis agravado por los errores inherentes a las asociaciones positivas), cómo analizar de la mejor manera un conjunto de datos y qué constituiría una refutación válida. Sugirieron que se requerirían trabajos que informaran sobre asociaciones genéticas y que incluyeran una estimación del efecto del tamaño y que incluyese o bien una réplica en una muestra independiente o datos fisiológicos significativos que diesen apoyo al papel funcional del polimorfismo en cuestión.

De la resecuenciación del locus de A2M resultó la identificación de 7 nuevos polimorfismos[365]. Utilizando una muestra completa de 1439 individuos de 437 familias, encontró significación para asociación genética en la delección de 5-bp y dos de los nuevos polimorfismos y la AD. Se detectó desequilibrio de ligamiento sustancial a lo largo del gen como conjunto y el análisis de haplotipos también mostraron asociación significativa entre AD y los grupos de polimorfismos de A2M. Algunos de estos polimorfismos y haplotipos permanecieron significativamente asociados con AD incluso después de efectuar la corrección de multiplicidad de test. Los datos apoyaban un papel potencial para A2M o un gen cercano en la AD.

Un estudio chino[366] no encontró asociación en 6 polimorfismos de A2M (5-prime UTR /G, rs226379; T/G, rs226380, intron 6 A/C; exon 24 A/G; intron 27 A/G; intron 4 T/C, rs3759277) con AD en un estudio de 216 casos de LOAD y 200 sujetos control de una población China. La comparación de frecuencias alélicas, genotípicas y de haplotipo para los polimorfismos de A2M no reveló diferencias significativas entre pacientes y controles.

2.7.3. Polimorfismo [A2M, V1000I (rs669)] y susceptibilidad a padecer AD

Mediante secuenciación genómica directa de los dos exones que codifican por la región atractora de proteasas y de la región que codifica el sitio ester-tiol en 30 individuos sanos y 30 pacientes con enfermedad pulmonar crónica, se descubrió una secuencia polimórfica cerca del sitio ester-tiol del gen, cambiando V1000 (GTC) por Ile (ATC); los dos alelos poseen frecuencias alélicas de 0.30 y 0.70, respectivamente[367]. No se encontraron diferencias en los niveles de A2M para estos dos alelos.

El inhibidor de proteinasa A2M se encuentra asociado a las placas seniles en la AD. A2M ha sido implicada bioquímicamente en la unión y degradación de proteína A β . En la exploración inicial de un conjunto de datos (90 controles y 171 casos de AD),[359] observaron un aumento de la frecuencia de genotipo [G/G] de 0.07 en controles y 0.12 en sujetos con AD. En otro conjunto de datos independientes de 359 controles y 566 pacientes de AD se realizó un estudio de cohortes y se obtuvieron los mismo resultados (0.07 y 0.12). La odds ratio para AD asociada con el genotipo [G/G] fue de 1.77 pero combinándolo con ApoE4 fue de 9.68.

En un estudio de 148 pacientes del sur de Italia con AD esporádica, encontraron un aumento del genotipo [V/V] en comparación con el grupo control, dando lugar a una odds ratio de 3.58 para el desarrollo de la enfermedad[368]. En combinación con el genotipo polimórfico del promotor de la mieloperoxidasa, -463G/G, la odds ratio se incrementaba hasta 23.29. Los autores sugerían que el efecto sinérgico de los

2 genotipo podría representar una ayuda para la deposición de A β o un descenso de su aclaramiento. Los hallazgos fueron independientes para el estatus ApoE4.

OBJETO DEL ESTUDIO

3. OBJETO DEL ESTUDIO

1. Desarrollar un método automatizado para facilitar la búsqueda de una asociación entre la enfermedad de Alzheimer de comienzo tardío (**LOAD**) y el polimorfismo intrónico del extremo 3' del exón 8 del gen de la Presenilina 1 (*SNP cluster report rs165932*)(I).

2. Realizar un estudio basado en casos clínicos para determinar la prevalencia del polimorfismo intrónico de PS-1 y su relación con los polimorfismos de la ApoE respecto a LOAD en un área rural del sureste de España, cuya población ha permanecido relativamente estable (II).

Este estudio sería complementado con un metanálisis centrado en el genotipo PS-1 [2/2] del citado polimorfismo (II).

3. Llevar a cabo un estudio del polimorfismo V1000I (*SNP cluster report rs669*) en el gen de la α -2-Macroglobulina y la susceptibilidad de padecer LOAD.

**SUJETOS,
MATERIAL Y
METODOS**

4. SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Descripción general de los sujetos estudiados

El estudio de los sujetos se llevó a cabo durante el periodo 2001-2002; aunque este periodo se prolongó hasta 2005 para la clasificación definitiva de los pacientes con diagnóstico incierto. Todos los pacientes y controles fueron reclutados a través de la sección de neurología del Hospital Comarcal del Noroeste, en Caravaca de la Cruz (Murcia) que da cobertura sanitaria a una población rural. Tanto pacientes como controles referían ser descendientes de antepasados que habitaban la comarca del Noroeste Murciano. Esta área no ha sido expuesta a la presión de la inmigración hasta hace pocos años. El análisis genético se llevó a cabo en el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, en Murcia.

Se realizó un censo previo para fijar la prevalencia de procesos demenciales. Durante los doce meses previos al inicio del estudio se recogieron los datos de todos los pacientes ambulatorios de la consulta de Neurología, lo que abarcaba al total de los pacientes en seguimiento (tanto casos incidentes como prevalentes).

Todos los pacientes cumplían con los criterios NINCDS-ADRDA[369] para enfermedad de Alzheimer probable. Los pacientes con otros deterioros cognitivos (alcohol, enfermedad tiroidea, déficit vitamínico, etc.) que pudieran confundirse con enfermedad de Alzheimer fueron descartados. El grupo control consistió en pacientes con enfermedad no demencial y sin antecedente familiares. Los grupos de pacientes y controles, en el momento de ser incorporados en el estudio, no presentaron diferencias en cuanto a edad y género. Se obtuvo de todos los pacientes un documento de consentimiento informado para la participación en este estudio y para la toma de muestras de sangre. En torno al 25% de los pacientes tenían un miembro de la familia afectado por la AD, de manera que asumimos que el riesgo para el desarrollo de AD en estos casos sería más estrechamente relacionada con la edad que a un componente familiar, por lo tanto, estos casos no fueron excluidos de la estudio.

4.1.1. Subpoblaciones del presente estudio

4.1.1.1. Estudio II.a.

Los genotipos de la Apolipoproteína E y sus frecuencias alélicas, así como el SNP rs165932 para el polimorfismo intrónico del extremo 3' del exón 8 del gen de la Presenilina 1, fueron determinados en 85 pacientes con LOAD y 86 controles. En el momento de ser introducidos en el estudio tanto pacientes como controles no presentaron diferencias en cuanto a edad (media±DS: LOAD 75.59±5.92, controles 73.69±7.34; t-test, P<0.05) o género (50.90% vs. 60.20% de mujeres con AD y mujeres control respectivamente; χ^2 test, p=0.68).

4.1.1.2. Estudio II.b.

Para el meta-análisis se siguieron las directrices de colaboración de la Cochrane[370]. La búsqueda se realizó a través de Pubmed utilizando las palabras "Presenilin", "intronic", "Alzheimer", "late" y "onset" (Enero 2007). Para ampliar la búsqueda se realizó una revisión de los artículos citados en los metanálisis existentes. En un intento de controlar el sesgo de selección (grupos no comparables debido a cómo se eligieron los pacientes o sujetos) los datos publicados se agruparon en función de los grupos de AD con diagnóstico de AD probable o posible según los criterios NINCDS-ADRDA[369] o CERAD[371]. Se excluyeron el resto de demencias no AD. Los artículos seleccionados incluían las tres frecuencias fenotípicas de los polimorfismos de PS-1[244], mientras que no aportaban datos duplicados[213;244;247;252]. Como grupos control utilizamos los que establecieron los autores (tabla 1).

A raíz de la revisión de los artículos surgieron algunos problemas. Lo más evidente fue el punto de corte para la edad de inicio para LOAD establecido en 65 años. Catorce de los estudios seleccionados, aproximadamente el 40%, incluía pacientes clasificados como LOAD pero menores de 65 años de edad. Decidimos no

excluir estos artículos del metanálisis. Solamente se excluyeron los grupos de AD cuando presentaban sujetos con AD mixta[246]. Finalmente, también fueron excluidos aquellos artículos cuyos grupos control no se encontraban en equilibrio de Hardy–Weinberg (HWE)[232;239] (tabla 1.).

Tabla 1. Estudios utilizados en el metanálisis (II)

Author	Año	Edad (CutOff)	Grupos analizados	Estudio de edad: años (SD)	Mujeres (%)	Criterio AD	Esporádico/Familiar
Wragg (USA)	1996	53 (7'3 +/-8'9)	208 LOAD	76'9 (8'8)	58%	NINCDS-ADRD	Esporádico y familiar
			185 Controles		58%	Probable-Posible	
			29 LOAD (afroA)	77'2 (9'6)	72%		
			50 Controles afroA	72'0 (7'8)	77%		
			32 LOADf	81'1 (7'3)	78%		
Perez-Tur (Francia)	1996	Comienzo media 73	147 LOAD (*)	?	70%	?	?
			78 Controles (*)	81 (?)	67%		
Kehoe (UK + USA)	1996	65	87 Cardiff AD	76'40 (?) – comienzo 67'4	51'72%	NINCDS-ADRD	47% primer grado
			114 London AD	83'25 (?) – comienzo 76'3	76'31%	Probable	47% primer grado
			72 (81?) Controles	76'20 (?)	58'33%		
			191 US controles				
Higuchi (Japon)	1996	65	27 EOAD + 79 LOAD	Global AD 76 (?)	?	Clínico	Esporádico
			186 Controles	Pareados edad	??		
Isoe (Japon)	1996	65	104 LOAD	78'2 (7'7)	?	NINCSD-ADRD	Esporádico y familiar
			19 EOAD	64'0 (7'0)	?	Probable	
			8 EOAD f	68'0 (7'1)	?	DSM – IV – R	
			38 VD	73'4 (9'4)	?		
			21 Alcohol	68'0 (7'9)	?		
			101 Controles	62'8 (14'7)	?		
Scott (USA)	1997	65	112 LOADf	Familia (n=151) 75'1 (8'2)	65%	NINCDS-ADRD	Esporádico y familiar
			298 LOADs (*)	Esporádico (n=458) 73'6 (8'1)	62%		
			220 Controles (*)	Controles (n=317) > 50 (?)	53%		
			36 EOADf				
			144 EOADs				
			295 Controles				
Singleton (UK)	1997	65	94 LOAD (*)	81'6 (0'6)	?	Clínico previo	?
			79 Controles (*)	79'5 (0'8)	?	Neuropatológico	
			26 EOAD	63'1 (1'3)	?		
			29 Controles	65'1 (0'5)	?		
Brookes (UK)	1997	?	81 EOAD	58'8 (5'1)	58%	NINCDS-ADRD/DSM-III-R	31 casos familiares
			152 Controles	58'0 (9'9)	38%	Probable-Posible	

Author	Año	Edad (CutOff)	Grupos analizados	Estudio de edad: años (SD)	Mujeres (%)	Criterio AD	Esporádico/Familiar
Nishiwaki (Japon)	1997	65	100 LOAD (*)	79'3 (7'0)	70'30%	NINCDS-ADRDA	Esporádico
			229 Controles (*)	81'7 (7'7)	20'00%		
			49 EOAD	EOAD (n=57) 58'9 (4'9)	64'91%		
			57 Controles	Controles (n=100) 57'2 (4'0)	68'00%		
Matsushita (Japon)	1997	?	106 LOAD	76 (?)	?	NINCDS-ADRDA Probable	Esporádico?
			86 VD	78 (?)	?	NINCDS-AIREN	
			186 Controles	75 (?)	?		
Lendon (Australia)	1997	<65 or 70	106 EOAD	68'1 (7'38)	56'00%	NINCDS-ADRDA	Esporádico y familiar
			171 Controles	54'9 (6'41)	57'00%	Probable-Posible	
						Histopatológico definitivo	
Aldudo (España)	1997	Aprox 58	114 LOAD	71 (?)	?	NINCDS-ADRDA	Esporádico
		(68 +/-5)	156 Controles	72 (7)	?	Probable	
Tysoe (UK)	1997	65	129 LOAD	82'06 (6'74)	64'34%	Histopatológico definitivo	?
			199 LOAD (Desconocido)	83'58 (7'13)	62'81%		
			54 EOAD	66'38 (7'36)	44'44%		
			Controles grupo uno	85'55 (7'11)	68'42%		
			Controles grupo dos	66'80 (15'01)	39'02%		
			(ambos agrupados, n=215)				
Sorbi (Italia)	1997	65	27 FAD PS-1	?	?	Histopatológico y Clínico	Esporádico y familiar
			10 FAD PS-2	?	?		
			26 FAD APP	?	?		
			20 FAD Desconocido	?	?		
			72 LOAD Esporádico	60'2 (5'5) edad de comienzo	?		
			80 Controles	80'8 (24'5)	?		
Ezquerria (España)	1997	65	79 LOAD	Global AD comienzo 64'26 (?)	?	NINCDS-ADRDA	Esporádico y familiar
			95 EOAD		?	Probable	
			147 Controles	Controles 66'40 (?)			
Helisalmi (Finlandia)	1997	60?	219 LOAD	78 (9)	67%	NINCDS-ADRDA	Esporádico
			104 Controles	71 (10)	85%	Probable	
Korovaitseva (Rusia)	1997	65	62 LOAD	?	?	NINCDS-ADRDA	?
			66 Controles	?	?	?	
			60 EOAD	?	?		
			44 Controles	?	?		
Cai (China)	1997	60	102 Clínica AD	?	?	NINCDS-ADRDA	Esporádico?
			20 Población AD	?		Probable-Posible	
			256 Controles	>60			
Yamada (Japon)	1997	Global rango 62 - 103	36 AD	84'5 (7'7)		CERAD protocolo	Esporádico
			101 Controles	85'1 (8'0)		Neuropatológico	
Sodeyama (Japon)	1998	?	36 LOAD	Mediana 87'5 rango 62-95	?	NINCDS-ADRDA	Esporádico
			86 Controles	Mediana 85'5 rango 65-101	?	DSM-III-R y Neuropatológico	

Author	Año	Edad (CutOff)	Grupos analizados	Estudio de edad: años (SD)	Mujeres (%)	Criterio AD	Esporádico/Familiar
Taddei (Australia)	1998	65 ?	210 LOAD	80 (rango 65-95)	61%	NINCDS-ADRDA	?
			51 EOAD	60 (rango 34-73)	43%	Probable	
			442 Controles	75 (rango 51-93)	50%		
Hu (China)	1998	Elderly – 64?	55 LOAD	76'28 (6'41)	49%	NINCDS-ADRDA	?
			93 Controles	79'76 (86'31)	35%	Probable	
Kowalska (Polonia)	1998	?	63 Probable AD	Edad media comienzo 74	?	NINCDS-ADRDA	Esporádico
			34 Posible AD	Rango 69-86	?	Probable-Posible	
			43 Controles	Rango 78-94	?		
Wang (USA)	1998	52?	427 AD	75'3 (8'5) Comienzo 68'6 (8'3)	63%	?	?
			250 Controles	66'7 (7'8)	54%		
Scacchi (Italia)	1999	?	85 LOAD (*)	86'1 (3'8)	76'5%	NINCDS-ADRDA / DSM-III-R	Esporádico
			156 Controles (*)	83'8 (3'2)	58'3%	Probable	
Van Duijn (Holanda)	1999	65	102 EOAD	63 (4'4)	?	NINCDS-ADRDA	Esporádico
			118 Controles	63 (4'4)	?		(familiar excluido)
Liao (USA)	1999	?	85 LOAD	81'44 (10'33)	?	CERAD protocolo	?
			18 Controles	73'28 (21'58)	?	Histopatológico definitivo	
Bagli (Alemania)	1999	70	102 AD	74'4 (10'3)	68'00%	NINCDS-ADRDA	?
			191 Controles	70'6 (11'4)	51'83%		PPsPP Esporádico
			160 Depresión	68'0 (7'7)	66'00%		
Yasuda (Japon)	1999	65	158 LOAD	75'7 (6'0)	52'54%	NINCDS-ADRDA	Esporádico
			158 Controles	75'7 (6'3)	52'54%	Probable	
			59 EOAD	62'1 (4'9)	67'72%		
			59 Controles	61'8 (4'8)	67'72%		
Combarros (España)	1999	65	157 LOAD + 54 EOAD	AD (n=211) 75'0 (9'4)	67%	NINCDS-ADRDA	?
			188 Controles	Controles 79'6 (8'1)	70%	Probable	
Wu (China)	1999	?	91 AD	Edad comienzo 69'2 (8'6)	?	DSM – III – R	Esporádico
			50 VD	Edad comienzo 67'4 (9'0)	?		
			73 Controles	68'6 (6'3)	?		
Tilley (UK)	1999	55	177 LOAD	81'6 (8'6) rango 55-101	62'15%	CERAD protocol	Esporádico
			118 Controles	72'8 (8'7) rango 58-94	31'35%	Histopatológico definitivo	
Rodríguez Martin (Italia)	2000	65	91 LOAD (*)	76'1 (?)	69'23%	NINCDS-ADRDA	Desconocido
			30 EOAD	64'6 (?)	50'00%	Probable/Posible	
			121 VD	83'5 (?)	69'12%	Modificado Hachinsky	
			18 Mixta	76'9 (?)	50'00%		
			125 Controles (*)	79'6 (?)	63'43%		
Romás (Caribe)	2000	55	93 LOAD	79'1 (?)	Global 73%	NINCDS-ADRDA	Familiar y pedigree
			45 Controles	73'1 (?)		Probable-Posible	
Cui (China)	2000	?	42 LOAD	74'4 (12'8)	50'92%	NINCDS-ADRDA	?
			108 Controles	74'4 (14'1)	47'62%	Probable-Posible	
Kim (Corea)	2000	65	59 LOAD +			NINCDS-ADRDA	Esporádico
			+ 41 EOAD	70'4 (7'6) (Edades globales)	?	DSM-IV	
			199 Controles	67'0 (7'5)	?		

4.1.1.3. Estudio del polimorfismo V1000I (rs669) en el gen de la α -2-Macroglobulina.

Determinamos este genotipo y sus frecuencias alélicas para el polimorfismo V1000I (rs669) del gen de la A2M en 95 controles y 75 pacientes con AD.

En el momento de ser introducidos en el estudio tanto pacientes como controles no presentaron diferencias en cuanto a edad (media \pm DS: LOAD 75.73 \pm 4.88, controles 71.72 \pm 7.48; t-test, $P < 0.05$) o género (53.68% vs. 68.00% de mujeres con AD y mujeres control respectivamente; χ^2 test, $p = 0.083$).

4.2. Análisis Genético

Se purificó DNA genómico a partir de 200 µL de sangre total utilizando *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Diagnostics GmbH).

4.2.1. Análisis de genotipado de las formas alélicas de ApoE

Se llevó a cabo mediante análisis de PCR en tiempo real con el sistema de PCR *LightCycler* (Roche Diagnostics GmbH) y el kit *ApoE Mutation Detection Kit* disponible comercialmente para *LightCycler*.

4.2.2. Determinación de las formas alélicas del polimorfismo intrónico del extremo 3' del exón 8 de PS-1

Se realizó como se describió previamente en I del modo siguiente:

El volumen de reacción fue de 10 µL conteniendo 2 µL de DNA (30–60 ng), 0.5 µM de cada uno de los cebadores (sentido 5' CAC CCA TTT ACA AGT TTA GC3', descrito por Wragg[210]; antisentido 5' GAT AAA TTC TAC ACT GAT T3'), 1 µL de tampón de reacción (*LightCycler FastStart DNA master hybridization probes 10xbuffer*; Roche Diagnostics GmbH), 2 mM de MgCl₂ y 0.25 µL de cada sonda. La sonda de detección se marcó en su extremo 3' con fluoresceína (5' GCT TTT TCCAGC TCT CAT TTA CTC CTG3' fluoresceína). La sonda de anclaje (LC Red 640 5' AAG TAT TTG AGA AGG ATA TTG AAT T3' extremo fosforilado) se marcó con *LightCycler Red 640* en el extremo 5' y se modificó en el extremo 3' mediante fosforilación para bloquear su extensión.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

Preincubación a 95° C, 10 segundos, desnaturalización a 95° C, 10 segundos;

45 ciclos de: desnaturalización a 95°, 10 segundos, 20° C/s; alineamiento/unión a cebador a 45° C, 10 segundos, 20° C/s; extensión/elongación de la cadena 72° C, 10 segundos, 20° C/s.

El análisis de la curva de fusión se compone de 1 ciclo a 95° C, 0 segundos y 40° C durante 10 segundos, seguido de un aumento de la temperatura de 65° C a 0,1° C/s.

La señal de fluorescencia (**F**) se monitoriza de modo continuo durante la rampa de temperatura y después se representa frente a la temperatura (**T**). Esta curva se transformó en las derivadas de las curvas de fusión $[(dF/dT) \text{ vs } T]$ (figura 9.) Las condiciones de la PCR fueran las mismas que las del protocolo de Wragg[210], excepto para el cebador antisentido, mencionado anteriormente.

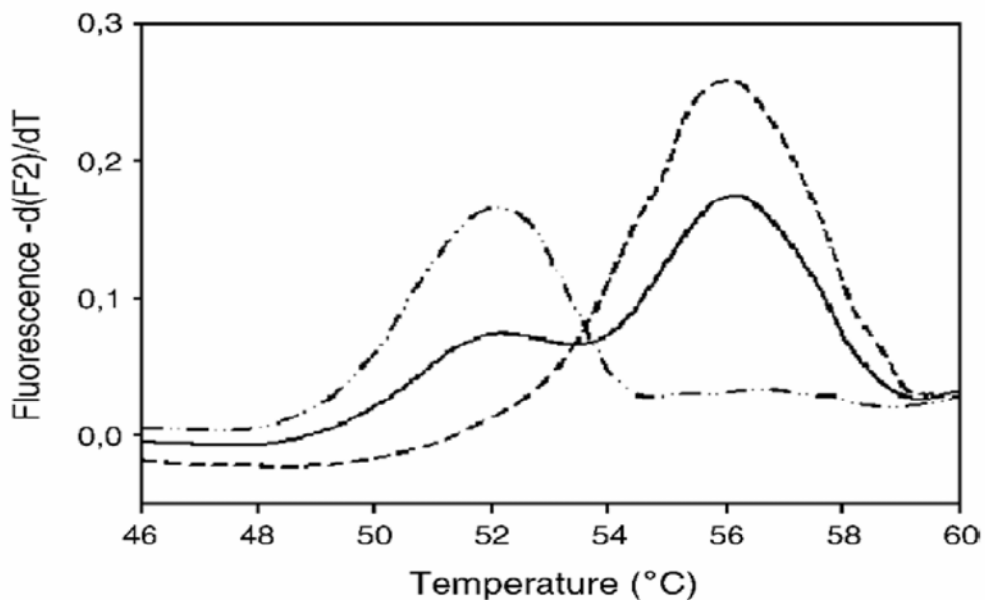


Figura 9. Derivada primera de la señal de fluorescencia frente a las temperaturas (°C) de fusión $(-d(F2)/dT)$ de los distintos genotipos del polimorfismo intrónico de PS1 [1/1] (· · · · ·), [1/2] (—), y [2/2] (- - - -) respectivamente (I).

4.2.3. Determinación de las formas alélicas del polimorfismo V1000I (rs669) del gen de la α -2-Macroglobulina

Este análisis se llevó a cabo siguiendo las especificaciones que se citan en el artículo de Gibson[363] para el polimorfismo V1000I (rs669) y son las siguientes:

La reacción se llevó a cabo en 20 µL de tampón estándar que contenía 15 pmol de cada cebador (sentido 5'CTCTGCCATGCAAAACACAC3', antisentido 5'TGGAAATCCAGTTGAATAACATT3'), 0.5 U de *Taq DNA polymerase* (Roche Diagnostics GmbH), 200 µmol/L de cada desoxinucleótido y 200 ng de DNA de cada sujeto.

Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes:

Desnaturalización inicial, 94° C, 5 minutos.

35 ciclos de: alineamiento/unión a cebador a 58° C, 20 segundos; extensión/elongación de la cadena 72° C, 30 segundos; desnaturalización a 94° C, 30 segundos.

El fragmento amplificado de 217 pares de bases fue digerido durante la noche a 37° C con 2.5 U de NdeII (Roche Diagnostics GmbH). Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa pura (3%) y tampón TBE (TRIS: 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol, Borato, EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético) y para la visualización de las bandas se hizo uso de bromuro de etidio (Bromuro de 2,7-diamino-10-etil-6-fenilfenantridinio). La presencia de dos bandas de 129 y 88 pares de bases, respectivamente, indicaba la presencia de la variante alélica I1000, mientras que el producto no escindido sería indicativo de la variante V1000.

4.3. Cálculos estadísticos

Los cálculos estadísticos se llevaron a cabo mediante el programa *SPSS* para *Windows*, versión 11.5.1.

El nivel de significación se estableció en $p < 0.05$ para todos los análisis.

Las distribuciones fenotípicas se estudiaron mediante los cálculos de la *odds ratio* (**OR**), utilizando para ello el test de χ^2 para tablas de 2 x 2, para un intervalo de confianza (**IC**) del 95%.

Las relaciones entre los diferentes polimorfismos de PS-1 y el alelo epsilon 4 de la ApoE fueron analizadas utilizando tablas de contingencia bivariadas y por capas aplicando el análisis de Mantel Haenszel para encontrar la OR. Para el modelo de regresión logística binaria, el nivel de significación de cada variable se estableció utilizando un valor a valor de significación a priori del 10%.

Para el metanálisis se utilizó el programa de la *Cochrane Collaboration's Review Manager Program: RevMan* version 4.2.8 para Windows, Oxford, 2005. Las frecuencias fenotípicas estaban en consonancia con un equilibrio de HWE teniendo en cuenta las recomendaciones concernientes a los errores propios del test de χ^2 [372], de modo que se utilizó el programa Arlequín[373].

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Automatización del análisis de las formas alélicas del polimorfismo intrónico del extremo 3' del exón 8 de PS-1

El nuevo método de discriminación alélica arroja idénticos resultados a los obtenidos mediante el método de RFLP (I).

5.2. Estudios de epidemiología genética

Las frecuencias genotípicas de los diferentes estudios se encontraban en concordancia con un equilibrio de Hardy-Weinberg (**HWE**) tanto en pacientes como en controles.

5.2.1. Estudio del alelo ϵ 4 del gen de la ApoE

Se encontró relación entre la presencia de al menos un alelo ϵ 4 y LOAD (OR 4.01, 1.93–8.34, χ^2 test, $p=0.0001$).

5.2.2. Estudio del genotipo PS-1 [2/2] ([CC/CC])

Se encontró una OR de 2.38 (1.07–5.29, χ^2 test, $p=0.03$) para el genotipo 2/2 (tabla 2.). No se encontraron diferencias significativas respecto a la edad de comienzo de la demencia y los diferentes genotipos ([1/1]: 71.05 ± 7.60 ; [1/2]: 73.18 ± 5.72 ; [2/2]: 72.95 ± 6.16 , ANOVA, $p=0.48$), ni siquiera cuando se agrupaban (test t: [2/2] vs. [1/2+1/1], $p=0.81$).

Tabla 2. Distribución global de los genotipos de PS1 estratificados por la casuística del alelo apoE ε4

- (1) LOAD vs control x PS-1 [2/2] vs PS-1 ([1/1]+[1/2]): $\chi^2 = 4.71$, $df=1$, $p=0.030$
 (2) ApoE ε4 OR $\chi^2 = 14.78$, $df=1$, $p=0.0001$
 (3) El genotipo PS-1 [2/2] aumenta el riesgo de padecer LOAD en los sujetos apoE ε4 negativos ($\chi^2 = 3.94$, $df=1$, $p=0.047$).

		PS-1 GENOTIPO									
		[1/1]		[1/2]		[2/2]		[1/1]+[1/2]		[2/2]	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Global											
	LOAD	18	21.2	45	53.0	22	25.9	63	74.1	22	25.9(1)
	Control	25	29.1	50	58.1	11	12.8	75	87.2	11	12.8
ApoE estratificado(2)											
ApoE ε4-	LOAD	10	20.8	25	52.1	13	27.1	35	73.9	13	27.1(3)
	Control	20	28.2	42	59.2	9	12.7	62	87.3	9	13.7(3)
ApoE ε4+	LOAD	7	20.0	20	57.1	8	22.9	27	77.1	8	22.9
	Control	4	30.8	7	53.9	2	15.4	11	84.6	2	15.4

5.2.3. Relación entre el genotipo PS-1 [2/2] y el alelo ApoE ε4

Al analizar la distribución de genotipos estratificados por la existencia de al menos un alelo ApoE ε4, se encontró una relación significativa entre el genotipo PS-1 [2/2] y el desarrollo de LOAD, en ausencia de alelo ApoE ε4 (test $\chi^2=3.94$; $p=0.047$) (tabla 2.). Después de aplicar la corrección de Bonferroni, como

corrección de test múltiple, la significación estadística desapareció ($p=0.094$), por ello ApoE épsilon 4 y PS-1 [2/2] podrían considerarse como factores de riesgo independiente para LOAD.

Lo anteriormente expuesto obligó a efectuar un análisis de regresión logística binaria, en el cual el hecho de ser paciente o control fue establecido con una variable dependiente y los dos factores subsiguientes fueron establecidos con variables independientes dicotómicas, a saber, tener o no un alelo $\epsilon 4$ y la presencia o ausencia del genotipo [2/2]. La OR ajustada fue de 4.03 (2.16–7.53) para $\epsilon 4$ y 2.31 (1.14–4.67) para el genotipo PS-1 [2/2]. La probabilidad estimada de encontrar el genotipo [2/2] fue de 0.22; en caso del alelo 4 fue de 0.45; y la probabilidad conjunta de alelo $\epsilon 4$ y genotipo 2/2 fue de 0.62. Ambas variables fueron estadísticamente significativas (test de Wald, $\epsilon 4$: $p=0.0002$, y genotipo [2/2]: $p=0.049$).

5.2.4. Metanálisis de la literatura

Los estudios publicados frecuentemente se encuentran agrupados en grupos étnicos ya que cuanto mayor sea la muestra, mayor la significación estadística. Inicialmente se decidió concentrar los artículos en bloques continentales: Europa, Estados Unidos de America, Asia, dos grupos adicionales más con individuos afro-americanos y un estudio australiano (figura 10.). En este estudio se consideraron conjuntamente los genotipos [1/1] y [1/2] vs. [2/2].

El test de heterogenicidad de χ^2 , llevó a la elección de un modelo de efectos aleatorios. Globalmente no se observó significación estadística entre el genotipo [2/2] y el desarrollo de la enfermedad. Para el grupo Europeo, el genotipo [2/2] se encontraba asociado a incremento de 1.19 veces en el riesgo de AD (IC=1.00–1.41). En este particular grupo, si se hubiera seguido un modelo de efectos fijos, como sugería el test de heterogeneidad χ^2 , se hubiera obtenido una OD de 1.18 (IC=1.02–1.37). En el grupo USA se observó un efecto protector del genotipo PS-1 [2/2] frente a la posibilidad de desarrollar AD (OR: 0.79, 0.64–0.98). Finalmente, el grupo asiático no mostró diferencias significativas (OR 0.79, 0.54–1.17).

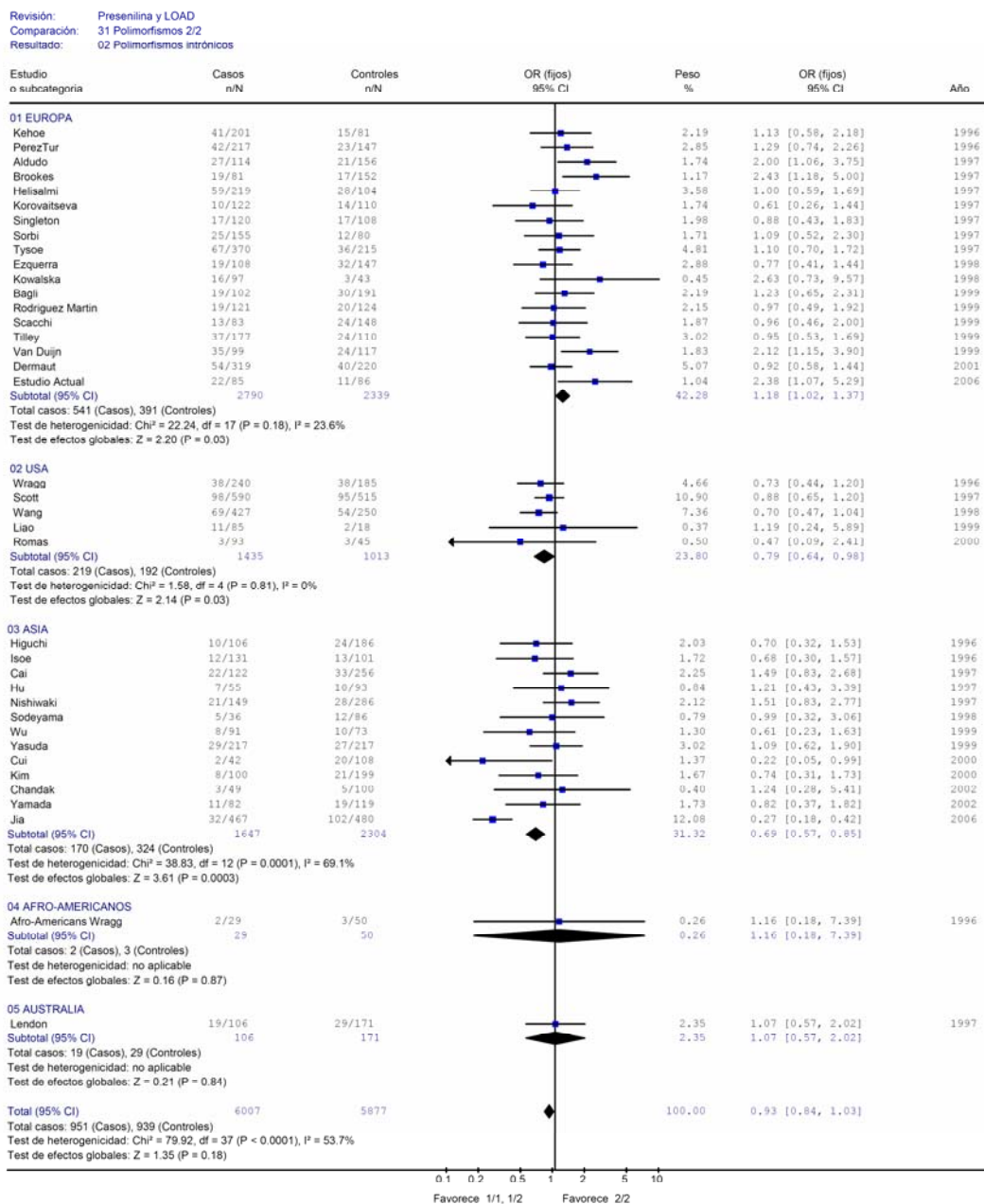


Figura 10. Metanálisis para los efectos del genotipo PS-1 [2/2] y el riesgo de padecer LOAD en los estudios ordenados OR respecto a los distintos continentes (aplicando el modelo de efectos aleatorios).

5.2.5. Estudio del alelo V del polimorfismo V1000I (rs669) del gen de la α -2-Macroglobulina

Se encontró que la frecuencia del alelo V no revelaba diferencias entre controles y pacientes con AD (AD vs. control: $\chi^2=0.18$, $p=0.78$, OR=0.78 (0.24–2.48)). Tampoco se encontraron diferencias significativas respecto a la edad de comienzo de la demencia y los diferentes genotipos ([I/I]: 71.57 ± 2.29 ; [I/V]: 72.22 ± 2.58 ; [V/V]: 74.20 ± 3.56 , ANOVA, $p=0.72$), ni siquiera cuando se agrupaban para alelo V (test t: sólo [I/I] vs. [I/V]+[V/V], $p=0.56$).

No se encontró ningún efecto cuando se estratificó para la presencia ($\chi^2=0,001$; $p=1,00$) o ausencia ($\chi^2=0,19$; $p=0.69$) de alelo épsilon 4, o al aplicar un modelo de regresión logística (Wald = 2,18; $p=0,14$).

DISCUSSION

6. DISCUSION

6.1. Genotipo [2/2] de PS-1

Los resultados de nuestro estudio atribuyen una mayor importancia a los genotipos estudiados de PS-1 en la AD respecto a lo que previamente se conocía. Más aún, en nuestra muestra, se ha visto que la presencia del genotipo [2/2] multiplica por un número superior a 2 el riesgo de padecer LOAD, un efecto mantenido independientemente del alelo $\epsilon 4$, alcanzando significación estadística a pesar del pequeño tamaño muestral. Los resultados sugieren que el genotipo [2/2] podría desempeñar algún papel, como ya se había publicado anteriormente[215;215;226] e incluso para la EOAD[219;238].

6.2. Relación del genotipo [2/2] de PS-1 con el alelo $\epsilon 4$

En nuestra muestra, el genotipo [2/2] se muestra como factor de riesgo independiente para AD frente al alelo epsilon 4, lo que sugiere un efecto combinado de estos dos genes a la hora de desarrollar LOAD. El pequeño tamaño de nuestra muestra evidentemente limita la significación de los resultados y el ajuste de Bonferroni influye sobre la significación estadística de los resultados, aumentando la probabilidad del error β . Sin embargo, el modelo de regresión logística parece suficientemente valido para considerar ambos genes independientes, pero actuando como factores sinérgicos.

En Europa, el genotipo [2/2] de PS-1 es más prevalente en pacientes con AD que en los controles, especialmente en población española. Por el contrario este genotipo se muestra como factor protector para las poblaciones norte americana y asiática.

Jia et al.[248] han expuesto que el alelo 1 en el gen PS-1 es un factor de susceptibilidad en población del norte de China. Este estudio y el nuestro analizan la

asociación del polimorfismo PS-1 descrito con la LOAD en poblaciones genéticamente homogéneas. Parece existir un factor de riesgo a padecer AD, ligado a etnicidad (es decir otros genes) y/o estilo de vida y que se relaciona con el polimorfismo intrónico de PS-1.

Sin embargo, todos los metanálisis publicados deberían tratarse con precaución, debido a la posibilidad de errores[374] y a la necesidad de contar con “subconjuntos válidos” de pacientes[375]. Por esta razón algunos autores han estudiado los casos de LOAD y EOAD juntos. El punto de corte para el comienzo del LOAD de 65 años es únicamente una edad arbitraria heredada de clasificaciones clínicas pretéritas. Si se hace una revisión atenta de los rangos de edad publicados se observa que existen límites de edad inferiores a 65 años. El resultado de este criterio de edad de comienzo es que se oculta un error en la selección de pacientes respecto a las diferentes publicaciones existentes. Ocurre lo mismo con la distribución de géneros (este hecho se utiliza para verificar la homogeneidad en los estudios casos-control). Manejamos artículos con prevalencias para hombres o mujeres, o sencillamente el dato no existe y por lo tanto no se puede asumir que todos los artículos poseen la misma fuerza en el análisis.

El concepto de AD familiar no se establece rigurosamente. En algunos casos, sólo se sugiere. Podría ser que estuviéramos estudiando AD esporádica con miembros afectados o AD familiar.

Los estudios de alta calidad requieren la existencia de grupos control compatibles con un HWE. Sin embargo, tratamos con enfermedades en un estadio tardío de la vida, donde los polimorfismos genéticos podrían comportarse como causantes de mortalidad. Por ello es improbable que exista un grupo control representativo concurrente con un HWE ya que muchos de los individuos portadores podrían haber desaparecido[376].

El agrupamiento de individuos basado en la etnicidad no se puede considerar como un método adecuado para obtener muestras mayores. En un determinado país, podrían existir varias diferencias étnicas debido a ciertas realidades históricas, por lo

que harían falta más criterios para seleccionar subconjuntos de pacientes válidos[224].

Otro factor que debería tener cierta influencia sobre los resultados del metanálisis es la gran variación entre la práctica clínica diaria y lo que se acaba confirmando en estudio anatomopatológico postmortem. Así, una demencia basada en el diagnóstico clínico podría considerarse como otra forma de alcanzar una mayor homogeneidad en los estudios seleccionados. Los criterios clínicos más ampliamente utilizados son los NINCDS-ADRDA[377]. Por otra parte cabe distinguir entre AD probable y posible, a pesar de que muchos estudios han confirmado la existencia entre una correlación de estos criterios con hallazgos anatomopatológicos establecidos[378]. Una AD posible puede enmascarar diversos tipos de demencia, lo que aumentaría el número de casos estudiados y también disminuiría la veracidad de la muestra.

El metanálisis más reciente está disponible en la red[254]. Desde el punto de vista estadístico, el estudio de distribución de las frecuencias alélicas tiende a aumentar la cantidad total de variables analizadas influyendo sobre la significación estadística. Más aún, la existencia de enfermedades homocigóticas o heterocigóticas pasaría desapercibida si sólo se considera este criterio de análisis.

Finalmente, un error común suele ser la reticencia de muchos investigadores a publicar resultados que estén en desacuerdo con los publicados anteriormente o que no se encuentren en revistas indexadas. Quizá, en estos trabajos no se han empleado tamaños muestrales adecuados para alcanzar la significación estadística significativa para el genotipo [2/2] ya que el diseño del estudio estaba orientado hacia la prevalencia del genotipo [1/1].

6.3. Genotipo [V/V] del polimorfismo V1000I (rs669) del gen de la α -2-Macroglobulina

Aunque no existe un metanálisis exhaustivo de este polimorfismo y teniendo en cuenta todo lo dicho anteriormente, en relación con la AD, la mayoría de los

estudios clínicos del alelo V del polimorfismo V1000I (rs669) del gen de la α -2-Macroglobulina frente al riesgo de padecer AD no muestran riesgo asociado al genotipo [V/V] (tabla 3., 21/32 estudios[379]).

Tabla 3. Extracto de la tabla que aparece en <http://www.alzgene.org/geneoverview.asp?geneid=52> de los estudios del genotipo [V/V] del polimorfismo V1000I (rs669) del gen de la α -2-Macroglobulina. Aparecen en primer lugar la etnia caucásica sin relleno, la asiática en amarillo y otras étnias/mezclas en verde[379].

Estudio	Poblacion	# Sujetos (% Mujeres)	Edad de comienzo (rango)	Edad (rango)	# Sujetos (% Mujeres)	Edad (rango)	Resultados
Clarimon, 2003	España	112 -73%	-	76.7 + 5.4	89 -52%	74.8 + 5.2	Negativo
Colacicco, 2007	Italia	169 -63%	69.5 + 9.7 (-)	69.4 + 5.2	264 -55%	71.7 + 7 (-)	Negativo
Depoylu, 2006	Alemania	271 -37%	-	70.7 + 9.6	280 -31%	66.9 + 10.6	Positivo
Gibson, 2000	UK	195 -66%	-	79.8 (57-98)	107 -58%	79 (60-100)	Tiende
Higuchi, 2000	Desconocido	85 -56%	-	77.6 + 7.3	65 -46%	60.9 + 14.8	Negativo
Janka, 2002	Hungría	53 -68%	69 + 4.2 (-)	73 + 6.2 (-)	51 -73%	72 + 7 (-)	Negativo
Koster, 2000	Holanda	456 -71%	76.5 + 6.6 (-)	- 76.1 + 7.1	358 -58%	74.5 + 4.4 (-)	Negativo
Mariani, 2006	Italia	100 -74%	-	(-)	136 -74%	72.9 + 7.3 (-)	Negativo
McIlroy, 2001	Irlanda	219 -67%	75.1 (-)	77.5 + 6 (-)	237 -70%	77.2 + 6.1 (-)	Negativo
Myllykangas, 1999	Finlandia	114 -82%	87.2 + 4.4 (-)	2.7 (-)	204 -80%	88.1 + 2.7 (-)	Positivo
Nacmias, 2001	Italia	179 (-)	66.7 + 6.3 (-)	- 79.2 + 7.3	98 (-)	74.5 + 25.1 (19-106)	Negativo
Nicosia, 2001	Italy	100 -75%	-	(-)	49 -63%	68.3 + 9.2 (-)	Negativo
Poduslo, 2002	USA	398 -67%	69.4 + 8.5 (44-92)	-	216 (-)	-	Negativo

Estudio	Poblacion	# Sujetos (% Mujeres)	Edad de comienzo (rango)	Edad (rango)	# Sujetos (% Mujeres)	Edad (rango)	Resultados
Singleton, 1999	UK	213 -64%	-	79.2 + 0.6	116 -54%	78.9 + 10.8	Tiende
Styczynska, 2003	Polonia	100 -66%	71 + 4.6 (-)	76.4 + 4.7 (-)	100 -58%	74.2 + 6.6 (-)	Negativo
Wang, 2001	USA	555 -68%	71.3 + 6.1 (-)	77.4 + 6.7 (-)	446 -68%	75.7 + 4.9 (-)	Negativo
Wavrant-DeVrieze, 1999	UK	119 (-)	-	-	114 (-)	-	Negativo
Wavrant-DeVrieze, 1999	USA (I)	329 (-)	-	-	487 (-)	-	Negativo
Wavrant-DeVrieze, 1999	USA (II)	136 (-)	-	-	145 (-)	-	Negativo
Wavrant-DeVrieze, 1999	Francia	616 (-)	-	-	648 (-)	-	Negativo
Zappia, 2004	Italia	148 -61%	-	71.3 + 7.4 (-)	158 -54%	74.1 + 6.7 (-)	Positivo
Zill, 2000	Alemania	88 -57%	-	73 + 9 (-)	118 -53%	47 + 12 (-)	Negativo
Bian, 2005	China	216 (-)	74.7 (-)	-	200 (-)	-	Negativo
Chen, 2004	China	158 -53%	69.4 + 9.4 (-)	-	195 -45%	70 + 7.8 (-)	Tiende
Higuchi, 2000	Japón	426 -73%	-	76.2 + 9 (-)	382 -69%	74 + 5.6 (-)	Negativo
Shibata, 2000	Japón	111 (-)	-	69.6 + 10.4 (-)	95 (-)	69.8 + 9.3 (-)	Negativo
Tang, 2002	China	114 -61%	69.4 + 7.8 (-)	74.6 + 7.5 (39-91)	190 -55%	55.8 + 15.5 (33-95)	Positivo
Crawford, 1999	USA	295 -56%	73.1 + 6.4 (-)	-	113 -62%	72.7 + 7.7 (-)	Negativo
Poduslo, 2002	USA	181 (-)	-	-	146 (-)	-	Tiende
Poduslo, 2002	USA (NIMH)	51 -63%	68.5 + 4.9 (59-81)	-	20 -60%	77.4 + 6 (66-87)	Positivo
Saunders, 2003	USA (NIMH)	-	-	-	-	-	Positivo
Romas, 2000	USA Caribe	100 (-)	74.4 + 9.5 (42-90)	-	47 (-)	-	Positivo

Solamente se puede adivinar cierta relación estratificando por grupos étnicos, excluyendo a caucásicos y asiáticos (3/5 estudios muestran riesgo asociado al genotipo [V/V]) o sería más propio decir que no se encuentra relación estratificando por continentes dado que dos estudios USA, que se consideran como caucásicos, arrojan un resultado negativo; como se ha dicho anteriormente, haría falta un análisis más profundo.

Nuestro estudio se encuentra en la misma tendencia que la mayoría de los caucásicos (18/23 no muestran riesgo asociado al genotipo [V/V]); a pesar del limitado número de casos.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. La nueva aproximación automatizada para la determinación del polimorfismo intrónico rs165932 ahorra tiempo y trabajo y permite un análisis a gran escala. Gracias a su robustez, velocidad y precisión este ensayo es muy adecuado para la determinación del polimorfismo para cualquier cantidad de muestras, haciéndolo muy útil en el trabajo rutinario y para solventar la controversia sobre el citado polimorfismo.

2. Las conclusiones que podrían extraerse de los resultados del metanálisis son las siguientes: En Europa, el genotipo [2/2] de PS-1 es más prevalente en pacientes con LOAD que en los controles, especialmente en población española. Por el contrario, este genotipo se muestra como factor protector para la población norteamericana.

3. En cuanto a la relación entre los polimorfismos de genotipo PS-1 [2/2] y del alelo ApoE epsilon 4: se pueden considerar ambos genes como independientes para el riesgo de padecer LOAD, pero actuando como factores sinérgicos (efecto combinado de estos dos genes a la hora de desarrollar LOAD).

4. Los resultados obtenidos para el polimorfismo alélico ApoE ε4 y el riesgo de desarrollar LOAD son similares a los encontrados en la literatura.

5. Los resultados obtenidos para el polimorfismo alélico V1000I y el riesgo a desarrollar LOAD son negativos (similares a los encontrados en la mayoría de estudios en poblaciones europeas), así como su relación con el alelo ApoE ε4.

BIBLIOGRAFIA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. R.D. Terry and R.Katzman, Senile dementia of the Alzheimer type, *Ann. Neurol.* 14 (1983) 497-506.
2. A.F. Jorm, Cross-national comparisons of the occurrence of Alzheimer's and vascular dementias, *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 240 (1991) 218-222.
3. P.H. Davis, V. Hachinski. «Epidemiology of cerebrovascular disease». En: C.G. Gottfries, R. Lewy, G. Clincke, L. Tritsmans (Eds.). *Diagnostic and therapeutic assessments in Alzheimer's disease*. Chicago: Wrightson Biomedical Publishing, 1991. In: 2009.
4. W.A. Rocca, A.Hofman, C.Brayne, M.M.Breteler, M.Clarke, J.R.Copeland, J.F.Dartigues, K.Engedal, O.Hagnell, T.J.Heeren, and ., Frequency and distribution of Alzheimer's disease in Europe: a collaborative study of 1980-1990 prevalence findings. The EURODEM-Prevalence Research Group, *Ann. Neurol.* 30 (1991) 381-390.
5. A. Hofman, W.A.Rocca, C.Brayne, M.M.Breteler, M.Clarke, B.Cooper, J.R.Copeland, J.F.Dartigues, D.A.da Silva, O.Hagnell, and ., The prevalence of dementia in Europe: a collaborative study of 1980-1990 findings. Eurodem Prevalence Research Group, *Int. J. Epidemiol.* 20 (1991) 736-748.
6. A. Lobo, L.J.Launer, L.Fratiglioni, K.Andersen, A.Di Carlo, M.M.Breteler, J.R.Copeland, J.F.Dartigues, C.Jagger, J.Martinez-Lage, H.Soininen, and A.Hofman, Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. *Neurologic Diseases in the Elderly Research Group, Neurology.* 54 (2000) S4-S9.
7. A. Lobo, P.Saz, G.Marcos, J.L.Dia, and C.De la Camara, The prevalence of dementia and depression in the elderly community in a southern European population. The Zaragoza study, *Arch. Gen. Psychiatry.* 52 (1995) 497-506.
8. P.S. Lopez, R.J.Llinas, F.J.Vilalta, and d.P.Lozano Fernandez, The prevalence of dementia in Girona, *Neurologia.* 10 (1995) 189-193.
9. F.J. Garcia Garcia, M.I.Sanchez Ayala, M.A.Perez, C.E.Martin, A.C.Marsal, F.G.Rodriguez, C.C.Garcia, R.L.Romero, M.J.Rodriguez Barqueroa, and A.G.Gutierrez,[The prevalence of dementia and its main subtypes in subjects older than 65 years: impact of occupation and education. The Toledo Study] *Prevalencia de demencia y de sus subtipos principales en sujetos mayores de 65 anos: efecto de la educacion y ocupacion. Estudio Toledo, Med. Clin. (Barc.).* 116 (2001) 401-407.

10. D.W. Kay, The epidemiology of dementia: a review of recent work., *Reviews in Clinical Gerontology* 1 (1991) 55-56.
11. R. Katzman, C. Kawas. «The epidemiology of dementia and Alzheimer disease». En: R.D. Terry, R. Katzman, K.L. Bick (Eds.). *Alzheimer disease*. New York: Raven Press, 1994. In: 2009.
12. K. Andersen, L.J.Launer, M.E.Dewey, L.Letteneur, A.Ott, J.R.Copeland, J.F.Dartigues, P.Kragh-Sorensen, M.Baldereschi, C.Brayne, A.Lobo, J.M.Martinez-Lage, T.Stijnen, and A.Hofman, Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies. EURODEM Incidence Research Group, *Neurology*. 53 (1999) 1992-1997.
13. F. Bermejo-Pareja, J.Benito-Leon, S.Vega, M.J.Medrano, and G.C.Roman, Incidence and subtypes of dementia in three elderly populations of central Spain, *J. Neurol. Sci.* 264 (2008) 63-72.
14. A.F. Jorm, A.E.Korten, and A.S.Henderson, The prevalence of dementia: a quantitative integration of the literature, *Acta Psychiatr. Scand.* 76 (1987) 465-479.
15. W.A. Rocca, S.Bonaiuto, A.Lippi, P.Luciani, F.Turtu, F.Cavarzeran, and L.Amaducci, Prevalence of clinically diagnosed Alzheimer's disease and other dementing disorders: a door-to-door survey in Appignano, Macerata Province, Italy, *Neurology*. 40 (1990) 626-631.
16. L. Liu, X.E.Guo, Y.Q.Zhou, and J.L.Xia, Prevalence of dementia in China, *Dement. Geriatr. Cogn Disord.* 15 (2003) 226-230.
17. C.M. van Duijn, D.G.Clayton, V.Chandra, L.Fratiglioni, A.B.Graves, A.Heyman, A.F.Jorm, E.Kokmen, K.Kondo, J.A.Mortimer, and ., Interaction between genetic and environmental risk factors for Alzheimer's disease: a reanalysis of case-control studies. EURODEM Risk Factors Research Group, *Genet. Epidemiol.* 11 (1994) 539-551.
18. J. Lindsay, D.Laurin, R.Verreault, R.Hebert, B.Helliwell, G.B.Hill, and I.McDowell, Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging, *Am. J. Epidemiol.* 156 (2002) 445-453.
19. M. Ganguli, H.H.Dodge, C.Shen, R.S.Pandav, and S.T.Dekosky, Alzheimer disease and mortality: a 15-year epidemiological study, *Arch. Neurol.* 62 (2005) 779-784.
20. A. Heyman, W.E.Wilkinson, B.J.Hurwitz, M.J.Helms, C.S.Haynes, C.M.Utley, and L.P.Gwyther, Early-onset Alzheimer's disease: clinical predictors of institutionalization and death, *Neurology*. 37 (1987) 980-984.

21. G.L. Wenk, Neuropathologic changes in Alzheimer's disease, *J. Clin. Psychiatry.* 64 Suppl 9 (2003) 7-10.
22. D.W. Dickson, The pathogenesis of senile plaques, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56 (1997) 321-339.
23. J.T. Jarrett, E.P. Berger, and P.T. Lansbury, Jr., 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.* 32 (1993) 4693-4697.
24. C.A. Lemere, J.K. Blusztajn, H. Yamaguchi, T. Wisniewski, T.C. Saido, and D.J. Selkoe, Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation, *Neurobiol. Dis.* 3 (1996) 16-32.
25. I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Y.C. Tung, M. Quinlan, H.M. Wisniewski, and L.I. Binder, Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83 (1986) 4913-4917.
26. K.S. Kosik, C.L. Joachim, and D.J. Selkoe, Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83 (1986) 4044-4048.
27. K. Vosseller, L. Wells, and G.W. Hart, Nucleocytoplasmic O-glycosylation: O-GlcNAc and functional proteomics, *Biochimie.* 83 (2001) 575-581.
28. K. Iqbal, A.C. Alonso, C.X. Gong, S. Khatoon, J.J. Pei, J.Z. Wang, and I. Grundke-Iqbal, Mechanisms of neurofibrillary degeneration and the formation of neurofibrillary tangles, *J. Neural Transm. Suppl.* 53 (1998) 169-180.
29. R.D. Terry, L.A. Hansen, R. DeTeresa, P. Davies, H. Tobias, and R. Katzman, Senile dementia of the Alzheimer type without neocortical neurofibrillary tangles, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 46 (1987) 262-268.
30. T. Tabira, d.H. Chui, H. Nakayama, S. Kuroda, and M. Shibuya, Alzheimer's disease with spastic paresis and cotton wool type plaques, *J. Neurosci. Res.* 70 (2002) 367-372.
31. G.G. Glenner and C.W. Wong, Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122 (1984) 1131-1135.
32. G.G. Glenner and C.W. Wong, Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120 (1984) 885-890.

33. N. Suzuki, T.Iwatsubo, A.Odaka, Y.Ishibashi, C.Kitada, and Y.Ihara, High tissue content of soluble beta 1-40 is linked to cerebral amyloid angiopathy, *Am. J. Pathol.* 145 (1994) 452-460.
34. M.C. Herzig, D.T.Winkler, P.Burgermeister, M.Pfeifer, E.Kohler, S.D.Schmidt, S.Danner, D.Abramowski, C.Sturchler-Pierrat, K.Burki, S.G.van Duinen, M.L.Maat-Schieman, M.Staufenbiel, P.M.Mathews, and M.Jucker, Abeta is targeted to the vasculature in a mouse model of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis, *Nat. Neurosci.* 7 (2004) 954-960.
35. N.K. Robakis, N.Ramakrishna, G.Wolfe, and H.M.Wisniewski, Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84 (1987) 4190-4194.
36. R.E. Tanzi, J.F.Gusella, P.C.Watkins, G.A.Bruns, P.George-Hyslop, M.L.Van Keuren, D.Patterson, S.Pagan, D.M.Kurnit, and R.L.Neve, Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus, *Science.* 235 (1987) 880-884.
37. D.J. Selkoe, M.B.Podlisny, C.L.Joachim, E.A.Vickers, G.Lee, L.C.Fritz, and T.Oltersdorf, Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85 (1988) 7341-7345.
38. R. Sandbrink, C.L.Masters, and K.Beyreuther, Beta A4-amyloid protein precursor mRNA isoforms without exon 15 are ubiquitously expressed in rat tissues including brain, but not in neurons, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 1510-1517.
39. T. Oltersdorf, P.J.Ward, T.Henriksson, E.C.Beattie, R.Neve, I.Lieberburg, and L.C.Fritz, The Alzheimer amyloid precursor protein. Identification of a stable intermediate in the biosynthetic/degradative pathway, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 4492-4497.
40. P. Ponte, P.Gonzalez-DeWhitt, J.Schilling, J.Miller, D.Hsu, B.Greenberg, K.Davis, W.Wallace, I.Lieberburg, and F.Fuller, A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors, *Nature.* 331 (1988) 525-527.
41. N. Kitaguchi, Y.Takahashi, Y.Tokushima, S.Shiojiri, and H.Ito, Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity, *Nature.* 331 (1988) 530-532.

42. R.P. Smith, D.A.Higuchi, and G.J.Broze, Jr., Platelet coagulation factor XIa-inhibitor, a form of Alzheimer amyloid precursor protein, *Science*. 248 (1990) 1126-1128.
43. H.H. Slunt, G.Thinakaran, C.von Koch, A.C.Lo, R.E.Tanzi, and S.S.Sisodia, Expression of a ubiquitous, cross-reactive homologue of the mouse beta-amyloid precursor protein (APP), *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 2637-2644.
44. W. Wasco, K.Bupp, M.Magendantz, J.F.Gusella, R.E.Tanzi, and F.Solomon, Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 10758-10762.
45. A. Weidemann, G.Konig, D.Bunke, P.Fischer, J.M.Salbaum, C.L.Masters, and K.Beyreuther, Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein, *Cell*. 57 (1989) 115-126.
46. K. Sennvik, J.Fastbom, M.Blomberg, L.O.Wahlund, B.Winblad, and E.Benedikz, Levels of alpha- and beta-secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients, *Neurosci. Lett.* 278 (2000) 169-172.
47. F.S. Esch, P.S.Keim, E.C.Beattie, R.W.Blacher, A.R.Culwell, T.Oltersdorf, D.McClure, and P.J.Ward, Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor, *Science*. 248 (1990) 1122-1124.
48. S.S. Sisodia, E.H.Koo, K.Beyreuther, A.Unterbeck, and D.L.Price, Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing, *Science*. 248 (1990) 492-495.
49. K. Tagawa, T.Kunishita, K.Maruyama, K.Yoshikawa, E.Kominami, T.Tsuchiya, K.Suzuki, T.Tabira, H.Sugita, and S.Ishiura, Alzheimer's disease amyloid beta-clipping enzyme (APP secretase): identification, purification, and characterization of the enzyme, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177 (1991) 377-387.
50. R. Vassar, B.D.Bennett, S.Babu-Khan, S.Kahn, E.A.Mendez, P.Denis, D.B.Teplow, S.Ross, P.Amarante, R.Loeloff, Y.Luo, S.Fisher, J.Fuller, S.Edenson, J.Lile, M.A.Jarosinski, A.L.Biere, E.Curran, T.Burgess, J.C.Louis, F.Collins, J.Treanor, G.Rogers, and M.Citron, Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE, *Science*. 286 (1999) 735-741.
51. R. Yan, M.J.Bienkowski, M.E.Shuck, H.Miao, M.C.Tory, A.M.Pauley, J.R.Brashier, N.C.Stratman, W.R.Mathews, A.E.Buhl, D.B.Carter, A.G.Tomasselli, L.A.Parodi, R.L.Heinrikson, and M.E.Gurney, Membrane-

- anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity, *Nature*. 402 (1999) 533-537.
52. P. Seubert, T.Oltersdorf, M.G.Lee, R.Barbour, C.Blomquist, D.L.Davis, K.Bryant, L.C.Fritz, D.Galasko, L.J.Thal, and ., Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide, *Nature*. 361 (1993) 260-263.
 53. S.S. Sisodia, Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 6075-6079.
 54. A. Kamal, A.Almenar-Queralt, J.F.LeBlanc, E.A.Roberts, and L.S.Goldstein, Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP, *Nature*. 414 (2001) 643-648.
 55. C. Haass, C.A.Lemere, A.Capell, M.Citron, P.Seubert, D.Schenk, L.Lannfelt, and D.J.Selkoe, The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway, *Nat. Med.* 1 (1995) 1291-1296.
 56. M.O. Grimm, H.S.Grimm, A.J.Patzold, E.G.Zinser, R.Halonen, M.Duering, J.A.Tschape, B.De Strooper, U.Muller, J.Shen, and T.Hartmann, Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-beta and presenilin, *Nat. Cell Biol.* 7 (2005) 1118-1123.
 57. E.H. Koo and S.L.Squazzo, Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 17386-17389.
 58. E.H. Koo, S.S.Sisodia, D.R.Archer, L.J.Martin, A.Weidemann, K.Beyreuther, P.Fischer, C.L.Masters, and D.L.Price, Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 1561-1565.
 59. B.V. Zlokovic, Cerebrovascular transport of Alzheimer's amyloid beta and apolipoproteins J and E: possible anti-amyloidogenic role of the blood-brain barrier, *Life Sci.* 59 (1996) 1483-1497.
 60. M.J. Adler, C.Cornel, E.Shelton, J.E.Seegmiller, and N.N.Dewji, Increased gene expression of Alzheimer disease beta-amyloid precursor protein in senescent cultured fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (1991) 16-20.
 61. H. Zheng, M.Jiang, M.E.Trumbauer, D.J.Sirinathsinghji, R.Hopkins, D.W.Smith, R.P.Heavens, G.R.Dawson, S.Boyce, M.W.Conner, K.A.Stevens, H.H.Slunt, S.S.Sisoda, H.Y.Chen, and L.H.Van der Ploeg,

- beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity, *Cell*. 81 (1995) 525-531.
62. R.G. Perez, H.Zheng, L.H.Van der Ploeg, and E.H.Koo, The beta-amyloid precursor protein of Alzheimer's disease enhances neuron viability and modulates neuronal polarity, *J. Neurosci.* 17 (1997) 9407-9414.
 63. W.E. Van Nostrand, A.H.Schmaier, and S.L.Wagner, Potential role of protease nexin-2/amyloid beta-protein precursor as a cerebral anticoagulant, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 674 (1992) 243-252.
 64. G. Multhaup, A.Schlicksupp, L.Hesse, D.Beher, T.Ruppert, C.L.Masters, and K.Beyreuther, The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper(II) to copper(I), *Science*. 271 (1996) 1406-1409.
 65. M. Takahashi, S.Dore, C.D.Ferris, T.Tomita, A.Sawa, H.Wolosker, D.R.Borchelt, T.Iwatsubo, S.H.Kim, G.Thinakaran, S.S.Sisodia, and S.H.Snyder, Amyloid precursor proteins inhibit heme oxygenase activity and augment neurotoxicity in Alzheimer's disease, *Neuron*. 28 (2000) 461-473.
 66. F.W. van Leeuwen, D.P.de Kleijn, H.H.van den Hurk, A.Neubauer, M.A.Sonnemans, J.A.Sluijs, S.Koycu, R.D.Ramdjielal, A.Salehi, G.J.Martens, F.G.Grosveld, J.Peter, H.Burbach, and E.M.Hol, Frameshift mutants of beta amyloid precursor protein and ubiquitin-B in Alzheimer's and Down patients, *Science*. 279 (1998) 242-247.
 67. A. Goate, M.C.Chartier-Harlin, M.Mullan, J.Brown, F.Crawford, L.Fidani, L.Giuffra, A.Haynes, N.Irving, L.James, and ., Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease, *Nature*. 349 (1991) 704-706.
 68. D.M. Mann, T.Iwatsubo, H.Fukumoto, Y.Ihara, A.Odaka, and N.Suzuki, Microglial cells and amyloid beta protein (A beta) deposition; association with A beta 40-containing plaques, *Acta Neuropathol. (Berl)*. 90 (1995) 472-477.
 69. E. McGowan, F.Pickford, J.Kim, L.Onstead, J.Eriksen, C.Yu, L.Skipper, M.P.Murphy, J.Beard, P.Das, K.Jansen, M.Delucia, W.L.Lin, G.Dolios, R.Wang, C.B.Eckman, D.W.Dickson, M.Hutton, J.Hardy, and T.Golde, Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice, *Neuron*. 47 (2005) 191-199.
 70. M. Mullan, F.Crawford, K.Axelman, H.Houlden, L.Lilius, B.Winblad, and L.Lannfelt, A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid, *Nat. Genet.* 1 (1992) 345-347.

71. A. Rovelet-Lecrux, D.Hannequin, G.Raux, N.Le Meur, A.Laquerriere, A.Vital, C.Dumanchin, S.Feuillette, A.Brice, M.Vercelletto, F.Dubas, T.Frebourg, and D.Campion, APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy, *Nat. Genet.* 38 (2006) 24-26.
72. K. Sleegers, N.Brouwers, I.Gijselinck, J.Theuns, D.Goossens, J.Wauters, J.Del Favero, M.Cruts, C.M.van Duijn, and C.Van Broeckhoven, APP duplication is sufficient to cause early onset Alzheimer's dementia with cerebral amyloid angiopathy, *Brain.* 129 (2006) 2977-2983.
73. J. Theuns, N.Brouwers, S.Engelborghs, K.Sleegers, V.Bogaerts, E.Corsmit, T.De Pooter, C.M.van Duijn, P.P.De Deyn, and C.Van Broeckhoven, Promoter mutations that increase amyloid precursor-protein expression are associated with Alzheimer disease, *Am. J. Hum. Genet.* 78 (2006) 936-946.
74. N. Brouwers, K.Sleegers, S.Engelborghs, V.Bogaerts, S.Serneels, K.Kamali, E.Corsmit, E.De Leenheir, J.J.Martin, P.P.De Deyn, C.Van Broeckhoven, and J.Theuns, Genetic risk and transcriptional variability of amyloid precursor protein in Alzheimer's disease, *Brain.* 129 (2006) 2984-2991.
75. S. Kumar-Singh, C.De Jonghe, M.Cruts, R.Kleinert, R.Wang, M.Mercken, B.De Strooper, H.Vanderstichele, A.Lofgren, I.Vanderhoeven, H.Backhovens, E.Vanmechelen, P.M.Kroisel, and C.Van Broeckhoven, Nonfibrillar diffuse amyloid deposition due to a gamma(42)-secretase site mutation points to an essential role for N-truncated A beta(42) in Alzheimer's disease, *Hum. Mol. Genet.* 9 (2000) 2589-2598.
76. K. Ancolio, C.Dumanchin, H.Barelli, J.M.Warter, A.Brice, D.Campion, T.Frebourg, and F.Checler, Unusual phenotypic alteration of beta amyloid precursor protein (betaAPP) maturation by a new Val-715 --> Met betaAPP-770 mutation responsible for probable early-onset Alzheimer's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 4119-4124.
77. S. Kumar-Singh, A.Julliams, R.Nuydens, C.Ceuterick, C.Labeur, S.Serneels, K.Vennekens, P.Van Osta, H.Geerts, B.De Strooper, and C.Van Broeckhoven, In vitro studies of Flemish, Dutch, and wild-type beta-amyloid provide evidence for two-staged neurotoxicity, *Neurobiol. Dis.* 11 (2002) 330-340.
78. W.E. Van Nostrand, J.P.Melchor, H.S.Cho, S.M.Greenberg, and G.W.Rebeck, Pathogenic effects of D23N Iowa mutant amyloid beta - protein, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 32860-32866.
79. J. Davis, F.Xu, J.Miao, M.L.Previti, G.Romanov, K.Ziegler, and W.E.Van Nostrand, Deficient cerebral clearance of vasculotropic mutant Dutch/Iowa Double Ass in human AssPP transgenic mice, *Neurobiol. Aging.* . (2005).

80. J. Attems and K.A.Jellinger, Only cerebral capillary amyloid angiopathy correlates with Alzheimer pathology--a pilot study, *Acta Neuropathol. (Berl)*. 107 (2004) 83-90.
81. J. Hardy, Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease, *Trends Neurosci*. 20 (1997) 154-159.
82. M. Citron, T.Oltersdorf, C.Haass, L.McConlogue, A.Y.Hung, P.Seubert, C.Vigo-Pelfrey, I.Lieberburg, and D.J.Selkoe, Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production, *Nature*. 360 (1992) 672-674.
83. N. Suzuki, T.T.Cheung, X.D.Cai, A.Odaka, L.Otvos, Jr., C.Eckman, T.E.Golde, and S.G.Youngkin, An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants, *Science*. 264 (1994) 1336-1340.
84. P. George-Hyslop, J.Haines, E.Rogaev, M.Mortilla, G.Vaula, M.Pericak-Vance, J.F.Foncin, M.Montesi, A.Bruni, S.Sorbi, and ., Genetic evidence for a novel familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14, *Nat. Genet.* 2 (1992) 330-334.
85. C. Van Broeckhoven, H.Backhovens, M.Cruts, G.De Winter, M.Bruyland, P.Cras, and J.J.Martin, Mapping of a gene predisposing to early-onset Alzheimer's disease to chromosome 14q24.3, *Nat. Genet.* 2 (1992) 335-339.
86. M. Mullan, H.Houlden, M.Windelspecht, L.Fidani, C.Lombardi, P.Diaz, M.Rossor, R.Crook, J.Hardy, K.Duff, and ., A locus for familial early-onset Alzheimer's disease on the long arm of chromosome 14, proximal to the alpha 1-antichymotrypsin gene, *Nat. Genet.* 2 (1992) 340-342.
87. E. Levy-Lahad, W.Wasco, P.Poorkaj, D.M.Romano, J.Oshima, W.H.Pettingell, C.E.Yu, P.D.Jondro, S.D.Schmidt, K.Wang, and ., Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus, *Science*. 269 (1995) 973-977.
88. R. Sherrington, E.I.Rogaev, Y.Liang, E.A.Rogaeva, G.Levesque, M.Ikeda, H.Chi, C.Lin, G.Li, K.Holman, and ., Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease, *Nature*. 375 (1995) 754-760.
89. E.I. Rogaev, R.Sherrington, E.A.Rogaeva, G.Levesque, M.Ikeda, Y.Liang, H.Chi, C.Lin, K.Holman, T.Tsuda, and ., 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 (1995) 775-778.

90. E. Levy-Lahad, P.Poorkaj, K.Wang, Y.H.Fu, J.Oshima, J.Mulligan, and G.D.Schellenberg, Genomic structure and expression of STM2, the chromosome 1 familial Alzheimer disease gene, *Genomics*. 34 (1996) 198-204.
91. <http://www.alzforum.org/res/com/mut/pre/diagram2006.asp>.
92. <http://www.alzforum.org/res/com/mut/pre/diagram2.asp>.
93. J. Kim and R.Schekman, The ins and outs of presenilin 1 membrane topology, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 905-906.
94. X. Li and I.Greenwald, Membrane topology of the *C. elegans* SEL-12 presenilin, *Neuron*. 17 (1996) 1015-1021.
95. X. Li and I.Greenwald, Additional evidence for an eight-transmembrane-domain topology for *Caenorhabditis elegans* and human presenilins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 7109-7114.
96. H. Laudon, E.M.Hansson, K.Melen, A.Bergman, M.R.Farmery, B.Winblad, U.Lendahl, G.von Heijne, and J.Naslund, A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 35352-35360.
97. Y.S. Oh and R.J.Turner, Topology of the C-terminal fragment of human presenilin 1, *Biochemistry*. 44 (2005) 11821-11828.
98. G. Thinakaran, D.R.Borchelt, M.K.Lee, H.H.Slunt, L.Spitzer, G.Kim, T.Ratovitsky, F.Davenport, C.Nordstedt, M.Seeger, J.Hardy, A.I.Levey, S.E.Gandy, N.A.Jenkins, N.G.Copeland, D.L.Price, and S.S.Sisodia, Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo, *Neuron*. 17 (1996) 181-190.
99. M.S. Wolfe, W.Xia, C.L.Moore, D.D.L Leatherwood, B.Ostaszewski, T.Rahmati, I.O.Donkor, and D.J.Selkoe, Peptidomimetic probes and molecular modeling suggest that Alzheimer's gamma-secretase is an intramembrane-cleaving aspartyl protease, *Biochemistry*. 38 (1999) 4720-4727.
100. M.S. Shearman, D.Beher, E.E.Clarke, H.D.Lewis, T.Harrison, P.Hunt, A.Nadin, A.L.Smith, G.Stevenson, and J.L.Castro, L-685,458, an aspartyl protease transition state mimic, is a potent inhibitor of amyloid beta-protein precursor gamma-secretase activity, *Biochemistry*. 39 (2000) 8698-8704.
101. M.S. Wolfe, W.Xia, B.L.Ostaszewski, T.S.Diehl, W.T.Kimberly, and D.J.Selkoe, Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity, *Nature*. 398 (1999) 513-517.

102. M.S. Wolfe, A.J.De Los, D.D.Miller, W.Xia, and D.J.Selkoe, Are presenilins intramembrane-cleaving proteases? Implications for the molecular mechanism of Alzheimer's disease, *Biochemistry*. 38 (1999) 11223-11230.
103. Y.M. Li, M.Xu, M.T.Lai, Q.Huang, J.L.Castro, J.DiMuzio-Mower, T.Harrison, C.Lellis, A.Nadin, J.G.Neduvellil, R.B.Register, M.K.Sardana, M.S.Shearman, A.L.Smith, X.P.Shi, K.C.Yin, J.A.Shafer, and S.J.Gardell, Photoactivated gamma-secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1, *Nature*. 405 (2000) 689-694.
104. W.P. Esler, W.T.Kimberly, B.L.Ostaszewski, T.S.Diehl, C.L.Moore, J.Y.Tsai, T.Rahmati, W.Xia, D.J.Selkoe, and M.S.Wolfe, Transition-state analogue inhibitors of gamma-secretase bind directly to presenilin-1, *Nat. Cell Biol.* 2 (2000) 428-434.
105. A. Capell, J.Grunberg, B.Pesold, A.Diehlmann, M.Citron, R.Nixon, K.Beyreuther, D.J.Selkoe, and C.Haass, The proteolytic fragments of the Alzheimer's disease-associated presenilin-1 form heterodimers and occur as a 100-150-kDa molecular mass complex, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 3205-3211.
106. G. Yu, F.Chen, G.Levesque, M.Nishimura, D.M.Zhang, L.Levesque, E.Rogaeva, D.Xu, Y.Liang, M.Duthie, P.H.George-Hyslop, and P.E.Fraser, The presenilin 1 protein is a component of a high molecular weight intracellular complex that contains beta-catenin, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 16470-16475.
107. A. Weihofen, K.Binns, M.K.Lemberg, K.Ashman, and B.Martoglio, Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease, *Science*. 296 (2002) 2215-2218.
108. D.E. Kang, S.Soriano, X.Xia, C.G.Eberhart, B.De Strooper, H.Zheng, and E.H.Koo, Presenilin couples the paired phosphorylation of beta-catenin independent of axin: implications for beta-catenin activation in tumorigenesis, *Cell*. 110 (2002) 751-762.
109. L. Baki, J.Shioi, P.Wen, Z.Shao, A.Schwarzman, M.Gama-Sosa, R.Neve, and N.K.Robakis, PS1 activates PI3K thus inhibiting GSK-3 activity and tau overphosphorylation: effects of FAD mutations, *EMBO J.* 23 (2004) 2586-2596.
110. W. Song, P.Nadeau, M.Yuan, X.Yang, J.Shen, and B.A.Yankner, Proteolytic release and nuclear translocation of Notch-1 are induced by presenilin-1 and impaired by pathogenic presenilin-1 mutations, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 6959-6963.

111. M. Bentahir, O.Nyabi, J.Verhamme, A.Tolia, K.Horre, J.Wiltfang, H.Esselmann, and B.De Strooper, Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms, *J. Neurochem.* 96 (2006) 732-742.
112. A. Weidemann, S.Eggert, F.B.Reinhard, M.Vogel, K.Paliga, G.Baier, C.L.Masters, K.Beyreuther, and G.Evin, A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing, *Biochemistry.* 41 (2002) 2825-2835.
113. T. Sato, N.Dohmae, Y.Qi, N.Kakuda, H.Misonou, R.Mitsumori, H.Maruyama, E.H.Koo, C.Haass, K.Takio, M.Morishima-Kawashima, S.Ishiura, and Y.Ihara, Potential link between amyloid beta-protein 42 and C-terminal fragment gamma 49-99 of beta-amyloid precursor protein, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 24294-24301.
114. T. Moehlmann, E.Winkler, X.Xia, D.Edbauer, J.Murrell, A.Capell, C.Kaether, H.Zheng, B.Ghetti, C.Haass, and H.Steiner, Presenilin-1 mutations of leucine 166 equally affect the generation of the Notch and APP intracellular domains independent of their effect on Abeta 42 production, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 8025-8030.
115. A. Fukumori, M.Okochi, S.Tagami, J.Jiang, N.Itoh, T.Nakayama, K.Yanagida, Y.Ishizuka-Katsura, T.Morihara, K.Kamino, T.Tanaka, T.Kudo, H.Tanii, A.Ikuta, C.Haass, and M.Takeda, Presenilin-dependent gamma-secretase on plasma membrane and endosomes is functionally distinct, *Biochemistry.* 45 (2006) 4907-4914.
116. Y. Qi-Takahara, M.Morishima-Kawashima, Y.Tanimura, G.Dolios, N.Hirotsu, Y.Horikoshi, F.Kametani, M.Maeda, T.C.Saido, R.Wang, and Y.Ihara, Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase, *J. Neurosci.* 25 (2005) 436-445.
117. M.S. Wolfe, When loss is gain: reduced presenilin proteolytic function leads to increased Abeta42/Abeta40. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease, *EMBO Rep.* 8 (2007) 136-140.
118. W.P. Esler, W.T.Kimberly, B.L.Ostaszewski, W.Ye, T.S.Diehl, D.J.Selkoe, and M.S.Wolfe, Activity-dependent isolation of the presenilin- gamma - secretase complex reveals nicastrin and a gamma substrate, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 2720-2725.
119. D. Edbauer, E.Winkler, C.Haass, and H.Steiner, Presenilin and nicastrin regulate each other and determine amyloid beta-peptide production via complex formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 8666-8671.

120. J.Y. Leem, S.Vijayan, P.Han, D.Cai, M.Machura, K.O.Lopes, M.L.Veselits, H.Xu, and G.Thinakaran, Presenilin 1 is required for maturation and cell surface accumulation of nicastrin, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 19236-19240.
121. T. Li, G.Ma, H.Cai, D.L.Price, and P.C.Wong, Nicastrin is required for assembly of presenilin/gamma-secretase complexes to mediate Notch signaling and for processing and trafficking of beta-amyloid precursor protein in mammals, *J. Neurosci.* 23 (2003) 3272-3277.
122. R. Francis, G.McGrath, J.Zhang, D.A.Ruddy, M.Sym, J.Apfeld, M.Nicoll, M.Maxwell, B.Hai, M.C.Ellis, A.L.Parks, W.Xu, J.Li, M.Gurney, R.L.Myers, C.S.Himes, R.Hiebsch, C.Ruble, J.S.Nye, and D.Curtis, aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation, *Dev. Cell.* 3 (2002) 85-97.
123. W.T. Kimberly, M.J.LaVoie, B.L.Ostaszewski, W.Ye, M.S.Wolfe, and D.J.Selkoe, Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 6382-6387.
124. D. Edbauer, E.Winkler, J.T.Regula, B.Pesold, H.Steiner, and C.Haass, Reconstitution of gamma-secretase activity, *Nat. Cell Biol.* 5 (2003) 486-488.
125. S. Zhou, H.Zhou, P.J.Walian, and B.K.Jap, CD147 is a regulatory subunit of the gamma-secretase complex in Alzheimer's disease amyloid beta-peptide production, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 7499-7504.
126. T. Sato, T.S.Diehl, S.Narayanan, S.Funamoto, Y.Ihara, B.De Strooper, H.Steiner, C.Haass, and M.S.Wolfe, Active gamma-secretase complexes contain only one of each component, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 33985-33993.
127. M.T. Lai, E.Chen, M.C.Crouthamel, J.DiMuzio-Mower, M.Xu, Q.Huang, E.Price, R.B.Register, X.P.Shi, D.B.Donoviel, A.Bernstein, D.Hazuda, S.J.Gardell, and Y.M.Li, Presenilin-1 and presenilin-2 exhibit distinct yet overlapping gamma-secretase activities, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 22475-22481.
128. Y. Gu, F.Chen, N.Sanjo, T.Kawarai, H.Hasegawa, M.Duthie, W.Li, X.Ruan, A.Luthra, H.T.Mount, A.Tandon, P.E.Fraser, and P.George-Hyslop, APH-1 interacts with mature and immature forms of presenilins and nicastrin and may play a role in maturation of presenilin.nicastrin complexes, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 7374-7380.

129. W.J. Luo, H.Wang, H.Li, B.S.Kim, S.Shah, H.J.Lee, G.Thinakaran, T.W.Kim, G.Yu, and H.Xu, PEN-2 and APH-1 coordinately regulate proteolytic processing of presenilin 1, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 7850-7854.
130. A. Capell, C.Kaether, D.Edbauer, K.Shirotni, S.Merkl, H.Steiner, and C.Haass, Nicastrin interacts with gamma-secretase complex components via the N-terminal part of its transmembrane domain, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 52519-52523.
131. S. Shah, S.F.Lee, K.Tabuchi, Y.H.Hao, C.Yu, Q.LaPlant, H.Ball, C.E.Dann, III, T.Sudhof, and G.Yu, Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor, *Cell.* 122 (2005) 435-447.
132. N. Takasugi, T.Tomita, I.Hayashi, M.Tsuruoka, M.Niimura, Y.Takahashi, G.Thinakaran, and T.Iwatsubo, The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex, *Nature.* 422 (2003) 438-441.
133. T. Iwatsubo, The gamma-secretase complex: machinery for intramembrane proteolysis, *Curr. Opin. Neurobiol.* 14 (2004) 379-383.
134. C. Kaether, A.Capell, D.Edbauer, E.Winkler, B.Novak, H.Steiner, and C.Haass, The presenilin C-terminus is required for ER-retention, nicastrin-binding and gamma-secretase activity, *EMBO J.* 23 (2004) 4738-4748.
135. D. Cai, W.J.Netzer, M.Zhong, Y.Lin, G.Du, M.Frohman, D.A.Foster, S.S.Sisodia, H.Xu, F.S.Gorelick, and P.Greengard, Presenilin-1 uses phospholipase D1 as a negative regulator of beta-amyloid formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 1941-1946.
136. D. Cai, M.Zhong, R.Wang, W.J.Netzer, D.Shields, H.Zheng, S.S.Sisodia, D.A.Foster, F.S.Gorelick, H.Xu, and P.Greengard, Phospholipase D1 corrects impaired betaAPP trafficking and neurite outgrowth in familial Alzheimer's disease-linked presenilin-1 mutant neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 1936-1940.
137. C. Das, O.Berezovska, T.S.Diehl, C.Genet, I.Buldyrev, J.Y.Tsai, B.T.Hyman, and M.S.Wolfe, Designed helical peptides inhibit an intramembrane protease, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 11794-11795.
138. A.Y. Kornilova, F.Bihel, C.Das, and M.S.Wolfe, The initial substrate-binding site of gamma-secretase is located on presenilin near the active site, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 3230-3235.
139. F. Bihel, C.Das, M.J.Bowman, and M.S.Wolfe, Discovery of a Subnanomolar helical D-tridecapeptide inhibitor of gamma-secretase, *J. Med. Chem.* 47 (2004) 3931-3933.

140. D. Pitsi and J.N.Octave, Presenilin 1 stabilizes the C-terminal fragment of the amyloid precursor protein independently of gamma-secretase activity, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 25333-25338.
141. K. Duff, C.Eckman, C.Zehr, X.Yu, C.M.Prada, J.Perez-Tur, M.Hutton, L.Buee, Y.Harigaya, D.Yager, D.Morgan, M.N.Gordon, L.Holcomb, L.Refolo, B.Zenk, J.Hardy, and S.Youngkin, Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1, *Nature.* 383 (1996) 710-713.
142. J.A. Davis, S.Naruse, H.Chen, C.Eckman, S.Youngkin, D.L.Price, D.R.Borchelt, S.S.Sisodia, and P.C.Wong, An Alzheimer's disease-linked PS1 variant rescues the developmental abnormalities of PS1-deficient embryos, *Neuron.* 20 (1998) 603-609.
143. S. Qian, P.Jiang, X.M.Guan, G.Singh, M.E.Trumbauer, H.Yu, H.Y.Chen, L.H.Van de Ploeg, and H.Zheng, Mutant human presenilin 1 protects presenilin 1 null mouse against embryonic lethality and elevates Abeta1-42/43 expression, *Neuron.* 20 (1998) 611-617.
144. M. Citron, D.Westaway, W.Xia, G.Carlson, T.Diehl, G.Levesque, K.Johnson-Wood, M.Lee, P.Seubert, A.Davis, D.Kholodenko, R.Motter, R.Sherrington, B.Perry, H.Yao, R.Strome, I.Lieberburg, J.Rommens, S.Kim, D.Schenk, P.Fraser, H.P.St George, and D.J.Selkoe, Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice, *Nat. Med.* 3 (1997) 67-72.
145. E. Levy-Lahad, E.M.Wijsman, E.Nemens, L.Anderson, K.A.Goddard, J.L.Weber, T.D.Bird, and G.D.Schellenberg, A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1, *Science.* 269 (1995) 970-973.
146. D. Scheuner, C.Eckman, M.Jensen, X.Song, M.Citron, N.Suzuki, T.D.Bird, J.Hardy, M.Hutton, W.Kukull, E.Larson, E.Levy-Lahad, M.Viitanen, E.Peskind, P.Poorkaj, G.Schellenberg, R.Tanzi, W.Wasco, L.Lannfelt, D.Selkoe, and S.Youngkin, Secreted amyloid beta-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, *Nat. Med.* 2 (1996) 864-870.
147. D.R. Borchelt, G.Thinakaran, C.B.Eckman, M.K.Lee, F.Davenport, T.Ratovitsky, C.M.Prada, G.Kim, S.Seekins, D.Yager, H.H.Slunt, R.Wang, M.Seeger, A.I.Levey, S.E.Gandy, N.G.Copeland, N.A.Jenkins, D.L.Price, S.G.Youngkin, and S.S.Sisodia, Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo, *Neuron.* 17 (1996) 1005-1013.
148. B. De Strooper, P.Saftig, K.Craessaerts, H.Vanderstichele, G.Guhde, W.Annaert, K.Von Figura, and F.van Leuven, Deficiency of presenilin-1

- inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein, *Nature*. 391 (1998) 387-390.
149. C. Russo, G.Schettini, T.C.Saido, C.Hulette, C.Lippa, L.Lannfelt, B.Ghetti, P.Gambetti, M.Tabaton, and J.K.Teller, Presenilin-1 mutations in Alzheimer's disease, *Nature*. 405 (2000) 531-532.
 150. C.J. Phiel, C.A.Wilson, V.M.Lee, and P.S.Klein, GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides, *Nature*. 423 (2003) 435-439.
 151. S. Kumar-Singh, J.Theuns, B.Van Broeck, D.Pirici, K.Vennekens, E.Corsmit, M.Cruts, B.Dermaut, R.Wang, and C.Van Broeckhoven, Mean age-of-onset of familial Alzheimer disease caused by presenilin mutations correlates with both increased Abeta42 and decreased Abeta40, *Hum. Mutat.* 27 (2006) 686-695.
 152. Y. Deng, L.Tarassishin, V.Kallhoff, E.Peethumnongsin, L.Wu, Y.M.Li, and H.Zheng, Deletion of presenilin 1 hydrophilic loop sequence leads to impaired gamma-secretase activity and exacerbated amyloid pathology, *J. Neurosci.* 26 (2006) 3845-3854.
 153. R. Baumeister, U.Leimer, I.Zweckbronner, C.Jakubek, J.Grunberg, and C.Haass, Human presenilin-1, but not familial Alzheimer's disease (FAD) mutants, facilitate *Caenorhabditis elegans* Notch signalling independently of proteolytic processing, *Genes Funct.* 1 (1997) 149-159.
 154. B. De Strooper, W.Annaert, P.Cupers, P.Saftig, K.Craessaerts, J.S.Mumm, E.H.Schroeter, V.Schrijvers, M.S.Wolfe, W.J.Ray, A.Goate, and R.Kopan, A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain, *Nature*. 398 (1999) 518-522.
 155. G. Struhl and I.Greenwald, Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*, *Nature*. 398 (1999) 522-525.
 156. G. Struhl and A.Adachi, Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins, *Mol. Cell.* 6 (2000) 625-636.
 157. Y. Ye, N.Lukinova, and M.E.Fortini, Neurogenic phenotypes and altered Notch processing in *Drosophila* Presenilin mutants, *Nature*. 398 (1999) 525-529.
 158. Y. Takahashi, K.Koizumi, A.Takagi, S.Kitajima, T.Inoue, H.Koseki, and Y.Saga, Mesp2 initiates somite segmentation through the Notch signalling pathway, *Nat. Genet.* 25 (2000) 390-396.

159. T. Ikeuchi and S.S.Sisodia, The Notch ligands, Delta1 and Jagged2, are substrates for presenilin-dependent "gamma-secretase" cleavage, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 7751-7754.
160. K. Prager, L.Wang-Eckhardt, R.Fluhrer, R.Killick, E.Barth, H.Hampel, C.Haass, and J.Walter, A structural switch of presenilin 1 by glycogen synthase kinase 3beta-mediated phosphorylation regulates the interaction with beta-catenin and its nuclear signaling, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 14083-14093.
161. P. He and Y.Shen, Interruption of beta-catenin signaling reduces neurogenesis in Alzheimer's disease, *J. Neurosci.* 29 (2009) 6545-6557.
162. A. Georgakopoulos, P.Marambaud, S.Efthimiopoulos, J.Shioi, W.Cui, H.C.Li, M.Schutte, R.Gordon, G.R.Holstein, G.Martinelli, P.Mehta, V.L.Friedrich, Jr., and N.K.Robakis, Presenilin-1 forms complexes with the cadherin/catenin cell-cell adhesion system and is recruited to intercellular and synaptic contacts, *Mol. Cell.* 4 (1999) 893-902.
163. X. Xia, S.Qian, S.Soriano, Y.Wu, A.M.Fletcher, X.J.Wang, E.H.Koo, X.Wu, and H.Zheng, Loss of presenilin 1 is associated with enhanced beta-catenin signaling and skin tumorigenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 10863-10868.
164. D. Hartmann, From Alzheimer's disease to skin tumors: the catenin connection, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 10522-10523.
165. P. Marambaud, P.H.Wen, A.Dutt, J.Shioi, A.Takashima, R.Siman, and N.K.Robakis, A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations, *Cell.* 114 (2003) 635-645.
166. J.L. Teo, H.Ma, C.Nguyen, C.Lam, and M.Kahn, Specific inhibition of CBP/beta-catenin interaction rescues defects in neuronal differentiation caused by a presenilin-1 mutation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 12171-12176.
167. J. Hardy and D.J.Selkoe, The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics, *Science.* 297 (2002) 353-356.
168. R.D. Terry, E.Masliah, D.P.Salmon, N.Butters, R.DeTeresa, R.Hill, L.A.Hansen, and R.Katzman, Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment, *Ann. Neurol.* 30 (1991) 572-580.

169. M.C. Irizarry, M.McNamara, K.Fedorchak, K.Hsiao, and B.T.Hyman, APPSw transgenic mice develop age-related A beta deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56 (1997) 965-973.
170. C.A. Saura, S.Y.Choi, V.Beglopoulos, S.Malkani, D.Zhang, B.S.Shankaranarayana Rao, S.Chattarji, R.J.Kelleher, III, E.R.Kandel, K.Duff, A.Kirkwood, and J.Shen, Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration, *Neuron.* 42 (2004) 23-36.
171. D. Levitan, T.G.Doyle, D.Brousseau, M.K.Lee, G.Thinakaran, H.H.Slunt, S.S.Sisodia, and I.Greenwald, Assessment of normal and mutant human presenilin function in *Caenorhabditis elegans*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 14940-14944.
172. J. Shen and R.J.Kelleher, III, The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: evidence for a loss-of-function pathogenic mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 403-409.
173. G.A. Seidner, Y.Ye, M.M.Faraday, W.G.Alvord, and M.E.Fortini, Modeling clinically heterogeneous presenilin mutations with transgenic *Drosophila*, *Curr. Biol.* 16 (2006) 1026-1033.
174. F. Chen, Y.Gu, H.Hasegawa, X.Ruan, S.Arawaka, P.Fraser, D.Westaway, H.Mount, and P.George-Hyslop, Presenilin 1 mutations activate gamma 42-secretase but reciprocally inhibit epsilon-secretase cleavage of amyloid precursor protein (APP) and S3-cleavage of notch, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 36521-36526.
175. A.L. Brunkan, M.Martinez, J.Wang, E.S.Walker, D.Beher, M.S.Shearman, and A.M.Goate, Two domains within the first putative transmembrane domain of presenilin 1 differentially influence presenilinase and gamma-secretase activity, *J. Neurochem.* 94 (2005) 1315-1328.
176. E.H. Schroeter, M.X.Ilagan, A.L.Brunkan, S.Hecimovic, Y.M.Li, M.Xu, H.D.Lewis, M.T.Saxena, B.De Strooper, A.Coonrod, T.Tomita, T.Iwatsubo, C.L.Moore, A.Goate, M.S.Wolfe, M.Shearman, and R.Kopan, A presenilin dimer at the core of the gamma-secretase enzyme: insights from parallel analysis of Notch 1 and APP proteolysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 13075-13080.
177. E.S. Walker, M.Martinez, A.L.Brunkan, and A.Goate, Presenilin 2 familial Alzheimer's disease mutations result in partial loss of function and dramatic changes in Abeta 42/40 ratios, *J. Neurochem.* 92 (2005) 294-301.

178. J.C. Wiley, M.Hudson, K.C.Kanning, L.C.Schechter, and M.Bothwell, Familial Alzheimer's disease mutations inhibit gamma-secretase-mediated liberation of beta-amyloid precursor protein carboxy-terminal fragment, *J. Neurochem.* 94 (2005) 1189-1201.
179. Y. Qi, M.Morishima-Kawashima, T.Sato, R.Mitsumori, and Y.Ihara, Distinct mechanisms by mutant presenilin 1 and 2 leading to increased intracellular levels of amyloid beta-protein 42 in Chinese hamster ovary cells, *Biochemistry.* 42 (2003) 1042-1052.
180. R. Siman, A.G.Reaume, M.J.Savage, S.Trusko, Y.G.Lin, R.W.Scott, and D.G.Flood, Presenilin-1 P264L knock-in mutation: differential effects on abeta production, amyloid deposition, and neuronal vulnerability, *J. Neurosci.* 20 (2000) 8717-8726.
181. P. Marambaud, J.Shioi, G.Serban, A.Georgakopoulos, S.Sarner, V.Nagy, L.Baki, P.Wen, S.Efthimiopoulos, Z.Shao, T.Wisniewski, and N.K.Robakis, A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions, *EMBO J.* 21 (2002) 1948-1956.
182. O. Murayama, M.Murayama, T.Honda, X.Sun, N.Nihonmatsu, and A.Takashima, Twenty-nine missense mutations linked with familial Alzheimer's disease alter the processing of presenilin 1, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 23 (1999) 905-913.
183. D.G. Flood, A.G.Reaume, K.S.Dorfman, Y.G.Lin, D.M.Lang, S.P.Trusko, M.J.Savage, W.G.Annaert, B.De Strooper, R.Siman, and R.W.Scott, FAD mutant PS-1 gene-targeted mice: increased A beta 42 and A beta deposition without APP overproduction, *Neurobiol. Aging.* 23 (2002) 335-348.
184. H. Steiner, H.Romig, M.G.Grim, U.Philipp, B.Pesold, M.Citron, R.Baumeister, and C.Haass, The biological and pathological function of the presenilin-1 Deltaexon 9 mutation is independent of its defect to undergo proteolytic processing, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 7615-7618.
185. O. Nyabi, M.Bentahir, K.Horre, A.Herremans, N.Gottardi-Littell, C.Van Broeckhoven, P.Merchiers, K.Spittaels, W.Annaert, and B.De Strooper, Presenilins mutated at Asp-257 or Asp-385 restore Pen-2 expression and Nicastrin glycosylation but remain catalytically inactive in the absence of wild type Presenilin, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 43430-43436.
186. D.E. Kang, S.Soriano, M.P.Frosch, T.Collins, S.Naruse, S.S.Sisodia, G.Leibowitz, F.Levine, and E.H.Koo, Presenilin 1 facilitates the constitutive turnover of beta-catenin: differential activity of Alzheimer's disease-linked PS1 mutants in the beta-catenin-signaling pathway, *J. Neurosci.* 19 (1999) 4229-4237.

187. R. Killick, C.C.Pollard, A.A.Asuni, A.K.Mudher, J.C.Richardson, H.T.Rupniak, P.W.Sheppard, I.M.Varndell, J.P.Brion, A.I.Levey, O.A.Levy, M.Vestling, R.Cowburn, S.Lovestone, and B.H.Anderton, Presenilin 1 independently regulates beta-catenin stability and transcriptional activity, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 48554-48561.
188. H. Tu, O.Nelson, A.Bezprozvanny, Z.Wang, S.F.Lee, Y.H.Hao, L.Serneels, B.De Strooper, G.Yu, and I.Bezprozvanny, Presenilins form ER Ca²⁺ leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations, *Cell.* 126 (2006) 981-993.
189. J. Shen, R.T.Bronson, D.F.Chen, W.Xia, D.J.Selkoe, and S.Tonegawa, Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice, *Cell.* 89 (1997) 629-639.
190. M.S. Wolfe, gamma-Secretase inhibitors as molecular probes of presenilin function, *J. Mol. Neurosci.* 17 (2001) 199-204.
191. M. Citron, T.S.Diehl, G.Gordon, A.L.Biere, P.Seubert, and D.J.Selkoe, Evidence that the 42- and 40-amino acid forms of amyloid beta protein are generated from the beta-amyloid precursor protein by different protease activities, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 13170-13175.
192. J.T. Durkin, S.Murthy, E.J.Husten, S.P.Trusko, M.J.Savage, D.P.Rotella, B.D.Greenberg, and R.Siman, Rank-order of potencies for inhibition of the secretion of abeta40 and abeta42 suggests that both are generated by a single gamma-secretase, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 20499-20504.
193. Y.M. Li, M.T.Lai, M.Xu, Q.Huang, J.DiMuzio-Mower, M.K.Sardana, X.P.Shi, K.C.Yin, J.A.Shafer, and S.J.Gardell, Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 6138-6143.
194. T. Yamazaki, C.Haass, T.C.Saido, S.Omura, and Y.Ihara, Specific increase in amyloid beta-protein 42 secretion ratio by calpain inhibition, *Biochemistry.* 36 (1997) 8377-8383.
195. L. Zhang, L.Song, and E.M.Parker, Calpain inhibitor I increases beta-amyloid peptide production by inhibiting the degradation of the substrate of gamma-secretase. Evidence that substrate availability limits beta-amyloid peptide production, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 8966-8972.
196. L. Zhang, L.Song, G.Terracina, Y.Liu, B.Pramanik, and E.Parker, Biochemical characterization of the gamma-secretase activity that produces beta-amyloid peptides, *Biochemistry.* 40 (2001) 5049-5055.

197. C.L. Moore, T.S.Diehl, D.J.Selkoe, and M.S.Wolfe, Toward the characterization and identification of gamma-secretases using transition-state analogue inhibitors, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 920 (2000) 197-205.
198. J.C. Gerhart and A.B.Pardee, Aspartate transcarbamylase, an enzyme designed for feedback inhibition, *Fed. Proc.* 23 (1964) 727-735.
199. G.R. Jacobson and G.R.Stark, Aspartate transcarbamylase of *Escherichia coli*. Mechanisms of inhibition and activation by dicarboxylic acids and other anions, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 6852-6860.
200. Z. Amtul, P.A.Lewis, S.Piper, R.Crook, M.Baker, K.Findlay, A.Singleton, M.Hogg, L.Younkin, S.G.Younkin, J.Hardy, M.Hutton, B.F.Boeve, D.Tang-Wai, and T.E.Golde, A presenilin 1 mutation associated with familial frontotemporal dementia inhibits gamma-secretase cleavage of APP and notch, *Neurobiol. Dis.* 9 (2002) 269-273.
201. B. Dermaut, S.Kumar-Singh, S.Engelborghs, J.Theuns, R.Rademakers, J.Saerens, B.A.Pickut, K.Peeters, B.M.Van den, K.Vennekens, S.Claes, M.Cruts, P.Cras, J.J.Martin, C.Van Broeckhoven, and P.P.De Deyn, A novel presenilin 1 mutation associated with Pick's disease but not beta-amyloid plaques, *Ann. Neurol.* 55 (2004) 617-626.
202. G. Raux, R.Gantier, C.Martin, Y.Pothin, A.Brice, T.Frebourg, and D.Campion, A novel presenilin 1 missense mutation (L153V) segregating with early-onset autosomal dominant Alzheimer's disease, *Hum. Mutat.* 16 (2000) 95.
203. B.J. Snider, J.Norton, M.A.Coats, S.Chakraverty, C.E.Hou, R.Jervis, C.L.Lendon, A.M.Goate, D.W.McKeel, Jr., and J.C.Morris, Novel presenilin 1 mutation (S170F) causing Alzheimer disease with Lewy bodies in the third decade of life, *Arch. Neurol.* 62 (2005) 1821-1830.
204. A. Ishikawa, Y.S.Piao, A.Miyashita, R.Kuwano, O.Onodera, H.Ohtake, M.Suzuki, M.Nishizawa, and H.Takahashi, A mutant PSEN1 causes dementia with Lewy bodies and variant Alzheimer's disease, *Ann. Neurol.* 57 (2005) 429-434.
205. H. Houlden, R.Crook, R.J.Dolan, J.McLaughlin, T.Revesz, and J.Hardy, A novel presenilin mutation (M233V) causing very early onset Alzheimer's disease with Lewy bodies, *Neurosci. Lett.* 313 (2001) 93-95.
206. V. Kallhoff-Munoz, L.Hu, X.Chen, R.G.Pautler, and H.Zheng, Genetic dissection of gamma-secretase-dependent and -independent functions of presenilin in regulating neuronal cell cycle and cell death, *J. Neurosci.* 28 (2008) 11421-11431.

-
207. Y. Yang, E.J.Mufson, and K.Herrup, Neuronal cell death is preceded by cell cycle events at all stages of Alzheimer's disease, *J. Neurosci.* 23 (2003) 2557-2563.
 208. Y. Yang, N.H.Varvel, B.T.Lamb, and K.Herrup, Ectopic cell cycle events link human Alzheimer's disease and amyloid precursor protein transgenic mouse models, *J. Neurosci.* 26 (2006) 775-784.
 209. V. Kallhoff-Munoz, L.Hu, X.Chen, R.G.Pautler, and H.Zheng, Genetic dissection of gamma-secretase-dependent and -independent functions of presenilin in regulating neuronal cell cycle and cell death, *J. Neurosci.* 28 (2008) 11421-11431.
 210. M. Wragg, M.Hutton, and C.Talbot, Genetic association between intronic polymorphism in presenilin-1 gene and late-onset Alzheimer's disease. Alzheimer's Disease Collaborative Group, *Lancet.* 347 (1996) 509-512.
 211. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=165932.
 212. M. Hutton and J.Hardy, The presenilins and Alzheimer's disease, *Hum. Mol. Genet.* 6 (1997) 1639-1646.
 213. P. Kehoe, J.Williams, S.Lovestone, G.Wilcock, and M.J.Owen, Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease. The UK Alzheimer's Disease Collaborative Group, *Lancet.* 347 (1996) 1185.
 214. S. Higuchi, T.Muramatsu, S.Matsushita, H.Arai, and H.Sasaki, Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease, *Lancet.* 347 (1996) 1186.
 215. J. Perez-Tur, V.F.Wavrant-De, J.C.Lambert, and M.C.Chartier-Harlin, Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease. The Alzheimer's Study Group, *Lancet.* 347 (1996) 1560-1561.
 216. K. Isoe, K.Urakami, Y.Ji, Y.Adachi, and K.Nakashima, Presenilin-1 polymorphism in patients with Alzheimer's disease, vascular dementia and alcohol-associated dementia in Japanese population, *Acta Neurol. Scand.* 94 (1996) 326-328.
 217. C. Tysoe, J.Whittaker, N.J.Cairns, P.F.Atkinson, C.R.Harrington, J.Xuereb, G.Wilcock, and D.C.Rubinsztein, Presenilin-1 intron 8 polymorphism is not associated with autopsy-confirmed late-onset Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.* 222 (1997) 68-69.
 218. M. Ezquerra, R.Blesa, E.Tolosa, P.S.Lopez, M.Aguilar, J.Pena, C.Van Broeckhoven, F.Ballesta, and R.Oliva, The genotype 2/2 of the presenilin-1 polymorphism is decreased in Spanish early-onset Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.* 227 (1997) 201-204.

219. A.J. Brookes, W.M.Howell, K.Woodburn, E.C.Johnstone, and A.Carothers, Presenilin-I, presenilin-II, and VLDL-R associations in early onset Alzheimer's disease, *Lancet*. 350 (1997) 336-337.
220. W.K. Scott, L.H.Yamaoka, P.A.Locke, B.L.Rosi, P.C.Gaskell, A.M.Saunders, P.M.Conneally, G.W.Small, L.A.Farrer, J.H.Growdon, A.D.Roses, M.A.Pericak-Vance, and J.L.Haines, No association or linkage between an intronic polymorphism of presenilin-1 and sporadic or late-onset familial Alzheimer disease, *Genet. Epidemiol.* 14 (1997) 307-315.
221. C.L. Lendon, A.Myers, A.Cumming, A.M.Goate, and D.St Clair, A polymorphism in the presenilin 1 gene does not modify risk for Alzheimer's disease in a cohort with sporadic early onset, *Neurosci. Lett.* 228 (1997) 212-214.
222. S. Sorbi, B.Nacmias, A.Tedde, P.Forleo, S.Piacentini, S.Latorraca, and L.Amaducci, Presenilin-1 gene intronic polymorphism in sporadic and familial Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.* 222 (1997) 132-134.
223. X. Cai, J.Stanton, D.Fallin, J.Hoyne, R.Duara, M.Gold, S.Sevush, P.Scibelli, F.Crawford, and M.Mullan, No association between the intronic presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease in clinic and population-based samples, *Am. J. Med. Genet.* 74 (1997) 202-203.
224. Y. Nishiwaki, K.Kamino, A.Yoshiiwa, N.Sato, K.Tateishi, M.Takeda, T.Kobayashi, H.Yamamoto, Y.Nonomura, H.Yoneda, T.Sakai, M.Imagawa, T.Miki, and T.Ogihara, T/G polymorphism at intron 9 of presenilin 1 gene is associated with, but not responsible for sporadic late-onset Alzheimer's disease in Japanese population, *Neurosci. Lett.* 227 (1997) 123-126.
225. G.I. Korovaitseva, A.Bukina, L.A.Farrer, and E.I.Rogaev, Presenilin polymorphisms in Alzheimer's disease, *Lancet*. 350 (1997) 959.
226. J. Aldudo, M.J.Bullido, A.Frank, and F.Valdivieso, Presenilin-1 genotype (2/2) is associated with late-onset Alzheimer's disease in Spanish patients, *Alzheimer's Res.* 3 (1997) 141-144.
227. S. Helisalmi, A.Mannermaa, M.Lehtovirta, M.Ryynanen, P.Riekkinen, Sr., and H.Soininen, No association between alpha1-antichymotrypsin polymorphism, apolipoprotein E and patients with late-onset Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.* 231 (1997) 56-58.
228. A.B. Singleton, H.Lamb, A.Leake, I.G.McKeith, R.H.Perry, and C.M.Morris, No association between an intronic polymorphism in the presenilin-1 gene and Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.* 234 (1997) 19-22.

-
229. D.M. Mann, S.M.Pickering-Brown, N.N.Bayatti, A.E.Wright, F.Owen, T.Iwatsubo, and T.C.Saido, An intronic polymorphism in the presenilin-1 gene does not influence the amount or molecular form of the amyloid beta protein deposited in Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.* 222 (1997) 57-60.
230. C.J. Hu, S.M.Sung, H.C.Liu, and J.G.Chang, Association of apolipoprotein E genotype and intronic polymorphism of the presenilin-1 gene with Alzheimer's disease in elderly Taiwan Chinese, *J. Neurol. Sci.* 157 (1998) 158-161.
231. A. Kowalska, M.Wender, and L.Lannfelt, Lack of association between an intronic polymorphism in the presenilin-1 gene and sporadic late-onset Alzheimer disease in Polish patients, *Dement. Geriatr. Cogn Disord.* 9 (1998) 137-139.
232. K. Taddei, D.Yang, C.Fisher, R.Clarnette, J.Hallmayer, R.Barnetson, R.Maller, W.S.Brooks, S.Whyte, G.A.Nicholson, C.L.Masters, G.A.Broe, S.E.Gandy, and R.N.Martins, No association of presenilin-1 intronic polymorphism and Alzheimer's disease in Australia, *Neurosci. Lett.* 246 (1998) 178-180.
233. X. Wang, S.T.Dekosky, S.Wisniewski, Aston, and M.I.Kamboh, Genetic association of two chromosome 14 genes (presenilin 1 and alpha 1-antichymotrypsin) with Alzheimer's disease, *Ann. Neurol.* 44 (1998) 387-390.
234. R. Scacchi, G.Gambina, M.Ruggeri, M.C.Martini, G.Ferrari, M.Silvestri, R.Schiavon, and R.M.Corbo, Plasma levels of apolipoprotein E and genetic markers in elderly patients with Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.* 259 (1999) 33-36.
235. X. Wu, S.Jiang, S.Lin, G.Tang, G.Feng, Y.Qian, D.Wang, D.Ren, and N.Gu, No association between the intronic presenilin 1 polymorphism and Alzheimer's disease in the Chinese population, *Am. J. Med. Genet.* 88 (1999) 1-3.
236. M. Yasuda, N.Hirono, K.Maeda, T.Imamura, E.Mori, and C.Tanaka, Case-control study of presenilin-1 intronic polymorphism in sporadic early and late onset Alzheimer's disease, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 66 (1999) 722-726.
237. M. Bagli, A.Papassotiropoulos, S.G.Schwab, F.Jessen, M.L.Rao, W.Maier, and R.Heun, No association between an intronic polymorphism in the presenilin-1 gene and Alzheimer disease in a German population, *J. Neurol. Sci.* 167 (1999) 34-36.

-
238. C.M. van Duijn, M.Cruts, J.Theuns, G.Van Gassen, H.Backhovens, B.M.Van den, A.Wehnert, S.Serneels, A.Hofman, and C.Van Broeckhoven, Genetic association of the presenilin-1 regulatory region with early-onset Alzheimer's disease in a population-based sample, *Eur. J. Hum. Genet.* 7 (1999) 801-806.
239. O. Combarros, A.Alvarez-Arcaya, A.Oterino, J.Berciano, M.Delgado-Rodriguez, N.Pena, C.Fernandez-Viadero, J.Luis Perez-Lopez, S.Setien, and A.Carvajal, Polymorphisms in the presenilin 1 and presenilin 2 genes and risk for sporadic Alzheimer's disease, *J. Neurol. Sci.* 171 (1999) 88-91.
240. S.N. Romas, R.Mayeux, M.X.Tang, R.Lantigua, M.Medrano, B.Tycko, and J.Knowles, No association between a presenilin 1 polymorphism and Alzheimer disease, *Arch. Neurol.* 57 (2000) 699-702.
241. K.W. Kim, J.H.Jhoo, K.U.Lee, D.Y.Lee, J.H.Lee, J.Y.Youn, B.J.Lee, and J.I.Woo, No association between presenilin 1 (PS1) intronic polymorphism and sporadic Alzheimer's disease in Koreans, *J. Neural Transm.* 107 (2000) 1191-1200.
242. T. Cui, X.Zhou, W.Jin, F.Zheng, and X.Cao, Gene polymorphism in apolipoprotein E and presenilin-1 in patients with late-onset Alzheimer's disease, *Chin Med. J. (Engl.)*. 113 (2000) 340-344.
243. M.T. Rodriguez, A.M.Calella, S.Silva, E.Munna, P.Modena, R.Chiesa, S.Terrevazzi, R.M.Ruggieri, R.Palermo, F.Piccoli, R.Confalonieri, P.Tiraboschi, C.Fragiacomo, P.Quadri, U.Lucca, and G.Forloni, Apolipoprotein E and intronic polymorphism of presenilin 1 and alpha-1-antichymotrypsin in Alzheimer's disease and vascular dementia, *Dement. Geriatr. Cogn Disord.* 11 (2000) 239-244.
244. A. Papassotiropoulos, M.Bagli, F.Jessen, W.Maier, H.Forstl, A.Kurz, and R.Heun, Interaction of two genes possibly involved in the regulation of the amyloid precursor protein (APP) processing, *Mol. Psychiatry.* 5 (2000) 240-241.
245. B. Dermaut, G.Roks, J.Theuns, R.Rademakers, J.J.Houwing-Duistermaat, S.Serneels, A.Hofman, M.M.Breteler, M.Cruts, C.Van Broeckhoven, and C.M.van Duijn, Variable expression of presenilin 1 is not a major determinant of risk for late-onset Alzheimer's disease, *J. Neurol.* 248 (2001) 935-939.
246. G.R. Chandak, M.U.Sridevi, C.J.Vas, D.M.Panikker, and L.Singh, Apolipoprotein E and presenilin-1 allelic variation and Alzheimer's disease in India, *Hum. Biol.* 74 (2002) 683-693.

-
247. M. Matsubara-Tsutsui, H.Yamagata, A.Morishima, J.Nakura, N.Mitsuda, K.Kamino, I.Kondo, and T.Miki, The 4,752 C/T polymorphism in the presenilin 1 gene increases the risk of Alzheimer's disease in apolipoprotein E4 carriers, *Intern. Med.* 41 (2002) 823-828.
248. L. Jia, C.Zhou, H.Lv, W.Wang, J.Ye, X.Zhang, W.Zhou, J.Xu, L.Wang, and J.Jia, Association between presenilin 1 intronic polymorphism and late onset Alzheimer's disease in the North Chinese population, *Brain Res.* 1116 (2006) 201-205.
249. N. Sodeyama, Y.Itoh, N.Suematsu, M.Matsushita, E.Otomo, H.Mizusawa, and M.Yamada, Presenilin 1 intronic polymorphism is not associated with Alzheimer type neuropathological changes or sporadic Alzheimer's disease, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 64 (1998) 548-551.
250. A. Liao, T.Gomez-Isla, A.Clatworthy, and B.T.Hyman, Lack of association of presenilin-1 intron-8 polymorphism with neuropathological features of Alzheimer's disease, *Brain Res.* 816 (1999) 295-298.
251. L. Tilley, K.Morgan, J.Grainger, P.Marsters, L.Morgan, J.Lowe, J.Xuereb, C.Wischik, C.Harrington, and N.Kalsheker, 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 (1999) 659-663.
252. M. Yamada, Risk factors for cerebral amyloid angiopathy in the elderly, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 977 (2002) 37-44.
253. C. De Jonghe, M.Cruts, E.A.Rogaeva, C.Tysoe, A.Singleton, H.Vanderstichele, W.Meschino, B.Dermaut, I.Vanderhoeven, H.Backhovens, E.Vanmechelen, C.M.Morris, J.Hardy, D.C.Rubinsztein, P.H.George-Hyslop, and C.Van Broeckhoven, Aberrant splicing in the presenilin-1 intron 4 mutation causes presenile Alzheimer's disease by increased Abeta42 secretion, *Hum. Mol. Genet.* 8 (1999) 1529-1540.
254. <http://www.alzforum.org/res/com/gen/alzgene/meta.asp?geneID=84>.
255. J. Perez-Tur, S.Froelich, G.Prihar, R.Crook, M.Baker, K.Duff, M.Wragg, F.Busfield, C.Lendon, R.F.Clark, and ., A mutation in Alzheimer's disease destroying a splice acceptor site in the presenilin-1 gene, *Neuroreport.* 7 (1995) 297-301.
256. K.H. Weisgraber, S.C.Rall, Jr., and R.W.Mahley, Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 9077-9083.
257. S.C. Rall, Jr., K.H.Weisgraber, T.L.Innerarity, and R.W.Mahley, Structural basis for receptor binding heterogeneity of apolipoprotein E from type III

- hyperlipoproteinemic subjects, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79 (1982) 4696-4700.
258. K.P. de, A.M.van den Maagdenberg, R.R.Frants, and L.M.Havekes, Genetic heterogeneity of apolipoprotein E and its influence on plasma lipid and lipoprotein levels, *Hum. Mutat.* 4 (1994) 178-194.
259. E.H. Corder, A.M.Saunders, N.J.Risch, W.J.Strittmatter, D.E.Schmechel, P.C.Gaskell, Jr., J.B.Rimmler, P.A.Locke, P.M.Conneally, K.E.Schmader, and ., Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease, *Nat. Genet.* 7 (1994) 180-184.
260. C.F. Lippa, T.W.Smith, A.M.Saunders, C.Hulette, D.Pulaski-Salo, and A.D.Roses, Apolipoprotein E-epsilon 2 and Alzheimer's disease: genotype influences pathologic phenotype, *Neurology.* 48 (1997) 515-519.
261. M. Lehtovirta, S.Helisalmi, A.Mannermaa, H.Soininen, K.Koivisto, M.Ryynanen, and P.Riekkinen, Sr., Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease in eastern Finland, *Neurosci. Lett.* 185 (1995) 13-15.
262. C. Betard, Y.Robitaille, M.Gee, D.Tiberghien, D.Larrivee, P.Roy, J.A.Mortimer, and D.Gauvreau, Apo E allele frequencies in Alzheimer's disease, Lewy body dementia, Alzheimer's disease with cerebrovascular disease and vascular dementia, *Neuroreport.* 5 (1994) 1893-1896.
263. T. Yoshizawa, K.Yamakawa-Kobayashi, Y.Komatsuzaki, T.Arinami, E.Oguni, H.Mizusawa, S.Shoji, and H.Hamaguchi, Dose-dependent association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset, sporadic Alzheimer's disease, *Ann. Neurol.* 36 (1994) 656-659.
264. D. Blacker, J.L.Haines, L.Rodes, H.Terwedow, R.C.Go, L.E.Harrell, R.T.Perry, S.S.Bassett, G.Chase, D.Meyers, M.S.Albert, and R.Tanzi, ApoE-4 and age at onset of Alzheimer's disease: the NIMH genetics initiative, *Neurology.* 48 (1997) 139-147.
265. E.S. Martin, S.E.Martin, L.Edelsohn, and D.S.Borgaonkar, Studies in a large family with late-onset Alzheimer disease (LOAD), *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 11 (1997) 163-170.
266. L.A. Farrer, L.A.Cupples, J.L.Haines, B.Hyman, W.A.Kukull, R.Mayeux, R.H.Myers, M.A.Pericak-Vance, N.Risch, and C.M.van Duijn, 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 (1997) 1349-1356.

-
267. J.A. Nicoll, G.W.Roberts, and D.I.Graham, Apolipoprotein E epsilon 4 allele is associated with deposition of amyloid beta-protein following head injury, *Nat. Med.* 1 (1995) 135-137.
268. J.A. Nicoll, G.W.Roberts, and D.I.Graham, Amyloid beta-protein, APOE genotype and head injury, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 777 (1996) 271-275.
269. B.D. Jordan, N.R.Relkin, L.D.Ravdin, A.R.Jacobs, A.Bennett, and S.Gandy, Apolipoprotein E epsilon4 associated with chronic traumatic brain injury in boxing, *JAMA.* 278 (1997) 136-140.
270. A.J. Slooter, M.X.Tang, C.M.van Duijn, Y.Stern, A.Ott, K.Bell, M.M.Breteler, C.Van Broeckhoven, T.K.Tatemichi, B.Tycko, A.Hofman, and R.Mayeux, Apolipoprotein E epsilon4 and the risk of dementia with stroke. A population-based investigation, *JAMA.* 277 (1997) 818-821.
271. M.F. Newman, N.D.Croughwell, J.A.Blumenthal, E.Lowry, W.D.White, W.Spillane, R.D.Davis, Jr., D.D.Glower, L.R.Smith, E.P.Mahanna, and ., Predictors of cognitive decline after cardiac operation, *Ann. Thorac. Surg.* 59 (1995) 1326-1330.
272. R. Egensperger, C.Bancher, S.Kosel, K.Jellinger, P.Mehraein, and M.B.Graeber, The apolipoprotein E epsilon 4 allele in Parkinson's disease with Alzheimer lesions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224 (1996) 484-486.
273. A. al Chalabi, Z.E.Enayat, M.C.Bakker, P.C.Sham, D.M.Ball, C.E.Shaw, C.M.Lloyd, J.F.Powell, and P.N.Leigh, Association of apolipoprotein E epsilon 4 allele with bulbar-onset motor neuron disease, *Lancet.* 347 (1996) 159-160.
274. F. Fazekas, C.Enzinger, S.Ropele, H.Schmidt, R.Schmidt, and S.Strasser-Fuchs, The impact of our genes: consequences of the apolipoprotein E polymorphism in Alzheimer disease and multiple sclerosis, *J. Neurol. Sci.* 245 (2006) 35-39.
275. R.L. Oliveri, R.Cittadella, G.Sibilia, I.Manna, P.Valentino, A.Gambardella, U.Aguglia, M.Zappia, N.Romeo, V.Andreoli, F.Bono, M.Caracciolo, and A.Quattrone, APOE and risk of cognitive impairment in multiple sclerosis, *Acta Neurol. Scand.* 100 (1999) 290-295.
276. C. Messier, Diabetes, Alzheimer's disease and apolipoprotein genotype, *Exp. Gerontol.* 38 (2003) 941-946.
277. D.L. Bliwise, Sleep apnea, APOE4 and Alzheimer's disease 20 years and counting?, *J. Psychosom. Res.* 53 (2002) 539-546.

-
278. D.W. Tsuang, R.K.Wilson, O.L.Lopez, E.K.Luedeking-Zimmer, J.B.Leverenz, S.T.Dekosky, M.I.Kamboh, and R.L.Hamilton, Genetic association between the APOE*4 allele and Lewy bodies in Alzheimer disease, *Neurology*. 64 (2005) 509-513.
279. K.H. Weisgraber and R.W.Mahley, Human apolipoprotein E: the Alzheimer's disease connection, *FASEB J.* 10 (1996) 1485-1494.
280. I.J. Deary, M.C.Whiteman, A.Pattie, J.M.Starr, C.Hayward, A.F.Wright, A.Carothers, and L.J.Whalley, Cognitive change and the APOE epsilon 4 allele, *Nature*. 418 (2002) 932.
281. G.W. Small, J.C.Mazziotta, M.T.Collins, L.R.Baxter, M.E.Phelps, M.A.Mandelkern, A.Kaplan, A.La Rue, C.F.Adamson, L.Chang, and ., Apolipoprotein E type 4 allele and cerebral glucose metabolism in relatives at risk for familial Alzheimer disease, *JAMA*. 273 (1995) 942-947.
282. E.M. Reiman, R.J.Caselli, K.Chen, G.E.Alexander, D.Bandy, and J.Frost, Declining brain activity in cognitively normal apolipoprotein E epsilon 4 heterozygotes: A foundation for using positron emission tomography to efficiently test treatments to prevent Alzheimer's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 3334-3339.
283. E.M. Reiman, K.Chen, G.E.Alexander, R.J.Caselli, D.Bandy, D.Osborne, A.M.Saunders, and J.Hardy, Functional brain abnormalities in young adults at genetic risk for late-onset Alzheimer's dementia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 284-289.
284. A.D. Roses, A.M.Saunders, Y.Huang, J.Strum, K.H.Weisgraber, and R.W.Mahley, Complex disease-associated pharmacogenetics: drug efficacy, drug safety, and confirmation of a pathogenetic hypothesis (Alzheimer's disease), *Pharmacogenomics. J.* 7 (2007) 10-28.
285. D.M. Holtzman, Role of apoe/Abeta interactions in the pathogenesis of Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy, *J. Mol. Neurosci.* 17 (2001) 147-155.
286. B.V. Zlokovic, R.Deane, J.Sallstrom, N.Chow, and J.M.Miano, Neurovascular pathways and Alzheimer amyloid beta-peptide, *Brain Pathol.* 15 (2005) 78-83.
287. Q. Xu, Y.Li, C.Cyras, D.A.Sanan, and B.Cordell, Isolation and characterization of apolipoproteins from murine microglia. Identification of a low density lipoprotein-like apolipoprotein J-rich but E-poor spherical particle, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 31770-31777.

288. A.M. Fagan, D.M.Holtzman, G.Munson, T.Mathur, D.Schneider, L.K.Chang, G.S.Getz, C.A.Reardon, J.Lukens, J.A.Shah, and M.J.LaDu, Unique lipoproteins secreted by primary astrocytes from wild type, apoE (-/-), and human apoE transgenic mice, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 30001-30007.
289. B.P. Nathan, S.Bellosta, D.A.Sanan, K.H.Weisgraber, R.W.Mahley, and R.E.Pitas, Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro, *Science*. 264 (1994) 850-852.
290. S. Bellosta, B.P.Nathan, M.Orth, L.M.Dong, R.W.Mahley, and R.E.Pitas, Stable expression and secretion of apolipoproteins E3 and E4 in mouse neuroblastoma cells produces differential effects on neurite outgrowth, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 27063-27071.
291. D.M. Holtzman, R.E.Pitas, J.Kilbridge, B.Nathan, R.W.Mahley, G.Bu, and A.L.Schwartz, Low density lipoprotein receptor-related protein mediates apolipoprotein E-dependent neurite outgrowth in a central nervous system-derived neuronal cell line, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 9480-9484.
292. Y. Sun, S.Wu, G.Bu, M.K.Onifade, S.N.Patel, M.J.LaDu, A.M.Fagan, and D.M.Holtzman, Glial fibrillary acidic protein-apolipoprotein E (apoE) transgenic mice: astrocyte-specific expression and differing biological effects of astrocyte-secreted apoE3 and apoE4 lipoproteins, *J. Neurosci.* 18 (1998) 3261-3272.
293. M. Buttini, M.Orth, S.Bellosta, H.Akeefe, R.E.Pitas, T.Wyss-Coray, L.Mucke, and R.W.Mahley, Expression of human apolipoprotein E3 or E4 in the brains of ApoE^{-/-} mice: isoform-specific effects on neurodegeneration, *J. Neurosci.* 19 (1999) 4867-4880.
294. M. Buttini, G.Q.Yu, K.Shockley, Y.Huang, B.Jones, E.Masliah, M.Mallory, T.Yeo, F.M.Longo, and L.Mucke, Modulation of Alzheimer-like synaptic and cholinergic deficits in transgenic mice by human apolipoprotein E depends on isoform, aging, and overexpression of amyloid beta peptides but not on plaque formation, *J. Neurosci.* 22 (2002) 10539-10548.
295. W.J. Strittmatter, K.H.Weisgraber, M.Goedert, A.M.Saunders, D.Huang, E.H.Corder, L.M.Dong, R.Jakes, M.J.Alberts, J.R.Gilbert, and ., Hypothesis: microtubule instability and paired helical filament formation in the Alzheimer disease brain are related to apolipoprotein E genotype, *Exp. Neurol.* 125 (1994) 163-171.
296. S. Lovestone, B.H.Anderton, C.Hartley, T.G.Jensen, and A.L.Jorgensen, The intracellular fate of apolipoprotein E is tau dependent and apoE allele-specific, *Neuroreport.* 7 (1996) 1005-1008.

297. M. Miyata and J.D.Smith, Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides, *Nat. Genet.* 14 (1996) 55-61.
298. C.M. Lauderback, J.Kanski, J.M.Hackett, N.Maeda, M.S.Kindy, and D.A.Butterfield, Apolipoprotein E modulates Alzheimer's Abeta(1-42)-induced oxidative damage to synaptosomes in an allele-specific manner, *Brain Res.* 924 (2002) 90-97.
299. B. Mazur-Kolecka, J.Frackowiak, D.Kowal, J.Krzeslowska, and D.Dickson, Oxidative protein damage in cells engaged in beta-amyloidosis is related to apoE genotype, *Neuroreport.* 13 (2002) 465-468.
300. J.S. Gong, M.Kobayashi, H.Hayashi, K.Zou, N.Sawamura, S.C.Fujita, K.Yanagisawa, and M.Michikawa, Apolipoprotein E (ApoE) isoform-dependent lipid release from astrocytes prepared from human ApoE3 and ApoE4 knock-in mice, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 29919-29926.
301. M.J. LaDu, M.T.Falduto, A.M.Manelli, C.A.Reardon, G.S.Getz, and D.E.Frail, Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 23403-23406.
302. D.M. Holtzman, K.R.Bales, T.Tenkova, A.M.Fagan, M.Parsadonian, L.J.Sartorius, B.Mackey, J.Olney, D.McKeel, D.Wozniak, and S.M.Paul, Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 2892-2897.
303. I. Tesseur, J.Van Dorpe, K.Bruynseels, F.Bronfman, R.Sciot, A.Van Lommel, and F.van Leuven, Prominent axonopathy and disruption of axonal transport in transgenic mice expressing human apolipoprotein E4 in neurons of brain and spinal cord, *Am. J. Pathol.* 157 (2000) 1495-1510.
304. I. Tesseur, J.Van Dorpe, K.Spittaels, H.C.Van den, D.Moechars, and F.van Leuven, Expression of human apolipoprotein E4 in neurons causes hyperphosphorylation of protein tau in the brains of transgenic mice, *Am. J. Pathol.* 156 (2000) 951-964.
305. Y. Huang, X.Q.Liu, T.Wyss-Coray, W.J.Brecht, D.A.Sanan, and R.W.Mahley, Apolipoprotein E fragments present in Alzheimer's disease brains induce neurofibrillary tangle-like intracellular inclusions in neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 8838-8843.
306. M. Buttini, H.Akeefe, C.Lin, R.W.Mahley, R.E.Pitas, T.Wyss-Coray, and L.Mucke, Dominant negative effects of apolipoprotein E4 revealed in transgenic models of neurodegenerative disease, *Neuroscience.* 97 (2000) 207-210.

307. J. Raber, D.Wong, M.Buttini, M.Orth, S.Bellosta, R.E.Pitas, R.W.Mahley, and L.Mucke, Isoform-specific effects of human apolipoprotein E on brain function revealed in ApoE knockout mice: increased susceptibility of females, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 10914-10919.
308. J. Raber, G.Bongers, A.LeFevour, M.Buttini, and L.Mucke, Androgens protect against apolipoprotein E4-induced cognitive deficits, *J. Neurosci.* 22 (2002) 5204-5209.
309. M. Tolar, M.A.Marques, J.A.Harmony, and K.A.Crutcher, Neurotoxicity of the 22 kDa thrombin-cleavage fragment of apolipoprotein E and related synthetic peptides is receptor-mediated, *J. Neurosci.* 17 (1997) 5678-5686.
310. M. Tolar, J.N.Keller, S.Chan, M.P.Mattson, M.A.Marques, and K.A.Crutcher, Truncated apolipoprotein E (ApoE) causes increased intracellular calcium and may mediate ApoE neurotoxicity, *J. Neurosci.* 19 (1999) 7100-7110.
311. K.R. Bales, T.Verina, D.J.Cummins, Y.Du, R.C.Dodel, J.Saura, C.E.Fishman, C.A.DeLong, P.Piccardo, V.Petegnief, B.Ghetti, and S.M.Paul, Apolipoprotein E is essential for amyloid deposition in the APP(V717F) transgenic mouse model of Alzheimer's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 15233-15238.
312. M.C. Irizarry, B.S.Cheung, G.W.Rebeck, S.M.Paul, K.R.Bales, and B.T.Hyman, Apolipoprotein E affects the amount, form, and anatomical distribution of amyloid beta-peptide deposition in homozygous APP(V717F) transgenic mice, *Acta Neuropathol. (Berl).* 100 (2000) 451-458.
313. V. Hirsch-Reinshagen, S.Zhou, B.L.Burgess, L.Bernier, S.A.McIsaac, J.Y.Chan, G.H.Tansley, J.S.Cohn, M.R.Hayden, and C.L.Wellington, Deficiency of ABCA1 impairs apolipoprotein E metabolism in brain, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 41197-41207.
314. S.E. Wahrle, H.Jiang, M.Parsadanian, J.Legleiter, X.Han, J.D.Fryer, T.Kowalewski, and D.M.Holtzman, ABCA1 is required for normal central nervous system ApoE levels and for lipidation of astrocyte-secreted apoE, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 40987-40993.
315. C.A. Fisher and R.O.Ryan, Lipid binding-induced conformational changes in the N-terminal domain of human apolipoprotein E, *J. Lipid Res.* 40 (1999) 93-99.
316. A.D. Dergunov, E.A.Smirnova, A.Merched, S.Visvikis, G.Siest, V.V.Yakushkin, and V.Tsibulsky, Conformation of apolipoprotein E both in free and in lipid-bound form may determine the avidity of triglyceride-rich

- lipoproteins to the LDL receptor: structural and kinetic study, *Biochim. Biophys. Acta.* 1484 (2000) 14-28.
317. M.J. LaDu, W.B.Stine, Jr., M.Narita, G.S.Getz, C.A.Reardon, and G.Bu, Self-assembly of HEK cell-secreted ApoE particles resembles ApoE enrichment of lipoproteins as a ligand for the LDL receptor-related protein, *Biochemistry.* 45 (2006) 381-390.
318. T. Tokuda, M.Calero, E.Matsubara, R.Vidal, A.Kumar, B.Permanne, B.Zlokovic, J.D.Smith, M.J.LaDu, A.Rostagno, B.Frangione, and J.Ghiso, Lipidation of apolipoprotein E influences its isoform-specific interaction with Alzheimer's amyloid beta peptides, *Biochem. J.* 348 Pt 2 (2000) 359-365.
319. D.M. Holtzman, In vivo effects of ApoE and clusterin on amyloid-beta metabolism and neuropathology, *J. Mol. Neurosci.* 23 (2004) 247-254.
320. R.D. Bell, A.P.Sagare, A.E.Friedman, G.S.Bedi, D.M.Holtzman, R.Deane, and B.V.Zlokovic, Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27 (2007) 909-918.
321. M.J. LaDu, T.M.Pederson, D.E.Frail, C.A.Reardon, G.S.Getz, and M.T.Falduto, Purification of apolipoprotein E attenuates isoform-specific binding to beta-amyloid, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 9039-9042.
322. M. Morikawa, J.D.Fryer, P.M.Sullivan, E.A.Christopher, S.E.Wahrle, R.B.DeMattos, M.A.O'Dell, A.M.Fagan, H.A.Lashuel, T.Walz, K.Asai, and D.M.Holtzman, Production and characterization of astrocyte-derived human apolipoprotein E isoforms from immortalized astrocytes and their interactions with amyloid-beta, *Neurobiol. Dis.* 19 (2005) 66-76.
323. V. Hirsch-Reinshagen, L.F.Maia, B.L.Burgess, J.F.Blain, K.E.Naus, S.A.McIsaac, P.F.Parkinson, J.Y.Chan, G.H.Tansley, M.R.Hayden, J.Poirier, W.Van Nostrand, and C.L.Wellington, The absence of ABCA1 decreases soluble ApoE levels but does not diminish amyloid deposition in two murine models of Alzheimer disease, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 43243-43256.
324. R. Koldamova, M.Staufenbiel, and I.Lefterov, Lack of ABCA1 considerably decreases brain ApoE level and increases amyloid deposition in APP23 mice, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 43224-43235.
325. S.E. Wahrle, H.Jiang, M.Parsadonian, R.E.Hartman, K.R.Bales, S.M.Paul, and D.M.Holtzman, Deletion of *Abca1* increases A β deposition in the PDAPP transgenic mouse model of Alzheimer disease, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 43236-43242.

-
326. S.W. Beaven and P.Tontonoz, Nuclear receptors in lipid metabolism: targeting the heart of dyslipidemia, *Annu. Rev. Med.* 57:313-29. (2006) 313-329.
327. A.D. Roses, Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease, *Annu. Rev. Med.* 47 (1996) 387-400.
328. R.E. Tanzi and L.Bertram, Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective, *Cell.* 120 (2005) 545-555.
329. K.R. Bales, T.Verina, R.C.Dodel, Y.Du, L.Altstiel, M.Bender, P.Hyslop, E.M.Johnstone, S.P.Little, D.J.Cummins, P.Piccardo, B.Ghetti, and S.M.Paul, Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition, *Nat. Genet.* 17 (1997) 263-264.
330. R.B. DeMattos, J.R.Cirrito, M.Parsadanian, P.C.May, M.A.O'Dell, J.W.Taylor, J.A.Harmony, B.J.Aronow, K.R.Bales, S.M.Paul, and D.M.Holtzman, ApoE and clusterin cooperatively suppress Abeta levels and deposition: evidence that ApoE regulates extracellular Abeta metabolism in vivo, *Neuron.* 41 (2004) 193-202.
331. R.J. Bateman, L.Y.Munsell, J.C.Morris, R.Swarm, K.E.Yarasheski, and D.M.Holtzman, Human amyloid-beta synthesis and clearance rates as measured in cerebrospinal fluid in vivo, *Nat. Med.* 12 (2006) 856-861.
332. R.E. Tanzi, R.D.Moir, and S.L.Wagner, Clearance of Alzheimer's Abeta peptide: the many roads to perdition, *Neuron.* 43 (2004) 605-608.
333. N. Iwata, S.Tsubuki, Y.Takaki, K.Watanabe, M.Sekiguchi, E.Hosoki, M.Kawashima-Morishima, H.J.Lee, E.Hama, Y.Sekine-Aizawa, and T.C.Saido, Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition, *Nat. Med.* 6 (2000) 143-150.
334. I.V. Kurochkin and S.Goto, Alzheimer's beta-amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme, *FEBS Lett.* 345 (1994) 33-37.
335. W. Farris, S.Mansourian, Y.Chang, L.Lindsley, E.A.Eckman, M.P.Frosch, C.B.Eckman, R.E.Tanzi, D.J.Selkoe, and S.Guenette, Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 4162-4167.
336. W. Farris, S.G.Schutz, J.R.Cirrito, G.M.Shankar, X.Sun, A.George, M.A.Leissring, D.M.Walsh, W.Q.Qiu, D.M.Holtzman, and D.J.Selkoe, Loss

- of neprilysin function promotes amyloid plaque formation and causes cerebral amyloid angiopathy, *Am. J. Pathol.* 171 (2007) 241-251.
337. N. Iwata, S.Tsubuki, Y.Takaki, K.Shirotnani, B.Lu, N.P.Gerard, C.Gerard, E.Hama, H.J.Lee, and T.C.Saido, Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin, *Science*. 292 (2001) 1550-1552.
338. I. Dolev and D.M.Michaelson, A nontransgenic mouse model shows inducible amyloid-beta (Abeta) peptide deposition and elucidates the role of apolipoprotein E in the amyloid cascade, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 13909-13914.
339. M.L. Hemming, M.Patterson, C.Reske-Nielsen, L.Lin, O.Isacson, and D.J.Selkoe, Reducing amyloid plaque burden via ex vivo gene delivery of an Abeta-degrading protease: a novel therapeutic approach to Alzheimer disease, *PLoS. Med.* 4 (2007) e262.
340. M.A. Leissring, W.Farris, A.Y.Chang, D.M.Walsh, X.Wu, X.Sun, M.P.Frosch, and D.J.Selkoe, Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death, *Neuron*. 40 (2003) 1087-1093.
341. R. Deane, Z.Wu, A.Sagare, J.Davis, Y.S.Du, K.Hamm, F.Xu, M.Parisi, B.LaRue, H.W.Hu, P.Spijkers, H.Guo, X.Song, P.J.Lenting, W.E.Van Nostrand, and B.V.Zlokovic, LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms, *Neuron*. 43 (2004) 333-344.
342. J. Rogers, R.Strohmeyer, C.J.Kovelowski, and R.Li, Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide, *Glia*. 40 (2002) 260-269.
343. W.Q. Qiu, D.M.Walsh, Z.Ye, K.Vekrellis, J.Zhang, M.B.Podlisny, M.R.Rosner, A.Safavi, L.B.Hersh, and D.J.Selkoe, Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 32730-32738.
344. R.W. Mahley and S.C.Rall, Jr., Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 1 (2000) 507-537.
345. Y. Huang, K.H.Weisgraber, L.Mucke, and R.W.Mahley, Apolipoprotein E: diversity of cellular origins, structural and biophysical properties, and effects in Alzheimer's disease, *J. Mol. Neurosci.* 23 (2004) 189-204.
346. F.M. Harris, W.J.Brecht, Q.Xu, I.Tesseur, L.Kekoniuss, T.Wyss-Coray, J.D.Fish, E.Maslah, P.C.Hopkins, K.Scearce-Levie, K.H.Weisgraber, L.Mucke, R.W.Mahley, and Y.Huang, Carboxyl-terminal-truncated apolipoprotein E4 causes Alzheimer's disease-like neurodegeneration and

- behavioral deficits in transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 10966-10971.
347. W.J. Brecht, F.M.Harris, S.Chang, I.Tesseur, G.Q.Yu, Q.Xu, F.J.Deer, T.Wyss-Coray, M.Buttini, L.Mucke, R.W.Mahley, and Y.Huang, Neuron-specific apolipoprotein e4 proteolysis is associated with increased tau phosphorylation in brains of transgenic mice, *J. Neurosci.* 24 (2004) 2527-2534.
348. S. Chang, M.T.ran, R.D.Miranda, M.E.Balestra, R.W.Mahley, and Y.Huang, Lipid- and receptor-binding regions of apolipoprotein E4 fragments act in concert to cause mitochondrial dysfunction and neurotoxicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 18694-18699.
349. R.W. Mahley, K.H.Weisgraber, and Y.Huang, Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 5644-5651.
350. G.E. Gibson, V.Haroutunian, H.Zhang, L.C.Park, Q.Shi, M.Lesser, R.C.Mohs, R.K.Sheu, and J.P.Blass, Mitochondrial damage in Alzheimer's disease varies with apolipoprotein E genotype, *Ann. Neurol.* 48 (2000) 297-303.
351. C.C. Kan, E.Solomon, K.T.Belt, A.C.Chain, L.R.Hiorns, and G.Fey, Nucleotide sequence of cDNA encoding human alpha 2-macroglobulin and assignment of the chromosomal locus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82 (1985) 2282-2286.
352. D. Bergqvist and I.M.Nilsson, Hereditary alpha 2-macroglobulin deficiency, *Scand. J. Haematol.* 23 (1979) 433-436.
353. L. Sottrup-Jensen, T.M.Stepanik, T.Kristensen, P.B.Lonblad, C.M.Jones, D.M.Wierzbicki, S.Magnusson, H.Domdey, R.A.Wetsel, A.Lundwall, and ., Common evolutionary origin of alpha 2-macroglobulin and complement components C3 and C4, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82 (1985) 9-13.
354. L. Umans, L.Serneels, C.Hilliker, L.Stas, L.Overbergh, S.B.De, L.F.Van, and B.H.Van den, Molecular cloning of the mouse gene coding for alpha 2-macroglobulin and targeting of the gene in embryonic stem cells, *Genomics.* 22 (1994) 519-529.
355. M. Narita, D.M.Holtzman, A.L.Schwartz, and G.Bu, Alpha2-macroglobulin complexes with and mediates the endocytosis of beta-amyloid peptide via cell surface low-density lipoprotein receptor-related protein, *J. Neurochem.* 69 (1997) 1904-1911.

-
356. M.Z. Kounnas, R.D.Moir, G.W.Rebeck, A.I.Bush, W.S.Argraves, R.E.Tanzi, B.T.Hyman, and D.K.Strickland, LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation, *Cell*. 82 (1995) 331-340.
357. D.E. Kang, C.U.Pietrzik, L.Baum, N.Chevallier, D.E.Merriam, M.Z.Kounnas, S.L.Wagner, J.C.Troncoso, C.H.Kawas, R.Katzman, and E.H.Koo, Modulation of amyloid beta-protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor-related protein pathway, *J. Clin. Invest.* 106 (2000) 1159-1166.
358. D. Blacker, M.A.Wilcox, N.M.Laird, L.Rodes, S.M.Horvath, R.C.Go, R.Perry, B.Watson, Jr., S.S.Bassett, M.G.McInnis, M.S.Albert, B.T.Hyman, and R.E.Tanzi, Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease, *Nat. Genet.* 19 (1998) 357-360.
359. A. Liao, R.M.Nitsch, S.M.Greenberg, U.Finckh, D.Blacker, M.Albert, G.W.Rebeck, T.Gomez-Isla, A.Clatworthy, G.Binetti, C.Hock, T.Mueller-Thomsen, U.Mann, K.Zuchowski, U.Beisiegel, H.Staehelin, J.H.Growdon, R.E.Tanzi, and B.T.Hyman, Genetic association of an alpha2-macroglobulin (Val1000Ile) polymorphism and Alzheimer's disease, *Hum. Mol. Genet.* 7 (1998) 1953-1956.
360. F. Wavrant-DeVrieze, V.Rudrasingham, J.C.Lambert, S.Chakraverty, P.Kehoe, R.Crook, P.Amouyel, W.Wu, P.Holmans, F.Rice, J.Perez-Tur, B.Frigard, J.C.Morris, S.Carty, D.Cottel, N.Tunstall, S.Lovestone, R.C.Petersen, M.C.Chartier-Harlin, A.Goate, M.J.Owen, J.Williams, and J.Hardy, No association between the alpha-2 macroglobulin I1000V polymorphism and Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.* 262 (1999) 137-139.
361. D. Blacker, M.A.Wilcox, N.M.Laird, L.Rodes, S.M.Horvath, R.C.Go, R.Perry, B.Watson, Jr., S.S.Bassett, M.G.McInnis, M.S.Albert, B.T.Hyman, and R.E.Tanzi, Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease, *Nat. Genet.* 19 (1998) 357-360.
362. E.A. Rogaeva, S.Premkumar, J.Grubber, L.Serneels, W.K.Scott, T.Kawarai, Y.Song, D.L.Hill, S.M.bou-Donia, E.R.Martin, J.J.Vance, G.Yu, A.Orlacchio, Y.Pei, M.Nishimura, A.Supala, B.Roberge, A.M.Saunders, A.D.Roses, D.Schmechel, A.Crane-Gatherum, S.Sorbi, A.Bruni, G.W.Small, P.M.Conneally, J.L.Haines, L.F.Van, P.H.St George-Hyslop, L.A.Farrer, and M.A.Pericak-Vance, An alpha-2-macroglobulin insertion-deletion polymorphism in Alzheimer disease, *Nat. Genet.* 22 (1999) 19-22.
363. A.M. Gibson, A.B.Singleton, G.Smith, R.Woodward, I.G.McKeith, R.H.Perry, P.G.Ince, C.G.Ballard, J.A.Edwardson, and C.M.Morris, Lack of association of the alpha2-macroglobulin locus on chromosome 12 in AD, *Neurology.* 54 (2000) 433-438.

-
364. V. Rudrasingham, V.F.Wavrant-De, J.C.Lambert, S.Chakraverty, P.Kehoe, R.Crook, P.Amouyel, W.Wu, F.Rice, J.Perez-Tur, B.Frigard, J.C.Morris, S.Carty, R.Petersen, D.Cottel, N.Tunstall, P.Holmans, S.Lovestone, M.C.Chartier-Harlin, A.Goate, J.Hardy, M.J.Owen, and J.Williams, Alpha-2 macroglobulin gene and Alzheimer disease, *Nat. Genet.* 22 (1999) 17-19.
365. A.J. Saunders, L.Bertram, K.Mullin, A.J.Sampson, K.Latifzai, S.Basu, J.Jones, D.Kinney, L.MacKenzie-Ingano, S.Yu, M.S.Albert, T.J.Moscarillo, R.C.Go, S.S.Bassett, M.J.Daly, N.M.Laird, X.Wang, G.Velicelebi, S.L.Wagner, D.K.Becker, R.E.Tanzi, and D.Blacker, Genetic association of Alzheimer's disease with multiple polymorphisms in alpha-2-macroglobulin, *Hum. Mol. Genet.* 12 (2003) 2765-2776.
366. L. Bian, J.D.Yang, T.W.Guo, Y.Duan, W.Qin, Y.Sun, G.Y.Feng, and L.He, Association study of the A2M and LRP1 Genes with Alzheimer disease in the Han Chinese, *Biol. Psychiatry.* 58 (2005) 731-737.
367. W. Poller, J.P.Faber, G.Klobeck, and K.Olek, Cloning of the human alpha 2-macroglobulin gene and detection of mutations in two functional domains: the bait region and the thiolester site, *Hum. Genet.* 88 (1992) 313-319.
368. M. Zappia, I.Manna, P.Serra, R.Cittadella, V.Andreoli, A.La Russa, F.Annesi, P.Spadafora, N.Romeo, G.Nicoletti, D.Messina, A.Gambardella, and A.Quattrone, Increased risk for Alzheimer disease with the interaction of MPO and A2M polymorphisms, *Arch. Neurol.* 61 (2004) 341-344.
369. Criteria for the clinical diagnosis of Alzheimer's disease. Excerpts from the NINCDS-ADRDA Work Group report, *J. Am. Geriatr. Soc.* 33 (1985) 2-3.
370. <http://www.cochrane.org>.
371. S.S. Mirra, A.Heyman, D.McKeel, S.M.Sumii, B.J.Crain, L.M.Brownlee, F.S.Vogel, J.P.Hughes, B.G.van, and L.Berg, The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease, *Neurology.* 41 (1991) 479-486.
372. J.D. Terwilliger, J. Ott. *Handbook of Human Genetic Linkage*. Johns Hopkins University Press, New York (1994).
373. L. Excoffier, G.Laval, and S.Schneider, Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis, *Evol. Bioinform. Online.* 1:47-50. (2005) 47-50.
374. P.R. Williamson, C.Gamble, D.G.Altman, and J.L.Hutton, Outcome selection bias in meta-analysis, *Stat. Methods Med. Res.* 14 (2005) 515-524.

375. D.J. Lehmann, J.Williams, J.McBroom, and A.D.Smith, Using meta-analysis to explain the diversity of results in genetic studies of late-onset Alzheimer's disease and to identify high-risk subgroups, *Neuroscience*. 108 (2001) 541-554.
376. A. Elbaz and A.Alperovitch, Bias in association studies resulting from gene-environment interactions and competing risks, *Am. J. Epidemiol.* 155 (2002) 265-272.
377. G. McKhann, D.Drachman, M.Folstein, R.Katzman, D.Price, and E.M.Stadlan, 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 (1984) 939-944.
378. S.S. Mirra, A.Heyman, D.McKeel, S.M.Sumi, B.J.Crain, L.M.Brownlee, F.S.Vogel, J.P.Hughes, G.van Belle, and L.Berg, The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease, *Neurology*. 41 (1991) 479-486.
379. <http://www.alzgene.org/geneoverview.asp?geneid=52>.

APENDICE

LISTADO DE PUBLICACIONES ORIGINALES

La tesis está basada en las siguientes publicaciones originales que se encuentran referenciadas en el texto mediante un número romano (I, II).

I. M. Rodriguez-Manotas, M.Amorin-Diaz, I.Vinals-Bellido, J.Cabezas-Herrera, P.Martinez-Hernandez, and F.Canizares-Hernandez, Real time PCR assay with fluorescent hybridization probes for genotyping intronic polymorphism in Presenilin-1 gene, *Clin. Chim. Acta.* 364 (2006) 343-344.

II. M. Rodriguez-Manotas, M.Amorin-Diaz, F.Canizares-Hernandez, F.Ruiz-Espejo, S.Martinez-Vidal, R.Gonzalez-Sarmiento, P.Martinez-Hernandez, and J.Cabezas-Herrera, Association study and meta-analysis of Alzheimer's disease risk and Presenilin-1 intronic polymorphism, *Brain Res.* 1170 (2007) 119-128.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

Clinica Chimica Acta 364 (2006) 343–344

www.elsevier.com/locate/clinchim

Short communication

Real time PCR assay with fluorescent hybridization probes for genotyping intronic polymorphism in presenilin-1 gene[☆]

Miguel Rodríguez-Manotas^{a,*}, Manuel Amorin-Díaz^b, Inmaculada Viñals-Bellido^a, Juan Cabezas-Herrera^a, Pedro Martínez-Hernández^a, Francisco Cañizares-Hernández^a

^aClinical Analysis Service, University Hospital Virgen de la Arrixaca, Ctra. Madrid-Cartagena s/n, El Palmar, 30120 Murcia, Spain
^bNeurology Service, Hospital Comarcal del Noroeste, Miguel Espinosa 1, Caravaca de la Cruz, 30400 Murcia, Spain

Received 28 June 2005; received in revised form 29 June 2005; accepted 29 June 2005
 Available online 1 September 2005

Abstract

Background: Identification of all susceptibility loci for Alzheimer's disease has been a major goal in resolving the pathogenesis of this disease.

Methods: A PCR assay with fluorescently labeled oligonucleotide hybridization probes with subsequent fluorescent probe melting point analysis was developed.

Results: Allelic discrimination of intronic polymorphism of presenilin-1 gene and the restriction fragment length polymorphism method yielded identical results, proving its usefulness for genotyping PS1 gene.

Conclusions: This method provides excellent robustness, speed, and accuracy, and is well suited for determination of the polymorphism in both small and large numbers of samples. This assay could help to overcome the controversy regarding the association between the PS1 s165932 intronic polymorphism and Alzheimer's disease.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Alzheimer's disease; Presenilin-1; Polymorphism; Light-cycler™

Identification of all susceptibility loci for Alzheimer's disease (AD) has been a major goal in resolving the pathogenesis of this disease. Presenilin-1 (PS1), classically associated with early-onset Alzheimer's disease (EOAD), has been also related with the late-onset Alzheimer's disease (LOAD) [1] suggesting that PS1 is an independent genetic factor. An association between an intronic polymorphism of the PS1 gene and late-onset (age at onset >65) familial and sporadic (no family history) AD has been reported [2]. This intronic polymorphism has been greeted with controversy regarding its applicability [3–7]. The polymorphism, with reference SNP cluster report s165932 [8], is located within

the intron 3' to exon 8 of the PS1 gene, at chromosome 14 (14q24.3).

Allele frequency of the polymorphism is in Hardy–Weinberg equilibrium, with a probability of 0.150 ($\chi^2=2.535$, $df=1$), an average estimated heterozygosity of 0.471 [9] and an average allele frequency of 0.621 and 0.379 for allele A and C, respectively.

In order to test an association between AD and the intronic polymorphism of the PS1 gene, Wragg et al. [2] amplified genomic DNA and then PCR products were digested with *Bam*H I. Finally, the resulting DNA fragments were resolved on a 3% agarose gel. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis is time-consuming and labor intensive. For that reason, we have developed a rapid PCR with fluorescently labeled oligonucleotide hybridization probes on the LightCycler™ instrument (Roche Diagnostics) with subsequent fluorescent probe melting point analysis.

[☆] Grant support: Fondo de Investigaciones Sanitarias projects 01/3025 and 02/1567.

* Corresponding author. Tel.: +34 968369441; fax: +34 369418.

E-mail address: MMANOTAS@terra.es (M. Rodríguez-Manotas).

0009-8981/\$ - see front matter © 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.
 doi:10.1016/j.cca.2005.06.017

Genomic DNA was extracted from 200 μ L of EDTA-treated human peripheral blood using the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instruction. All blood samples were kept at -20°C until DNA isolation.

PCR reaction volume was 10 μ L, containing 2 μ L of DNA (30–60 ng), 0.5 μM each of the primers: sense (Presen_for: 5'-CAC CCA TTT ACA AGT TTA GC-3') reported by Wragg et al. [2], and antisense (Presen_rev: 5'-GAT AAA TTC TAC ACT GAT T-3'), 1 μ L of reaction buffer (LightCycler FastStart DNA master hybridization probes 10 \times buffer; Roche Diagnostics), 2 mM of MgCl_2 , and 0.25 μM each of the probes. The detection probe was labeled at the 3' end with fluorescein (5'-GCT TTT TCC AGC TCT CAT TTA CTC CTG-fluorescein). The anchor probe (LC Red 640-AAG TAT TTG AGA AGG ATA TTG AAT T-phosphorylated end) was labeled with LightCycler Red 640 at the 5' end and was modified at the 3' end by phosphorylation in order to block extension.

The PCR conditions were as follows: preincubation denaturation at 95°C for 10 s, followed by 45 cycles of denaturation (95°C for 10 s, $20^{\circ}\text{C}/\text{s}$), annealing (45°C for 10 s, $20^{\circ}\text{C}/\text{s}$), and extension (72°C for 10 s, $20^{\circ}\text{C}/\text{s}$). The melting curve analysis consisted of 1 cycle at 95°C for 0 s and 40°C for 10 s, followed by an increase of the temperature to 65°C at $0.1^{\circ}\text{C}/\text{s}$. The fluorescence signal (F) was monitored continuously during the temperature ramp and then plotted against the temperature (T). These curves were transformed into derivative melting curves [$-dF/dT$ vs T]. The derivative melting curves for the three genotypes (A/A, A/C and C/C) are depicted in Fig. 1.

The PCR conditions were the same as in the Wragg's protocol, except for the reverse primer, Presen_rev (mentioned above). Agarose electrophoresis of PCR product in agarose gel yielded the expected 211 bp fragment (not shown). In order to further confirm that the PCR product corresponded with the expected sequence, 10 PCR products were sequenced using a 310 Genetic Analyzer (ABI PRISMTM).

Out of 220 subjects tested by real-time PCR, 111 (50.5%) were heterozygotic for the polymorphism and 109 (49.5%) were homozygotic, and of these 60 (55%) were A/A allele and 49 (45%) were C/C allele. To establish a correlation between RFLP and real-time PCR methods, genomic DNA from 30 subjects (10 of each genotype) was tested for intronic polymorphism in presenilin-1 gene as described by Wragg et al. [2]. In all of the cases, except in one that no PCR product was amplified, we obtained the same results with the two protocols.

The proposed method for allelic discrimination of intronic polymorphism of presenilin-1 gene and the RFLP

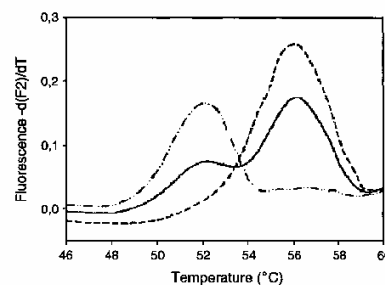


Fig. 1. Derivative melting curves of PS1 A/A (—), A/C (---), and C/C (· · · · ·) genotypes.

method yielded identical results, proving its usefulness for genotyping PS1 gene. This new approach is time- and labor-saving and it allows for large scale analysis. Because of its robustness, speed, and accuracy, this assay is well suited for determination of the polymorphism in both small and large numbers of samples, and could help to overcome the controversy regarding the association between the PS1 s165932 intronic polymorphism and Alzheimer's disease.

References

- [1] Schellenberg GD, Payami H, Wijsman EM, et al. Chromosome 14 and late-onset familial Alzheimer disease (FAD). *Am J Hum Genet* 1993;53(3):619–28.
- [2] Wragg M, Hutton M, Talbot C. Genetic association between intronic polymorphism in presenilin-1 gene and late-onset Alzheimer's disease. *Alzheimer's Disease Collaborative Group. Lancet* 1996;347(9000):509–12.
- [3] Perez-Tur J, Froelich S, Prihar G, et al. A mutation in Alzheimer's disease destroying a splice acceptor site in the presenilin-1 gene. *Neuroreport* 1995;7(1):297–301.
- [4] Scott WK, Yamaoka LH, Locke PA, et al. No association or linkage between an intronic polymorphism of presenilin-1 and sporadic or late-onset familial Alzheimer disease. *Genet Epidemiol* 1997;14(3):307–15.
- [5] Sodeyama N, Itoh Y, Suematsu N, et al. Presenilin 1 intronic polymorphism is not associated with Alzheimer type neuropathological changes or sporadic Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;64(4):548–51.
- [6] Yasuda M, Hirono N, Maeda K, Imamura T, Mori E, Tanaka C. Case-control study of presenilin-1 intronic polymorphism in sporadic early and late onset Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999;66(6):722–6.
- [7] Sorbi S, Nacmias B, Tedde A, et al. Presenilin-1 gene intronic polymorphism in sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1997;222(2):132–4.
- [8] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=165932.
- [9] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/Hetfreq.html>.

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/brainresBRAIN
RESEARCH

Research Report

Association study and meta-analysis of Alzheimer's disease risk and presenilin-1 intronic polymorphism

Miguel Rodríguez-Manotas^a, Manuel Amorín-Díaz^{b,*}, Francisco Cañizares-Hernández^a, Francisco Ruíz-Espejo^a, Salvadora Martínez-Vidal^b, Rogelio González-Sarmiento^c, Pedro Martínez-Hernández^a, Juan Cabezas-Herrera^{a,*}

^aClinical Analysis Service, University Hospital Virgen de la Arrixaca, Ctra. Madrid-Cartagena s/n, El Palmar, 30120 Murcia, Spain

^bNeurology Service, Hospital Comarcal del Noroeste, C/Miguel Espinosa, 1, Caravaca de la Cruz, 30400 Murcia, Spain

^cUnidad de Medicina Molecular, Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Campus Miguel Unamuno, 37007 Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 17 July 2007

Available online 25 July 2007

Keywords:

Presenilin

Alzheimer's disease

Late-onset

Polymorphism

ABSTRACT

Numerous studies have tested for associations between an intronic polymorphism (rs165932) of presenilin-1 (PS-1) gene and the risk of Alzheimer's disease (AD), but results have been conflicting. To throw light on this issue, we investigate the possible involvement of PS-1 genotype in a case-control study based on a relatively stable population in Spain and a meta-analysis of published studies. An examination was conducted of 85 patients with probable or possible AD, along with controls from the same community, by using an χ^2 test for homogeneity and a binary logistic regression model. For comparison purposes, a meta-analysis of data from all available published studies was assessed. In our patients, homozygosity of the allele 2 in the PS-1 gene increased for late-onset AD (OR 2.38, 95% CI 1.07–5.29, $P < 0.05$). The presence of at least one allele of apoE was also associated with AD (OR 4.01, 95% CI 1.93–8.34, $p < 0.05$). The regression model showed that, overall, the presence of the apoE $\epsilon 4$ allele and the PS-1 2/2 genotype were independent factors for the development of AD in our sample. In our genotype-based meta-analysis, the PS-1 2/2 genotype was probably related with AD for the European sub-group (fixed effects model, OR 1.19, 95% CI 1.02–1.37, $p < 0.05$), but there are many confusing factors between different studies. Presenilin-1 2/2 genotype is a risk factor for late onset Alzheimer disease in the Spanish population, and probably, for Europeans.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The presenilin-1 gene (PS-1), together with the amyloid precursor protein (APP) and presenilin-2 (PS-2), is one of the most widely recognized genes in the development of familial Alzheimer's disease (FAD) (Levy-Lahad et al., 1995;

Rogaev et al., 1995; Sherrington et al., 1995). PS-1 is an integral membrane protein that forms the catalytic core of the γ -secretase complex (De Strooper, 2003), activity related to the accumulation of the Abeta 42 protein in the brain of patients with Alzheimer's disease (AD) (Borchelt et al., 1996).

* Corresponding authors. J. Cabezas-Herrera is to be contacted at Clinical Analysis Service, University Hospital Virgen de la Arrixaca, Ctra. Madrid-Cartagena s/n, El Palmar 30120 Murcia, Spain. M. Amorín-Díaz, Neurology Service Hospital Comarcal del Noroeste, C/Miguel Espinosa 1, Caravaca de la Cruz, 30400 Murcia, Spain.

E-mail addresses: mdiaza@medynet.com (M. Amorín-Díaz), juan.cabezas@carm.es (J. Cabezas-Herrera).

0006-8993/\$ – see front matter © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.brainres.2007.07.032

Initial studies on the possible relationship between the 1/1 genotype in the PS-1 gene (PubMed reference rs165932), located at intron 8, and late onset Alzheimer's disease (LOAD) started more than 10 years ago (Wragg et al., 1996; Hutton and Hardy, 1997). Later, clinical (Kehoe et al., 1996; Higuchi et al., 1996; Perez-Tur et al., 1996; Isoe et al., 1996; Tysoe et al., 1997; Ezquerra et al., 1997; Brookes et al., 1997; Korovaitseva et al., 1997; Scott et al., 1997; Lendon et al., 1997; Sorbi et al., 1997; Cai et al., 1997; Nishiwaki et al., 1997; Aldudo et al., 1997; Helisalmi et al., 1997; Singleton et al., 1997; Mann et al., 1997; Hu et al., 1998; Kowalska et al., 1998; Taddei et al., 1998; Wang et al., 1998; Scacchi et al., 1999; Wu et al., 1999; Yasuda et al., 1999; Bagli et al., 1999; Van Duijn et al., 1999; Combarros et al., 1999; Romas et al., 2000; Kim et al., 2000; Cui et al., 2000; Rodriguez-Martin et al., 2000; Papassotiropoulos et al., 2000; Dermaut et al., 2001; Chandak et al., 2002; Matsubara-Tsutsui et al., 2002; Jia et al., 2006) and anatomopathological (Yamada et al., 1997; Singleton et al., 1997; Mann et al., 1997; Sodeyama et al., 1998; Liao et al., 1999; Tilley et al., 1999; Yamada, 2002; Jia et al., 2006) studies were not able to confirm these results, and some authors have described histological changes related with intronic polymorphisms (De Jonghe et al., 1999), while others found no such relationship (Liao et al., 1999). Several meta-analyses have been published on the PS-1 1/1 genotype (Yasuda et al., 1999; Dermaut et al., 2001) or allelic frequency (<http://www.alzforum.org/res/com/gen/alzgene/meta.asp?geneID=84>), analyzing both early (EOAD) and late (LOAD) onset Alzheimer's disease, although a significant relationship was only found for LOAD (Yasuda et al., 1999). Moreover, some clinical studies have even suggested that the 2/2 genotype might be related to the disease (Ezquerra et al., 1997; Brookes et al., 1997; Aldudo et al., 1997).

We present a new study based on clinical cases to ascertain the prevalence of rs165932 PS-1 intronic polymorphism and its relationship with apoE polymorphisms of Alzheimer's disease in a rural area of south-eastern Spain whose population has remained relatively stable. The study was complemented with a meta-analysis focusing on the PS-1 2/2 genotype.

2. Results

The genotypic frequencies of AD and control groups were consistent with the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and, taking into account the recommendations concerning χ^2 test errors (Terwilliger and Ott, 1994), the Arlequin program was used (Excoffier et al., 2005).

2.1. Study of the apoE epsilon 4 allele

As expected, a relationship between the presence of at least one epsilon 4 allele and LOAD (OR 4.01, 1.93–8.34, χ^2 test, $p=0.0001$) was found (Table 1).

2.2. Study of the PS-1 2/2 genotype

An OR of 2.38 (1.07–5.29, χ^2 test, $p=0.03$) was found for the 2/2 genotype (Table 1). There were no significant differences for the age of onset of dementia and the different genotypes ([1/1]: 71.05±7.60; [1/2]: 73.18±5.72; [2/2]: 72.95±6.16, ANOVA, $p=0.48$), not even when they were grouped (t-test: [2/2] vs. [1/2+1/1], $p=0.81$).

When we analyzed the distribution of the genotypes stratified by the occurrence of at least one allele of apoE epsilon 4, a significant relationship was found between the PS-1 2/2 genotype and the development of LOAD in the absence of apoE epsilon 4 (χ^2 test=3.94, $p=0.047$). When Bonferroni adjustment was applied as a correction for a multiple test, the statistical significance disappeared ($p=0.094$), and so apoE epsilon 4 and PS-1 2/2 can be considered as independent risk factors for LOAD.

2.3. Relationship between the PS-1 2/2 genotype and the apoE epsilon 4

As a consequence of the above result, binary logistic regression analysis was carried out, in which the fact of being a patient or a control was established as a dependent variable

Table 1 – Distribution of PS-1 genotypes and stratification by the occurrence of the apoE ε4 allele

	PS-1 GENOTYPE									
	1/1		1/2		2/2		1/1+1/2		2/2	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
LOAD	18	21.2	45	53.0	22	25.9	63	74.1	22	25.9 (1)
Control	25	29.1	50	58.1	11	12.8	75	87.2	11	12.8
ApoE stratified (2)										
ApoE ε4-										
LOAD	10	20.8	25	52.1	13	27.1	35	73.9	13	27.1 (3)
Control	20	28.2	42	59.2	9	12.7	62	87.3	9	13.7 (3)
ApoE ε4+										
LOAD	7	20.0	20	57.1	8	22.9	27	77.1	8	22.9
Control	4	30.8	7	53.9	2	15.4	11	84.6	2	15.4

(1) LOAD vs. control×PS-1 2/2 vs. PS-1 (1/1+1/2); $\chi^2=4.71$, $df=1$, $p=0.030$.

(2) ApoE ε4 OR $\chi^2=14.78$, $df=1$, $p=0.0001$.

(3) PS-1 2/2 genotype increases the risk for LOAD in the apoE ε4 negative subjects ($\chi^2=3.94$, $df=1$, $p=0.047$). After Bonferroni adjustment (×2 multiple comparisons) this relationship disappears ($p=0.094$).

Data of apoE epsilon 4 were missed from two patients and two controls.

and the following two factors were established as dichotomous independent variables: having or not one of the epsilon 4 alleles and the presence or absence of the 2/2 genotype. The adjusted OR were 4.03 (2.16-7.53) for epsilon 4 and 2.31 (1.14-4.67) for PS-1 2/2 genotype. The estimated probability of

finding the presence of the 2/2 genotype was 0.22; in the case of allele 4 it was 0.45, and for the combination of at least one allele 4 with the 2/2 genotype it was 0.62. Both variables were statistically significant (Wald test, epsilon 4: $p=0.0002$, and 2/2 genotype: $p=0.049$).

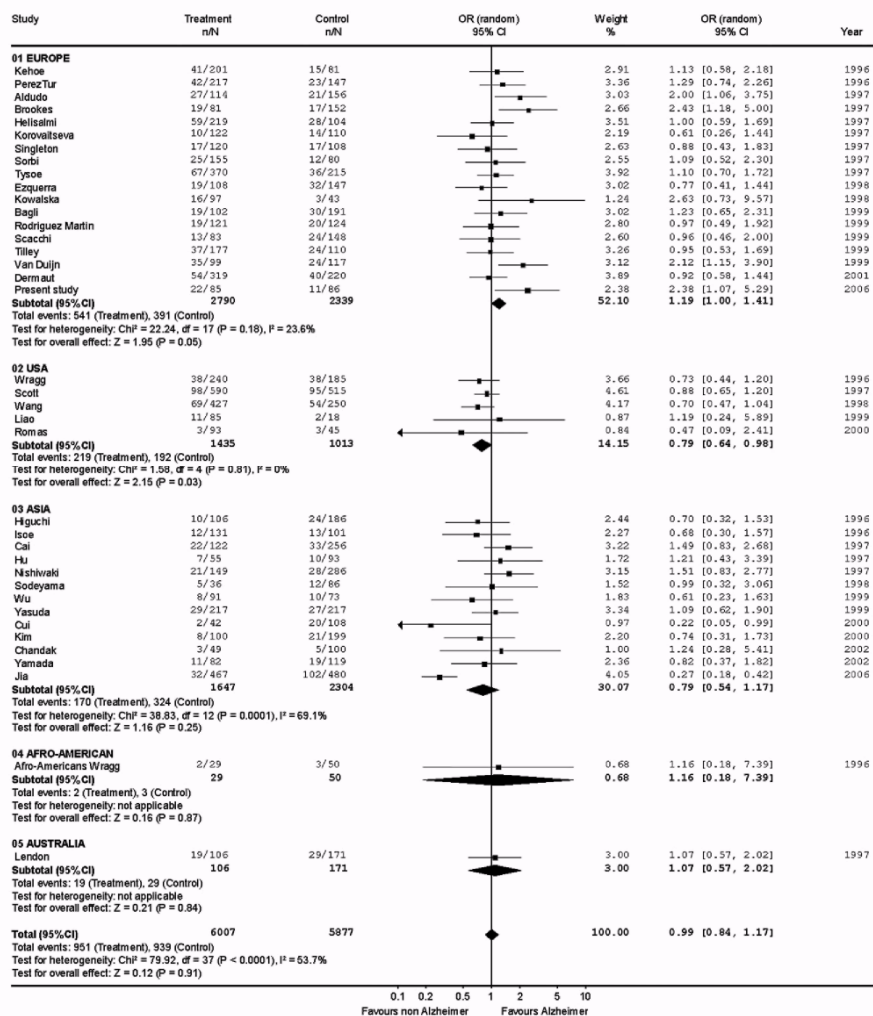


Fig. 1 - Meta-analysis for the effect of PS-1 2/2 genotype on the risk of LOAD in studies ordered according to continents (random effects model applied). Overall, there is not evidence of a relation between 2/2 genotype and AD. Only the USA population show a possible protective effect, while, there is a weak association between PS-1 2/2 genotype and risk for AD in the European population.

2.4. Meta-analysis of the literature

Published studies are usually clustered by ethnic group, because the larger the sample, the greater the significance. Initially, we decided to summarize the articles into continental clusters: Europe, United States of America, Asia and two additional groups with Afro-American people and an Australian study (Fig. 1). We considered 1/1 plus 1/2 genotype vs. 2/2 genotype in this study.

Following the heterogeneity χ^2 test, a random effects model was chosen. Overall, there was no statistical significance between the 2/2 genotype and the development of the disease. For the European group, the 2/2 genotype was associated with a 1.19-fold increase of risk for AD (CI=1.00–1.41). In this particular group, if a fixed effects model had been followed as the heterogeneity χ^2 test suggested, an OR of 1.18 (CI=1.02–1.37) would have been obtained. In the USA group, we observed a protective effect of the PS-1 2/2 genotype against the development of AD (OR: 0.79, 0.64–0.98). Finally, the Asian group showed no statistical significance (OR 0.79, 0.54–1.17).

3. Discussion

The results of our study suggest greater importance than previously thought for the PS-1 genotype in AD. Moreover, in our sample, it was seen that the presence of the 2/2 genotype more than doubles the risk of LOAD, an effect maintained independently of the epsilon 4 allele and statistically significant in spite of the small size of our sample. Results suggesting a possible role for the PS-1 2/2 genotype have already been published for LOAD (Perez-Tur et al., 1996; Aldudo et al., 1997) and even for EOAD (Brookes et al., 1997; Van Duijn et al., 1999).

Nonetheless, in our sample, the PS-1/2/2 genotype and apoE epsilon 4 are independent risk factors, suggesting a combined effect of the two genes for developing LOAD. The small size of our sample might of course limit the significance of the results, and Bonferroni adjustment influences the statistical significance in small samples, increasing the probability of a beta error. However, we consider our model of logistic regression sufficiently valid for both genes to be regarded as independent but synergistic factors.

Some of the conclusions that might be extracted from the results of the meta-analysis are as follows. In Europe, the PS-1 2/2 genotype is more prevalent in patients with AD than in the controls, especially in the Spanish population. In contrast, this genotype could be a protective factor for North American and Asian populations. Jia et al. (2006) recently reported that allele 1 in the PS-1 gene is a susceptibility factor for LOAD in the North Chinese population. This study and ours tested the association of PS-1 polymorphism with LOAD in genetically homogeneous populations. These seems therefore to be a role for ethnicity and/or lifestyle in the AD risk linked to PS-1 intronic polymorphism, as recent studies have found for other AD-related genes, e.g. the apoE -491A/T promoter polymorphism (Juhász et al., 2005).

However, all published meta-analyses should be treated with caution, because of possible bias (Williamson et al., 2005), and “valid subsets” of patients are necessary (Lehmann et al.,

2001). For this reason, some authors have studied cases of LOAD and EOAD together. The cut-off age of 65 years is only a traditionally used and arbitrary age, inherited from historical clinical classifications. A careful review of the published age range reveals lower limits than 65 years. Obviously, a bias could be hidden in the selection of the patients between different papers as a result of this criterion. Can this be solved by mixing LOAD and EOAD? Probably not, although this has been the method most frequently used.

Similarly, the sex distribution has often been overlooked. This fact is used as a verification of homogeneity in control-case studies and not as representative data of a given group. So, we have articles with male or female prevalence, or, simply, missing data and it cannot be assumed that all articles have the same strength in the analysis.

The concept of familial Alzheimer’s disease is not rigorously established. In some cases, it is only suggested. So, are we studying sporadic AD with affected family members or genetic familial AD?

High quality studies require the existence of control groups with HWE. Therefore, we only included the publications that had such controls. However, we are dealing with diseases that occur late in life, and as polymorphism might behave as a mortality-causing gene, it is improbable that a real and representative control group exists with HWE, because several gene-carriers might well have died (Elbaz and Alperovitch, 2002).

The clustering of individuals based on ethnicity cannot be considered an adequate method for obtaining larger sample. In a given country, several ethnic differences may exist due to historical reality; so more information is necessary to select a valid subset of patients (Nishiwaki et al., 1997).

Another factor that might have an influence is the great variation between what occurs in daily clinic practice, and what would be confirmed by an anatomopathological study. Thus, a clinical diagnostic base of dementia could be considered as another way of achieving greater homogeneity in the selected studies. The most widely applied clinically based criteria are NINCDS-ADRDA (McKhann et al., 1984). Although many studies have confirmed a correlation of these criteria with established anatomopathological findings (Mirra et al., 1991), it must not be forgotten that probable and possible AD is not the same disease. Possible AD can mask a very different dementia and, while its inclusion might increase the number of AD cases studied, it also diminishes the veracity of the sample.

The most recent meta-analysis is available at the Web site (<http://www.alzforum.org/res/com/gen/alzgene/meta.asp?genelD=84>). In our opinion, allelic frequencies have a propensity to enlarge the total amount of analyzed variables and influence statistical significance. Furthermore, the existence of homozygotic and heterozygotic diseases cannot be established if allelic distribution is considered.

Finally, a classic and well-known bias is the reticence of many researchers to publish results that disagree with those that have already been published or were sent to non-indexed journals. Perhaps, adequate sample sizes have not been used to reach statistical significance for the 2/2 genotype, given that the designs were orientated toward the prevalence of the 1/1 genotype.

As regards our relatively small sample, we are well aware that its small size could influence any conclusion, but we think that an isolated rural population, as used in this study, could be more adequate for studying the genetics of AD than larger populations which are genetically heterogeneous.

In our meta-analysis, when all the European studies were grouped together, we achieved borderline statistical significance. But, as we have discussed above, this result should be treated with caution, since there are discrepancies between previously published papers.

Taking all the above into account, it still remains true that we are dealing with a specific polymorphism within an intronic sequence. We should not forget the fact that the polymorphism analyzed is within a non-coding region. Until now, many different hypotheses have been formulated to explain the association between PS-1 intronic polymorphism and AD: the biased selection of patients; the different ethnic backgrounds between the populations analyzed; or the existence of linkage disequilibrium between intron 8 and another coding segment from the rest of the PS-1 or other genes (Hutton and Hardy, 1997).

Whether and how this polymorphism, located within an intron, contributes to the AD remains unknown. The position of the polymorphism suggests that the splicing of PS-1 pre mRNA could be affected in aged cells in which the delicate regulation of the splicing process is misdirected (Meshorer and Soreq, 2002). Recently published manuscripts suggest another possible mechanism. Reported deletions $\Delta 9$ and $\Delta 10$ of PS-1 gene, located in the main hydrophilic loop of PS-1, downstream of the intron-8 sequence which precedes both mutations, drastically reduces γ -secretase cleavage at the $A\beta_{40}$, but not the $A\beta_{42}$ site, increasing the $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ ratio (Bentahir et al., 2006; Deng et al., 2006). These two mutations could develop cotton-wool plaques in LOAD, with an absence or lower predominance of senile plaques, which would explain why anatomopathological studies have not found evidence concerning a role for intronic PS-1 polymorphism in AD (Yamada et al., 1997; Yasuda et al., 1999). It is tempting to think that PS-1 intronic polymorphism and cotton-wool plaques are related in some sporadic AD patients who would show an atypical pathology.

To conclude, according to our results, it seems that the PS-1 2/2 genotype might confer a small level of risk of causing Alzheimer's disease in the European population.

This study of presenilin once again shows the need to standardize the methodology for use in future studies to obtain more reliable information, and increase the relevance of any new evidence concerning the genetics of Alzheimer's disease.

4. Experimental procedures

4.1. Patients and controls

Eighty-five patients with LOAD were recruited through the Neurology Section of the Hospital Comarcal of Caravaca, which serves a rural community in south-eastern Spain. AD patients and normal elderly controls had a history of several generations living in the same local area. Until recent years,

this area has not been exposed to emigration or immigration pressure. All the patients met the NINCDS-ADRDA criteria for probable or possible AD. Patients with other cognitive disorders (alcohol, thyroid disease, vitamin deficiency, etc.) that could mimic AD were ruled out. The control group consisted of patients with non-demential diseases, and without family antecedents of AD. At the time of being introduced into the study, the AD and control groups did not differ in age (mean \pm SD: LOAD 75.59 \pm 5.92, Control 73.69 \pm 7.34; t-test, $p > 0.05$) or gender (50.90% vs. 60.20% of women with AD and control, respectively; χ^2 test, $p = 0.68$). An informed consent document for participation in this study and for taking blood samples was obtained from all patients.

Only 25% of patients had a family member affected by AD, so we assumed that the risk for developing AD in these subjects would be more closely related to age than to a familial component; therefore, these cases were not excluded from the study.

For the meta-analysis, the Cochrane Collaboration guidelines were followed. A search was carried out through PubMed using the words "presenilin", "intronic", "Alzheimer", "late" and "onset" (January 2007). To extend the search, a review of articles quoted in previous meta-analyses was made. In an attempt to control any selection bias, published data were compiled about AD groups with possible or probable AD diagnosis according to the NINCDS-ADRDA or CERAD criteria. Other types of dementia were excluded. Selected articles had to include the three genotypic frequencies of PS-1 polymorphism (Papassotiropoulos et al., 2000), and not to provide duplicate data (Kehoe et al., 1996; Yamada et al., 1997; Papassotiropoulos et al., 2000; Matsubara-Tsutsui et al., 2002). As control groups, we used the groups established as such by the authors (Table 2).

Some problems arose when reviewing the literature. The most evident fact was the cut-off age for LOAD onset at 65 years. Fourteen of the selected studies (about 40%) included patients classified as LOAD but aged less than 65 years. We decided not to exclude these articles from the meta-analysis. AD groups were only excluded when they were mixed AD (Chandak et al., 2002). Lastly, those articles with only control groups that were not in Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were also excluded (Taddei et al., 1998; Combarros et al., 1999).

4.2. Genetic analysis

Genomic DNA was purified from 200 μ L of whole blood by using a High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH).

apoE genotyping was performed by real-time PCR on a LightCycler Instrument (Roche Diagnostics) with the commercially available LightCycler ApoE Mutation Detection Kit (Roche Diagnostics), and by PS-1 genotyping, as described previously (Rodríguez-Manotas et al., 2006).

4.3. Statistical analysis

Genotype distributions were studied using the 2×2 χ^2 test, calculating the odds ratio (OR) with a confidence interval (CI) of 95%. The relationships between the different PS-1 polymorphisms and the apoE epsilon 4 allele were analyzed using

Table 2 – Studies used in the meta-analysis							
Author	Year	Onset age	Studied groups	Study age: years (SD)	Female (%)	Diagnostic criteria	Sporadic/familial AD
Wragg (USA)	1996	Aprox 53 (71.3±8.9)	208 LOAD(*)	76.9 (8.8)	58%	NINCDS-ADRD Probable-possible	Sporadic and familial
			185 control (*)	76.2 (11.0)	58%		
			29 LOAD (afroA) (*)	77.2 (9.6)	72%		
			50 control afroA (*)	72.0 (7.8)	77%		
Perez-Tur (France)	1996	73 (media)	147 LOAD (*)	?	70%	?	?
			78 control (*)	81 (?)	67%		
Kehoe (UK+USA)	1996	65	87 Cardiff AD (*)	76.40 (?)—onset 67.4	51.72%	NINCDS-ADRD Probable	47% first degree
			114 London AD (*)	83.25 (?)—onset 76.3	76.31%		
			72 (81?) controls (*)	76.20 (?)	58.33%		
Higuchi (Japan)	1996	65	27 EOAD+79 LOAD (*)	Global AD 776 (?)	?	Clinically diagnosed AD	Sporadic
			186 controls (*)	Age matched	??		
Isoe (Japan)	1996	65	104 LOAD (*)	78.2 (7.7)	?	NINCDS-ADRD Probable DSM-IV-R	Sporadic and familial
			19 EOAD (*)	64.0 (7.0)	?		
			8 EOADf (*)	68.0 (7.1)	?		
			38 VD	73.4 (9.4)	?		
			21 alcohol	68.0 (7.9)	?		
Scott (USA)	1997	65	101 controls (*)	62.8 (14.7)	?	NINCDS-ADRD	Sporadic and familial
			112 LOADf (*)	Family (n=151)	65%		
			298 LOADs (*)	75.1 (8.2) Sporadic (n=458)	62%		
			220 control (*)	73.6 (8.1) Control (n=317)	53%		
			36 EOADf (*)	>50 (?)			
Singleton (UK)	1997	65	144 EOADs (*)	81.6 (0.6)	?	Clinical previous and neuropathological	?
			295 control (*)	79.5 (0.8)	?		
			94 LOAD (*)	63.1 (1.3)	?		
			79 control (*)	65.1 (0.5)	?		
Brookes (UK)	1997	?	81 EOAD (*)	58.8 (5.1)	58%	NINCDS-ADRD/ DSM-III-R	31 familial cases
			152 control (*)	58.0 (9.9)	38%		
Nishiwaki (Japan)	1997	65	100 LOAD (*)	79.3 (7.0)	70.30%	Probable-possible NINCDS-ADRD	Sporadic
			229 control (*)	81.7 (7.7)	20.00%		
			49 EOAD (*)	EOAD (n=57)	64.91%		
			57 control (*)	58.9 (4.9) Control (n=100)	68.00%		
Lendon (Australia)	1997	<65 or 70	106 EOAD(*)	68.1 (7.38)	56.00%	NINCDS-ADRD probable-possible AD and histopathological definite	Sporadic and family
			171 control (*)	54.9 (6.41)	57.00%		
Aldudo (Spain)	1997	Aprox 58 (68±5)	114 LOAD (*)	71 (?)	?	NINCDS-ADRD Probable AD	Sporadic
Tysoe (UK)	1997	65	156 control (*)	72 (7)	?		
			129 LOAD (*)	82.06 (6.74)	64.34%		
			199 LOAD (*)	83.58 (7.13)	62.81%		
			54 EOAD (*)	66.38 (7.36)	44.44%		
			Control group one	85.55 (7.11)	68.42%		
Control group two	66.80 (15.01)	39.02%					
Sorbi (Italy)	1997	65	80 controls (*)	80.8 (24.5)	?	Histopathological and clinical	Familial and sporadic
			27 FAD PS-1 (*)	?	?		
			10 FAD PS-2 (*)	?	?		
			26 FAD APP (*)	?	?		
			20 FAD unKn (*)	?	?		
			72 LOAD sporadic (*)	60.2 (5.5) onset age	?		
			80 controls (*)	80.8 (24.5)	?		

Table 2 (continued)							
Author	Year	Onset age	Studied groups	Study age: years (SD)	Female (%)	Diagnostic criteria	Sporadic/familial AD
Ezquerria (Spain)	1997	65	79 LOAD (*)	Global AD	?	NINCDS-ADRDA	Sporadic and family
			95 EOAD (*)	onset 64.26 (?)	?	Probable	
Helisalmi (Finland)	1997	Aprox 60	147 controls (*)	Control 66.40 (?)			Sporadic
			219 LOAD (*)	78 (9)	67%	NINCDS-ADRDA	
Korovaitseva (Russia)	1997	65	104 controls (*)	71 (10)	85%	Probable	?
			62 LOAD (*)	?	?	ADRD-NINCDS	
Cai (China)	1997	60	66 controls (*)	?	?	?	Sporadic?
			60 EOAD (*)	?	?		
Sodeyama (Japan)	1998	?	44 controls (*)	?	?		Sporadic
			102 clinic AD (*)	?	?	NINCDS-ADRDA	
Hu (China)	1998	Elderly–aprox 64	20 population AD (*)	?	?	Probable–possible	?
			256 controls (*)	>60			
Kowalska (Polonia)	1998	?	36 LOAD (*)	Median 87.5	?	NINCDS-ADRDA	Sporadic
			86 control (*)	range 62–95			
Wang (USA)	1998	Aprox 52	55 LOAD (*)	Median 85.5	?	DSM-III-R and neuropathologic	?
			93 control (*)	range 65–101		NINCDS-ADRDA	
Scacchi (Italy)	1999	?	63 probable AD (*)	76.28 (6.41)	49%	Probable	Sporadic
			34 possible AD (*)	79.76 (86.31)	35%	NINCDS-ADRDA	
Van Duijn (Netherlands)	1999	?	43 controls (*)	Mean age onset 74	?	Probable–possible	?
			427 AD (*)	Range 69–86			
Liao (USA)	1999	?	68.6 (8.3)	Range 78–94	?		?
			250 controls (*)	75.3 (8.5) onset	63%	?	
Bagli (Germany)	1999	70	85 LOAD (*)	66.7 (7.8)	54%	NINCDS-ADRDA/ DSM-III-R	Sporadic
			156 control (*)	86.1 (3.8)	76.5%	Probable AD	
Yasuda (Japan)	1999	65	102 EOAD (*)	83.8 (3.2)	58.3%	NINCDS-ADRDA	Sporadic (family excluded)
			118 controls (*)	63 (4.4)	?		
Wu (China)	1999	?	85 LOAD (*)	63 (4.4)	?		?
			18 controls (*)	81.44 (10.33)	?	CERAD protocol	
Tilley (UK)	1999	55	73 controls (*)	73.28 (21.58)	?	Histopathological definite	Sporadic
			177 LOAD (*)	72.8 (8.7)			
Rodríguez Martín (Italy)	2000	65	91 LOAD (*)	74.4 (10.3)	68.00%	NINCDS-ADRDA	Unknown
			30 EOAD (*)	70.6 (11.4)	51.83%	Probable–possible AD	
Romas (Caribbean)	2000	55	121 VD	68.0 (7.7)	66.00%	Hachinsky score	?
			18 mixed	62.1 (4.9)	67.72%		
Cui (China)	2000	?	125 control (*)	61.8 (4.8)	67.72%		Sporadic
			93 LOAD (*)	Age onset 69.2 (8.6)	?	DSM-III-R	
Kim (Korea)	2000	65	45 control (*)	Age onset 67.4 (9.0)	?		Sporadic
			42 LOAD (*)	68.6 (6.3)	?		
Kim (Korea)	2000	65	108 controls (*)	81.6 (8.6)	62.15%	CERAD protocol	Sporadic
			59 LOAD +	range 55–101			
Kim (Korea)	2000	65	+41 EOAD (*)	72.8 (8.7)	31.35%	Histopathological definite	Sporadic
			199 controls (*)	range 58–94			
Kim (Korea)	2000	65	91 LOAD (*)	76.1 (?)	69.23%	NINCDS-ADRDA	Unknown
			30 EOAD (*)	64.6 (?)	50.00%	Probable–possible AD	
Cui (China)	2000	?	121 VD	64.6 (?)	50.00%	Hachinsky score	?
			18 mixed	83.5 (?)	69.12%		
Cui (China)	2000	?	125 control (*)	76.9 (?)	50.00%		?
			93 LOAD (*)	79.6 (?)	63.43%		
Cui (China)	2000	?	45 control (*)	79.1 (?)	Global 73%	NINCDS-ADRDA	Familial with pedigree
			42 LOAD (*)	73.1 (?)		Probable–possible AD	
Cui (China)	2000	?	108 controls (*)	74.4 (12.8)	50.92%	NINCDS-ADRDA	?
			59 LOAD +	74.4 (14.1)	47.62%	Probable–possible	
Cui (China)	2000	65	+41 EOAD (*)	70.4 (7.6) (global ages)	?	NINCDS-ADRDA	Sporadic
			199 controls (*)	67.0 (7.5)	?	DSM-IV	

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Author	Year	Onset age	Studied groups	Study age: years (SD)	Female (%)	Diagnostic criteria	Sporadic/familial AD
Dermaut (Netherlands)	2001	68–69	319 LOAD (*) 220 controls (*)	Prevalent AD (n=258) 82.1±7.1 (onset) Incident AD (n=98) 83±7.3 (onset) Control (n=242) 81±4.9	75% 80% 60%	NINCDS-ADRDA DSM-III-R Probable-possible AD	?
Chandak (India)	2002	?	49 AD (*) 12 VD 10 mixed 7 Others 100 controls (*)	AD: global age 71.9 (7.9) AD: range 48 - 90 Mean age 73.3 (8.3)	Sex matched	NINCDS-ADRDA Probable-possible	?
Yamada (Japan)	2002	62	82 AD (*) 119 controls (*)	86.1 (7.9) range 62–104 85.7 (8.0) range 65–103	Global 60.20%	CERAD protocol	Sporadic
Jia (China)	2006	70.2 (5.1)	379 LOAD (*) 441 controls (*)	75.3 (7.3) 75.1 (7.8)	51.18% 51.87%	NINCDS-ADRDA DSM-IV	Sporadic

Extracted groups are marked with (*). Missed data are substituted by (?). In the onset column, "aprox" indicates a value based in the lower limit of the study or onset-age.
Abbreviations: LOAD: late-onset Alzheimer's disease, LOADf: familial late-onset Alzheimer's disease, EOAD: early-onset Alzheimer's disease, EOADf: familial early-onset Alzheimer's disease, VD: vascular dementia.

bivariate contingency tables and by layers applying the Mantel Haenszel test to find the odds ratio. For the binary logistic regression model, the level of significance of each variable was established using a priori *p*-value of 10%. These data were analyzed using the SPSS for Windows statistical analysis program v.11.5. The Cochrane Collaboration's Review Manager Program (RevMan version 4.2.8 for Windows, Oxford, 2005) was used for the meta-analysis. The genotypic frequencies were consistent with HWE, taking into account the recommendations concerning χ^2 test errors (Terwilliger and Ott, 1994), and so the Arlequin program was used (Excoffier et al., 2005).

Acknowledgments

This work was supported in part by grants from the Fondo de Investigación Sanitaria (F.I.S.) (Projects 01/3025 and 02/1567). J. C-H., P. M-H. and F. C-H. belong to "Red Temática de Investigación Cooperativa 03/10".

REFERENCES

- Aldudo, J., Bullido, M.J., Frank, A., Valdivieso, F., 1997. Presenilin-1 genotype (2/2) is associated with late-onset Alzheimer's disease in Spanish patients. *Alzheimer's Res.* 3, 141–144.
- Bagli, M., Papassotiropoulos, A., Schwab, S.G., Jessen, F., Rao, M.L., Maier, W., Heun, R., 1999. No association between an intronic polymorphism in the presenilin-1 gene and Alzheimer disease in a German population. *J. Neurol. Sci.* 167, 34–36.
- Bentahir, M., Nyabi, O., Verhamme, J., Tolia, A., Horre, K., Wiltfang, J., Esselmann, H., De, S.B., 2006. Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms. *J. Neurochem.* 96, 732–742.
- Borchelt, D.R., Thinakaran, G., Eckman, C.B., Lee, M.K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C.M., Kim, G., Seekins, S., Yager, D., Slunt, H.H., Wang, R., Seeger, M., Levey, A.I., Gandy, S.E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Price, D.L., Younkin, S.G., Sisodia, S.S., 1996. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1–42/1–40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 17, 1005–1013.
- Brookes, A.J., Howell, W.M., Woodburn, K., Johnstone, E.C., Carothers, A., 1997. Presenilin-I, presenilin-II, and VLDL-R associations in early onset Alzheimer's disease. *Lancet* 350, 336–337.
- Cai, X., Stanton, J., Fallin, D., Hoyle, J., Duara, R., Gold, M., Sevush, S., Scibelli, P., Crawford, F., Mullan, M., 1997. No association between the intronic presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease in clinic and population-based samples. *Am. J. Med. Genet.* 74, 202–203.
- Chandak, G.R., Sridevi, M.U., Vas, C.J., Panikker, D.M., Singh, L., 2002. Apolipoprotein E and presenilin-1 allelic variation and Alzheimer's disease in India. *Hum. Biol.* 74, 683–693.
- Combarros, O., Alvarez-Arcaya, A., Oterino, A., Berciano, J., Delgado-Rodriguez, M., Pena, N., Fernandez-Viadero, C., Luis Perez-Lopez, J., Setien, S., Carvajal, A., 1999. Polymorphisms in the presenilin 1 and presenilin 2 genes and risk for sporadic Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* 171, 88–91.
- Cui, T., Zhou, X., Jin, W., Zhen, F., Cao, X., 2000. Gene polymorphism in apolipoprotein E and presenilin-1 in patients with late-onset Alzheimer's disease. *Chin. Med. J. (Engl)* 113, 340–344.
- De Jonghe, C., Cruts, M., Rogeava, E.A., Tysoe, C., Singleton, A., Vanderstichele, H., Meschino, W., Dermaut, B., Vanderhoeven, I., Backhovens, H., Vanmechelen, E., Morris, C.M., Hardy, J., Rubinsztein, D.C., St George-Hyslop, P.H., Van Broeckhoven, C., 1999. Aberrant splicing in the presenilin-1 intron 4 mutation causes presenile Alzheimer's disease by increased Abeta42 secretion. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1529–1540.
- Deng, Y., Tarassishin, L., Kallhoff, V., Peethumongsin, E., Wu, L., Li, Y.M., Zheng, H., 2006. Deletion of presenilin 1 hydrophilic loop sequence leads to impaired gamma-secretase activity and exacerbated amyloid pathology. *J. Neurosci.* 26, 3845–3854.

- Dermaut, B., Roks, G., Theuns, J., Rademakers, R., Houwing-Duistermaat, J.J., Serneels, S., Hofman, A., Breteler, M.M., Cruts, M., Van Broeckhoven, C., van Duijn, C.M., 2001. Variable expression of presenilin 1 is not a major determinant of risk for late-onset Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 24, 935–939.
- De Strooper, B., 2003. Aph-1, Pen-2, and nicastrin with presenilin generate an active gamma-secretase complex. *Neuron* 38, 9–12.
- Elbaz, A., Alperovitch, A., 2002. Bias in association studies resulting from gene-environment interactions and competing risks. *Am. J. Epidemiol.* 155, 265–272.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics online* 1, 47–50.
- Ezquerria, M., Blesa, R., Tolosa, E., Lopez, P.S., Aguilar, M., Pena, J., Van, B.C., Ballesta, F., Oliva, R., 1997. The genotype 2/2 of the presenilin-1 polymorphism is decreased in Spanish early-onset Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 227, 201–204.
- Helisalmi, S., Mannerman, A., Lehtovirta, M., Rynnänen, M., Riekkinen, S., Soininen, H., 1997. No association between alpha1-antichymotrypsin polymorphism, apolipoprotein E and patients with late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 231, 56–58.
- Higuchi, S., Muramatsu, T., Matsushita, S., Arai, H., Sasaki, H., 1996. Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 347, 1186.
- Hu, C.J., Sung, S.M., Liu, H.C., Chang, J.G., 1998. Association of apolipoprotein E genotype and intronic polymorphism of the presenilin-1 gene with Alzheimer's disease in elderly Taiwan Chinese. *J. Neurosci.* 157, 158–161.
- Hutton, M., Hardy, J., 1997. The presenilins and Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* 6, 1639–1646.
- Isoe, K., Urakami, K., Ji, Y., Adachi, Y., Nakashima, K., 1996. Presenilin-1 polymorphism in patients with Alzheimer's disease, vascular dementia and alcohol-associated dementia in Japanese population. *Acta Neurol. Scand.* 94, 326–328.
- Jia, L., Zhou, C., Lv, H., Wang, W., Ye, J., Zhang, X., Zhou, W., Xu, J., Wang, L., Jia, J., 2006. Association between presenilin 1 intronic polymorphism and late onset Alzheimer's disease in the North Chinese population. *Brain Res.* 1116, 201–205.
- Juhasz, A., Palotas, A., Janka, Z., Rimanoczy, A., Palotas, M., Bodi, N., Boda, K., Zana, M., Vincze, G., Kalman, J., 2005. ApoE -491A/T promoter polymorphism is not an independent risk factor, but associated with the epsilon4 allele in Hungarian Alzheimer's dementia population. *Neurochem. Res.* 30, 591–596.
- Kehoe, P., Williams, J., Lovestone, S., Wilcock, G., Owen, M.J., 1996. Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease. The UK Alzheimer's Disease Collaborative Group. *Lancet* 347, 1185.
- Kim, K.W., Jho, J.H., Lee, K.U., Lee, D.Y., Lee, J.H., Youn, J.Y., Lee, B.J., Woo, J.I., 2000. No association between presenilin 1 (PS1) intronic polymorphism and sporadic Alzheimer's disease in Koreans. *J. Neural Transm.* 107, 1191–1200.
- Korovaitseva, G.I., Bukina, A., Farrer, L.A., Rogaev, E.I., 1997. Presenilin polymorphisms in Alzheimer's disease. *Lancet* 350, 959.
- Kowalska, A., Wender, M., Lannfelt, L., 1998. Lack of association between an intronic polymorphism in the presenilin-1 gene and sporadic late-onset Alzheimer disease in Polish patients. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 9, 137–139.
- Lehmann, D.J., Williams, J., McBroom, J., Smith, A.D., 2001. Using meta-analysis to explain the diversity of results in genetic studies of late-onset Alzheimer's disease and to identify high-risk subgroups. *Neuroscience* 108, 541–554.
- Lendon, C.L., Myers, A., Cumming, A., Goate, A.M., St. Clair, D., 1997. A polymorphism in the presenilin 1 gene does not modify risk for Alzheimer's disease in a cohort with sporadic early onset. *Neurosci. Lett.* 228, 212–214.
- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D.M., Oshima, J., Pettingell, W.H., Yu, C.E., Jondro, P.D., Schmidt, S.D., Wang, K., Crowley, A.C., Fu, Y.H., Guenette, S.U., Galas, D., Nemens, E., Wijsman, E.M., Bird, T.D., Schellenberg, G.D., Tanzi, R.E., 1995. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269, 973–977.
- Liao, A., Gomez-Isla, T., Clatworthy, A., Hyman, B.T., 1999. Lack of association of presenilin-1 intron-8 polymorphism with neuropathological features of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 816, 295–298.
- Mann, D.M., Pickering-Brown, S.M., Bayatti, N.N., Wright, A.E., Owen, F., Iwatsubo, T., Saido, T.C., 1997. An intronic polymorphism in the presenilin-1 gene does not influence the amount or molecular form of the amyloid beta protein deposited in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 222, 57–60.
- Matsubara-Tsutsui, M., Yamagata, H., Morishima, A., Nakura, J., Mitsuda, N., Kamino, K., Kondo, I., Miki, T., 2002. The 4,752 C/T polymorphism in the presenilin 1 gene increases the risk of Alzheimer's disease in apolipoprotein E4 carriers. *Intern. Med.* 41, 823–828.
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., Stadlan, E.M., 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.
- Meshorer, E., Soreq, H., 2002. Pre-mRNA splicing modulations in senescence. *Aging Cell* 1, 10–16.
- Mirra, S.S., Heyman, A., McKeel, D., Sumi, S.M., Crain, B.J., Brownlee, L.M., Vogel, F.S., Hughes, J.P., van, B.G., Berg, L., 1991. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 41, 479–486.
- Nishiwaki, Y., Kamino, K., Yoshiwa, A., Sato, N., Tateishi, K., Takeda, M., Kobayashi, T., Yamamoto, H., Nonomura, Y., Yoneda, H., Sakai, T., Imagawa, M., Miki, T., Ogihara, T., 1997. T/G polymorphism at intron 9 of presenilin 1 gene is associated with, but not responsible for sporadic late-onset Alzheimer's disease in Japanese population. *Neurosci. Lett.* 227, 123–126.
- Papassotiropoulos, A., Bagli, M., Jessen, F., Maier, W., Forstl, H., Kurz, A., Heun, R., 2000. Interaction of two genes possibly involved in the regulation of the amyloid precursor protein (APP) processing. *Mol. Psychiatry* 5, 240–241.
- Perez-Tur, J., Wavrant-De, V.F., Lambert, J.C., Chartier-Harlin, M.C., 1996. Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease. The Alzheimer's Study Group. *Lancet* 347, 1560–1561.
- Rodriguez-Manotas, M., Amorin-Diaz, M., Vinals-Bellido, I., Cabezas-Herrera, J., Martinez-Hernandez, P., Canizares-Hernandez, F., 2006. Real time PCR assay with fluorescent hybridization probes for genotyping intronic polymorphism in presenilin-1 gene. *Clin. Chim. Acta* 364, 343–344.
- Rodriguez-Martin, T., Callela, A.M., Silva, S., Munna, E., Modena, P., Chiesa, R., Terrevazzi, S., Ruggieri, R.M., Palermo, R., Piccoli, F., Confalonieri, R., Tiraboschi, P., Fragiaco, C., Quadri, P., Lucca, U., Forloni, G., 2000. Apolipoprotein E and intronic polymorphism of presenilin 1 and alpha-1-antichymotrypsin in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 11, 239–244.
- Rogaev, E.I., Sherrington, R., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Sorbi, S., Nacmias, B., Piacentini, S., Amaducci, L., Lannfelt, D., Fraser, L., Rommens, P.E., St. George-Hyslop, J.M., 1995. 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, 775–778.
- Romas, S.N., Mayeux, R., Tang, M.X., Lantigua, R., Medrano, M., Tycko, B., Knowles, J., 2000. No association between a presenilin 1 polymorphism and Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 57, 699–702.

- Scacchi, R., Gambina, G., Ruggeri, M., Martini, M.C., Ferrari, G., Silvestri, M., Schiavon, R., Corbo, R.M., 1999. Plasma levels of apolipoprotein E and genetic markers in elderly patients with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 259, 33–36.
- Scott, W.K., Yamaoka, L.H., Locke, P.A., Rosi, B.L., Gaskell, P.C., Saunders, A.M., Conneally, P.M., Small, G.W., Farrer, L.A., Growdon, J.H., Roses, A.D., Pericak-Vance, M.A., Haines, J.L., 1997. No association or linkage between an intronic polymorphism of presenilin-1 and sporadic or late-onset familial Alzheimer disease. *Genet. Epidemiol.* 14, 307–315.
- Sherrington, R., Rogeev, E.L., Liang, Y., Rogeeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Foncin, J.F., Bruni, A.C., Montesi, M.P., Sorbi, S., Rainero, I., Pinessi, L., Nee, L., Chumakov, I., Pollen, D., Brookes, A., Sansequ, P., Polinsky, R.J., Wasco, W., Da Silva, H.A.R., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., Tanzi, R.E., Roses, A.D., Fraser, P.E., Rommens, J.M., St George-Hyslop, P.H., 1995. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754–760.
- Singleton, A.B., Lamb, H., Leake, A., McKeith, I.G., Perry, R.H., Morris, C.M., 1997. No association between an intronic polymorphism in the presenilin-1 gene and Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 234, 19–22.
- Sodeyama, N., Itoh, Y., Suematsu, N., Matsushita, M., Otomo, E., Mizusawa, H., Yamada, M., 1998. Presenilin 1 intronic polymorphism is not associated with Alzheimer type neuropathological changes or sporadic Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 64, 548–551.
- Sorbi, S., Nacmias, B., Tedde, A., Forleo, P., Piacentini, S., Latorraca, S., Amaducci, L., 1997. Presenilin-1 gene intronic polymorphism in sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 222, 132–134.
- Taddei, K., Yang, D., Fisher, C., Clamette, R., Hallmayer, J., Barnetson, R., Maller, R., Brooks, W.S., Whyte, S., Nicholson, G.A., Masters, C.L., Broe, G.A., Gandy, S.E., Martins, R.N., 1998. No association of presenilin-1 intronic polymorphism and Alzheimer's disease in Australia. *Neurosci. Lett.* 246, 178–180.
- Terwilliger, J.D., Ott, J., 1994. *Handbook of Human Genetic Linkage*. Johns Hopkins University Press, New York.
- Tilley, L., Morgan, K., Grainger, J., Marsters, P., Morgan, L., Lowe, J., Xuereb, J., Wischik, C., Harrington, C., Kalsheker, N., 1999. 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, 659–663.
- Tysoe, C., Whittaker, J., Cairns, N.J., Atkinson, P.F., Harrington, C.R., Xuereb, J., Wilcock, G., Rubinsztein, D.C., 1997. Presenilin-1 intron 8 polymorphism is not associated with autopsy-confirmed late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 222, 68–69.
- van Duijn, C.M., Cruts, M., Theuns, J., Van, G.G., Backhovens, H., Van den, B.M., Wehnert, A., Serneels, S., Hofman, A., Van Broeckhoven, C., 1999. Genetic association of the presenilin-1 regulatory region with early-onset Alzheimer's disease in a population-based sample. *Eur. J. Hum. Genet.* 7, 801–806.
- Wang, X., DeKosky, S.T., Wisniewski, S., Kamboh, M.I., 1998. Genetic association of two chromosome 14 genes (presenilin 1 and alpha 1-antichymotrypsin) with Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 44, 387–390.
- Williamson, P.R., Gamble, C., Altman, D.G., Hutton, J.L., 2005. Outcome selection bias in meta-analysis. *Stat. Methods Med. Res.* 14, 515–524.
- Wragg, M., Hutton, M., Talbot, C., 1996. Genetic association between intronic polymorphism in presenilin-1 gene and late-onset Alzheimer's disease. *Alzheimer's Disease Collaborative Group. Lancet* 347, 509–512.
- Wu, X., Jiang, S., Lin, S., Tang, G., Feng, G., Qian, Y., Wang, D., Ren, D., Gu, N., 1999. No association between the intronic presenilin 1 polymorphism and Alzheimer's disease in the Chinese population. *Am. J. Med. Genet.* 88, 1–3.
- Yamada, M., Sodeyama, N., Itoh, Y., Suematsu, N., Otomo, E., Matsushita, M., Mizusawa, H., 1997. Association of presenilin-1 polymorphism with cerebral amyloid angiopathy in the elderly. *Stroke* 28, 2219–2221.
- Yamada, M., 2002. Risk factors for cerebral amyloid angiopathy in the elderly. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 977, 37–44.
- Yasuda, M., Hirono, N., Maeda, K., Imamura, T., Mori, E., Tanaka, C., 1999. Case-control study of presenilin-1 intronic polymorphism in sporadic early and late onset Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 66, 722–726.