

20.688

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Dpto. de GENÉTICA



* 5 3 0 9 5 3 6 6 0 5 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**APORTACIONES AL ESTUDIO DE LAS BASES
MOLECULARES DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

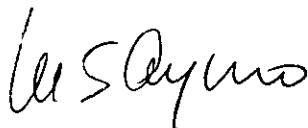
DOLORES IBARRETA RUIZ
MADRID, 1996

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Dpto. de GENÉTICA

APORTACIONES AL ESTUDIO DE LAS BASES MOLECULARES
DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

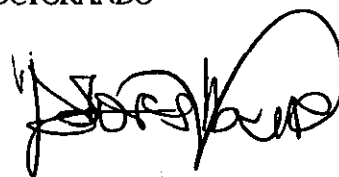
TRABAJO PRESENTADO POR DOLORES IBARRETA RUIZ PARA OPTAR
AL GRADO DE DOCTORES EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Vº Bº DIRECTOR DE TESIS



Matilde Sanchez Ayuso
Investigador Científico
C.S.I.C.

DOCTORANDO



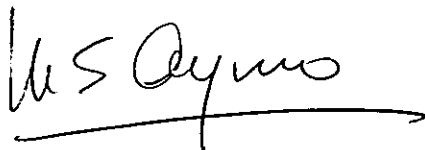
Dolores Ibarreta

MATILDE SANCHEZ AYUSO, Investigadora Científica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

INFORMA QUE:

El trabajo presentado como tesis doctoral, con el título: "APORTACIONES AL ESTUDIO DE LAS BASES MOLECULARES DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER" por Dña. Dolores Ibarreta Ruiz, ha sido realizado bajo mi dirección, en el Departamento de Fisiopatología y Genética Molecular Humana del Centro de Investigaciones Biológicas (C.S.I.C.) y, en mi opinión, reúne todos los requisitos necesarios para poder optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Madrid, 3 de Enero de 1996

A handwritten signature in black ink, appearing to read "M. S. Ayuso". The signature is written in a cursive style and is underlined with a long horizontal stroke that extends to the right.

A Carmen y Juan Luis

INDICE

INTRODUCCION

1. BREVE DESCRIPCION DE LA ENFERMEDAD	1
1.1 Anatomía patológica de la enfermedad	3
2. GENETICA DE LA ENFERMEDAD	4
2.1 Ligamiento al cromosoma 21	4
2.2 Ligamiento al cromosoma 14	5
2.3 Ligamiento al cromosoma 1	6
2.4 Ligamiento al cromosoma 19	6
3. EL PEPTIDO β -AMILOIDE Y LAS PLACAS NEURITICAS	7
3.1 Expresión y procesamiento de la APP	7
3.2 Alteraciones genéticas en el gen de la APP	11
3.3 Función fisiológica y/o patológica de β A4	13
4. LA PROTEINA TAU Y LOS OVILLOS NEUROFIBRILARES	15
5. LA APOLIPOPROTEINA E	20
5.1 ApoE4 y EA de aparición tardía	21
5.2 Estructura de la apoE	22
5.3 ApoE y β A4	23
5.4 ApoE y los ovillos neurofibrilares	24
Objetivos y planteamiento experimental	26

METODOS

MEDIOS Y TAMPONES	30
1. VARIACIONES ESTRUCTURALES DEL ADN GENOMICO	31
1.1 Obtención y manipulación del ADN genómico	31
1.2 Métodos de rastreo de alteraciones en el ADN	35
1.3 Análisis del genotipo de apoE	39
2. ESTABLECIMIENTO Y CARACTERIZACION DE LINEAS CELULARES LINFOBLASTOIDES	40
2.1 Establecimiento de las líneas celulares linfoblásticas	40

2.2 Crecimiento celular de los cultivos de linfoblastos	42
2.3 Actividad de PKC	42
2.4 Estudios de expresión de ARN	44
2.5 Determinación de la $[Ca^{2+}]_{intracelular}$	45
2.6 Detereminación del pH intracelular	46

RESULTADOS

1. ANALISIS ESTRUCTURAL DEL ADN DE LOS ENFERMOS	49
1.1 Descripción de los individuos de los cuales se obtuvieron muestras de ADN	49
1.2 Búsqueda de alteraciones estructurales en el gen de la APP	52
1.3 Determinación del genotipo para la apoE	57
2. CARACTERIZACION DE LAS LINEAS LINFOBLASTICAS ESTABLECIDAS	61
2.1 Crecimiento celular	62
2.2. Expresión de APP	65
2.3 Homeostasis de calcio	65
2.4 Regulación del pH intracelular en linfoblastos	78
2.5 Análisis estructural del gen de la calmodulina	83

DISCUSION

1. ALTERACIONES ESTRUCTURALES EN LOS GENES IMPLICADOS EN LA EA	89
1.1 Alteraciones estructurales en el gen de la APP	89
1.2 Asociación de la EA con el alelo 4 de la apoE	92
2. CARACTERIZACION DE LAS LINEAS LINFOBLASTICAS DE ENFERMOS DE ALZHEIMER	94
2.1 Expresión de la APP	95
2.2 Crecimiento celular	95
2.3 Homeostasis de calcio en linfoblastos	97
2.4 Homeostasis de protones en linfoblastos	99
2.5 Significado funcional de las alteraciones en homeostasis de calcio y protones	100

Conclusiones	102
---------------------	-----

Bibliografía	106
---------------------	-----

INTRODUCCION

1. BREVE DESCRIPCION DE LA ENFERMEDAD

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia en los individuos de mediana y avanzada edad, entendiéndose como demencia el deterioro global de las facultades cognoscitivas, emocionales e intelectuales de un individuo sin que se afecte su estado de conciencia. El síntoma inicial es la pérdida de memoria, esto es, la capacidad de retener información durante un período de tiempo. Con el desarrollo de la enfermedad aparecen también dificultades en el uso del lenguaje, en la capacidad de resolver problemas, de razonar, de aprendizaje, de pensamiento abstracto, etc. Algunos pacientes sufren determinados trastornos de la personalidad, como la paranoia. Irremediablemente desembocan en una muerte acelerada en un lapso de muy pocos años.

En Estados Unidos, esta enfermedad afecta del 5 al 10% de la población por encima de los 65 años, y del 24 hasta el 47% de la población mayor de 85 años (Bachman y col, 1992; Evans y col, 1989). Se conocen más de 4 millones de casos (Kamboh, 1995) y el coste social y económico que esto conlleva es extremadamente alto. Un estudio europeo a gran escala encontró que 0.4% de las mujeres y 0.3% de los hombres entre los 60 y 69 años, y que 11.2% de las mujeres y 10% de los hombres entre los 80 y 89 de la población padecen EA (Rocca y col, 1991). Teniendo en cuenta estos porcentajes tan altos y la tendencia de la expectativa de vida media a alargarse, se entiende que la EA se está convirtiendo en un grave problema para la salud pública.

La enfermedad se clasifica en dos tipos:

-Enfermedad de aparición precoz o EA presenil si la enfermedad se manifiesta antes de los 65 años. Es muy improbable que esta aparición tenga lugar antes de los 40 años.

-Enfermedad de aparición tardía si los síntomas aparecen a partir de los 65 años. Se calcula que 3 de cada 4 pacientes de EA presentan los primeros síntomas después de los 60 años

Esta edad de división a los 65 años es arbitraria ya que no existe diferencia fenotípica alguna entre los dos grupos. Sí se ha observado que en los casos preseniles la enfermedad progresa más rápidamente (Van Broeckhoven, 1995).

La enfermedad puede ser familiar o esporádica, dependiendo de que existan o no antecedentes familiares. La EA de aparición precoz es normalmente hereditaria, con una herencia autosómica dominante, mientras que la de aparición tardía suele considerarse esporádica. Sin embargo, el hecho de que se trata de pacientes de avanzada edad hace difícil llevar a cabo un estudio detallado de los antecedentes familiares (normalmente los padres y la mayoría de los parientes de mayor edad que el enfermo han fallecido) y, por tanto, puede dificultar la determinación del carácter hereditario de estos casos. La estadística actual nos dice que aproximadamente el 60% de los enfermos carecen de historia familiar de EA (Tabla I).

Tabla I. Distribución de casos en la población de enfermos de EA

Tipo de EA		% del total de casos
EA de aparición tardía	familiar	30
	esporádico	45
EA de aparición precoz	familiar	15
	esporádico	10

(Van Broeckhoven, 1995)

Se han establecido unos parámetros de diagnóstico de esta enfermedad por el NINCDS-ADRDA Work Group (McKhann y col, 1984) en un intento de unificar el criterio. Además del diagnóstico neuropsicológico de demencia, se evalúa en cada caso tomografías computarizadas, espectroscopía de resonancia magnética, electroencefalograma y otros análisis que permiten, además, eliminar otras posibles causas patológicas para el deterioro mental como accidentes cerebrovasculares, infecciones, traumatismos, etc. Aun así, el diagnóstico se considera sólo probable a menos que haya una confirmación post-mortem a través del análisis de la anatomía patológica del cerebro del enfermo.

1.2 Anatomía patológica de la enfermedad

La enfermedad se caracteriza histopatológicamente por la formación de placas neuríticas o seniles, ovillos neurofibrilares en el citoplasma de las neuronas y depósitos amiloideos en el endotelio vascular en la corteza cerebral.

Las placas neuríticas están formadas por glía y neuritas degeneradas alrededor de un centro de material amiloide que también se observa alrededor de los vasos sanguíneos cerebrales. Las placas se encuentran fundamentalmente en las áreas de asociación de la corteza, en la amígdala y en el hipocampo. Se componen de un núcleo central de amiloide rodeado de neuritas distróficas que contienen acúmulos de organelas vesiculares y estructuras helicoidales filamentosas. También se encuentran astrocitos y células de microglía reactivas al depósito de β -amiloide. Estos depósitos de β -amiloide se encuentran además en otras enfermedades como el síndrome de Down, la angiopatía congofílica holandesa (HCHWA-D), demencias parkinsonianas, etc.

Los entramados u ovillos neurofibrilares se componen de pares de filamentos de material proteico, principalmente una proteína asociada a los microtúbulos que se denomina *tau*, que se entrelazan formando estructuras de filamentos helicoidales emparejados que se depositan intracelularmente. Estos filamentos helicoidales emparejados son fibras neuronales anormales que se componen de 2 filamentos de 10 nm enrollados en una hélice con una periodicidad media de 80 nm (Kidd, 1964) fácilmente distinguibles de otras estructuras filamentosas normales como los neurofilamentos y microtúbulos. Se encuentran en el pericarion neuronal formando los ovillos y alrededor de las placas seniles en las neuritas distróficas. La localización habitual de estos ovillos es siempre intracelular pero, ocasionalmente, se encuentran en el parénquima, liberados de la célula como resultado de la muerte neuronal. Además de en EA, los entramados neurofibrilares se encuentran en otras enfermedades del sistema nervioso central como el síndrome de Down, la demencia pugilística, y el parkinsonismo post-encefálico. Aunque sólo se puede afirmar que se encuentran sistemáticamente y de manera abundante en EA (Brion, 1992).

2. GENETICA DE LA ENFERMEDAD

La EA no ha sido considerada tradicionalmente como una enfermedad meramente genética, a pesar de que siempre se han conocido casos familiares con una herencia clara. Individuos con una historia familiar de EA tienen un mayor riesgo estadístico de padecer la enfermedad, pero la explicación genética de esta herencia no ha sido conseguida más que en un porcentaje muy pequeño de los casos. Al menos un 15% de éstos presentan una herencia autosómica dominante (Potter, 1991). Estudios epidemiológicos han demostrado que hay un riesgo familiar claro en un tercio de los casos (Heyman y col, 1983), estimando entre 25 y 40% los casos familiares, y siendo la herencia, cuando la hay, autosómica dominante en la mayoría (Fitch y col, 1988; Heston y col, 1981; Hofman y col, 1989). La disponibilidad de grandes familias con formas hereditarias de EA permitió el uso de estudios de ligamiento genético para localizar el gen o, más correctamente, los genes de la enfermedad. Son varios los *loci* que se han relacionado con la enfermedad y se localizan en cromosomas distintos: 1, 14, 19 y 21.

2.1 Ligamiento al cromosoma 21

Durante la década de los 80 la investigación en relación a la genética de la enfermedad se centró en el cromosoma 21. Una pista inicial en la búsqueda de la localización cromosómica de la enfermedad fue la observación de que todos los individuos con síndrome de Down^a acaban desarrollando las placas y los ovillos neurofibrilares típicos de EA (Ellis y col, 1974). Esta observación provocó que se centrara la búsqueda del posible error genético en el cromosoma 21 (cuya trisomía es la causante del síndrome de Down).

En 1984, Glenner y Wong purificaron y secuenciaron la proteína amiloide a partir de las placas seniles de cerebros de EA. Tres años más tarde varios grupos localizaron esta proteína o, más concretamente, su precursora (APP), en el cromosoma 21 (Goldgaber y col, 1987; Kang y col, 1987; Tanzi y col, 1987a). Finalmente, ese mismo año, St.George-Hyslop y col (1987a)

describieron un ligamiento en los enfermos de EA a marcadores del cromosoma 21. Estos argumentos dieron lugar a una teoría, rápidamente aceptada, que consideraba la APP como la causante de EA (bien por sobreexpresión, como en la trisomía 21, o bien por algún tipo de mutación que diera lugar a una expresión aberrante). La búsqueda de errores de expresión de la APP fue iniciada por muchos grupos aunque no se ha llegado a ninguna conclusión definitiva.

Posteriormente se demostró que este ligamiento al cromosoma 21 se daba solo en la EA de aparición precoz. Se encontraron varias mutaciones en el gen de la APP, pero sólo un mínimo porcentaje de EA de aparición precoz corresponde a mutaciones en este gen. Por último, otro tipo de EA precoz se ha encontrado ligado a marcadores centroméricos próximos a APP pero independientes de ésta (St George-Hyslop y col, 1987b; Tanzi y col, 1987b). Esta heterogeneidad entre los distintos casos se explica asumiendo que son genes diferentes los responsables de EA. Algunos grupos postulan la posibilidad de que exista en el cromosoma 21 algún *locus* que determine EA además del gen de la APP (Tanzi y col, 1988a, 1991).

2.2 Ligamiento al cromosoma 14

A finales de 1992 se publicaron varios trabajos que señalaban la existencia de un *locus* para EA de aparición precoz en el brazo largo del cromosoma 14 (14q24.3). Este ligamiento se encontró en casi un 70% de los casos de aparición precoz (Schellenberg y col, 1992; St George-Hyslop y col, 1992; Van Broeckhoven y col, 1992). El proto-oncogen FOS, localizado en la región 14q24.3-q31 (Barker y col, 1984), fue pronto estudiado en relación con EA. Se vio que el producto de este gen forma parte de un heterodímero que reconoce una secuencia de unión al ADN denominada AP-1 (Sheng y Greenberg, 1993). Dado que existen zonas de homología a esta secuencia en el gen de la APP, se pensó que el producto de FOS podría estar implicado en la regulación de expresión de la APP, pero el análisis de la secuencia total del gen en enfermos y controles no reveló diferencia alguna (Cruts y col, 1994).

Finalmente se ha determinado el gen en el cromosoma 14 que corresponde a la herencia en estos casos de EA de aparición precoz, el S182, que codifica lo que parece una proteína integral de membrana que actuaría como un receptor, un canal proteico o una proteína estructural (Sherrington y col, 1995). Se han descrito 5 mutaciones distintas en este gen que se corresponden con la aparición temprana de la enfermedad (Sherrington y col, 1995) y se cree probable que casi el 70% de los casos precoces de EA estén causados por errores en este gen (Van Broeckhoven, 1995).

2.3 *Ligamiento al cromosoma 1*

Se ha descrito recientemente una ligación a un *locus* del cromosoma 1 (1q31-42) en casos de EA precoz en un grupo de siete familias de origen ruso (Levy-Lahad y col, 1995a). Se ha encontrado un gen candidato, STM2 o E5-1, que, sorprendentemente, es homólogo en secuencia al gen S182 del cromosoma 14 que se ha descrito en otros casos de EA precoz. Se ha localizado una mutación en este gen que segrega con la enfermedad (Levy-Lahad y col, 1995b; Rogaev y col, 1995). La presencia en EA de mutaciones en dos genes homólogos pero localizados en cromosomas diferentes apoya la hipótesis de que dichas mutaciones, aunque distintas, son patogénicas para la enfermedad.

Se ha encontrado una homología muy alta de estas proteínas con otra de *Drosophila* que actúa como canal iónico y otra proteína que en el nematodo *C. elegans* actúa como transportadora de esperma (Rogaev y col, 1995; Levy-Lahad y col, 1995b).

2.4 *Ligamiento al cromosoma 19*

El ligamiento al cromosoma 19 fue inicialmente descrito por Pericak-Vance y col en 1993 para casos de EA de aparición tardía. Se encontró también una relación clara entre EA y un alelo específico de la apolipoproteína E, $\epsilon 4$, que mapea en el cromosoma 19 (q13.2). La relación entre la apoE y EA se describe con más detalle en los siguientes apartados.

3. EL PEPTIDO β -AMILOIDE Y LAS PLACAS NEURITICAS

La parte central de las placas seniles de EA se compone de un fragmento insoluble de 4 KDa, el péptido β -amiloide (β A4), que proviene de una proteína precursora de 90-130 kDa, glicosilada y ligada a la membrana celular (APP). El péptido β -amiloide que se encuentra en los depósitos vasculares proviene también de la APP.

3.1 *Expresión y procesamiento de la APP*

La APP se expresa, además de en neuronas, en la membrana de otros muchos tipos de células. La función biológica de la APP no es del todo conocida. El componente mayoritario de la APP, la proteasa nexina II, es un inhibidor de proteasas que estimula el crecimiento de las neuritas (Oltersdorf y col, 1989). Mattson y col (1993a) sugirieron que la APP tiene un papel muy importante en la plasticidad neuronal y en la homeostásis de calcio, considerándola casi como un neuroprotector. Se ha descrito su participación en la regulación del crecimiento celular usando fibroblastos como modelo experimental (Saitoh y col, 1989). También se ha observado un aumento de la adhesión celular en presencia de APP (Schubert y col, 1989) que puede promover el crecimiento de las neuritas. Se ha estipulado que está relacionada con el contacto célula-célula (Shivers y col, 1988) o con la axogénesis (Luo y col, 1990). Puede que también participe, de algún modo, en la regulación del proceso de coagulación ya que las plaquetas activadas secretan APP (Van Nostrand y col, 1990). Como confirmación de esta última hipótesis, se ha descrito que la APP inhibe el factor de coagulación plaquetaria XIa (Smith y col, 1990). Se ha sugerido también la posibilidad de que las plaquetas actúen como vehículo transportador de APP (Gardella y col, 1992). Se ha descrito la capacidad de APP para acoplarse a Go, una proteína de unión a GTP en cerebro, funcionando así como receptor de membrana (Nishimoto y col, 1993). En conclusión, todo parece indicar que es una molécula multifuncional.

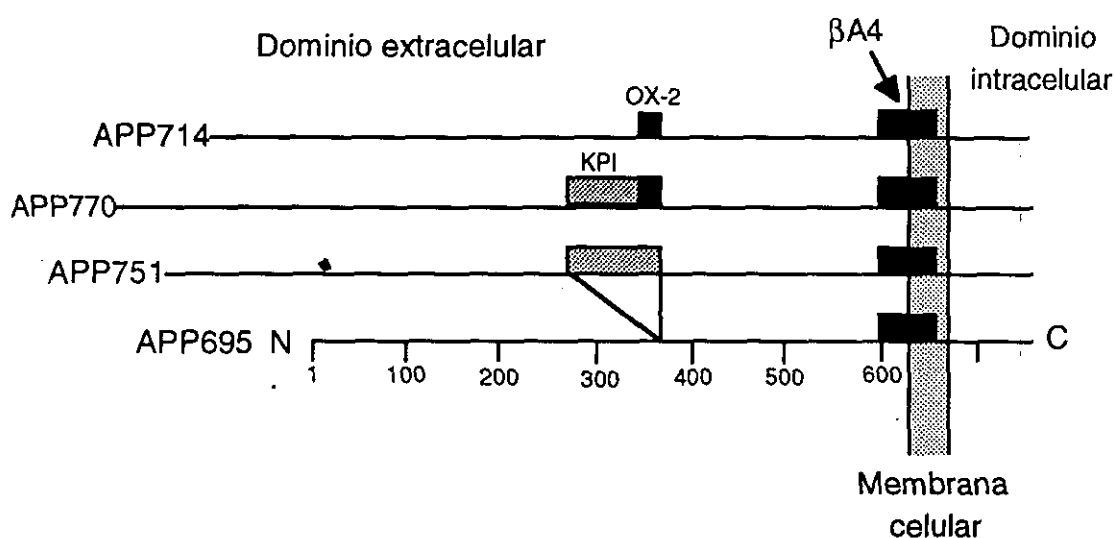
La regulación del metabolismo de APP está sujeta a continuo estudio como posible respuesta a la patología de EA, aunque no se

ha encontrado una causa definitiva para esta enfermedad en la expresión de APP, con la excepción de algunos casos familiares, y existen todavía muchas contradicciones al respecto. Esta regulación puede tener lugar a distintos niveles:

- Modulación de la transcripción mediante diversos factores.
- Procesamiento alternativo de mRNA.
- Regulación post-transcripcional (glicosilación, fosforilación, proteolisis)

La expresión de APP puede ser regulada a nivel de la transcripción. Se ha descrito (Quon y col, 1990) que muchos factores de crecimiento y citoquinas aumentan los niveles de mRNA de APP. Otros factores que modulan el crecimiento celular también aumentan la transcripción de APP (Adler 1991).

Otro nivel de control de expresión de la APP se encuentra en el procesamiento del mRNA. Se han observado varias isoformas, resultado de un procesamiento alternativo (esquema 1), con diferente número de aminoácidos y ausencia o presencia de los exones 7 y 8 del gen de la proteína.



Esquema 1. Distintas isoformas de la APP resultado de procesamiento alternativo del mRNA.

Los exones 7 y 8 del gen de la APP codifican dominios con homología a un inhibidor de proteasa tipo Kunitz (KPI) o un dominio de OX-2, respectivamente (Ponte y col, 1988; Tanzi y col, 1988b; Kitaguchi y col, 1988). El dominio OX-2 corresponde a un antígeno que se expresa en los timocitos (Williamson y col, 1992). Estas isoformas difieren en la longitud de la proteína a la que dan lugar y se denominan de acuerdo al número de aminoácidos de que se componen (Tabla II).

Tabla II. Isoformas conocidas de la APP humana

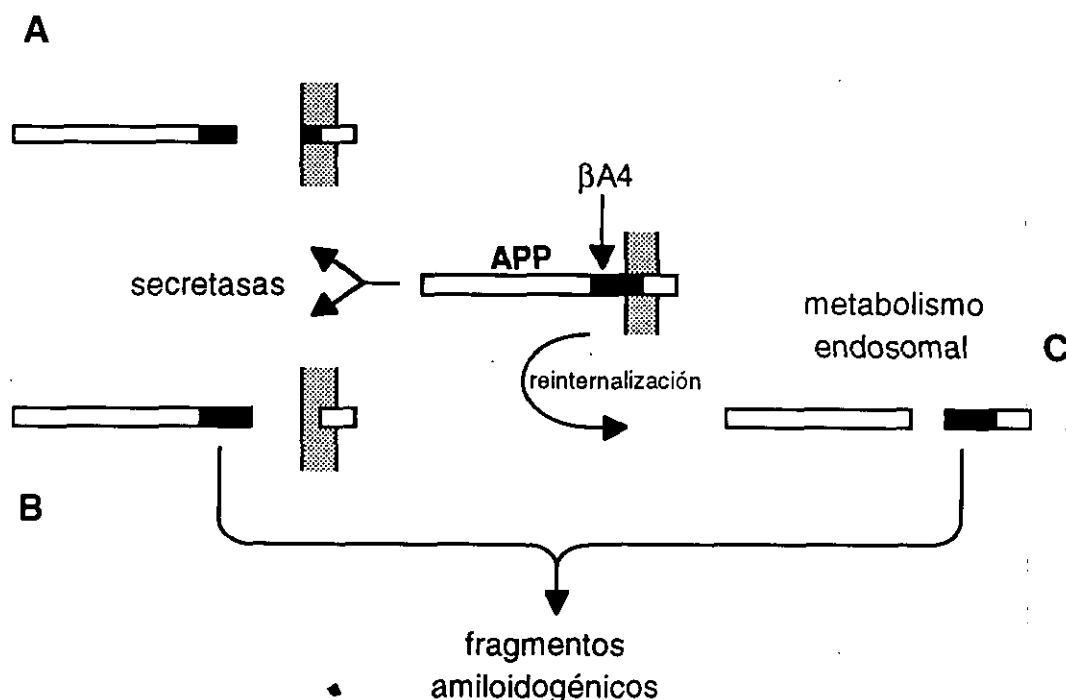
Isoforma	Presencia de β A4	Otros dominios	Referencia
APP770	SI	KPI, OX-2	Kitaguchi y col, 1988
APP752	SI	KPI	
APP751	SI	KPI	Ponte y col, 1988 Tanzi y col, 1988
APP733	SI		
APP714	SI	OX-2	Golde y col, 1990
APP695	SI		Kang y col, 1987
APP563	NO	KPI	Sauvage y Octave, 1989
APP365	NO	KPI	

El procesamiento alternativo parece ser específico del tejido. La isoforma APP695 es la más abundante en el sistema nervioso central mientras que APP751 y APP770 son las formas más comunes de los tejidos periféricos (Kang y Muller, 1990; Neve y col, 1988; Tanaka y col, 1989). Las neuronas expresan fundamentalmente APP695, mientras que en los astrocitos las formas más abundantes son APP751 y APP770 (Ohyagi y col, 1990). En un principio varios trabajos indicaron que tanto la concentración de las isoformas que contienen KPI (APP751 y APP770), como la proporción APP751/APP695, eran mayores en EA (Tanzi y col, 1988b; Tanaka y col, 1988, 1989; Johnson y col, 1989; Johnson y Rogers, 1990) y que estas diferencias en la expresión de APP podían ser la causa de los depósitos de β A4. Por el contrario, otros estudios posteriores de expresión de las isoformas 695, 751 y 770 en la

corteza cerebral de enfermos de EA y controles sanos no mostraron diferencia alguna (Ohyagi y col, 1992).

A nivel post-transcripcional existen datos que indican una regulación mediada por la fosforilación y glicosilación de la proteína (Gandy y col, 1988; Oltersdorf y col, 1990; Weidemann y col, 1989). Entre otros se ha estudiado el efecto de agentes que regulan la fosforilación, como los ésteres de forbol, sobre el metabolismo de APP (Buxbaum y col, 1990).

El esquema 2 muestra las distintas vías descritas del procesamiento de la APP.



Esquema 2. Vías metabólicas de la APP

La secuencia de $\beta A4$ se localiza entre el fragmento de membrana de la APP y su parte externa, siendo el extremo amino-terminal extracelular y el extremo carboxilo-terminal intracelular. Se requiere por tanto la proteólisis de la APP para que se pueda liberar $\beta A4$ y que de lugar a los depósitos extracelulares. Se ha demostrado la capacidad de la $\beta A4$ para agregarse espontáneamente (Burdick y col, 1992) y su gran afinidad por las placas seniles

(Maggio y col, 1992), luego un aumento de la cantidad de β A4 disponible extracelularmente daría fácilmente lugar a estos depósitos.

El procesamiento proteolítico de la APP (esquema 2A) da lugar a la secreción de un fragmento soluble, de más de 100 KDa, del extremo amino-terminal de la APP, proteasa nexina II, y de un fragmento pequeño del extremo carboxilo-terminal asociado a membrana (Oltersdorf y col, 1990). El corte tiene lugar entre los aminoácidos lisinal16--leucinal17 de la secuencia de la β A4 dentro de la APP (Esch y col, 1990; Anderson y col, 1991), dejando fuera parte del fragmento amiloide. Por lo tanto esta vía de procesamiento no puede dar lugar a los depósitos amiloideos.

El procesamiento alternativo de la APP que podría dar lugar a este aumento de β A4 ha sido ampliamente estudiado, y existen varias posibilidades. Por ejemplo, Anderson y col (1992) propusieron un sitio de corte alternativo en lisina 28 que daría lugar a un fragmento, aún mayor, que sí podría estar relacionado con los depósitos vasculares de amiloide y promover de una forma más clara la formación de placas (esquema 2B).

Algunos investigadores han sugerido que el procesamiento de la APP puede hacerse también a nivel lisosomal tras el reciclaje endosomal de la APP ligada a membrana (Estus y col, 1992; Golde y col, 1992). Siguiendo esta ruta metabólica intracelular (esquema 2C) se producen fragmentos que contienen β A4, pero no está claro cómo llegan estos fragmentos al espacio extracelular. Se sabe que la producción de β A4 es constitutiva y está normalmente presente en el líquido cefalorraquídeo y sangre (Haass y col, 1992; Shoji y col, 1992), aunque no se ha encontrado correlación entre la concentración de β A4 en el líquido cefalorraquídeo y la abundancia de depósitos en el cerebro. Falta todavía aclarar cómo se llega a una superproducción de β A4 o al fomento patológico de su depósito en las placas neuríticas.

3.2 Alteraciones en el gen de la APP

Por otro lado, al tiempo que se llevaron a cabo estudios de expresión y procesamiento de la APP, se estudió la secuencia de este gen en enfermos con antecedentes familiares. Hasta el momento, se han descrito 4 mutaciones distintas que se consideran causantes principales de la aparición de la patología en estos enfermos. Otras dos mutaciones, asociadas a enfermedades distintas (HCHWA-D y esquizofrenia) han sido descritas en la misma zona (Levy y col, 1990; Mant y col, 1992), aunque parece que la esquizofrenia ha sido desligada de la APP por posteriores investigaciones (Sorbi y col, 1994).

Estas mutaciones se encuentran en la zona de la APP que codifica la β A4, que coincide con los exones 16 y 17 de dicha proteína.

3.2.1 Alteraciones en el exón 16

-Residuos 670 y 671 APP770 (Mullan y col, 1992).

lisina--->asparagina
metionina--->leucina

Esta alteración es una doble mutación se encuentra dentro del extremo amino-terminal de la β A4 y podría interferir con la proteólisis de dicho fragmento al separarse de APP. Líneas celulares transfectadas con la APP doblemente mutada producen hasta 5 ó 6 veces más cantidad de β A4 en comparación con líneas transfectadas con la APP silvestre (Citron y col, 1992). Este aumento no se ha visto en las mutaciones en el exón 17 y se piensa que pueden producir una mayor producción de los fragmentos lisados de APP que todavía contienen β A4 y que se sabe están involucrados en las placas seniles (Cai y col. 1993).

Se ha descrito para casos de HCHWA-D, enfermedad que presenta depósitos amiloides similares a los de EA en los vasos cerebrales la siguiente mutación:

-Residuo 698 APP770

glicina--->glutamina (Levy y col, 1990)

3.2.2 Alteraciones en el exón 17

-Resíduo 717 de la APP770

valina--->isoleucina (Goate y col, 1991)

valina---->fenilalanina (Murrell y col, 1991)

valina--->glicina (Chartier y col, 1991)

Estudios de representación de estas mutaciones en la población de EA familiar demostraron que son muy infrecuentes y solamente asociadas a EA precoz (Schellenberg y col, 1991; Goate y col, 1991). En conjunto, estos errores genéticos pueden ser responsables de 5 a 10% de los casos de EA familiar de aparición precoz (Hardy y col, 1992; Van Broeckhoven, 1995) e incluso algunos afirman que de menos del 3% (Sherrington y col, 1995).

Estas mutaciones, que se encuentran en la zona de corte de la secretasa encargada de la proteólisis de la APP, podrían inhibir la disociación del extremo carboxilo-terminal de la APP impidiendo así la degradación de β A4, la unión de APP a la membrana o también favoreciendo la estabilidad de los fragmentos β A4 en los lisosomas (Estus y col, 1992; Goate y col, 1991). Xiao-Dan (1993) ha observado un aumento en la producción (hasta cinco veces más) mediante el metabolismo endosomal de fragmentos carboxilo-terminales de la APP que contienen β A4 y esa podría ser la causa del aumento de los depósitos.

3.3 Función fisiológica y/o patológica de β A 4

La hipótesis inicialmente aceptada es que los fragmentos de β A4, solos o con restos de APP, causan o promueven la muerte neuronal y la formación de ovillos (Hardy y col, 1992). Hubo en un principio desacuerdo respecto a la acción de β A4 sobre las células. Varios estudios con líneas celulares PC12 (que tienen características neuronales en cuanto que desarrollan neuritas bajo los efectos de factores de crecimiento neuronal) transfectadas con β A 4 demostraron un efecto trófico como consecuencia de su sobre-

expresión (Zain, 1989). Se ha observado que la β A4 promueve el crecimiento de las neuritas y la viabilidad de neuronas del hipocampo en cultivo (Whitson y col, 1989). Otros estudios parecidos (Allsop y col, 1989; Whitson y Selkoe, 1990; Saitoh y col, 1989) parecían confirmar este efecto neurotrófico, pero pronto empezaron a aparecer resultados contradictorios (Schubert y col, 1989; Yankner y col, 1989 y 1990). Finalmente se llegó a un consenso en el que se acepta la función trófica de β A4 sólo durante la fase de diferenciación celular, pasando luego a ser tóxica para las células si se administra en concentraciones relativamente altas (Yankner y col, 1990). La toxicidad de β A4 puede deberse al aumento de la sensibilidad a aminoácidos excitatorios en las neuronas (Koh y col, 1990). Kowall y col (1991) introdujo artificialmente β A4 en cerebro de rata dando lugar a cambios neurodegenerativos con pérdida neuronal y alteraciones en neuronas y neuritas. El intento de reproducir estos resultados (Podlisny y col, 1992) no funcionó y aumentó la polémica al respecto. Ultimamente proliferan los estudios de expresión de β A4 en animales transgénicos (LaFerla 1995). Se ha visto neurodegeneración y muerte celular por apoptosis, acompañadas de gliosis reactiva, que son características patológicas descritas en EA, pero su relación con la etiología de la enfermedad todavía no ha sido aclarada. En definitiva, no se puede aceptar inequívocamente la neurotoxicidad de β A4, ni que cause por sí misma los cambios neuropatológicos del EA, pero sí se ha observado *in vivo* e *in vitro* que puede dar lugar a algunas alteraciones neurodegenerativas.

Mattson y col. (1992) sugirieron un mecanismo por el cual la β A4 podría contribuir a la degeneración neuronal en EA y que estaría relacionado con alteraciones en la homeostasis de Ca^{2+} y cambios en la organización del citoesqueleto, inducidos por la APP. Neuronas corticales en cultivo expuestas a β A4 sufren cambios en la homeostasis de Ca^{2+} de forma que la respuesta a aminoácidos excitatorios, despolarización o ionóforos de calcio se ve potenciada. Las neuronas previamente tratadas con β A4 son más vulnerables a la neurotoxicidad de los aminoácidos excitatorios y muestran cambios en el citoesqueleto similares a los ovillos neurofibrilares (Mattson y col 1993).

Estudios de incorporación de β A4 sintético en membranas lipídicas demostraron que forma canales específicos para cationes (Arispe y col, 1993a, 1993b). Estos canales son permeables a los cationes metálicos monovalentes, como lo son la mayoría de los canales clásicos de Ca^{2+} presentes en la membrana celular y retículo endoplásmico. El canal que forma β A4 se bloquea reversiblemente por trometamina e irreversiblemente por Al^{3+} . Esta actividad conductora puede ser la causante de un desequilibrio en la homeostasis de Ca^{2+} que podría ser el responsable de la neurotoxicidad de β A4.

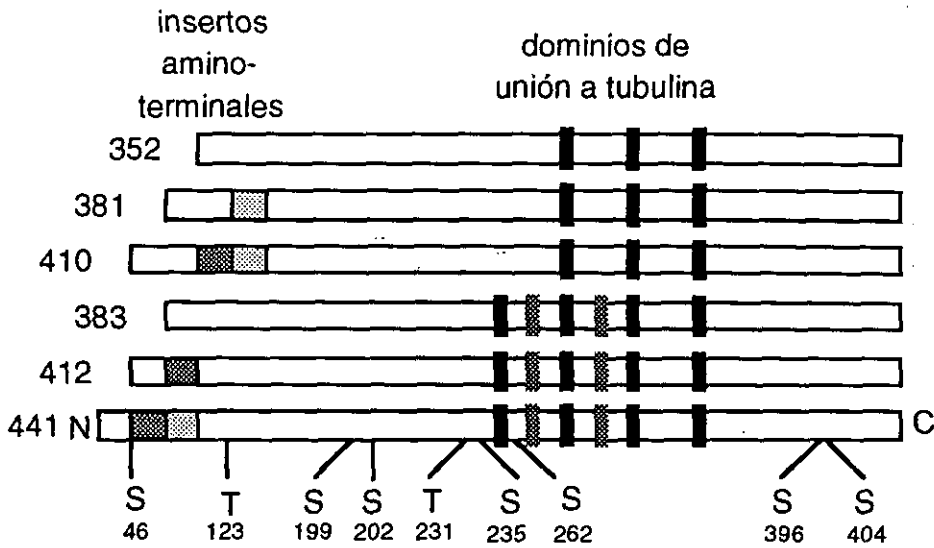
Algunos autores sugieren que la falta de acuerdo existente respecto a las propiedades del péptido se deben, en gran medida, al uso de péptidos artificiales en los experimentos por falta de acceso al péptido natural que se encuentra en concentraciones muy bajas en el cuerpo humano (Frangione, comunicación personal). Dada la importancia que estos grupos confieren a la conformación de la proteína, afirman que el uso de péptidos comerciales que presentan conformaciones no fisiológicas en la experimentación puede dar lugar a conclusiones erróneas. Soto y Frangione (1995) han propuesto que la β A4 presenta dos conformaciones estructurales distintas. Una fisiológica y que no sedimenta que denominan $\text{A}\beta_{\text{nc}}$ (no-amiloideogénica) que en condiciones patológicas se transforma en la molécula patogénica que se deposita en las placas, y que denominan $\text{A}\beta_{\text{ac}}$ (amiloideogénica). Esta transformación no es espontánea, sino mediada por factores diversos entre los que podrían encontrarse: cambios en el medio asociados con la edad (pH, presencia de radicales libres, etc), concentraciones anormalmente altas del péptido, interacciones con iones metálicos (Al^{3+} , Zn^{2+}), catálisis a través de una proteína acompañante (apoE, α -antiquimotripsina, glicosaminoglicanos), mutaciones en la APP, o modificaciones post-transcripcionales (Soto y Frangione, 1995).

4. LA PROTEINA TAU Y LOS OVILLOS NEUROFIBRILARES

El citoesqueleto de las neuronas de los enfermos de EA se ve desplazado por la aparición de los ovillos neurofibrilares, compuestos por filamentos helicoidales emparejados que no se parecen morfológicamente a ninguna estructura normal de la célula. Estos ovillos se encuentran sobre todo en el pericáron de las neuronas afectadas y en las ramificaciones que rodean a las placas seniles. Los filamentos helicoidales emparejados se encuentran también en estructuras neuropílicas filamentosas como resultado del deterioro neuronal, dando lugar a los denominados ovillos "fantasmas". Mediante química de proteínas y clonaje molecular se determinó pronto que la proteína *tau* era el componente mayoritario de los filamentos helicoidales emparejados (Goedert y col, 1988; Kondo y col), lo que se confirmó, posteriormente, mediante inmunohistoquímica (Wolozin y col, 1988).

Tau pertenece a un grupo de proteínas asociadas a microtúbulos de bajo peso molecular y es una de las más abundantes en el citoesqueleto de las células nerviosas, encontrándose casi exclusivamente en la zona del axón (Doering, 1993). En neuronas normales, *tau* estabiliza los microtúbulos en los axones (Kanai y Chen, 1992; Lee y Rook, 1992) estimulando la unión de GTP a la subunidad β de la tubulina, señal que inicia su acoplamiento en microtúbulos (Khatoon 1990). Otra función potencial de *tau* es la regulación de la diferenciación de una neurita a axón en vez de a dendrita, ya que se ha visto que se requiere la expresión de *tau* para la formación de axones en cultivos neuronales (Baas y col, 1991).

Las *tau* son un grupo de proteínas que se generan por procesamiento alternativo a partir de un único gen (Kosik y col, 1986). Se conocen 6 isoformas distintas con longitud entre 352 y 441 resíduos (Goedert y col, 1989) que se diferencian por la ausencia o presencia de dos tipos de insertos en la mitad del N-terminal (insertos 1 y 2) con 3 o 4 repeticiones en tandem del dominio de unión a tubulina en el C-terminal (Goedert y Jakes, 1990) (Esquema 3).



Esquema 3. Isoformas de la proteína *tau* indicando los residuos fosforilados en EA.

La proteína *tau* que se encuentra en los filamentos de los ovillos, a la que se denomina EA-*tau* o PHF-*tau*, es distinta de la *tau* normal. La proteína *tau* en EA está modificada mediante fosforilación, proteólisis y ubiquitinación. La fosforilación anormal es la modificación inicial y la más crítica en cuanto a la patología. La proteólisis y ubiquitinación se consideran más una respuesta reactiva a la formación de los filamentos helicoidales emparejados (Mandelkow y Mandelkow, 1994).

En preparaciones de *tau* obtenidas a partir de los ovillos neurofibrilares, ésta migra de forma diferente a la de preparaciones de *tau* normal cuando se separa mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y sodio diodecil sulfato (SDS-PAGE). La EA-*tau* extraída de los filamentos helicoidales emparejados se separa en tres bandas en geles de SDS-PAGE (Lee y col, 1991). Estas bandas de EA-*tau* contienen la *tau* completa, ya que se ha comprobado que se unen a anticuerpos tanto contra las zonas carboxilo como amino terminal de la *tau* normal (Goedert y col, 1992; Lee y col, 1991). Después de tratar las bandas con fosfatasa alcalina, se desdoblán en seis, que corresponden a las seis isoformas de *tau* normal (Liu y col, 1993; Goedert y col, 1992). Estas observaciones, junto con el hecho

de que la *tau* normal contiene 2-3 moles de fosfato/mol de proteína mientras la EA-*tau* contiene de 5 a 10 moles (Ksiezak-Reading y col, 1992; Kopke y col, 1993), llevó a la conclusión de que la fosforilación de *tau* era clave en la formación de los ovillos en EA. Cuando la *tau* normal se trata con proteína kinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (pero no con la proteína quinasa C) adquiere un comportamiento similar al de la EA-*tau* (Baudier y Cole, 1987; Baudier y col, 1987). Se ha observado además que la proteína kinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina I está aumentada en la región hipocámpica de los enfermos de EA (McKee y col, 1990) por lo que se cree que el error de fosforilación puede deberse en parte a proteínas dependientes de Ca^{2+} /calmodulina (Goedert 1993).

La unión de *tau* a los microtúbulos está regulada por el estado de fosforilación de la proteína (Lindwall y col, 1984) y la transformación de *tau* normal a EA-*tau* impide, por tanto, su unión eficiente a los microtúbulos (Bramblett y col, 1993). Esta falta de unión a los microtúbulos depende sólo del grado de fosforilación, ya que esto es lo único que diferencia a la *tau* normal de la EA-*tau*. Dicha disminución en la unión probablemente desestabiliza los microtúbulos en EA, dando lugar a fallos en el transporte axonal que llevan a la degeneración y muerte de las neuronas afectadas. Un cambio en la tubulina o en las proteínas asociadas a microtúbulos puede notarse más en las neuronas de individuos de edad avanzada ya que la concentración de tubulina disminuye con la edad (Yang y col, 1985) y esta concentración es bastante crítica para la formación de microtúbulos. La EA-*tau* se cataboliza ineficientemente y se acumula intracelularmente en las neuronas formando filamentos helicoidales emparejados que se acumulan en los ovillos neurofibrilares y placas seniles (Goedert, 1993; Holzer y col, 1994) Todas las isoformas conocidas de *tau* pueden dar lugar a los ovillos neurofibrilares (Goedert, 1993) (Esquema 4).

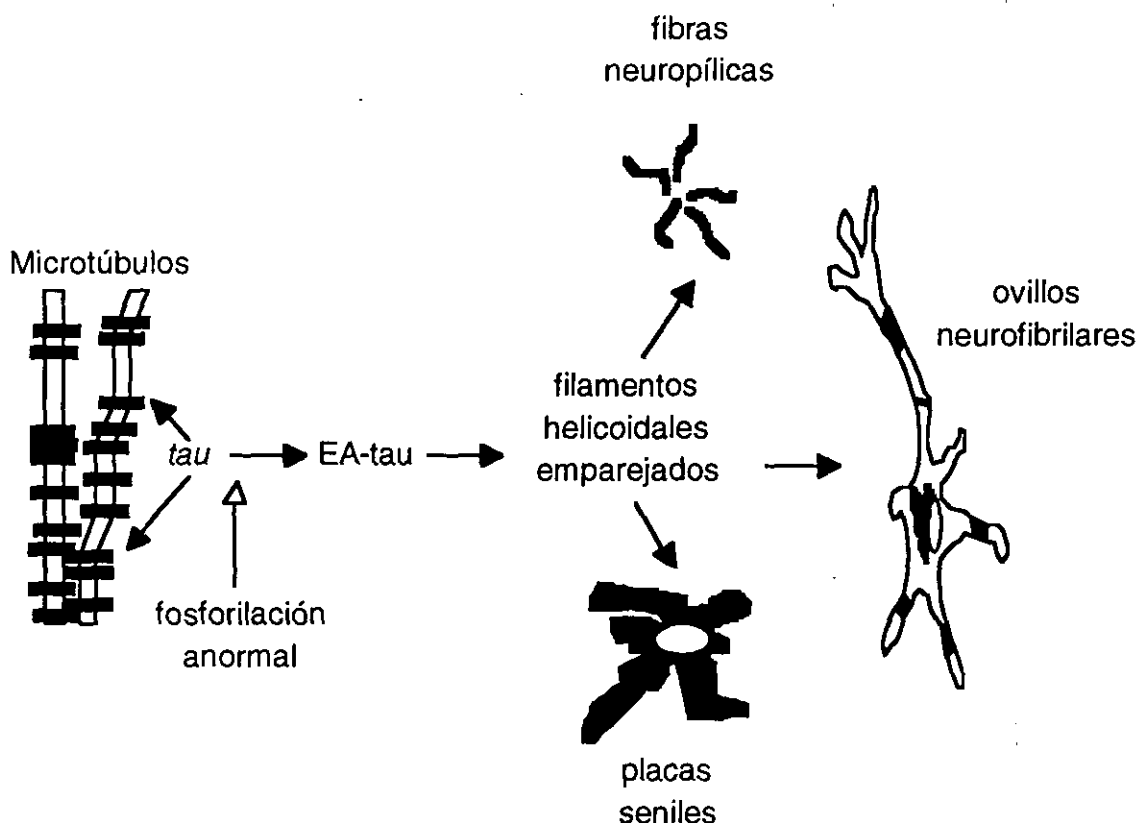
La pérdida de microtúbulos afecta funcionalmente a la neurona ya que éstos son necesarios para mantener el flujo axoplásmico en axones y dendritas. En las células con ovillos neurofibrilares se observa una disminución en el número de microtúbulos y una acumulación de organelas vesiculares. Estas

organelas se mueven normalmente a lo largo de los microtúbulos mediante un sistema dependiente de ATP (Brion, 1992). Es interesante mencionar el hecho de que la APP se desplace usando el transporte axoplásmico (Koo y col, 1990).

Una vez observado que la fosforilación juega un papel fundamental en los procesos patológicos que promueven la formación de ovillos, las quinasas y fosfatasas responsables de la conversión de *tau* a *tau* hiperfosforilada o anormalmente fosforilada (EA-*tau*) están siendo identificadas y caracterizadas. Es necesario determinar también los residuos que se fosforilan. Hasta ahora se han descrito varios residuos serina y treonina seguidos de prolina sensibles a esta fosforilación (Goedert, 1993; Hasagawa y col, 1992). La mayoría de los residuos hiperfosforilados se encuentran fuera de la zona de repetición en tandem (Esquema 3).

Además de los filamentos helicoidales emparejados en los ovillos, se encuentran filamentos libres que contienen *tau* normal (Brion y col, 1991). La diferencia entre los filamentos helicoidales emparejados libres y los que forman parte de los ovillos es la presencia de ubiquitina en los últimos (Mori y col, 1987). La ubiquitina forma parte de un sistema proteolítico dependiente de ATP encargado del catabolismo de proteínas intracelulares de vida corta (Kyte 1982). Una vez que la ubiquitina se une a la proteína, ésta se degrada rápidamente por la acción de una proteasa dependiente de ATP. Esta proteólisis de la *tau*, que se produce en los ovillos, se considera más una consecuencia que una causa de la patología.

Los filamentos helicoidales emparejados, además de proteína *tau*, contienen otro tipo de materiales como aluminio, Ca^{2+} , y proteoglicanos. También se ha observado presencia de péptido $\beta A 4$ (Brion, 1992).



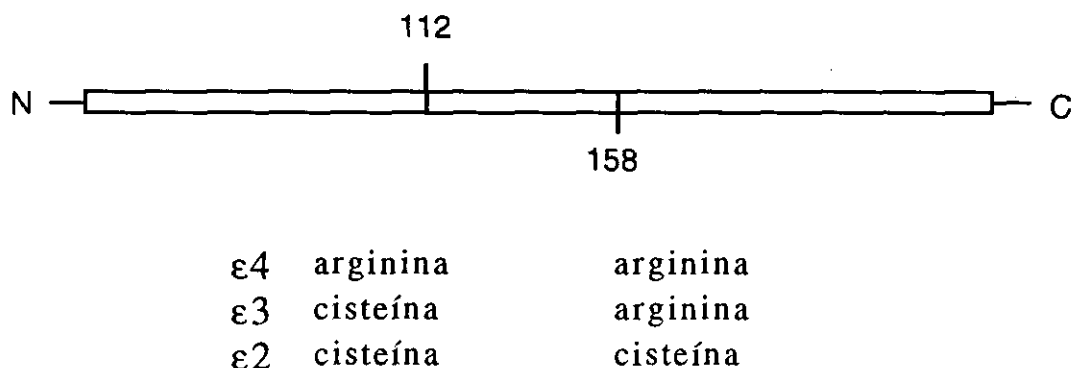
Esquema 4. Hipótesis sobre la vía patológica de la formación de filamentos helicoidales emparejados a partir de una hiperfosforilación de *tau* (Trojanowski y Lee, 1994).

5. LA APOLIPOPROTEINA E

La apolipoproteína E es una proteína plasmática cuyo papel fundamental es el transporte de colesterol. Participa en el metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas y en la homeostasis del colesterol a través de su capacidad de interacción con el receptor de lipoproteínas de baja densidad y con la proteína relacionada con dicho receptor (Mahley, 1988; Weisgraber, 1994). También funciona como transportador de lípidos en el sistema nervioso (Weisgraber y col, 1994) y se ha observado que juega un papel fundamental en la regeneración de nervios periféricos (Boyles y col, 1989; Weisgraber y col 1994). Estudios de expresión de la proteína demuestran que el segundo punto de síntesis de apoE, después del hígado, es el cerebro (Elshourbagy y col, 1985).

Dentro del sistema nervioso central son los astrocitos los encargados de su producción y en el sistema nervioso periférico su síntesis tiene lugar en células gliales no mielinizantes y macrófagos (Boyles y col, 1985).

El gen de esta proteína es polimórfico y presenta mayoritariamente tres alelos para tres isoformas distintas ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) (Esquema 5) (Zannis y col, 1982). La isoforma más corriente es la $\epsilon 3$ y se distingue por una cisteína en la posición 112 (112cys) y una arginina en la 158 (158arg) en la zona de unión al receptor de la proteína. La forma $\epsilon 4$ presenta una arginina en el residuo 112 y la $\epsilon 2$ una cisteína en el 158 y son mucho menos frecuentes que la isoforma $\epsilon 3$ (Davignon y col 1988).



Esquema 5. Diferencias en la composición de aminoácidos entre las isoformas de apoE.

5.1 ApoE4 y EA de aparición tardía

Se ha observado que la frecuencia del alelo $\epsilon 4$ es mucho más alta en los EA de aparición tardía por lo que se considera como un factor importante en la etiología de esta enfermedad. Se observó inicialmente que la apoE es un componente de las placas amiloides del cerebro de los enfermos de EA. Fue localizada inmunoquímicamente en las placas, depósitos amiloides alrededor de los vasos y en los ovillos neurofibrilares de cerebros con EA (Namba y col, 1991; Strittmatter y col, 1993). Finalmente, la

localización cromosómica de la apoE coincide con una región del cromosoma 19 previamente relacionada con un ligamiento para EA de aparición tardía. El ligamiento se había marcado entre las zonas 19q13.1 y 19q13.3 y la localización exacta de la apoE es 19q13.2. La tipificación de las distintas isoformas de apoE ya se había llevado a cabo mediante estudios de restricción (Emi y col, 1988), dado que se conocía la correlación entre los distintos polimorfismos de apoE y diversas enfermedades coronarias (Hixson y Vernier, 1990). Por esta razón el estudio de las frecuencias alélicas de los pacientes de EA se llevó a cabo muy rápidamente. El resultado de estos estudios estableció una clara relación entre la presencia de la isoforma $\epsilon 4$ y EA de aparición tardía (Saunders y col, 1993). Se observó que la frecuencia del alelo $\epsilon 4$ en el grupo de enfermos analizado era de 0,5 mientras que en la población control era de 0,16 (Strittmatter y col, 1993). La asociación de $\epsilon 4$ con EA está actualmente corroborada por múltiples estudios.

Se ha descrito que el alelo $\epsilon 4$ confiere un mayor riesgo de aparición de la enfermedad al tiempo que acorta la edad de aparición. El riesgo de desarrollar EA en familias con la enfermedad de aparición tardía aumenta de 20 a 90% y la edad media de aparición baja de 84 a 68 años dependiendo de que la carga alélica de $\epsilon 4$ aumente de 0 a 2 (Corder y col, 1993). El efecto de $\epsilon 2$ parece ser de protección contra la enfermedad en comparación con el más frecuente $\epsilon 3$ (Corder y col, 1994). Algunos grupos estipulan que su efecto es dosis-dependiente, mientras que otros no encuentran diferencias entre hetero u homocigotos.

5.2 Estructura de la apoE

ApoE presenta dos dominios estructurales: el amino-terminal (residuos 1-191) y el carboxilo-terminal (residuos 216-299) que definen también los dominios funcionales (Wetterau y col 1988, Aggerbeck y col 1988). El amino-terminal contiene el sitio de unión a receptores de lipoproteínas (residuos 136-150), mientras que el carboxilo-terminal contiene las regiones de unión a lípidos (Mahley 1988). Los dos dominios interaccionan entre sí modificando sus propiedades. El amino-terminal de las tres isoformas se dobla en 4

hélices (Wilson y col 1991). La estructura del carboxilo-terminal no se conoce tan bien, pero se sabe que es altamente helicoidal y menos estable que el extremo amino-terminal. Las pequeñas diferencias en las cadenas de las tres isoformas producen cambios estructurales que repercuten en diferencias funcionales las cuales podrían explicar su distinto comportamiento en relación a EA (Weisgraber, 1994). ApoE3 y 4 se unen a los receptores de lipoproteínas con gran afinidad, al contrario que apoE2. Esta afinidad tan baja de la apoE2 se explica por un cambio estructural en la zona de unión a los receptores por la aparición de puentes entre la cisteína 158, ácido aspártico 154 y arginina 150.

ApoE3 difiere de apoE4 en su afinidad hacia las lipoproteínas. ApoE3 se une mejor a lipoproteínas pequeñas de alta densidad mientras que apoE4 se une preferentemente a lipoproteínas de muy baja densidad. Esta diferencia se debe a la distinta interacción del residuo arginina 61, común para las dos isoformas, con el cisteína/arginina 112 de una u otra isoforma.

5.3 ApoE y A4

Se ha observado *in vitro* que entre las proteínas del líquido cefalorraquídeo que se unen a A4 inmovilizada se encuentra apoE (Wisniewski y col, 1993). Dado que apoE también se encuentra en los depósitos amiloideos de enfermedades como Creutzfeld-Jacob y otras asociadas a priones, se sugirió que podrá actuar como acompañante patológico de A4 (Wisniewski y Frangione, 1992). La unión apoE-A4 varía entre las distintas isoformas. Los complejos con apoE4 se forman antes que con apoE3 (Strittmatter y col, 1993). La correlación entre el patrón de distribución de los depósitos amiloideos en los cerebros de EA de aparición tardía y su genotipo de apoE apoyan la teoría del efecto de apoE4 sobre la formación de estos depósitos (Schmechel y col, 1993). Dentro de la teoría de las dos conformaciones de A4, no-amilodegénica y amiloidogénica, se ha observado que apoE4 transforma una en la otra (Soto y Frangione, 1995).

5.4 ApoE y los ovillos neurofibrilares

Actualmente, se postula que la apoE modula el citoesqueleto intracelular y altera la extensión y ramificación de las neuritas en presencia de colesterol (Handelmann y col, 1992). Estudios llevados a cabo en diversos cultivos de células neuronales demostraron que apoE3 en presencia de lípidos (fundamentalmente β -lipoproteínas de muy baja densidad) aumentaba la extensión de las neuritas al contrario que apoE4 (Nathan y col, 1994).

En cuanto al efecto específico de las distintas isoformas de apoE sobre el citoesqueleto, se ha observado que la formación de microtúbulos se ve negativamente influenciada por apoE4 y además produce una marcada dispersión de la tubulina. La hipótesis final es que apoE3 estabiliza el citoesqueleto y promueve la extensión neurítica, se acumula en el cuerpo neuronal y en las neuritas modulando la actividad del citoesqueleto. El efecto de apoE4 es, por el contrario, desestabilizador (Weisgraber y col, 1994). ApoE3 se une a *tau* evitando su fosforilación, mientras que apoE4 no se une a *tau*. El principal componente de las lesiones neurofibrilares son los filamentos helicoidales emparejados y su formación se vería aumentada por un fallo en la regulación de la fosforilación de *tau* en presencia de apoE4 (Strittmatter y col, 1994; Wisniewski, 1994). La unión de apoE a *tau* está mediada por cisteína, apoE3 y apoE2 tienen, respectivamente, uno y dos residuos de cisteína, mientras que apoE4 ninguno (Kamboh, 1995). La proteína *tau* presenta uno o dos residuos de cisteína (dependiendo de la isoforma) situados en la zona de unión a microtúbulos. Esta zona es la que forma el centro de los filamentos helicoidales emparejados (Crowther y col, 1992) y la que forma los puentes de unión en los dímeros de *tau*. Así pues, los residuos de cisteína en apoE2 y apoE3 permiten su unión a *tau* previniendo la formación de los ovillos. Queda todavía por aclarar si apoE se encuentra en el citoplasma de las neuronas y cómo llega hasta allí. Se piensa que lo hace a través de los receptores de lipoproteínas de baja densidad o las proteínas asociadas a dichos receptores sin pasar por la vía metabólica endosomal permaneciendo libre para interactuar con el citoesqueleto neuronal (Wisniewski y col, 1994b).

Objetivos experimentales

Objetivos de la tesis y planteamiento experimental

El objetivo general de esta tesis es la detección y caracterización a nivel celular y molecular de las posibles alteraciones estructurales de los genes implicados en la etiopatogenia de la enfermedad de Alzheimer. Nos basamos para la realización de este estudio en las tres hipótesis más verosímiles: En primer lugar, consideramos la posibilidad de que alteraciones estructurales de la proteína precursora de la sustancia amiloide (APP) sean causa de su procesamiento anómalo y/o de su insolubilidad en nuestra población de enfermos de Alzheimer. Para ello, hicimos un análisis estructural de los exones 16 y 17 de la APP, que son los que codifican el péptido β -amiloide (Kang y col, 1987) y en los que se han encontrado mutaciones asociadas a la enfermedad (Mullan y col, 1992; Chartier y col, 1991; Murrell y col, 1991; Goate y col, 1991). El abordaje experimental que utilizamos fue la amplificación de los fragmentos de ADN genómico de los pacientes de EA correspondientes a estos dos exones y la determinación de posibles alteraciones estructurales mediante técnicas de rastreo.

En segundo lugar, hicimos un estudio de la asociación entre el alelo 4 de la apolipoproteína E (apoE4) y la enfermedad de Alzheimer. Este estudio se realizó sobre la base de la gran incidencia de enfermos de Alzheimer de aparición tardía en individuos portadores de la apoE4 (Corder y col. 1993; Saunders y col. 1993). Para abordar este estudio diseñamos unos oligonucleótidos que nos permiten amplificar la zona polimórfica del gen de la apoE y determinar la proporción de los distintos alelos en el ADN de individuos control y enfermos de Alzheimer.

Por último, abordamos el estudio de la hipótesis de que anomalías en los mecanismos de homeostasis iónica celular puedan ser la causa del procesamiento anómalo y/o insolubilidad de la proteína amiloide. Estas anomalías podrían ser consecuencia de alteraciones estructurales en el gen(es) que codifica(n) alguna de las proteínas de canales iónicos, o de otro tipo de cambios estructurales característicos del proceso involutivo senil. En este sentido, creemos que la caracterización de los mecanismos

celulares de homeostasis iónica son esenciales para la comprensión de la etiopatogenia de la demencia de Alzheimer.

Para la realización de este estudio utilizamos células derivadas de pacientes de demencia de Alzheimer. Nos hemos basado en el supuesto de que los procesos patológicos que afectan primordialmente al sistema nervioso tienen también una expresión sistémica. Por tal razón, intentamos obviar las dificultades inherentes a la obtención de material de estudio procedente del sistema nervioso, utilizando como modelo experimental un tejido extraneural, relativamente fácil de inmortalizar, como son los linfocitos. Nos basamos en la hipótesis de que las mismas anomalías estructurales o de procesamiento de las proteínas que pudieran estar relacionadas con la deposición de la proteína β -amiloide, deben de manifestarse en todas las células que las expresen, a pesar de que las repercusiones funcionales sean una característica intrínseca de cada tipo celular.

Por tanto, decidimos utilizar como modelo experimental cultivos de linfoblastos, obtenidos mediante transformación de linfocitos con el virus de Epstein Barr. Para ello, iniciamos la constitución de un banco de líneas celulares linfoblásticas de enfermos de EA y de donantes sanos de la misma edad. La caracterización del medio iónico intracelular de estas líneas linfoblásticas la llevamos a cabo determinando los niveles basales de pH y de Ca^{2+} libre citosólico, así como el efecto de inhibidores específicos de los intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y Na^+/H^+ sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} y H^+ y la respuesta a factores de activación celular. La activación *in vitro* de los linfoblastos la realizamos con anticuerpos anti-IgM (Bourget y col, 1993). La respuesta celular a este activador consiste en una serie coordinada de acontecimientos que culminan con la síntesis de ADN y la división celular. Algunos de los acontecimientos primarios incluyen la salida de K^+ (Gelfand y col, 1986; Segel y col, 1979) y H^+ (Hesketh y col, 1985; Rosoff y Cantley, 1985) y la entrada de Na^+ (Felber y Brand, 1983; Prasad y col, 1987) y Ca^{2+} (Tsien y col, 1982; Whitney y Sutherland, 1973). Al mismo tiempo se hidroliza el fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato, formando inositol 1,4,5-trisfosfato, el cual moviliza Ca^{2+} de depósitos intracelulares, y diacilglicerol, activador de la proteína quinasa C (Cambier y col,

1987). La movilización de Ca^{2+} va acompañada de un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ libre citosólico, que puede activar proteína quinasas dependientes de Ca^{2+} -calmodulina (Schulman, 1993). Por tanto, la utilización de este activador celular ofrece la ventaja de que su utilización podría permitir determinar posibles alteraciones en los mecanismos implicados en la transmisión de señales, a través de varias vías.

METODOS

MEDIOS Y TAMPONES

- LB (para 1 litro):
 - 10 g bactotripton
 - 5 g extracto de levadura
 - 10 g NaCl

- PBS (para 1 litro):
 - 8 g NaCl
 - 0.2 g KCl
 - 1.44 g Na₂PO₄
 - 0.24 g KH₂PO₄

- SOC (para 1 litro)
 - 20 g bactotripton
 - 5 g extracto de levadura
 - 0.5 g NaCl
 - 18 g glucosa

- TE pH 8:
 - 10mM Tris HCl pH 8
 - 1 mM EDTA

- TAE 1x:
 - 40 mM Tris-base
 - 20 mM ácido acético glacial
 - 1 mM EDTA pH 8.0

- TBE 5x:
 - 54 g Tris base
 - 27.5 g ácido bórico
 - 20 ml 0.5 M EDTA pH 8.0

1. VARIACIONES ESTRUCTURALES DEL ADN GENOMICO

1.1 Obtención y manipulación del ADN genómico

1.1.1. Extracción de ADN

El ADN genómico se obtuvo a partir de leucocitos. Para ello, de unos 10 a 15 ml de sangre fueron extraídos de cada paciente o individuo control y tratados con anticoagulante (heparina o EDTA). Los hematíes se eliminaron mediante un procedimiento de lisis osmótica. Se añadió a la muestra 3-4 volúmenes de tampón de lisis (150 mM CINH₄, 10 mM CO₃HK, 1 mM EDTA) a 0°C. Tras una centrifugación de 10 min. a 500xg, el sedimento se resuspendió en 0,9 ml de un tampón de digestión (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH8, 1%SDS, 1 mg/ml proteinasa K) y se incubó a 50 °C durante 12-18 h. El ADN liberado al digerir las estructuras celulares se precipitó con acetato amónico 7,5 M (1/2 vol) y etanol 100% (2 vol). Una vez precipitado, el ADN se compacta en una masa mucosa que es fácilmente separable de los demás restos celulares con una varilla de vidrio fino. El ADN se disolvió en 1 ml de TE pH 8 y se congeló en alícuotas de 500 µl a -20°C para su futuro uso experimental.

En algunos casos el ADN se obtuvo a partir de líneas linfoblásticas mediante el mismo procedimiento pero suprimiendo el paso con el tampón de lisis de los hematíes.

1.1.2 Amplificación de fragmentos de ADN

La amplificación de los fragmentos de interés del ADN genómico se realizó mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite obtener un número muy elevado de copias de un fragmento de ADN flanqueado por oligonucleótidos específicos mediante la repetición de ciclos en los que la polimerasa completa la secuencia complementaria a la hebra desnaturalizada

(Saiki y col, 1985; Mullis y col, 1986; Mullis y Faalona 1987). La polimerasa que se usó en estas amplificaciones es la Taq ADN polimerasa de Boehringer Mannheim (Alemania). Los PCR se preparon en volúmenes de 25 a 50 μ l y, a menos que se indique lo contrario, con 1,5 mM de Cl_2Mg , 200 μ M dNTP, 0,8 μ mol/ μ l de cada oligonucleótido, 0,5 unidades de taq polimerasa y el tampón suministrado con la enzima por la casa comercial. El termociclador automático usado para estas amplificaciones es el modelo Gene Amp PCR System 9600 de Perkin Elmer. El programa para cada reacción variaba en función de los oligonucleótidos y la longitud del fragmento siendo el patrón básico similar en todos los casos:

1 ó 2 min.	94°C		Desnaturalización inicial
25-33 ciclos	30-60"	94°C	Desnaturalización
	1'	T_{oligo}	Anillamiento
	1-2'	72°C	Extensión
5 ó 10 min.	72°C		Extensión final

La temperatura de anillamiento (T_{oligo}) dependía de la secuencia de cada pareja de oligonucleótidos y se menciona específicamente en cada caso.

1.1.3. Clonaje de los fragmentos de PCR en plásmido bacteriano

El clonaje de los fragmentos de PCR se hizo en un vector comercial, pCRII (TA Cloning Kit, Invitrogen, California, USA), que aprovecha la terminación 3'-A libre que dejan las polimerasas que se usan en la amplificación. Este vector comercial está abierto y contiene bordes 3'-T libres con lo que la ligación del fragmento de PCR se produce fácilmente con la T4 ADN ligasa. Las reacciones de ligación se preparon en 10 μ l con el tampón suministrado con el kit, con 1 unidad de enzima y una proporción 1:1 de fragmento de PCR (1 μ l de una

reacción de 50 μ l) y vector (50 ng) y se mantuvieron a 14°C durante un mínimo de 4 horas (preferiblemente hasta 18h).

La transformación de las construcciones se llevó a cabo en la cepa INV α F' de *E. coli* introduciendo el plásmido (1 μ l de la reacción de ligación por cada alícuota de 50 μ l de bacteria competente) tras un choque térmico a 42°C. Después, las células se crecieron en 0,5 ml de medio SOC durante 1 hora a 37°C con agitación. El plásmido utilizado para el clonaje contiene un gen de resistencia a ampicilina, que permite la selección de las bacterias transformadas creciéndolas en medio con antibiótico. Este plásmido presenta también el gen de la β -galactosidasa en la zona de inserción del fragmento con lo que se facilita la selección de los clones positivos. La incorporación del fragmento de ADN en el plásmido rompe el gen y evita que la bacteria sea capaz de utilizar un análogo de la galactosa, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactosido (X-gal), que le da a las colonias una coloración azul cuando se metaboliza. Unos 100 μ l del cultivo en SOC recién transformado se plaquearon sobre LB-agar con ampicilina y X-gal y se crecieron a 37 °C durante la noche.

Después de poner a crecer las colonias blancas, portadoras del ADN transformado, se extrajeron los plásmidos mediante un método de lisis alcalina que es una adaptación del método descrito por Birboin y Doly (1979). Este método permite la extracción y purificación del plásmido a partir de un cultivo líquido de la bacteria. Los cultivos se crecieron durante 16-18 horas en 10 ml de LB líquido con ampicilina (50 μ g/ml) a 37°C en baños con agitación. Se centrifugaron 10 min a 600xg y el sedimento se resuspendió en 250 μ l de tampón de lisis (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA y 4 mg/ml lisozima). Tras esta lisis enzimática se añadió una solución alcalina (0,2 N NaOH, 1% SDS) que acaba de romper y desnaturalizar los restos bacterianos. El ADN cromosómico junto con otros restos bacterianos se precipitó añadiendo 1/2 vol. de 7,5 M acetato amónico. La solución se centrifugó 6 min a 10.000 rpm y el sobrenadante se transfirió a otro tubo añadiendo 0,6 vol de isopropanol para precipitar el ADN plasmídico. Se centrifugó 15 min a 13.000 rpm, se lavó el sedimento

con 70% etanol, se secó y se resuspendió en 50 μ l de TE pH 8 con 1mg/ml de ARNasa y se mantuvo 1h a 37°C para eliminar el ARN de la preparación. Este ADN se purificó mediante extracción con fenol/cloroformo (24:1) añadiendo un volumen a la muestra y centrifugando 1-2 min a 10.000 rpm para separar bien las fases. El ADN permanece en la fase acuosa mientras que los restos protéicos son arrastrados por el fenol. Los posibles restos de fenol o cloroformo se eliminaron precipitando el ADN con 1/10 vol de acetato sódico 3M pH 5,2 y 2 vol de etanol. Tras sedimentar el ADN, se lavó y secó la muestra para volverla a resuspender en 25 o 50 μ l de TE pH 8.

1.1.4 Secuenciación

Para secuenciar las muestras se utilizó el método de la terminación específica de base mediante dideoxinucleótidos (ddNTP) usando la T7 ADN polimerasa (Sanger 1977, 1980) y ^{35}S -dATP (Amershan) como marcador radioactivo. La reacción de la polimerasa incorpora los dNTP a partir del oligonucleótido unido a la hebra simple desnaturalizada marcando radioactivamente la nueva hebra con la incorporación de ^{35}S -dATP. En el momento que a la reacción se le añaden los ddNTP comienza a romperse el alargamiento de la nueva hebra a distintas alturas de la secuencia. Los reactivos para la reacción de secuenciación se obtuvieron de Pharmacia Biotech. De forma rutinaria se secuenció el fragmento de ADN inserto en un plásmido para facilitar la desnaturalización alcalina de la muestra. Para garantizar la presencia de las dos formas alélicas en casos heterocigotos, se secuenciaron mezclas de, al menos, 10 clones distintos para cada fragmento amplificado. Para cada secuenciación, unos 15 μ g de plásmido se trataron con 0,4 M NaOH en un volumen de 30 μ l, durante 30 min a 37°C para su desnaturalización. Inmediatamente después, se precipitó la muestra con acetato sódico y etanol en las proporciones descritas anteriormente. Tras la precipitación y lavado del sedimento con 70% etanol, el ADN seco se resuspendió con el oligonucleótido en un tampón de anillamiento (0,14 M Tris-HCl pH7,6, 14 mM MgCl_2 , 30 mM DTT) y se calentó 5 min a 65°C. Se dejó que la

temperatura bajara hasta 37°C poco a poco para favorecer la unión del oligonucleótido a la hebra desnaturalizada del ADN y entonces se añadieron los dNTP (200 μ M cada uno), 35 S-dATP (10 mCi/ml) y la T7 ADN polimerasa (0,1 unidades/ μ l) en un volumen final de 20 μ l, dejando que la reacción se prolongara durante 5 min para despues añadir los dideoxinucleótidos (5 μ M) por separado, obteniendo así cuatro reacciones para cada muestra que acaban en cada una de las bases.

La electroforesis de las muestras secuenciadas se hizo en geles de poliacrilamida al 6% con 5,6M urea en tampón TBE. Las muestras se sometieron a 40-50W manteniendo la temperatura alta y homogénea en todo el gel mediante una placa difusora de aluminio. La secuencia se obtuvo tras exposición de los geles secos en película fotografica.

1.2 *Métodos de rastreo de alteraciones en el ADN*

Se usaron dos técnicas distintas para facilitar la búsqueda de alteraciones en la secuencia de los fragmentos de ADN correspondientes a las proteínas en estudio: la electroforésis en geles de gradiente desnaturalizante (DGGE) y la técnica de polimorfismos conformacionales de ADN monocatenario (SSCP).

1.2.1 *Electroforésis en geles de gradiente desnaturalizante (DGGE)*

La detección de alteraciones estructurales en el gen que codifica para la APP se realizó mediante electroforesis en geles de gradiente desnaturalizante (DGGE) de los exones de la proteína correspondientes al fragmento β A4, los exones 16 y 17.

La DGGE es una técnica que permite separar moléculas de ADN que se diferencien incluso en una sola base. Esta separación se basa en las distintas propiedades de fusión de cada molécula que se expresa como una capacidad de migración distinta en geles de poliacrilamida con sustancias desnaturalizantes, en este caso urea y formamida. El efecto de estos dos desnaturalizantes equivale a un aumento de

temperatura. La combinación GC requiere una temperatura de fusión más alta, o una concentración más alta de desnaturalizantes, que AT.

Se ha observado que la desnaturalización de una molécula de ADN se produce gradualmente con el aumento de temperatura, separándose por regiones de longitud variable (50-100 pb). Estas regiones o dominios se separan en bloque al alcanzar una temperatura determinada. Los cambios de secuencia dentro de un dominio son los que marcan la diferencia en la T_m (temperatura de fusión) de éste sin afectar a los dominios adyacentes. La electroforesis de los fragmentos de ADN en estos geles de gradiente se lleva a cabo a una temperatura de 60 °C porque se aproxima a la T_m más baja que puede presentar un fragmento cualquiera de ADN. Los fragmentos entran en el gel y comienzan a migrar como estructuras de doble cadena hasta que el aumento en la concentración de urea y formamida alcanza la T_m del dominio más fácilmente desnaturalizable. El fragmento adquiere entonces una estructura ramificada, con una parte en doble cadena y otra en cadena sencilla. Esta estructura migra a través de los poros del gel con mayor dificultad (mayor cuanto más largo sea el dominio desnaturalizado). Dos fragmentos de ADN que difieran en una base y tengan, por tanto, T_m diferentes, comenzarán a migrar a distinta velocidad en puntos diferentes del gel, dependiendo de cual de ellos contenga el dominio que se desnaturalize primero. Este procedimiento incrementa notablemente la sensibilidad de la separación electroforética, permitiendo la detección de prácticamente el 100% de las mutaciones, apareamientos incorrectos de incluso una sola base en fragmentos de 200 ó 300 bases. Con esta técnica se hace patente la diferencia de movilidad en un gradiente desnaturalizante del homodúplex mutante y heterodúplexes silvestre-mutante, que se originan durante la amplificación por PCR, con relación a la movilidad del homodúplex silvestre normal. Basta un cambio de una sola base para alterar la temperatura de fusión de un fragmento de ADN y modificar, por tanto, su movilidad en el gel.

Para cada fragmento se estableció primero la concentración de desnaturalizante para alcanzar la T_m del primer dominio. Para ello, se

hizo una electroforesis con el gradiente perpendicular a la corriente eléctrica y se corrió una única muestra abarcando todo el gel. La muestra se desplaza en forma de curva sigmoïdal con el punto de inflexión en la zona de desnaturalización del primer dominio. Una vez determinada la concentración óptima para alcanzar esta desnaturalización se procedió a la electroforesis de todas las muestras correspondientes a cada paciente en geles con el gradiente paralelo a la corriente eléctrica

El PCR de los exones 16 y 17 de la APP se hizo a partir de 2 µg de ADN genómico en volúmenes de 25 ó 50 µl para los geles paralelos o perpendiculares respectivamente, con las concentraciones de oligonucleótido, tampón y dNTP ya descritas. La reacción se hizo con con el mismo programa para los dos fragmentos:

2'	94°C
30 ciclos	30'' 94°C
	30'' 55°C
	2' 72°C
5'	72°C

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (1%), utilizando un alícuota de 1/10 del volumen de la reacción. El resto del volumen de las muestras se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida 6,5% acrilamida (37,5:1 bisacrilamida). La concentración de desnaturalizante variaba desde 0% a 80%, siendo esta última concentración de 32% formamida y 5,6 M urea. El tampón de electroforesis estaba compuesto de 800 mM Tris-base, 400 mM acetato sódico, 20 mM EDTA. El tampón de carga se preparó con 20% ficoll, 10 mM Tris-HCl pH 7,8, 1 mM EDTA y 0,1% azul de bromofenol. Las muestras se cargaron 1:1 con tampón de carga y se sometieron a 150 V (0,4 A) durante 5-7 horas, sumergido el gel en

una cubeta de tampón a 60°C. La tinción se llevó a cabo con plata (Silver Stain, BioRad) o bromuro de etidio (0,5 µg/µl).

1.2.2 Técnica de polimorfismos conformacionales de ADN monocatenario (SSCP)

La técnica de polimorfismos conformacionales de ADN monocatenario (SSCP) está basada en los distintos patrones de migración del ADN de cadena sencilla en geles de poliacrilamida. La estructura secundaria que adquieren estas hebras sencillas hace que tengan una movilidad distinta aunque el tamaño sea el mismo, incluso diferencias de una sola base producen cambios notables (Orita 1989a y 1989b). Este procedimiento es especialmente eficaz para rastrear fragmentos de ADN de un tamaño entre 200 y 400 pb.

Los fragmentos de ADN analizados fueron amplificados por PCR en volúmenes de 25 µl a partir de 2 µg de ADN genómico con parejas de oligonucleótidos específicos en cada caso y descritos en el apartado de resultados. Tras comprobar la eficacia del PCR visualizando con 1/10 de la muestra los fragmentos en geles de agarosa (1,5%), 1 µl de cada PCR preparó para la electroforesis de SSCP. Las muestras se resuspendieron para su desnaturalización en un volumen final de 10 µl con 80% formamida, 0,02 M hidroxido metil mercurio (SERVA, Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg, Alemania), 0,25% azul de bromofenol y 0,25% xilen-cianol (Weghorst y Buzard, 1993). Se aseguró la desnaturalización de las muestras hirviéndolas 5' y manteniéndolas a 0°C hasta el momento de la carga en los geles. La composición de los geles era de 10% glicerol y 8 o 12% poliacrilamida (acrilamida/bis 39:1) dependiendo del tamaño del fragmento. La electroforesis se llevó a cabo a 20 W durante 3 ó 4 horas en tampón TBE. Los geles de SSCP se corrieron en un sistema de inmersión completa en cubeta (Modelo P8DS-1, The Penguin TM, OWL Scientific, Maryland, USA) con recirculación (Bomba modelo Masterflex L/S, COLE PALMER Instrument Co., Illinois, USA) y situados en una cámara fría (Hongyo y col, 1993). Con el aumento de temperatura debido a la resistencia del gel y la compensación del ambiente a 4°C y la

refrigeración por recirculación se alcanzaba una temperatura media de 10-12°C. La tinción de los geles se hizo con plata (Silver Stain, BioRad).

En aquellos casos en los que el producto de PCR no era de un único fragmento por producirse amplificaciones inespecíficas, el fragmento de interés se purificó extrayendo la banda tras electroforesis en geles de agarosa y posterior centrifugación a través de una matriz de papel 3MM en tampón TE (Zhun Lu y col, 1994).

1.3 Análisis del genotipo de la apolipoproteína E

Se amplificó mediante PCR un fragmento de 227 bp de la apoE (Hixson y Vernier, 1990) con los siguientes oligonucleótidos:

ES-3 sense (p3681)
5' TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA 3'

EA-3 antisense (p3891)
5' ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACAG 3'

El tampón utilizado para la reacción de PCR se modificó para poder digerir el fragmento amplificado con el mismo tampón. Este se componía de 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris-HCl pH 8,8, 10 mM β-mercaptoetanol, 170 µg/ml albúmina sérica bovina y a la reacción se añadió 1,5 mM dNTP, 0,8 µM oligonucleótido EA-3, 0,8 µM oligonucleótido ES-3, 10% DMSO y 0,5 unidades de Taq polimerasa. La reacción de amplificación partía de 1 µg de ADN, con el siguiente programa:

2'	94°C
33 ciclos	1' 94°C
	1' 57°C
	2' 70°C
2'	70°C

Tras comprobar la eficiencia del PCR visualizando la banda correspondiente en un gel de agarosa al 1%, el fragmento obtenido se digirió con el enzima de restricción *HhaI*, añadiendo directamente el enzima a la reacción e incubando a 37°C un mínimo de 3 horas para asegurar una digestión total. Se separaron los fragmentos de la digestión completa mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% (acrilamida:bisacrilamida 38:2) en TBE y a unos 11-12 v/cm durante 3 ó 4 horas. La tinción del gel se realizó con bromuro de etidio (0,5µg/ml) en TBE durante 30 min. Los distintos alelos presentan un patrón de digestión diferente ya que el número y localización de las dianas de restricción *HhaI* varía entre ellos y eso permite identificarlos fácilmente mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.

2. ESTABLECIMIENTO Y CARACTERIZACION DE LINEAS CELULARES LINFOBLASTICA

Para establecer las líneas celulares, los linfocitos se separaron de la sangre total (muestra de unos 15 ml) mediante un gradiente de Ficoll y se inmortalizaron con el virus de Epstein-Barr siguiendo el procedimiento descrito previamente (Seigneurin y col, 1988).

2.1 Establecimiento de las líneas celulares linfoblásticas

2.1.1 Producción del virus Epstein-Barr

El virus de Epstein-Barr utilizado en las transformaciones se obtuvo a partir de una línea celular de linfoma de Burkitt (B-95-6) cedida por Longina Akhtar (National Institute of Alcohol and Abuse Disorders, NIH, Bethesda, USA). En condiciones normales, un porcentaje de las células en cultivo sufre una infección lítica que libera el virus al medio. Se recolectó el sobrenadante del cultivo en monocapa de estas células y tras una centrifugación para eliminar restos celulares, se pasó a través de un filtro de 0,2 µm (Renner GmbH,

Alemania). El virus se conservó en alícuotas de 1 ml a -70°C para su posterior uso en las transformaciones linfoblásticas.

2.1.2 Extracción y transformación de linfocitos

15 ml de sangre se diluyeron en un volumen de PBS y se centrifugaron sobre 10-12 ml de ficoll-hypaque (Boehringer Lymphocyte Separation Medium). Con este medio se forma un gradiente de densidad que permite separar la fase celular mononucleada (linfocitos y monocitos) y plaquetas, que no sedimentan, de los hematíes que sedimentan. La fase que contiene los linfocitos se recolectó eliminando los restos del ficoll (que resulta tóxico para las células) con varios lavados con PBS. Finalmente, esta mezcla de mononucleados era resuspendida en medio de cultivo RPMI-1640 (GIBCO BRL, Scotland), complementado con 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, 10% suero fetal bovino y 200 mM glutamina. Se les añadió inicialmente una alícuota de 1ml de virus de Epstein-Barr y ciclosporina (1µg/ml) para evitar la activación de los linfocitos T que podría impedir la proliferación inicial de los linfocitos B infectados y se pusieron a cultivar a 37°C con una humedad del 70% y un contenido de CO₂ de 5%. A partir de este momento se vigila el cultivo con cambios de medio una o dos veces por semana y en 3-4 semanas aparecen los primeros clones linfoblásticos. Una acidificación importante del medio constituye un excelente marcador de la transformación. Una vez transformadas las células se dividieron y se prepararon para su congelación. Se congelaron en el medio ya descrito con un 0,075% de dimetilsulfóxido (DMSO), para evitar rupturas celulares con la formación de hielo y se mantienen a -120°C en nitrógeno líquido en alícuotas de 1 ml.

2.2 *Crecimiento de los cultivos de linfoblastos*

2.2.1 *Proliferación celular*

El estudio de la proliferación se hizo mediante conteo celular de los cultivos un hemocitómetro de Neubauer diluyendo la muestra según la densidad del cultivo.

2.2.2 *Ciclo celular*

El análisis de la fase del ciclo en el que se encontraban las células se hizo mediante la incorporación de yoduro de propidio al ADN celular (Krishan, 1975). El yoduro de propidio (0,05 mg/ml) se añade a aproximadamente 10^6 células en un volumen de 0,5 ml de PBS. Las células se rompen con 1% NP-40 y la proporción de yoduro incorporado se mide mediante fluorimetría de flujo (EPICS XL-MCL flow cytometry system, Coulter corporation, USA) con una excitación a 488 nm (emisión a 610 nm). Los datos fueron analizados mediante el programa de ordenador Multicycle AV (Phoenix Flow Systems Inc. USA).

2.3 *Actividad de la proteína quinasa C (PKC)*

La actividad de la proteína quinasa C (PKC) se determinó en las fracciones citosólica y de membrana obtenidas de linfoblastos. Para ello cultivos de 2 días de linfoblastos sembrados a 10^6 células/ml se centrifugaron a $400 \times g$ 10 min y se resuspendieron en un volumen de 2 ml de medio RPMI-1640 completo. Se incubaron 5 minutos a $37^\circ C$ en ausencia o presencia de $10 \mu g/ml$ de αIgM para conseguir activación de las células. Tras esto, los linfoblastos se recolectaron por centrifugación y el sedimento celular fue homogeneizado en tampón con Tris-HCl pH 7,5, 2 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 2 mM DTT, 2 mM PMSF, 0,25 M sacarosa, $20 \mu g/ml$ inhibidor de tripsina y 0,04 mM leupeptina.

Los homogenados se centrifugaron a 12.000xg durante 20 min, separando la fracción citosólica en el sobrenadante. El pellet se trató con el mismo tampón con 1% tritón X-100 y se incubó a 4°C durante 30 min. Posteriormente se centrifugó a 12.000xg otros 30 min. El sobrenadante resultante de esta centrifugación contenía la fracción solubilizada de membrana.

Ambas fracciones fueron purificadas parcialmente en columnas de DEAE-celulosa (1 ml) equilibradas en el tampón inicial sin sacarosa. La elución se realizó con NaCl 0,1 M en el mismo tampón. La actividad de PKC se determinó mediante anticuerpos monoclonales que reconocen la fosforilación de determinados residuos en peptidos artificiales. Este método se llevó a cabo mediante un kit comercial (PK ELISA KIT, NRPK Assay System Kamiya Biomedical Co., USA). La incorporación de estos anticuerpos medida a través de su posterior unión a conjugados anti Ig produce cambios cuantificables en la densidad óptica. La correlación actividad/unidades enzimáticas se hizo midiendo cantidad de proteína mediante el método Bradford (1976) con el colorante Coomassie brilliant blue G-250 (BioRad).

2.4 Estudios de expresión de ARN

2.4.1 Extracción de ARN

50 ml de un cultivo de linfoblastos ($1,5-2 \times 10^6$ cel/ml aproximadamente) se centrifugaron a 400xg durante 10 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS y se lisaron en un volumen de 900 μ l de una solución de 0,14% NP40, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM TrisHCl pH 7,8 y 10 mM VRC (Vanidyl Ribonucleoside Complex, GIBCO BRL), un inhibidor de ribonucleasas. Al sobrenadante resultante de la centrifugación de esta lisis (unos 700 μ l), se le añadió 35 μ l de 10% SDS y 7,5 μ l de 1 M Tris-HCl (pH 7,6) y se extrajo dos veces con 1 vol de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). Se repitió la extracción con cloroformo/isoamílico para eliminar el fenol y se precipitó el ARN con acetato sódico 3 M pH 5,3 (1/20 vol) y etanol (2,5

2.5 *Determinación de la concentración de calcio intracelular*

La $[Ca^{2+}]_i$ se determinó con un indicador fluorescente, FURA-2 (Boehringer, Alemania), que varía su fluorescencia en función del Ca^{2+} libre que hay en el medio. La sonda entra en las células en forma de ester y, una vez dentro, las esterasas del citosol rompen la estructura y la sonda no puede volver a salir porque deja de ser permeable a la membrana.

La carga del FURA-2 en los linfoblastos se consiguió incubando las células (10^7 células/ml) en tampón de carga (1 mM $CaCl_2$, 145 mM NaCl, 1 mM Na_2HPO_4 , 0,5 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 mM glucosa, 10 mM hepes, 5 mM ClK, pH 7,4) durante 45 min a $37^\circ C$ con $5 \mu M$ de la sonda. Tras dos lavados con tampón de carga fresco, para cada muestra, se centrifugó una alícuota de 1 ml justo antes de iniciar la medida y se resuspendió en 2ml de tampón a $37^\circ C$ (aprox. $0,5-1 \times 10^6$ cel/ml) que se pasó a una cubeta de metacrilato. Para los experimentos que requerían que las células estuvieran privadas de calcio se eliminó éste del tampón de carga. Las medidas de fluorimetría fueron realizadas en un espectrofluorímetro Perkin Elmer (Connecticut, USA) modelo LS 50B dotado de un sistema de microagitación magnética. Al equipo se acopló un termocirculador que permitía mantener las células a $37^\circ C$ durante las mediciones. La concentración intracelular de calcio libre se mide en función de la proporción de fluorescencia de la sonda a dos longitudes de onda distintas, 340 nm y 380 nm, midiendo la emisión a 510 nm. En función de esta doble excitación, el espectrofluorímetro estaba equipado con un accesorio ("fast filter") de doble lente que permite el cambio de longitud de onda en un intervalo mínimo de tiempo. Los valores de fluorescencia fueron almacenados en soporte informático para su posterior tratamiento matemático.

La calibración de la señal de fluorescencia se realizó según el método de Grienkiewicz y col (1985). La lectura máxima (R_{max}) se obtuvo rompiendo las células después de cada experimento con Tritón X-100 liberando así todo el FURA-2. Seguidamente se determinó la

fluorescencia mínima (R_{\min}) quelando el calcio del medio con exceso de EGTA. La concentración intracelular de calcio se calcula aplicando la fórmula:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \times (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$$

Siendo R la medida en un tiempo dado y K_d la constante de disociación para el complejo Ca^{2+} -FURA2 con un valor de 224 nM a 37°C.

2.7 Determinación del pH intracelular

El pH intracelular se determinó de una manera similar al calcio, mediante otro indicador fluorescente, 2'-7' bis carboxietil 5,6 carboxifluoresceína (BCECF) (Boehringer), que varía la emisión en función de la concentración de H^+ . El cociente de fluorescencia en este caso es 495/440.

Las células recibieron el mismo tratamiento que para la carga con FURA pero con distinto tampón. Este tampón de carga estaba compuesto de 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1mM $CaCl_2$, 1mM K_2HPO_4 , 10mM HEPES sódico y la concentración de BCECF era de 5 μ M. Los tiempos de incubación y los lavados fueron los mismos que en la carga con FURA.

La conversión de la señal de fluorescencia en pH se realizó por medio de una calibración interna utilizando el método de Thomas (1979). Las células cargadas con BCECF se resuspenden en distintos tampones de alto contenido en K^+ (140mM) en un rango de pH desde 6,2 a 7,6 y en presencia de nigericina (10 μ g/ml) para alcanzar el equilibrio de pH entre el medio intracelular y el extracelular. Otra forma de calibración directa se llevó a cabo resuspendiendo las células en tampón de pH conocido y rompiendo la membrana celular con el detergente tritón-X100. Se obtuvieron de esta forma distintas medidas de fluorescencia a distintos pH. En ambos casos el cociente de

fluorescencia 495/440 aumentaba en función lineal del pH, permitiendo obtener unos parámetros de calibración muy fiables.

RESULTADOS

1. ANALISIS ESTRUCTURAL DEL ADN DE LOS ENFERMOS

1.1 Descripción de los individuos de los cuales se obtuvieron muestras de ADN.

Las muestras de ADN utilizadas como control provenían de tres grupos de individuos. Un grupo formado por 186 individuos donantes de sangre, que no fueron sometidos a ningún tipo de selección, con una edad media de $36 \pm 1,4$, un rango de edades de 18 a 63 años y una distribución por sexos del 50%. Estas muestras se obtuvieron de diversos hospitales de Madrid. Otro grupo control estaba formado por individuos sanos que se sometieron voluntariamente a la exploración y a donar la muestra de sangre, y en los que se descartó la existencia de enfermedades neurológicas o de patologías añadidas. La mayoría de ellos eran los conyuges de los enfermos en estudio. Esta población control estaba formada por 51 individuos de una media de edad $67 \pm 1,9$ años, con un rango desde 42 a 89 años y una distribución por igual de ambos sexos. El tercer grupo control estaba formado por pacientes de Parkinson sin síntomas de senilidad (valorado a través del test mini-mental de Folstein y col, 1975) y diagnosticados según los criterios del Parkinson Study Group (1989) que se describen en la tabla III. Este grupo consta de 64 individuos de edades comprendidas entre 44 y 90 años, con una media de $65 \pm 1,6$ años.

<

TABLA III

Criterios de inclusión para el diagnóstico de enfermedad de Parkinson

Presencia durante un año o más de dos de los tres signos motores cardinales de Parkinson.

Temblor de reposo o postural

Bradikinesia

Rigidez

Respuesta a la terapia con levodopa (al menos 1000 mg/d durante un mes)

Grado de mejoría de moderado a marcado

Duración de la mejoría durante un año o más

Parkinson Study Group, 1989

Los pacientes de EA fueron diagnosticados según los criterios del NINCDS-ADRDA (MacKahn y col, 1984) que se describen en la Tabla IV. Los casos de EA recolectados (Tabla V) fueron un total de 71, de edades entre 52 y 95 años, con una media de $69,5 \pm 1$ años. De los 71 individuos con EA, sólo 26 eran varones. De estos pacientes, 20 padecían EA de aparición precoz y 51 de aparición tardía. Cuatro de los casos de aparición precoz y doce de los de EA aparición tardía tenían antecedentes familiares de demencia.

TABLA IV

Criterios del grupo de trabajo NINCDS-ADRDA para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer

CRITERIOS PARA EL DIAGNOSTICO DE PROBABLE EA

1. Demencia establecida por un examen clínico, documentada por test MMS, escala de deterioro de Blessed y confirmada por tests neuropsicológicos.
2. Déficit en dos o más áreas cognitivas.
3. Empeoramiento progresivo de la memoria y otras funciones cognitivas.
4. Ausencia de trastornos de la conciencia.
5. Inicio entre los 40-90 años, a menudo después de los 65.
6. Ausencia de otras enfermedades sistémicas o neurológicas que pudieran explicar los déficits cognitivos.

El diagnóstico de EA es apoyado por:

1. Deterioro de funciones cognitivas específicas: afasia, apraxia y agnosia.
2. Incapacidad para desarrollar las tareas cotidianas y alteraciones de conducta.
3. Historia familiar, particularmente si está confirmada neuropatológicamente.
4. Resultados de laboratorio: punción lumbar normal, EEG normal o con cambios inespecíficos, TAC con evidencia de atrofia y su progresión documentada por estudios seriados.

CRITERIOS PARA EL DIAGNOSTICO CLINICO DE POSIBLE EA

1. Síndrome de demencia en ausencia de otras enfermedades neurológicas, psiquiátricas o sistémicas que puedan causar demencia, con variaciones en el inicio, la presentación o el curso evolutivo.
2. En presencia de otra enfermedad sistémica o neurológica potencialmente causante de demencia, la cual no sea considerada como causante de la misma.

CRITERIOS PARA EL DIAGNOSTICO DE EA DEFINITIVA

1. Cumplir los criterios clínicos de EA probable.
2. Evidencias histopatológicas obtenidas por biopsia o necropsia.

TABLA V

Lista pacientes de EA.

EA	EDAD	SEXO	MM	Tipo de EA (familiar)	Hist. clínico adicional	EA	EDAD	SEXO	MM	Tipo de EA (familiar)	Hist. clínico adicional
1	89	V	2	EAAT		41	68	V		EAAT	
2	73	M	7	EAAT		42	69	V		EAAT	
3	66	M	10	EAAT		43	66	M		EAAT	
4	60	M		EAAP		44	68	V	2	EAAT	
5	65	M		EAAT		45		V		AD	
6	77	V		EAAT		46	70	M		EAAT	
7	60	V	4	EAAP	hipercolesterolemia	47	54	M	0	EAAP (SI)	
8	63	V		EAAP		48	72	M		EAAT	
9	73	V	10	EAAT	hipertensión	49	73	M	11	EAAT (SI)	depresión
10	80	M	10	EAAT		50	78	V		EAAP	parkinson
11	58	M	2	EAAP (SI)		51	57	V	10	EAAP	
12	73	M		EAAT	hipertensión	52	66	M	17	EAAT (SI)	depresión anemia
13	84	M		EAAT		53	66	V	23	EAAT	tromboflebitis
14	68	M		EAAT (SI)		54	77	M	7	EAAT (SI)	hipertensión
15	76	M		EAAT		55	71	M	6	EAAT (SI)	hipertensión
16	55	M		EAAP		56	52	V	0	EAAP	
17	56	V		EAAP (SI)		57	68	M	15	EAAT (SI)	artrosis
18	80	M		EAAT		58	76	V	5	EAAT (SI)	hipertensión
19	68	V		EAAT		59	79	M	4	EAAT (SI)	
20	54	M		EAAP		60	62	V	15	EAAP (SI)	ulcus duodenal
21	65	M		EAAT		61	52	V	0	EAAP	
22	70	M		EAAT		62	83	M	11	EAAT (SI)	cardiopatía isquémica
23	79	V		EAAT		63	69	M	1	EAAT	
24	72	V		EAAT		64	61	M	0	EAAP	insuf. mitral
25	75	M		EAAT		65	72	M	0	EAAT	hipercolesterolemia
26	59	V		EAAP		66	79	M	9	EAAT	
27	90	V		EAAT		67	75	M	14	EAAT	hipertensión
28	58	M		EAAP		68	74	M	25	EAAT (SI)	
33	69	V		EAAT		69	77	M	19	EAAT	artrosis
34	79	M	12	EAAT (SI)		70	73	M		EAAT	
35	77	M		EAAT		71	68	M		EAAT	
36	68	M	6	EAAT (SI)		72	56	M		EAAP	Parkinson
37	52	V	22	EAAP		73	68	M		EAAT	
38	76	M	0	EAAT		74	52	V	0	EAAP	
39	65	M	15	EAAT		75	55	V		EAAP	
40	72	M		EAAT							

MM: Test Mini-Mental de Folstein (1975) para valorar capacidad intelectual entre 0 y 30 puntos. EAAT: EA de aparición tardía. EAAP: EA de aparición precoz.

El diagnóstico, selección y extracción de la muestra de sangre de los controles sanos, los enfermos de Parkinson y los enfermos de EA se llevó a cabo en el Departamento de Neurología del Hospital Doce de Octubre de Madrid por el Dr. Portera Sánchez y la Dra. Gómez Isla.

1.2 Búsqueda de alteraciones estructurales en el gen de la APP.

El rastreo de cambios estructurales en el gen de la APP se realizó mediante la técnica de electroforesis en geles de gradiente desnaturizante (DGGE), analizando la estructura de los exones 16 y 17 que corresponden al fragmento β A4. Es en estos dos exones donde se han descrito mutaciones asociadas a EA de tipo familiar (Mullan y col, 1992; Goate y col, 1991; Murrell y col, 1991, Chartier y col 1991). Para ello, se diseñaron oligonucleótidos correspondientes a secuencias intrónicas próximas a los exones 16 y 17.

Exón 17

(Intrón pos 28)

5'-CAGTTGGGCACACAATATAC-3'

(Intrón pos 451)

5'AAAGAACAACACTGTAACCCAA-3'

La amplificación por la reacción de PCR de ADN genómico utilizando estos oligonucleótidos da lugar a un fragmento de 443 pb que contiene el exón 17.

Exón 16

(Intrón pos. 102)

5'GTTGTCCTGCACTTTAAT3'

(Intrón pos. 246)

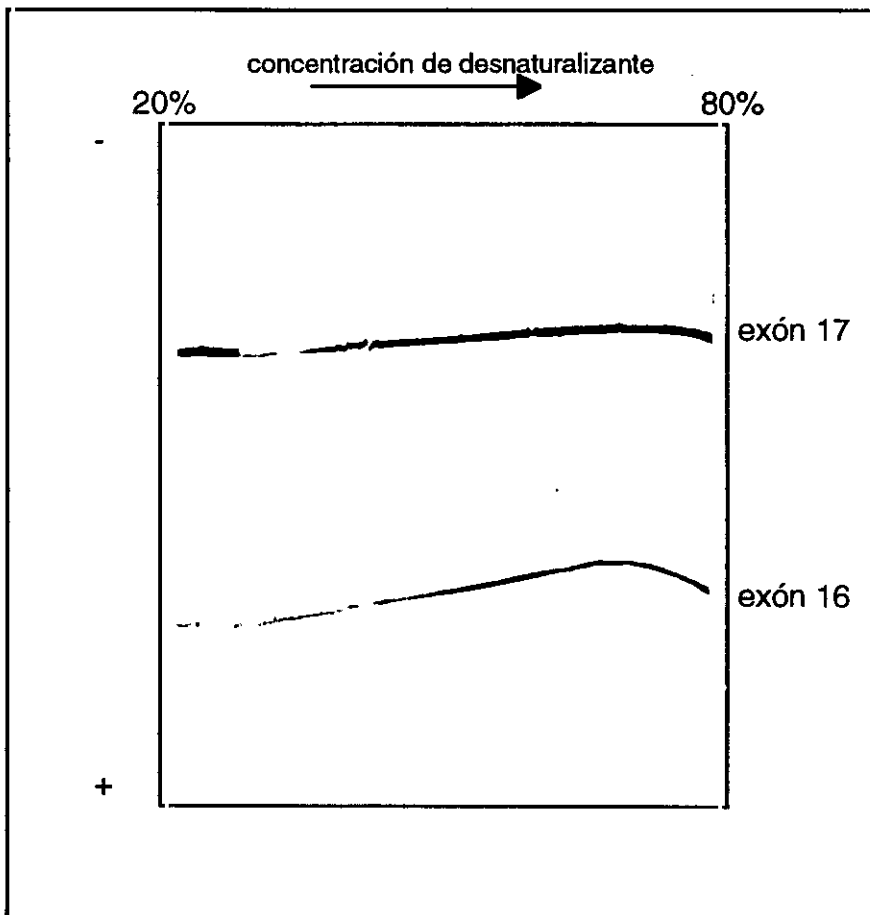
5'GTGGGAAAGAGGTAAATTATT-3'

La amplificación por la reacción de PCR de ADN genómico da lugar a un fragmento de 134 pb que contiene el exón 16.

La figura 1 muestra el patrón de fusión de estos dos fragmentos cuando se les sometió a electroforesis en un gradiente perpendicular de 20 a 80% de agente desnaturalizante. Pudimos observar un único dominio de fusión para ambos casos, reflejado por la ausencia de un punto de inflexión.

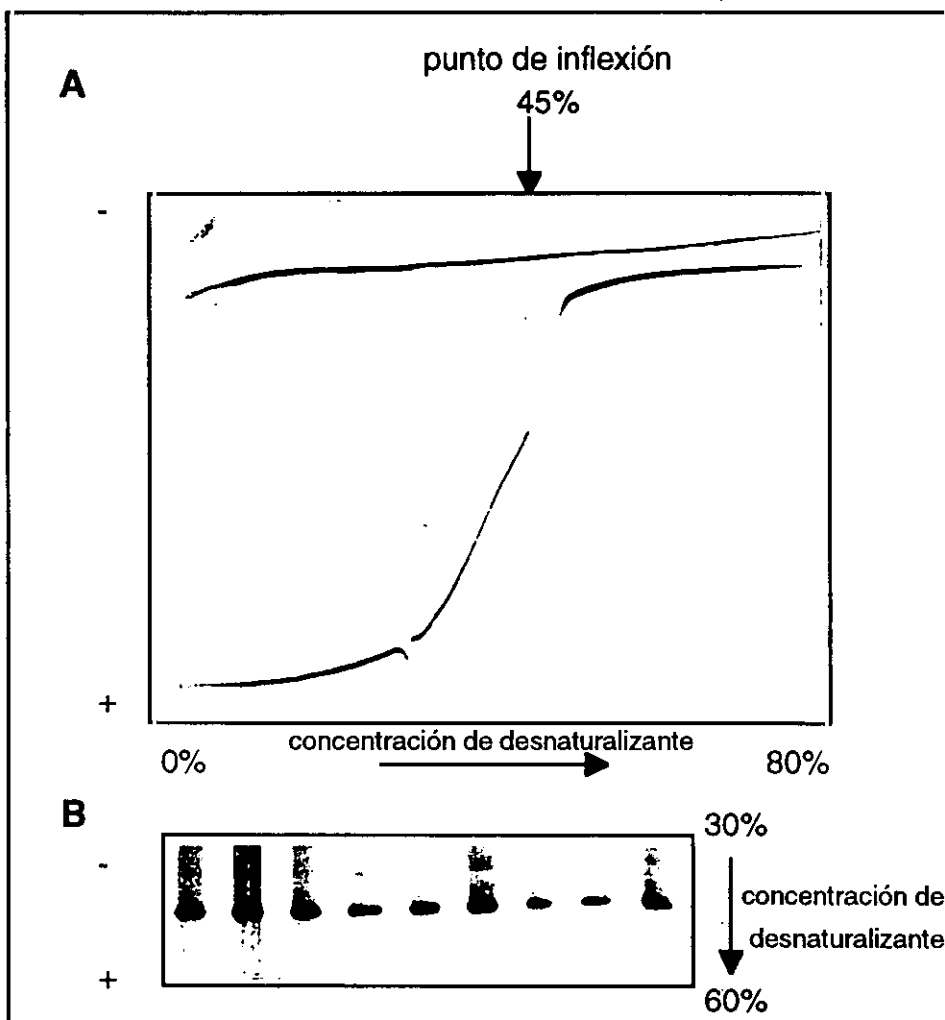
FIGURA 1

Determinación del patrón de fusión de los exones 16 y 17 de la APP en geles de gradiente desnaturalizante



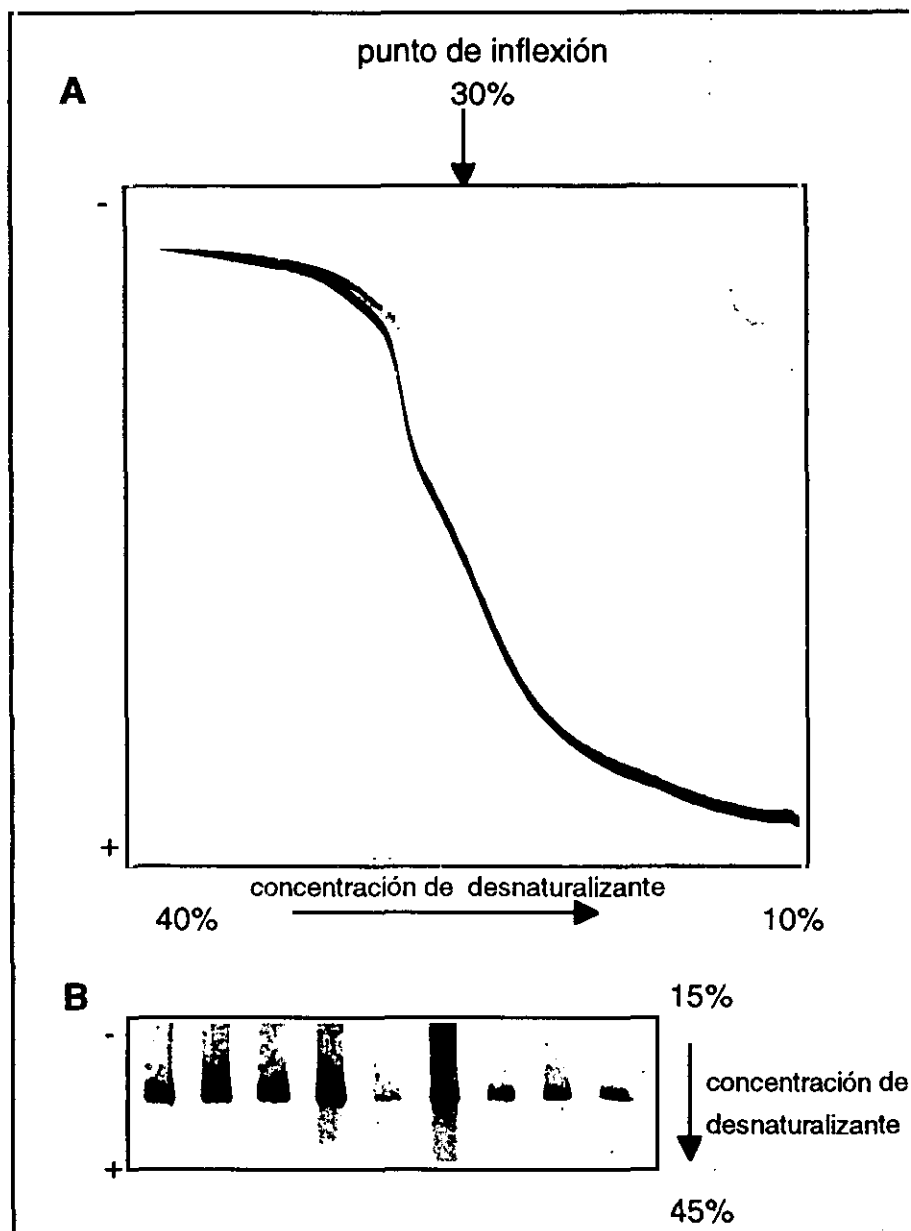
La amplificación de los exones 16 y 17 de la APP se realizó como se describe en Métodos, utilizando oligonucleótidos sin colas de GC. Los fragmentos se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida de gradiente desnaturalizante (con urea y formamida) perpendicular a la corriente eléctrica.

FIGURA 2

DGGE del exón 16 de la APP con pinzamiento térmico mediante amplificación con oligonucleótido-GC

La amplificación del exón 16 se realizó por PCR, como se describe en Métodos, utilizando el oligonucleótido del extremo 5' con un añadido de 20 bases G y C. El panel A muestra el resultado de la electroforesis del fragmento amplificado en un gel de gradiente de agentes desnaturalizantes, urea y formamida, perpendicular a la corriente eléctrica. El punto de inflexión corresponde a un porcentaje de desnaturalizante del 45%. El panel B muestra el rastreo realizado con los fragmentos amplificados a partir de ADN genómico de enfermos mediante electroforesis en gradiente paralelo al movimiento de las bandas de ADN, con un rango de 30 a 60% de agentes desnaturalizantes.

FIGURA 3

DGGE del exón 17 de la APP con pinzamiento térmico mediante amplificación con oligonucleótido-GC

El experimento se llevó a cabo por el mismo procedimiento descrito en la figura 2 con el fragmento de ADN correspondiente al exón 17 de la APP amplificado con colas de G y C en el extremo 5'. El punto de inflexión observado cuando se sometió a electroforesis en gradiente perpendicular de desnaturalizante (panel A) se determinó a una concentración de desnaturalizante de 30%. El panel B muestra el rastreo de las muestras realizado en geles con un gradiente desde 15% a 45% de agente desnaturalizante paralelo a la corriente eléctrica.

1.3 Determinación del genotipo para la apolipoproteína E

En el intento de continuar estudiando la relación entre la patología de EA y la estructura genética de los enfermos, se llevó a cabo la determinación del genotipo de la apolipoproteína E en la muestra de enfermos. Como referencia control se usaron por un lado, una muestra de controles sanos que habían sido clínicamente estudiados y por otro, un grupo de población proveniente de donantes de sangre. Como control de otro tipo de demencia, se estudió un grupo de enfermos de Parkinson. La determinación del genotipo se realizó como se describe en métodos obteniendo un patrón de digestión específico para cada alelo (Figura 4).

La Tabla VI muestra los genotipos de los grupos de controles y del grupo EA. Se observó una diferencia estadísticamente significativa en el grupo EA que presentaba una frecuencia alélica para $\epsilon 4$ mucho mayor, en detrimento de la frecuencia de $\epsilon 3$. En el grupo de controles sanos, esta frecuencia es incluso más alta que en el grupo de donantes de sangre, al contrario que lo que ocurre con $\epsilon 4$.

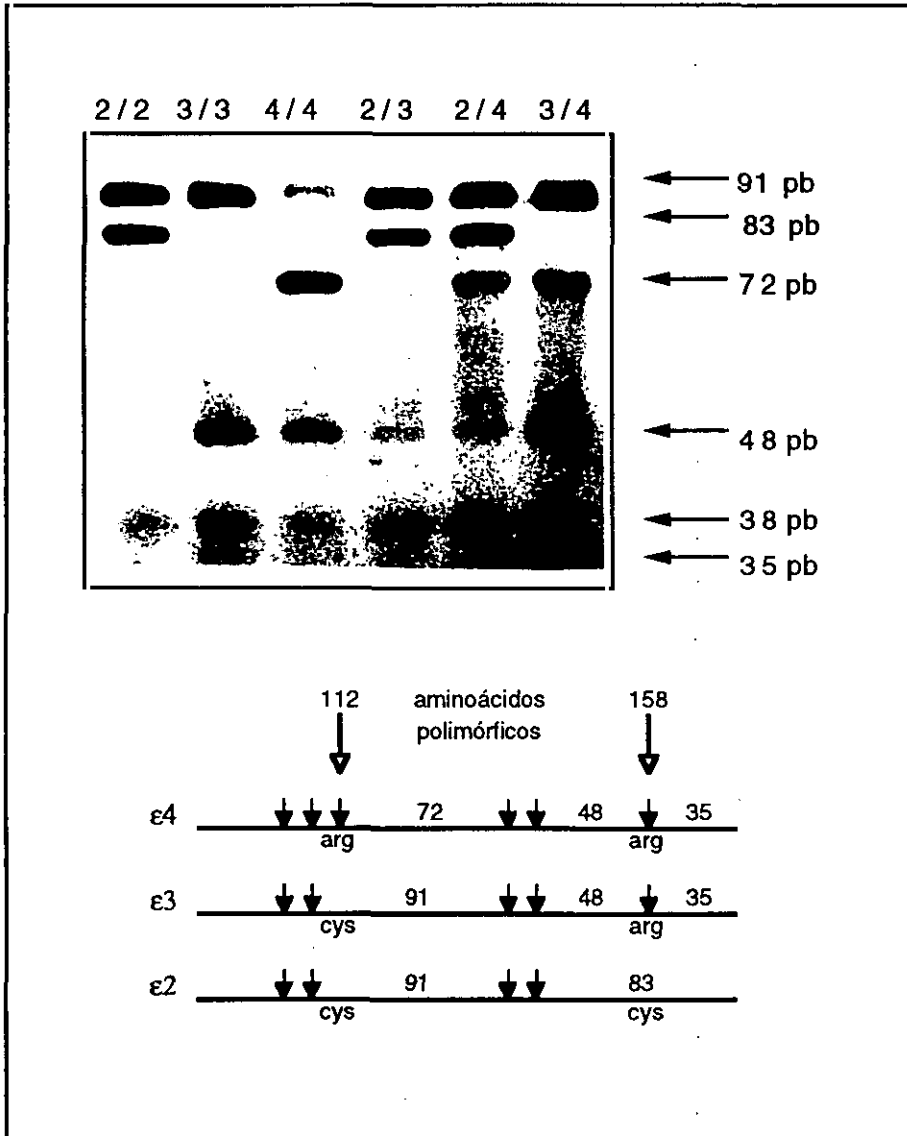
TABLA VI
Frecuencias de ApoE en EA

Población	Num. de alelos	Frecuencias alélicas		
		$\epsilon 2$	$\epsilon 3$	$\epsilon 4$
Donantes de sangre	372	0,06±0,01	0,88±0,02	0,06±0,01
Controles de edad similar	84	0,05±0,02	0,92±0,03	0,04±0,02
EA	130	0,06±0,02	0,67±0,04*	0,27±0,04*

*Diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de EA y los otros dos grupos. Por el test de Student: $P < 0,05$

FIGURA 4

Determinación del genotipo de la apolipoproteína E mediante análisis de restricción



Se amplificó la zona polimórfica del gen de la apolipoproteína E tal y como se describe en Métodos. La banda resultante de 244 pb se digirió con el enzima de restricción *Hha I* y el producto de la digestión se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida. El patrón de digestión es distinto para cada alelo y se presenta en el panel superior. La variabilidad en la digestión se debe a los sitios de restricción del enzima (que se indican con flechas en el esquema) que aparecen cuando el codon de las posiciones 112 o 158 presenta una arginina (arg) en lugar de una cisteína (cys) como ocurre en las isoformas $\epsilon 4$ y $\epsilon 3$.

Si se separan los casos de EA en aparición precoz y tardía de carácter familiar o esporádico se observa un marcado cambio en la distribución (Tabla VII). La frecuencia alélica de $\epsilon 4$ en los casos de EA de aparición precoz es similar a la de la población control, siendo estos datos coherentes con los estudios llevados a cabo por otros grupos que indican que la mayor frecuencia del alelo apoE $\epsilon 4$ está ligada a los casos de EA de aparición tardía. En estos casos se observa una mayor frecuencia del alelo apoE $\epsilon 4$ en los casos con antecedentes familiares que en los esporádicos (Tabla VII).

TABLA VII.

Frecuencia alélica para apoE en pacientes de EA

Tipo de EA	Num. de alelos	Frecuencia alélica		
		$\epsilon 2$	$\epsilon 3$	$\epsilon 4$
EAAP	36	0,03±0,001	0,89±0,003	0,08±0,002
EAAT	94	0,06±0,001	0,60±0,002*	0,34±0,002*
familiar	22	0,09±0,004	0,41±0,011*	0,50±0,011*
esporádica	66	0,06±0,001	0,63±0,004*	0,32±0,003*

*Diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de EA y los otros dos grupos. Por el test de Student: $P < 0,05$ EAAT: EA de aparición tardía. EAAP: EA de aparición precoz

La Tabla VIII describe las medias de edad de aparición para cada genotipo en la población de EA. Si se representan estos valores juntos a partir de los 65 años (Figura 5) se observa como dentro de la EA tardía hay una tendencia a una aparición más temprana con una mayor carga de $\epsilon 4$.

En cuanto a la distribución de los alelos en pacientes con la enfermedad de Parkinson, la Tabla X muestra que no hay diferencia alguna con la población control (Tabla IX).

TABLA VIII

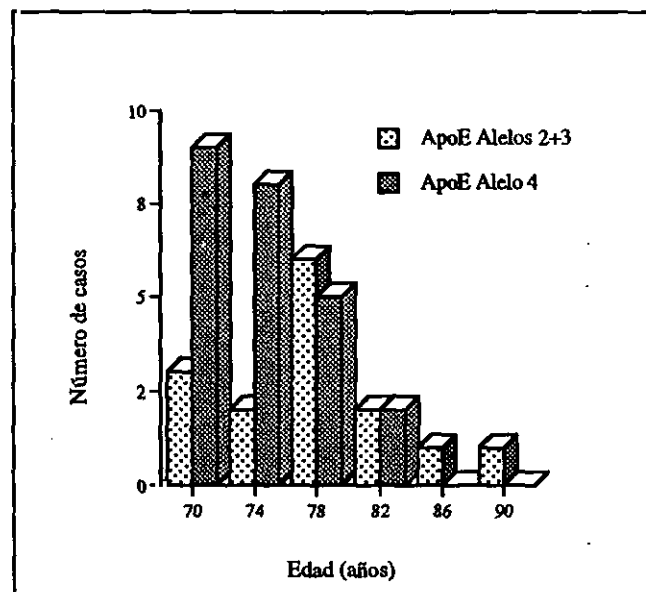
Genotipo apoE de los pacientes de EA

Genotipo	EA tardía	EA precoz	Edad (n)
4/4	70±1,8 (5)	62 (2)	
4/3	73±1,1 (21)	---	
4/2	75 (2)	---	
3/3	75±1,6 (16)	58±1.2 (15)	
2/3	66 (2)	55 (1)	
2/2	76 (1)	---	

Los valores son las medias \pm error estándar. Los valores en paréntesis representan el número de individuos.

FIGURA 5

Distribución por edades de los distintos alelos para la apolipoproteína E en enfermos de EA



Las barras representa el número de casos con la isoforma 4 de la apolipoproteína E, por un lado, o las isoformas 2 y 3. por otro. La determinación de los distintos genotipos se llevó a cabo a partir del ADN genómico de cada enfermo como se describe en Métodos.

TABLA IX

Frecuencia de alelos apo E en la muestra de enfermos de Parkinson

	n	$\epsilon 2$	$\epsilon 3$	$\epsilon 4$
Enfermos	128	0,09±0,026	0,86±0,031	0,05±0,019
>65 años	66	0,11±0,040	0,86±0,05	0,04±0,025
<65 años	62	0,05±0,001	0,89±0,002	0,06±0,001

2. CARACTERIZACION DE LAS LINEAS LINFOBLASTICAS ESTABLECIDAS

Se transformaron varias líneas linfoblásticas a partir de muestras de sangre de individuos enfermos y controles como se describe en Métodos. Las líneas linfoblásticas establecidas que se utilizaron en los experimentos se describen en las Tablas X y XI.

TABLA X

Líneas celulares linfoblásticas de enfermos de EA seleccionadas para los experimentos

Línea celular	Edad	SEXO	Años de evol.	Diagnóstico probable (familiar)	Historia clínica adicional	ApoE
AZ10	81	M	1	TARDIA		4/3
AZ13	86	M	2	TARDIA		3/3
AZ23	82	V	3	TARDIA (SI)		4/3
AZ25	79	M	5	TARDIA		4/3
AZ26	61	V	2	PRECOZ		4/3
AZ27	91	V	1	TARDIA		3/3
AZ34	82	M	3	TARDIA (SI)		4/3
AZ40	74	M	2	TARDIA		4/3
AZ46	74	M	4	TARDIA		4/3
AZ54	79	M	2	TARDIA (SI)	hipertension	4/3
AZ67	80	M	5	TARDIA	hipertensión	3/3
AZ72	56			PRECOZ	Parkinson	4/3
AZ73	84	M	4	TARDIA		3/3
AZ75	62	V	7	PRECOZ		2/3

TABLA XI

Líneas celulares de controles sanos seleccionados para los experimentos

Líneas	Edad	Sexo	Diagnóstico	Historial clínico	ApoE
C-10	78	V	sano		4/3
C-11	77	V	sano		3/3
C-12	73	V	sano		3/3
C-14	58	M	sano		3/3
C-18	67	M	sano		3/3
C-33	82	V	sano	enf. pulmonar	2/3
C-34	88	M	sano	anemia	3/3
C-36	79	M	sano	angor	3/3
C-37	57	M	sano	broncoespasmos	3/3
C-38	69	V	sano	enf. pulmonar	3/3
C-39	53	V	sano		2/3
C-40	89	V	sano	cetoacidosis diabética	3/3
C-41	79	M	sano	fibrilación auricular	3/3
C-42	82	M	sano	infarto	3/3
C-43	46	M	sano	dolor torácico	3/3
C-45	45	V	sano		3/3
C-46	68	V	sano	enf. pulmonar	2/3
C-48	42	M	sano		3/3
C-47	80	V	sano	angor post infarto	3/3
C-49	81	M.	sano		3/3
C-50	77	M	sano		3/3
C-51	86	V	sano	enf. pulmonar	3/3

2.1 Crecimiento celular

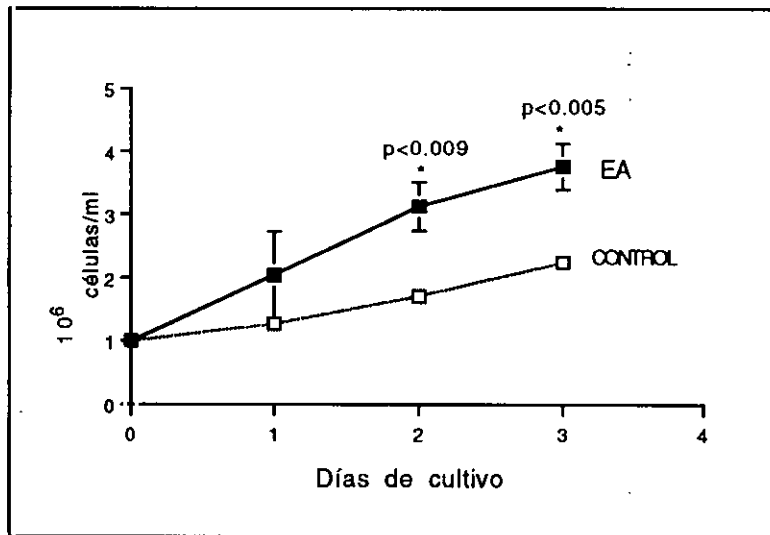
La Figura 6 muestra el crecimiento celular de las poblaciones de linfoblastos control y EA. La velocidad de crecimiento de los linfoblastos EA fue significativamente mayor que la de los linfoblastos control. Para intentar determinar si esta diferencia en la velocidad de crecimiento implica una variación en el número de células que se encuentran en la fase de síntesis de ADN del ciclo celular, determinamos la incorporación de yoduro de propidio mediante citofluorimetría de flujo, como se describe en métodos.

La Figura 7 representa un experimento tipo de incorporación de yoduro de propidio en el ADN de las células y junto al registro se

detalla en formato de tabla los valores en porcentaje de células para las dos poblaciones, control y EA, que se encuentran en fase G₀, S o G₂/M del ciclo celular. Se observa que no hay diferencias entre enfermos y controles.

FIGURA 6

Velocidad de crecimiento celular de linfoblastos control y EA

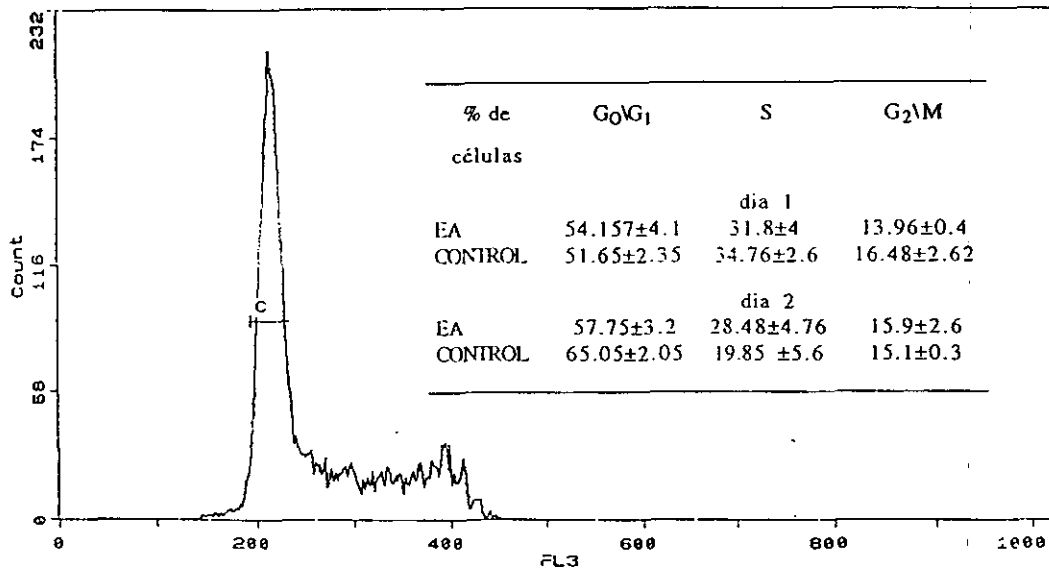


La gráfica representa los valores medios del conteo de células de un grupo de 9 líneas celulares de EA y 6 de controles cultivados en RPMI-1640 como se describe en métodos. La siembra celular se hizo a una concentración de 10⁶ cel/ml y el conteo se repitió a las 24h, 48h y 36h. Las líneas AD fueron AZ13, AZ23, AZ27, AZ34, AZ46, AZ54, AZ67, AZ72 y AZ75. El grupo control C-10, C-11, C-12, C-33, C-45 y C-47.

* Diferencia estadísticamente significativa (unpaired t-test de Student).

FIGURA 7

**Análisis del ciclo celular de los linfoblastos mediante
incorporación de yoduro de propidio**



Se llevó a cabo la determinación de los porcentajes celulares en las fases G₀/G₁, S y G₂/M del ciclo en cultivos de líneas linfoblásticas. Esta determinación se hizo midiendo en FACS la incorporación en núcleo de yoduro de propidio (IP) tal y como se describe en Métodos. Se establecieron cultivos de líneas de enfermos (AZ13, AZ27, AZ46, AZ54, AZ72) y de controles (C-10, C-12, C-33) y se repitieron las medidas durante 3 días. La figura muestra un registro representativo al pasar la muestra de 10⁶ células aproximadamente marcadas con IP por el fluorímetro de flujo. La determinación de los porcentajes celulares se hizo mediante análisis informático de los datos (ver Métodos). En la tabla se presentan los valores medios para el grupo control y EA con sus respectivos errores estándar.

2.2 Expresión de APP

Para determinar si las líneas linfoblásticas establecidas expresaban APP, hicimos una extracción de ARN a partir del cual preparamos ADNc (ADN complementario), utilizando como cebador el oligonucleótido complementario a la secuencia del extremo 3' de la zona codificadora del exón 17 de la APP (Figura 8A)

La figura 8B muestra el resultado de la amplificación mediante PCR de un fragmento de 333 pb de ADNc correspondiente a los exones 16 y 17, del fragmento β A4. Como se observa en la figura 8B, se obtuvo una banda única que confirmaba la expresión de la proteína en estas células.

Para distinguir entre las diversas isoformas de APP conocidas se diseñaron oligonucleótidos que incluyeran la zona del inserto de KPI y OX-2, de forma que los diferentes tipos de APP produjeran un fragmento de tamaño distinto (Figura 9A y B). La amplificación dió lugar a dos bandas: una de ellas por tamaño coincidía con APP770 y la otra, aunque se aproximaba más a APP751, podía ser confundida con APP695. Como el patrón de digestión con el enzima de restricción *Ava I* es distinto para las tres isoformas (Figura 9B), se determinó el patrón de fragmentos obtenidos por digestión con este enzima. Los resultados obtenidos muestran que los fragmentos correspondían a las isoformas APP770 y APP751 (Figura 9C).

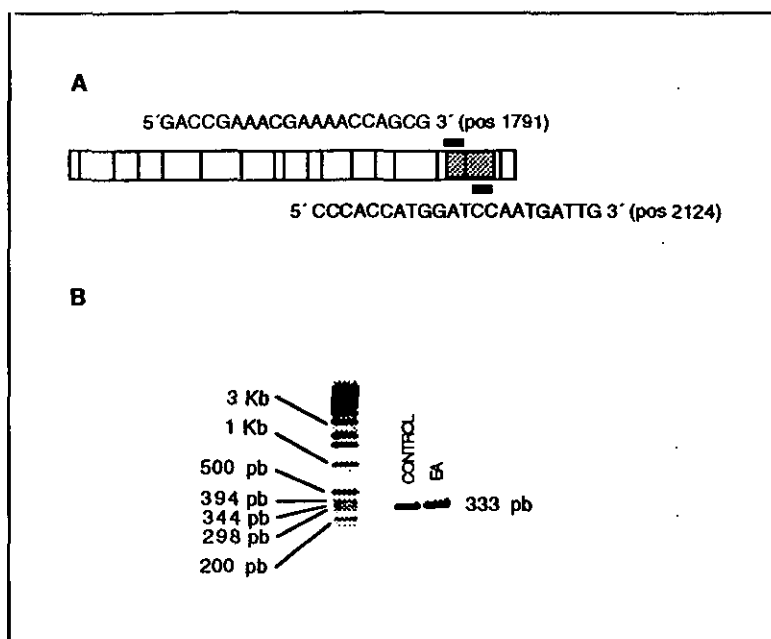
2.3 Homeostasis de Calcio

2.3.1 Calcio libre intracelular

La Tabla XII muestra los valores basales de $[Ca^{2+}]$ libre citosólico en linfoblastos control y EA. Tanto en células mantenidas en condiciones normales de cultivo como mantenidas en ausencia de suero durante 48 h, los valores basales de $[Ca^{2+}]$ libre citosólico son más altos en los linfoblastos EA que en los linfoblastos control. La diferencia fue mayor y estadísticamente significativa en linfoblastos mantenidos con medio que contiene suero que en ausencia de éste.

FIGURA 8

Expresión de APP en linfoblastos



Se extrajo ARN de linfoblastos de enfermos de EA y de controles tal y como se describe en Métodos. La preparación de ADNc se realizó utilizando como cebador el oligonucleótido 3' (pos 2124) (panel A). La amplificación de los exones 16 y 17 de la APP, que corresponden con el fragmento β A4 (en gris en la figura, panel A), se realizó como se describe en Métodos con una temperatura de anillamiento de 60°C, los oligonucleótidos utilizados se muestran flanqueando el fragmento en la figura. El fragmento resultante de la amplificación presentaba el tamaño esperado (panel B).

TABLA XII

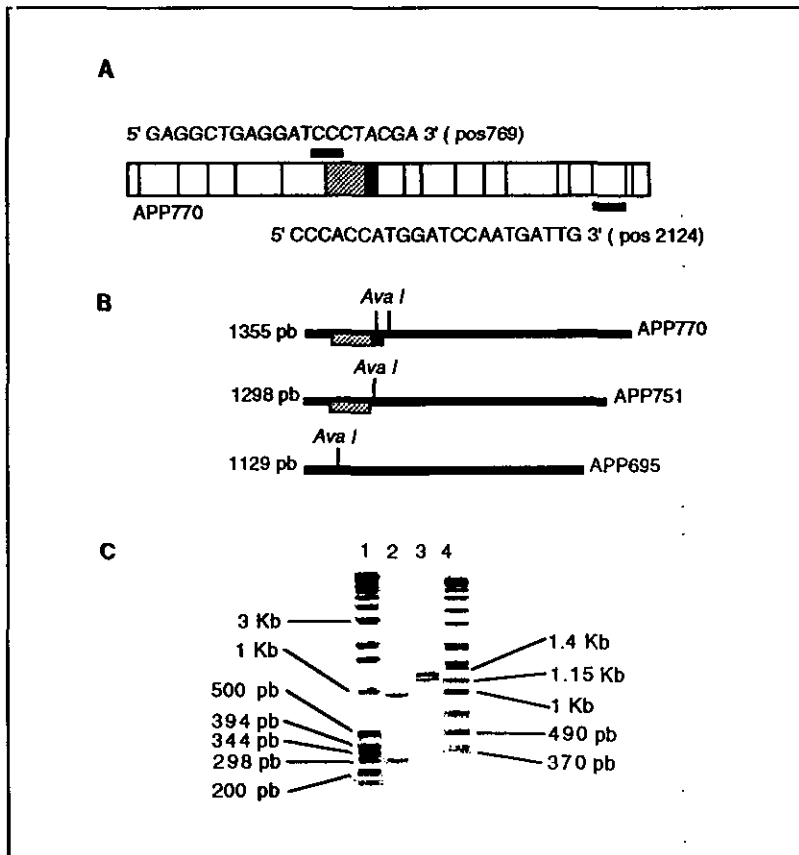
Concentración intracelular basal de calcio

	CONTROL	EA
	[Ca ²⁺] _{intracelular} basal (nM)	
Medio con suero	29±2	41±4*
Medio sin suero	33±3	37±6

El experimento se realizó como se describe en Métodos. Las líneas linfoblásticas control utilizadas fueron C-10, C-12, C-33, C-34, C-36, C-37, C-38, C-40, C-41, C-47, C-49, C-50 y C-51. Las líneas de enfermos usadas fueron: AZ13, AZ25, AZ26, AZ27, AZ34, AZ46, AZ54, AZ67 y AZ72. La determinación de los niveles basales de [Ca²⁺]_{intracelular} se realizó con cada línea celular de 2 a 5 veces. Los valores mostrados son los valores medios obtenidos con las medias de cada línea celular ± E.S. *Por el método de la T de Student: P=0.02

FIGURA 9

Expresión de las isoformas APP770 y APP751 en linfoblastos



El ADNc se obtuvo a partir de ARN total como se describe en la fig. 8. Se diseñaron oligonucleótidos que flanquean la zona de los insertos KPI y OX-2 cuya presencia o ausencia determina las distintas isoformas de la APP. Los oligonucleótidos, que se muestran en el panel A, se usaron para amplificar el cDNA de los linfoblastos. Las condiciones del PCR fueron las descritas en el apartado de Métodos con una temperatura de anillamiento de 60°C. En el panel B se presentan los fragmentos posibles dependiendo del tipo de APP y sus dianas para *Ava I*. El panel C muestra la electroforesis en gel de agarosa de 1.5% de los fragmentos obtenidos de esta digestión. Línea 1: escalera de peso molecular variable. Línea 2: Fragmentos amplificados por PCR y digeridos con *Ava I*. Línea 3: Fragmentos amplificados por PCR. Línea 4: Escalera de peso molecular variable

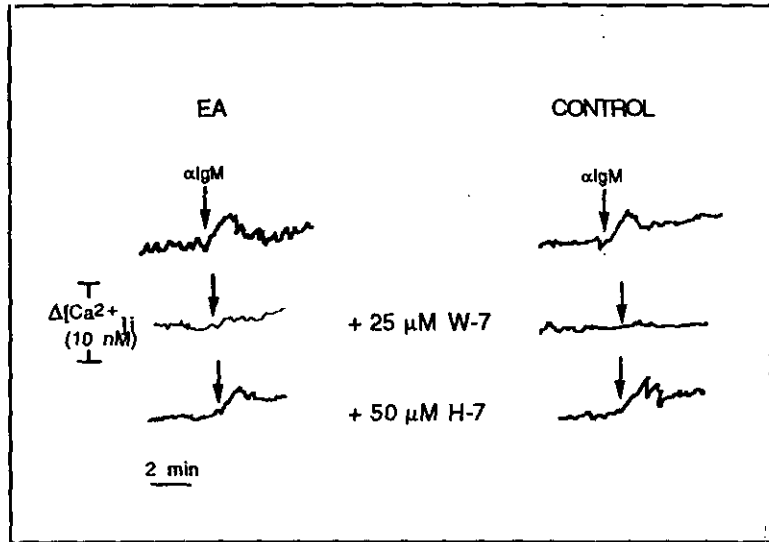
2.3.2 Efecto de α IgM sobre la concentración de calcio intracelular

Puesto que en ausencia de suero no hay crecimiento celular, intentamos determinar si en estas condiciones, la adición de agentes que provocan la activación celular da lugar a diferencias significativas en la $[Ca^{2+}]$ libre citosólica. Para ello determinamos la respuesta de los linfoblastos a anticuerpos contra IgM (α IgM). Los anticuerpos anti-IgM (α IgM) son capaces de activar linfocitos B mediante un mecanismo mediado por un aumento en $[Ca^{2+}]$ libre citosólico (Cambier y col, 1987). El virus de Epstein-Barr infecta preferentemente linfocitos B, induciendo su diferenciación en linfoblastos que mantienen la capacidad de producir IgM (Aman y col, 1984; Tosato y col, 1985; Ounanian y col, 1992) y la de respuesta a la activación por α IgM. La Figura 10 muestra un experimento representativo de la respuesta del $[Ca^{2+}]$ libre citosólico de los linfoblastos control y EA a α IgM, cuando se mantienen en medio con un contenido en suero de 10%. Se produce un aumento de aproximadamente el 15-20 % de la $[Ca^{2+}]$ libre citosólico basal. Este aumento es transitorio (aproximadamente unos 5 min.) aunque los niveles de calcio intracelular se mantienen en niveles superiores a los basales durante al menos 10 min de duración del experimento. El aumento fue similar en linfoblastos EA y en linfoblastos control.

La respuesta a α IgM del $[Ca^{2+}]$ libre citosólico parece no estar mediada por la activación de proteína quinasa C, puesto que, como muestra la figura 10, no es sensible al inhibidor H-7 (1-(5-isoquinolinilsulfonil)-2-metilpiperazina) (Hidaka y col, 1984). La α IgM tampoco fue capaz de producir la traslocación de la proteína quinasa C del citosol a la membrana (Figura 11). Puesto que esta traslocación es un índice de la activación del enzima, los resultados de la figura 11 indican que la respuesta a α IgM no parece estar mediada por la activación de proteína quinasa C y que no existen diferencias significativas en la actividad basal de este enzima entre linfoblastos control o EA. La figura 10 muestra que la respuesta a α IgM parece depender de la activación de proteínas quinasas dependientes de calmodulina, puesto que es sensible a

FIGURA 10

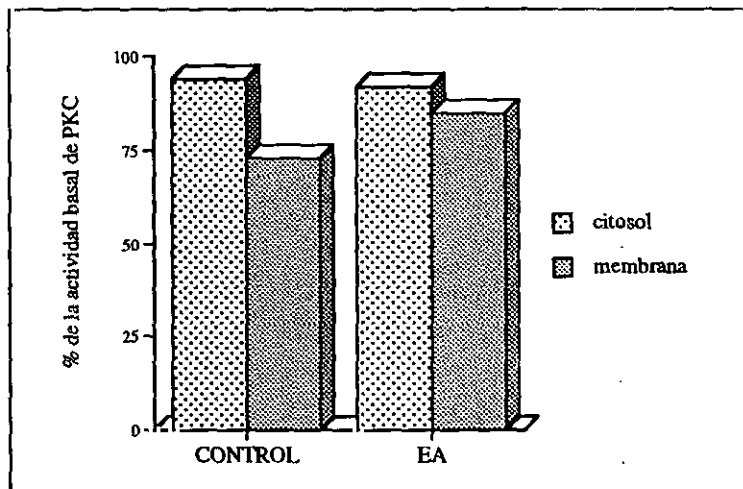
Efecto de la inhibición de proteína quinasa C y calmodulina en la respuesta del $[Ca^{2+}]_i$ de linfoblastos a α IgM



El experimento se realizó como se describe en Métodos. La figura muestra los trazados originales obtenidos con las muestras C-33 y AZ34. La concentración de α IgM utilizada fue 10 μ g/ml.

FIGURA 11

Activación de PKC en respuesta a α IgM en los linfoblastos



El experimento se realizó como se describe en Métodos. Las muestra utilizadas fueron C-37, C-33, C-40 para el grupo control, y AZ13, AZ23, AZ54, AZ67 para el grupo EA. Los resultados son valores medios.

W-7, un inhibidor de calmodulina (N-(6-aminohehexil)-5-cloro-1-naftalenosulfonamida) (Hidaka y col, 1981).

La tabla XIII muestra que, cuando los linfoblastos se mantuvieron en una situación de reposo, mediante privación de suero fetal bovino en el medio durante 48 horas, la respuesta a α IgM en los controles es significativamente menor que la de los linfoblastos EA. Sin embargo, la respuesta a α IgM cuando los linfoblastos están activados por la presencia de las proteínas del suero no es diferente entre las distintas líneas celulares (tabla XIII).

TABLA XIII

Efecto de β A25-35 y α IgM sobre $[Ca^{2+}]_i$ de los linfoblastos

	CONTROL	EA
	$\Delta[Ca^{2+}]_i$ (nM)	
Medio con suero:		
β A25-35	3,28 \pm 0,4	4,07 \pm 0,9
α IgM	4,02 \pm 0,4	4,06 \pm 0,7
α IgM después de β A25-35	3,33 \pm 0,4	3,8 \pm 1
Medio sin suero:		
β A25-35	2,1 \pm 0,4	4,5 \pm 0,6*
α IgM	3,2 \pm 0,4	4,7 \pm 0,6**
α IgM después de β A25-35	3,3 \pm 0,2	3,95 \pm 0,6

El experimento se realizó como se describe en Métodos. Las líneas linfoblásticas utilizadas fueron C-10, C-12, C-33, C-34, C-36, C-37, C-38, C-40, C-41, C-47, C-49, C-50 y C-51, para el grupo control y AZ13, AZ25, AZ26, AZ27, AZ34, AZ46, AZ54, AZ67 y AZ72 para el grupo EA. Las concentraciones de α IgM y β A25-35 son las mismas que en la fig. 12. La determinación de la respuesta de $[Ca^{2+}]_{intracelular}$ se realizó con cada línea celular de 2 a 5 veces. Los valores mostrados corresponden al incremento máximo en la $[Ca^{2+}]_i$ y son los valores medios obtenidos con los valores de todas la determinaciones realizadas con cada línea celular \pm error estándar. Por el método de la t de Student: *P=0,008; **P=0,03

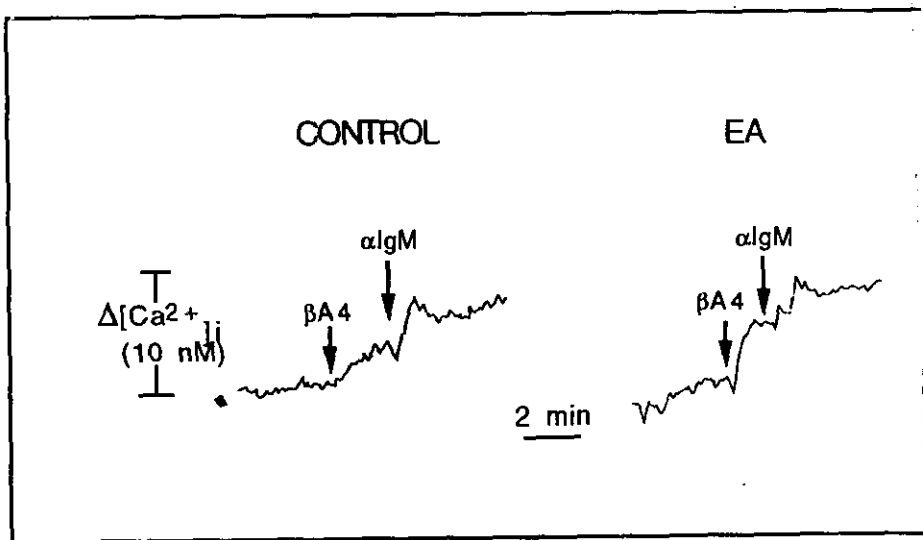
2.3.4 Efecto de β -amiloide sobre $[Ca^{2+}]$ libre citosólico

Los resultados descritos anteriormente indican que la respuesta del Ca^{2+} libre citosólico a la presencia de activadores celulares es distinta en linfoblastos EA que en controles. Intentamos discriminar si este efecto diferencial era dependiente de la activación celular o si las diferencias se podían observar también

cuando el Ca^{2+} libre citosólico aumenta por otros procedimientos. El péptido β -amiloide produce un aumento en $[\text{Ca}^{2+}]$ libre citosólico en cultivos de células neuronales (Mattson y col, 1992; Joseph y Han, 1992), cerebro de ratón (Hartman y col, 1993) y linfocitos humanos (Eckert y col, 1993). Cuando se incorpora a una bicapa lipídica, es capaz de formar canales transportadores de cationes con capacidad para transportar Ca^{2+} (Arispe y col, 1993; Arispe y col, 1993). El fragmento 25-35 del péptido β -amiloide representa la secuencia neurotóxica (Yankner y col, 1990) y se ha descrito que altera la respuesta del Ca^{2+} libre citosólico a activadores celulares (Eckert y col, 1993). Administrando $2 \mu\text{M}$ $\beta\text{A}25-35$ a los linfoblastos pudimos registrar, de acuerdo con estas observaciones previas, un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]$ libre citosólico (Figura 12).

FIGURA 12

Efecto de $\beta\text{A}4$ (25-35) sobre la $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular de los linfoblastos y sobre la respuesta a αIgM .



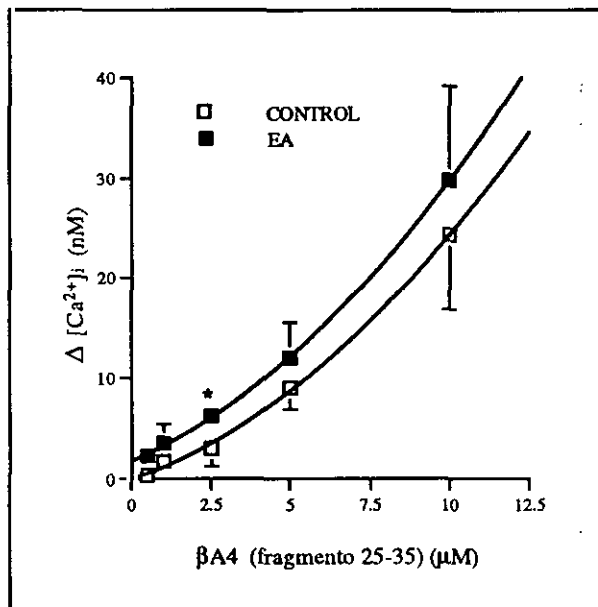
La figura representa un registro representativo de una línea control y otra de enfermo de EA. Se observa el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular en respuesta a $10 \mu\text{g/ml}$ de αIgM con adición previa de $2 \mu\text{M}$ $\beta\text{A}4$ (25-35). Los linfoblastos fueron cultivados en medio RPMI-1640 sin suero fetal bovino durante 48 h previamente a la carga con FURA-2AM.

La figura 13 muestra el efecto de cantidades crecientes del péptido $\beta\text{A}25-35$ sobre los niveles de Ca^{2+} libre citosólico. Se

produce un aumento de $[Ca^{2+}]_i$ libre citosólico que es mayor en los linfoblastos de EA. La tabla XIII muestra que esta diferencia es estadísticamente significativa cuando la respuesta se mide tras cultivar los linfoblastos en ausencia de suero durante 48 h.

FIGURA 13

Efecto de concentraciones crecientes de $\beta A4(25-35)$ sobre la $[Ca^{2+}]_i$ de linfoblastos control y EA



Las medidas se llevaron a cabo como se describe en Métodos. Las líneas celulares utilizadas en el grupo control fueron: C-10, C-12, C-33 y C-36. Las líneas del grupo EA fueron AZ13, AZ27, AZ46, AZ67 y AZ72. Los linfoblastos fueron mantenidos en cultivo sin suero fetal bovino 48h antes de efectuar las medidas. Las líneas verticales representan el error standard de la media.

* $p < 0.009$ (unpaired t-test de Student).

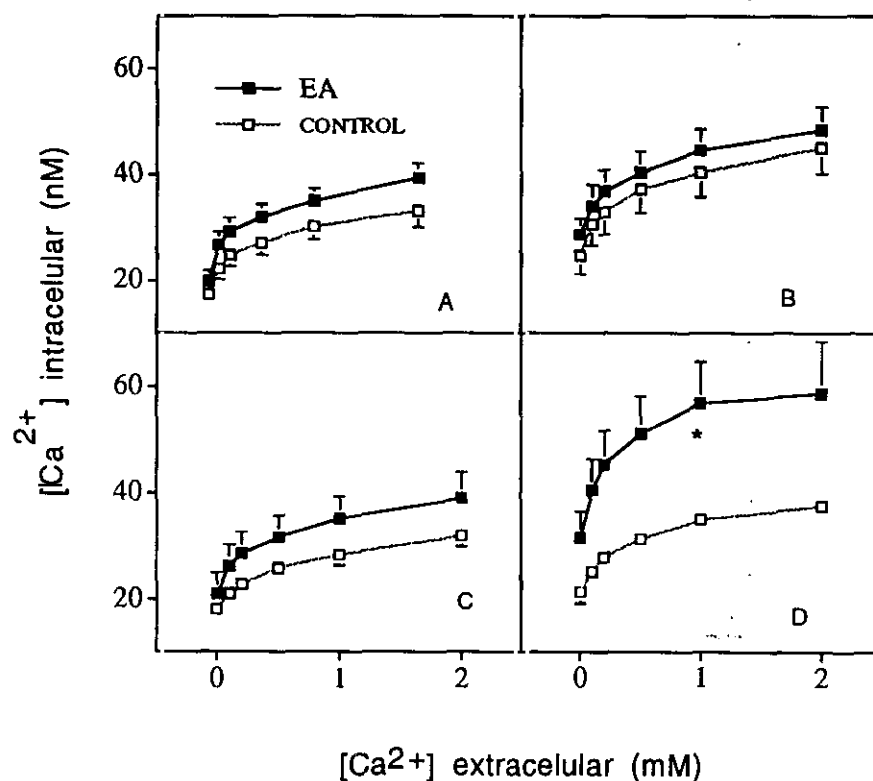
El $\beta A25-35$ no parece alterar la respuesta a αIgM ni en los linfoblastos control ni en los EA. Tampoco es alterada por la presencia o ausencia de suero en el medio de cultivo de las células (Tabla XIII y figura 12).

2.3.5 Cinética de la restauración de los niveles de $[Ca^{2+}]$ libre citosólico en linfoblastos deplecionados de Ca^{2+} .

Los resultados descritos hasta ahora muestran que los linfoblastos EA pueden alcanzar unos niveles más altos de Ca^{2+} libre citosólico en respuesta a factores de activación del suero fetal, a α IgM y a β A25-35 que los linfoblastos control. Una posible explicación para esta observación es que ambos tipos de linfoblastos difieran en las propiedades cinéticas de la ATPasa dependiente de Ca^{2+} de la membrana plasmática o en la velocidad de expresión o en las constantes de disociación de las estructuras intracelulares que ligan Ca^{2+} . La K_m para Ca^{2+} de las distintas isoformas de la ATPasa dependiente de Ca^{2+} de la membrana plasmática esta dentro del rango μ M (Carafoli, 1992), esto es, dos ordenes de magnitud por encima de los niveles basales de Ca^{2+} libre citosólico (tabla XII). Por tanto, aunque diferencias en la actividad de este enzima puedan resultar en cambios en la velocidad de salida de Ca^{2+} , parece improbable que puedan ser responsables de los diferentes niveles de Ca^{2+} libre citosólico que se observan. Para aclarar este punto determinamos los niveles de Ca^{2+} libre citosólico que se alcanzan cuando la velocidad de salida de Ca^{2+} es despreciable en comparación con su entrada. Para ello estudiamos la cinética de restauración de los niveles de Ca^{2+} libre citosólico en linfoblastos privados de Ca^{2+} . La figura 14, paneles A y C, muestra los niveles de Ca^{2+} libre citosólico en linfoblastos control o EA en función de la $[Ca^{2+}]$ extracelular. Los linfoblastos privados de Ca^{2+} tienen los mismos niveles basales de Ca^{2+} libre citosólico que los que se mantienen en condiciones normales de $[Ca^{2+}]$ extracelular (Tabla XII). Aunque los linfoblastos EA mostraron niveles algo más altos de Ca^{2+} libre citosólico que los controles las diferencias no fueron estadísticamente significativas, ni en los niveles basales de $[Ca^{2+}]$ intracelular ni después de la restauración de los niveles normales de Ca^{2+} extracelular. Sin embargo, cuando la salida de Ca^{2+} se inhibió mediante la adición de benzamil, un inhibidor de canales de Ca^{2+} (García y col, 1990), (figura 14, paneles B y D) se alcanzaron niveles más altos de $[Ca^{2+}]$ libre citosólico en los linfoblastos EA que en los controles, especialmente cuando las células se habían mantenido en un medio libre de suero durante

FIGURA 14

Efecto de concentraciones crecientes de Ca^{2+} extracelular sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{intracelular}}$ en los linfoblastos privados de Ca^{2+} extracelular



Los linfoblastos se lavaron 3 veces con tampón sin Ca^{2+} y se cargaron con FURA-2AM como se describe en el apartado de métodos. Los experimentos se realizaron tras cultivar las células durante 48 horas en presencia (paneles A y B) o ausencia (paneles C y D) de suero fetal bovino. Las gráficas B y D fueron registradas en presencia de $1 \mu\text{M}$ benzamil, un bloqueante de canales de calcio. Se hicieron adiciones de Ca^{2+} al medio y se registraron los correspondientes aumentos en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{intracelular}}$. Las curvas representan los valores medios de la población control (líneas C-10, C-11, C-12, C-18, C-33, C-36 y C-42) y la de los enfermos de EA (AZ13, AZ23, AZ27, AZ40, AZ46, AZ54, AZ67, AZ72 y AZ75). Las líneas verticales representan los errores estándar. * $p=0.032$ (método t de Student para valores no emparejados)

las 48h previas al experimento (figura 14, panel D). Estos resultados permiten descartar que posibles diferencias en las propiedades cinéticas de la ATPasa dependiente de pudieran dar cuenta del aumento en $[Ca^{2+}]$ libre citosólica que se observa en linfoblastos EA.

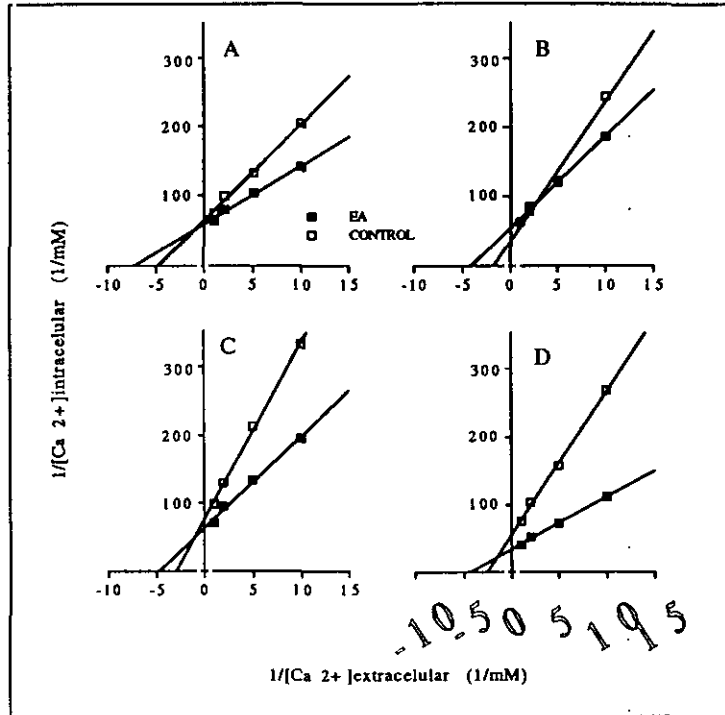
La figura 14 muestra que la cinética de restauración de los niveles de Ca^{2+} libre citosólico es una cinética de saturación de tipo exponencial. La curva de saturación se puede linearizar cuando se representa $1/[Ca^{2+}]$ libre citosólico en función de $1/[Ca^{2+}]$ extracelular. La figura 15 muestra este tipo de representación utilizando los valores medios representados en la figura 14. Basándonos en esta representación gráfica calculamos la concentración de Ca^{2+} extracelular necesarios para alcanzar una concentración de $[Ca^{2+}]$ libre citosólico mitad de la máxima ($[Ca^{2+}]_{0,5}$ extracelular), así como la concentración máxima de Ca^{2+} libre citosólico, con los resultados obtenidos con cada línea celular. El primer parámetro corresponde al punto de intersección de la recta con el eje X, esto es cuando la $[Ca^{2+}]$ libre citosólico es infinita y por tanto $1/[Ca^{2+}]$ libre citosólico es cero. El segundo parámetro es el valor de $1/[Ca^{2+}]$ libre citosólico cuando el valor de $1/[Ca^{2+}]$ extracelular es cero, esto es cuando $[Ca^{2+}]$ extracelular es infinita. La tabla XIV muestra los valores medios obtenidos. La $[Ca^{2+}]_{0,5}$ extracelular es menor en los linfoblastos EA que en los controles de edad similar, tanto en presencia como en ausencia de benzamil, La tabla XV muestra el valor del $[Ca^{2+}]$ libre citosólico máxima. Este parámetro es mayor en presencia de benzamil que en su ausencia. En estas condiciones los linfoblastos EA muestran un aumento en el valor de $[Ca^{2+}]_{max}$ libre citosólico respecto a los linfoblastos controles, que fue especialmente significativo cuando los linfoblastos se mantuvieron en reposo, esto es en ausencia de suero, durante las 48 previas a la realización del experimento.

2.3.6 Efecto del envejecimiento en la cinética de reemplazamiento de Ca^{2+}

La figura 16 muestra los niveles de Ca^{2+} libre citosólico en individuos sanos de edades comprendidas entre 42 y 57 años (edad media) y entre 68 y 89 años (edad avanzada) que se

FIGURA 15

Representación de dobles recíprocos de las curvas de entrada de Ca^{2+} en los linfoblastos en respuesta al aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{extracelular}}$



En la figura se representan los valores inversos de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{intracelular}}$ frente a la inversa de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{extracelular}}$ de las curvas de la fig 14

TABLA XIV

Valores para la carga de $[\text{Ca}^{2+}]_{0.5}$ necesaria para saturación

	EA	Edad avanzada	Edad media
Medio con suero:			
normal	0.176±0.029	0.240±0.05	0.436±0.15
+benzamil	0.287±0.057	0.360±0.01	0.504±0.25
Medio sin suero:			
normal	0.264±0.056	0.334±0.056	0.467±0.06
+benzamil	0.307±0.047	0.427±0.112	0.468±0.1

El experimento es el mismo descrito en la figura 14. El cálculo de $[\text{Ca}^{2+}]_{0.5}$ se realizó como se describe en el texto. Los valores son medias de 7 controles y 9 EA ± error estandar..

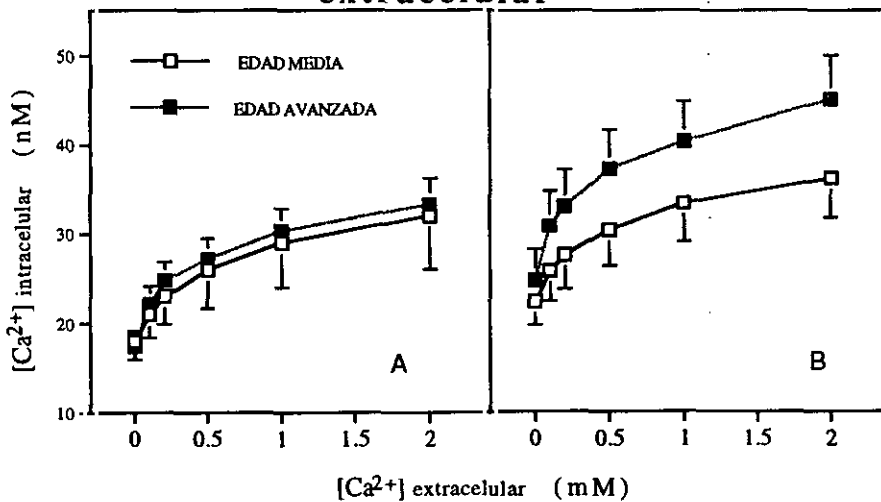
TABLA XV

Valores de $[Ca^{2+}]$ intracelular máxima

	EA	Edad avanzada	Edad media
Medio con suero:			
normal	36.6±2.3	33±2.6	29±1.8
+benzamil	48±4.7	43.6±4	32±4
Medio sin suero:			
normal	37.3±4.5	33.6±3.4	34±7.6
+benzamil	66.2±10*	41±2	37±3.7

El experimento es el mismo descrito en la figura 15. El cálculo de $[Ca^{2+}]$ intracelular (nM) máxima se realizó como se describe en el texto. Las concentración de benzamil fue 1 μ M. Los valores son medias de 7 controles y 9 EA \pm E.S.. *Por el método de la t de Student: P=0.056.

FIGURA 16

Efecto de la edad sobre la cinética de restauración de la $[Ca^{2+}]$ intracelular en linfoblastos privados de Ca^{2+} extracelular

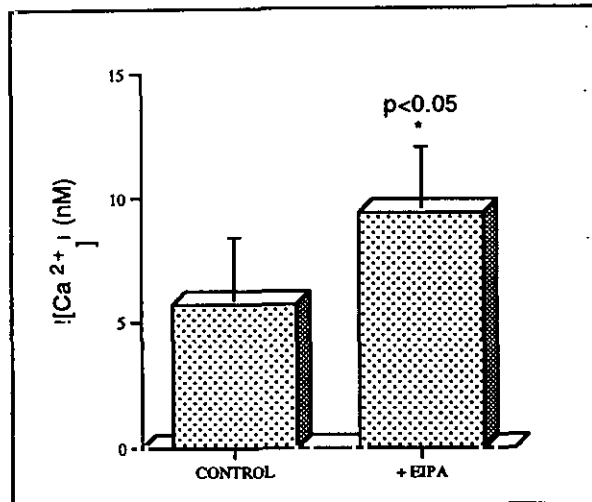
El experimento se realizó como se describe en la figura 15 con una población de controles de mediana edad (panel A). El panel B representa la entrada de calcio en presencia de 1 μ M benzamil. Las líneas utilizadas fueron líneas C-10, C-11, C-12, C-18, C-33, C-36 y C-42 en el grupo de edad avanzada (77 años de media) y C-37, C-39, C-43, C-45, C-48 en el grupo de mediana edad (48 años de media).

alcanzan después de reemplazar con distintas concentraciones de Ca^{2+} extracelular los niveles de Ca^{2+} intracelular. Los linfoblastos de controles de edad avanzada alcanzan niveles de Ca^{2+} libre citosólico mayores que los de edad media. Cuando estos datos fueron sometidos a un tratamiento similar al que hemos descrito para la figura 14 (tablas XIV y XV) vemos que, aunque el envejecimiento disminuye el valor de $[\text{Ca}^{2+}]_{0,5}$ extracelular, no afecta la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{max}}$ libre citosólico a diferencia de lo que ocurre en linfoblastos EA, lo que indica que los mecanismos implicados en la elevación de $[\text{Ca}^{2+}]$ libre citosólico son distintos en ambos procesos.

2.4 Regulación del pH intracelular en linfoblastos

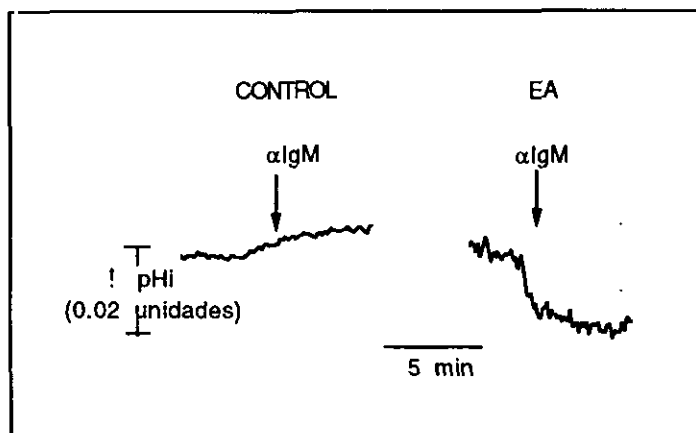
La determinación del pH intracelular (pHi) basal no mostró diferencia alguna entre linfoblastos control y EA ($7,1 \pm 0,05$ y $7,1 \pm 0,03$, respectivamente). Este resultado fue inesperado puesto que la existencia de una relación entre pHi y $[\text{Ca}^{2+}]$ libre citosólico ha sido descrita en una gran variedad de sistemas. La tabla X muestra que el $[\text{Ca}^{2+}]$ libre citosólico basal es mayor en linfoblastos EA que en los controles, lo cual sugiere una alteración simultánea en la $[\text{H}^+]$. La figura 17 muestra que en los linfoblastos también existe esa correlación, puesto que la inhibición del intercambiador Na^+/H^+ por la adición de 5-(N-etil-N-isopropil) amilorida (EIPA) (Lesburg y col, 1990) da lugar a un aumento estadísticamente significativo de $[\text{Ca}^{2+}]$ libre citosólico en respuesta a la adición de αIgM . Esta observación indica que al igual que ocurre en otros sistemas biológicos (Van Obberghen-Schilling y col, 1985; Moolenaar, 1986; Urcelay y col, 1994) en los linfoblastos los estímulos extracelulares pueden actuar controlando simultáneamente pHi y $[\text{Ca}^{2+}]$ libre citosólico. De acuerdo con esta posibilidad, la figura 18 muestra que la adición de αIgM produce un aumento en el pH intracelular de 0,01 unidades. Esta misma figura muestra que en los linfoblastos EA, la adición de αIgM da lugar a una acidificación del medio intracelular en lugar de la alcalinización observada en los linfoblastos control. Estos resultados sugieren la posibilidad de que los linfoblastos EA tengan una alteración en el intercambiador Na^+/H^+ que afecte a su regulación. La activación del intercambiador Na^+/H^+ en respuesta a distintos estímulos está mediada por la

FIGURA 17

Efecto de EIPA sobre la respuesta a α IgM

La figura representa el aumento en el $\Delta[Ca^{2+}]_{intracelular}$ en respuesta a $10 \mu\text{g/ml}$ de αIgM en presencia y ausencia de $10 \mu\text{M}$ EIPA, un inhibidor del intercambiador Na^+/H^+ . Los valores son medias de los resultados obtenidos con dos líneas celulares control, C-34 y C-36, y dos EA, AZ27 y AZ34. Las barras verticales representan el error estandar. *por el método de la t de Student

FIGURA 18

Respuesta a α IgM del pH_i de linfoblastos control y EA

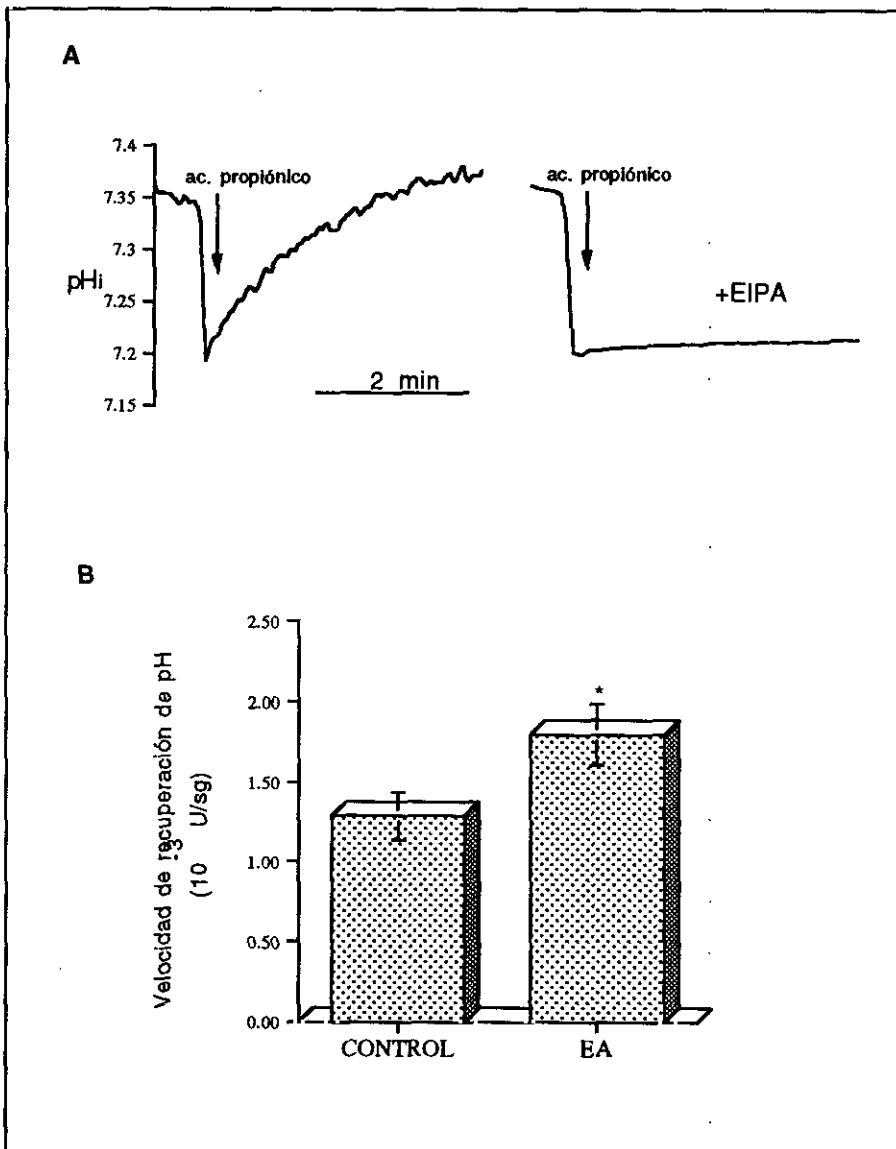
Los registros representan el valor medio del cambio en el registro de pH_i intracelular de 7 líneas linfoblásticas control y 7 EA en respuesta a $20 \mu\text{g/ml}$ de αIgM . El valor ΔpH para los controles es 0.01 ± 0.007 unidades mientras que para EA es de -0.021 ± 0.009 , estadísticamente distintas ($p = 0.017$ por el método de la t de Student para muestras no apareadas). Las líneas celulares usadas para esta serie fueron AZ13, AZ27, AZ46, AZ54, AZ67, AZ72 y AZ75 para el grupo EA y C-12, C-33, C-37, C-40, C-46 y C-47 para el grupo control.

activación de proteína quinasa C (Moolenaar, 1986; Grinstein y col, 1989; Urcelay y col, 1993). Sin embargo, el hecho de que α IgM no induzca la translocación de proteína quinasa C del citosol a la membrana (Figura 12) indica que éste no es el mecanismo mediador de la respuesta del pHi a α IgM mostrado en la figura 18. El intercambiador Na^+/H^+ es una proteína fijadora de calmodulina y la activación mediada por factores de crecimiento y choque osmótico es dependiente de calmodulina (Bertrand y col, 1994). Puesto que la calmodulina también parece jugar un papel importante en la respuesta a α IgM de los linfoblastos (figura 11), consideramos de interés determinar si diferencias en la actividad del intercambiador Na^+/H^+ podían dar cuenta de las diferentes respuestas de los linfoblastos control y EA a α IgM. Para ello determinamos la velocidad de recuperación de la células frente a una carga de ácido. Utilizamos el abordaje experimental descrito por Göbel y col. (1994) que consiste en la adición de ácido propiónico a células cargadas con la sonda fluorescente BCECF (Biscarboxietilcarboxi-fluoresceína) y el registro continuo de la fluorescencia emitida a 530 nm cuando se excitan las células de forma alternativa a 495 y 440 nm. La figura 19 (panel A) muestra un experimento típico de respuesta a una carga de ácido propiónico. La eliminación de H^+ del medio intracelular es sensible a EIPA lo que confirma su dependencia del intercambiador Na^+/H^+ . Un segundo procedimiento utilizado fue el de Grinstein y col. (1989). Este procedimiento se basa en el uso de nigericina, un ionóforo carboxílico que cataliza el intercambio electroneutro de K^+ por H^+ . La adición de nigericina a células en un medio sin Na^+ ni K^+ , dará lugar a que el K^+ citosólico se intercambie por H^+ extracelular. El medio intracelular se acidificará mientras esté la nigericina presente. La eliminación de nigericina, mediante la adición de albúmina, acabará la acidificación intracelular y tras la adición de Na^+ se pondrá en marcha el intercambiador Na^+/H^+ dando lugar a una alcalinización del medio intracelular, cuya velocidad será proporcional a la actividad del intercambiador. La Figura 20 (panel A) muestra un experimento típico con la recuperación del pH intracelular y su sensibilidad a EIPA.

La figura 19 (panel B) muestra la velocidad de recuperación de la carga ácida en linfoblastos control y EA utilizando el primero de estos métodos y la figura 20 (panel B) la velocidad de

FIGURA 19

Activación del intercambiador Na^+/H^+ mediante acidificación con propiónico

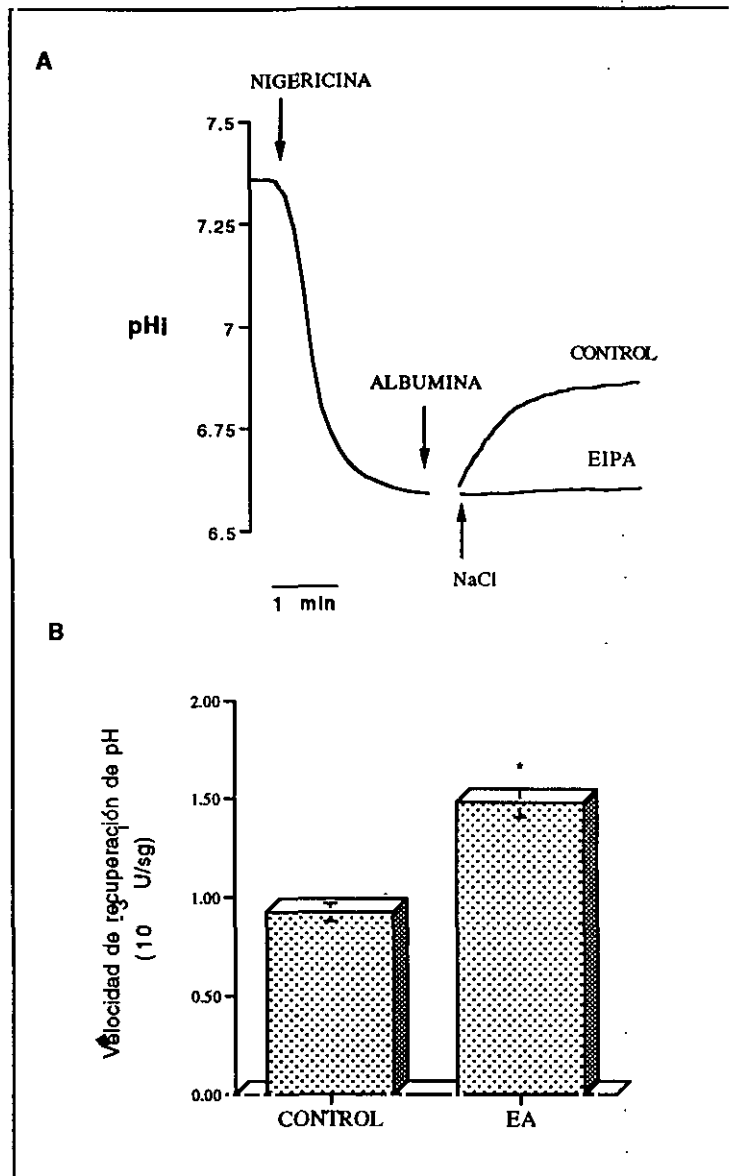


Los linfoblastos fueron cargados con BCECF como se describe en Métodos. Panel A: Cuando se indica, se añadió 50 mM ácido propiónico. El panel de la izquierda muestra el cambio de pH intracelular en respuesta a ácido propiónico y el panel de la derecha en presencia de 10 μM EIPA, inhibidor del intercambiador Na^+/H^+ . Panel B: Se determinó la velocidad de recuperación del pH intracelular en los 30 seg. que siguen a la adición de ácido propiónico. Los resultados son medias de los valores obtenidos con las líneas C-10, C-11, C-12, C-33, C-34, C-37, C-40, C-42, C-46, C-47 para el grupo control y AZ13, AZ23, AZ26, AZ27, AZ46, AZ54, AZ72, AZ73 y AZ75 para el grupo EA. Las líneas verticales representan los errores estandar.

* $p=0.05$ (test de la t de Student para valores no emparejados)

FIGURA 20

Activación del intercambiador Na^+/H^+ mediante acidificación con nigericina en medio libre de Na^+



Panel A: Linfoblastos cargados con BCECF como se describe en Métodos se acidificaron mediante incubación en tampón de carga sin Na^+ (con colina como sustituto) en presencia de $5 \mu\text{M}$ nigericina. La acidificación se interrumpió eliminando la nigericina con 5 mg/ml de albúmina bovina. Cuando se indica se añadió 50 mM NaCl y $10 \mu\text{M}$ EIPA. Panel B: Se determinó la velocidad de recuperación del pH intracelular en los 30 seg. que siguen a la adición de ClNa . Las líneas celulares control utilizadas fueron C-10, C-11, C-12, C-33, C-34, C-37, C-40, C-42, C-46, C-47 y AZ13, AZ23, AZ26, AZ27, AZ46, AZ54, AZ67, AZ72 y AZ75 para el grupo EA. Las líneas verticales representan los errores estandar. * $p=0,003$ (método t de Student para valores no emparejados).

recuperación utilizando el segundo método. Con ambos procedimientos se pudo observar una mayor velocidad de alcalinización en los linfoblastos EA. La diferencia con la velocidad de alcalinización de los controles fue estadísticamente significativa, tanto cuando se utilizó el procedimiento de la nigericina como con el procedimiento del ácido propiónico. Estos resultados sugieren que los linfoblastos EA tienen una mayor actividad del intercambiador Na^+/H^+ . Sin embargo, cuando determinamos la velocidad real de salida de H^+ como consecuencia de la carga con ácido propiónico, los resultados obtenidos no apoyan esa conclusión. La Tabla XVI muestra que la capacidad de tamponar cambios en la concentración de H^+ de los dos tipos celulares es distinta.

TABLA XVI.

Capacidad de tamponamiento de los linfoblastos ante un choque de ácido propiónico

	CONTROL	EA
Capacidad de tamponamiento ($\Delta\text{pH}/\text{mM H}^+$)	118 \pm 11	88 \pm 8*
Velocidad inicial de salida de H^+ (mM/min)	12 \pm 1	9 \pm 0,6
Velocidad máxima de salida de H^+ (mM/min)	71 \pm 6	66 \pm 6

El experimento se realizó como se describe en Métodos. Las líneas linfoblásticas control utilizadas para la determinación de la capacidad de tamponamiento fueron C-10, C-11, C-12, C-33, C-34, C-37, C-40, C-42, C-46, C-47 y AZ13, AZ23, AZ26, AZ27, AZ46, AZ54, AZ72, AZ73 y AZ75 para el grupo EA. Con cada línea celular se realizaron de 2 a 7 determinaciones y se calculó un valor medio. Los valores mostrados son las medias de los valores medios obtenidos con cada línea celular \pm error estándar. La determinación de las velocidades inicial y máxima de salida de H^+ fue realizada con los datos de ΔpH mostrados en la figura 19 y corregidos por la capacidad de tamponamiento media. *Por el método de la t de Student: $P=0,05$

La capacidad tampón (β) es la cantidad de H^+ necesarios para producir un cambio en una unidad de pH intracelular. Se calcula de acuerdo con la fórmula: $\beta = \Delta[\text{Prop}^-]_i / \text{pH}_i$, donde ΔpH_i se mide inmediatamente después de la acidificación y $[\text{Prop}^-]_i$ se calcula con la fórmula (Göbel et al, 1994):

$$[\text{Prop}^-]_i = [\text{Prop}] (10^{\text{pH}_i - \text{pK}} / 1 + 10^{\text{pH}_o - \text{pK}})$$

donde $[\text{Prop}^-]_i$ =concentración intracelular de propionato; $[\text{Prop}]$ =propionato sódico añadido; pH_i =pH intracelular después de la acidificación; pK =constante de disociación del ácido propiónico (4,87); pH_o =pH extracelular (7,4).

Cuando se calcula la velocidad inicial de salida de H^+ de cada línea celular utilizando los valores individuales de capacidad tampón calculados, no hay diferencias significativas (Tabla XVI). Tampoco se pueden observar diferencias en la velocidad máxima de la actividad del intercambiador Na^+/H^+ calculado extrapolando los resultados obtenidos a un pH intracelular de 6.

2.5 *Análisis estructural del gen de la calmodulina*

Los resultados descritos anteriormente muestran que los linfoblastos EA tienen disminuida la capacidad de tamponar los cambios agudos en $[\text{Ca}^{2+}]$ libre citosólico y de $[\text{H}^+]$. Una posible interpretación de esta observación podría ser la existencia de alteraciones estructurales en alguna de las proteínas fijadoras de Ca^{2+} y de H^+ . La calmodulina cumple esta función dentro de la célula (Weinstein y Mehler, 1994) y es una proteína codificada por tres genes, localizados en los cromosomas 2 (2p21.1-p21.3), 14 (14q24-31) y 19 (19q13.2-13.3) (Berchtold y col, 1993). La EA de aparición tardía muestra ligamiento con el cromosoma 19, en la región entre 19q13.1 y 19q13.3 (Pericak-Vance y col, 1993), mientras que la de aparición precoz muestra ligamiento con el cromosoma 14 región 14q24.3 (Schellenberg y col, 1992; St George-Hyslop y col, 1992; Van Broeckhoven y col, 1992). Además, se ha descrito que la expresión de calmodulina está aumentada en linfoblastos en comparación con linfocitos (Colomer y col, 1994), lo que sugeriría que las consecuencias de una alteración estructural del gen que codifica alguna de las formas de calmodulina serían más fácilmente detectables en nuestro modelo experimental. Consideramos justificado abordar el análisis estructural del gen y para ello estudiamos el gen de la calmodulina 3, que es el que está localizado en el cromosoma 19, puesto que la mayor parte de los casos de EA que teníamos eran de aparición tardía y mostraban un ligamiento con el alelo e4 de la ApoE. Esta otra proteína está localizada en la misma zona del cromosoma 19 que la calmodulina.

El abordaje experimental que utilizamos se basó en hacer un rastreo por el procedimiento de detección de polimorfismos conformacionales de ADN monocatenario (SSCP). Para ello, diseñamos una serie de oligonucleótidos correspondientes a secuencias intrónicas próximas a los exones III, IV y V del gen de la calmodulina 3 (CALM3) que nos permitieran amplificar por PCR fragmentos de ADN de unas 200 pb, que pudieran ser analizados por SSCP. La figura 21 muestra la estructura primaria de la calmodulina. Como se puede ver estos tres exones codifican la secuencia de aminoácidos correspondiente a los cuatro sitios de fijación de Ca^{2+} .

Las figuras 22, 23 y 24 muestran los resultados del análisis por SSCP correspondientes a los exones III, IV y V de una serie de muestras de EA. La existencia de polimorfismos es evidente y para intentar determinar la alteración estructural precisa a la que se debían procedimos a clonar y secuenciar estos fragmentos de ADN. Los productos de amplificación de exones fueron clonados en vectores-T siguiendo los principios generales descritos previamente (Marchuk y col, 1991). La figuras 24 y 25 muestran como las alteraciones estructurales detectadas corresponden a las zonas intrónicas, sin que pudieramos detectar alteración alguna en las zonas codificadoras que pudiera dar lugar a una proteína alterada. Puesto que alguna de las alteraciones estructurales estaban próximas a la zona límite exón-intrón, consideramos la posibilidad de que pudieran dar lugar a un procesamiento alternativo del ARN, con la aparición de sitios de escisión crípticos (Krawczak y col, 1992). Para abordar esta cuestión, preparamos ARN mensajero de las siguientes líneas linfoblásticas AZ13, AZ23, AZ26, AZ27, AZ75, C-36 y C-40. Utilizando un oligonucleótido antisentido, correspondiente al extremo 3' no codificador del ARN mensajero, preparamos ADN complementario como se describe en Métodos, y amplificamos por PCR toda la zona codificadora de la calmodulina. Los oligonucleótidos utilizados fueron:

C3 sense (pos. 68)

5'-CTTGATCCCCGTGCTCCGGA-3'

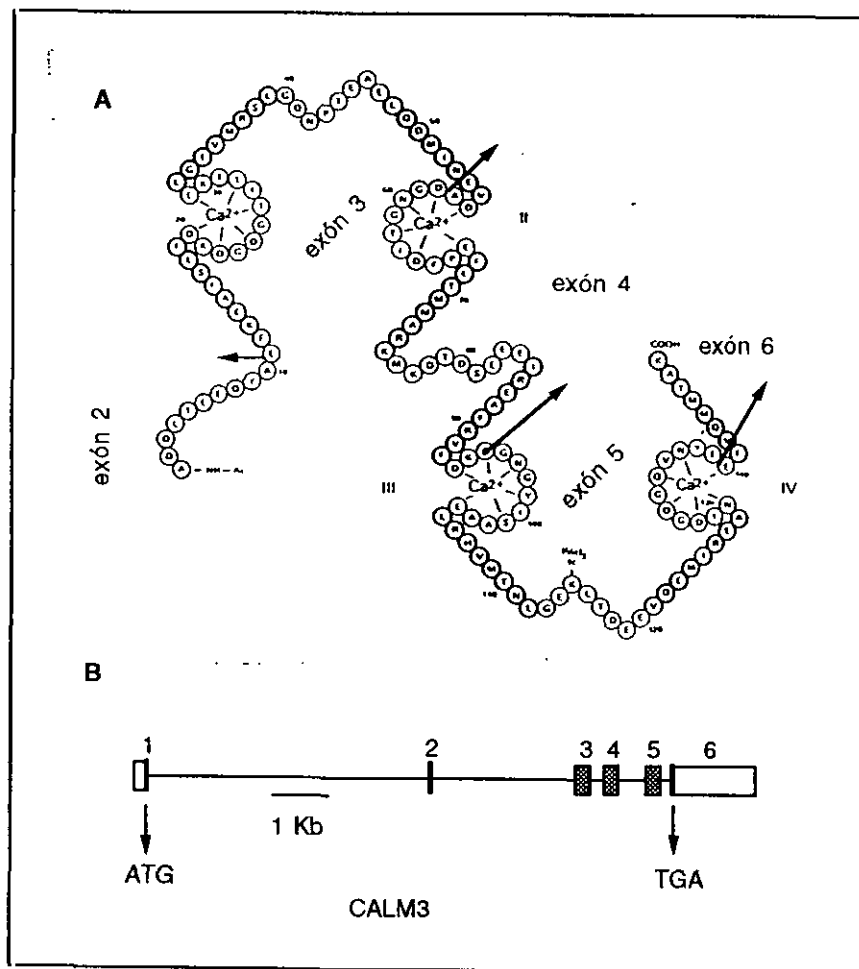
C3 complementario (pos 586)

5'-TGTTGAAGAGAGAGTGCGCGC-3'

Pudimos comprobar que existía un único producto de PCR. El fragmento amplificado fue purificado y clonado en un vector-T. Su secuenciación completa no mostró ninguna alteración estructural.

FIGURA 21

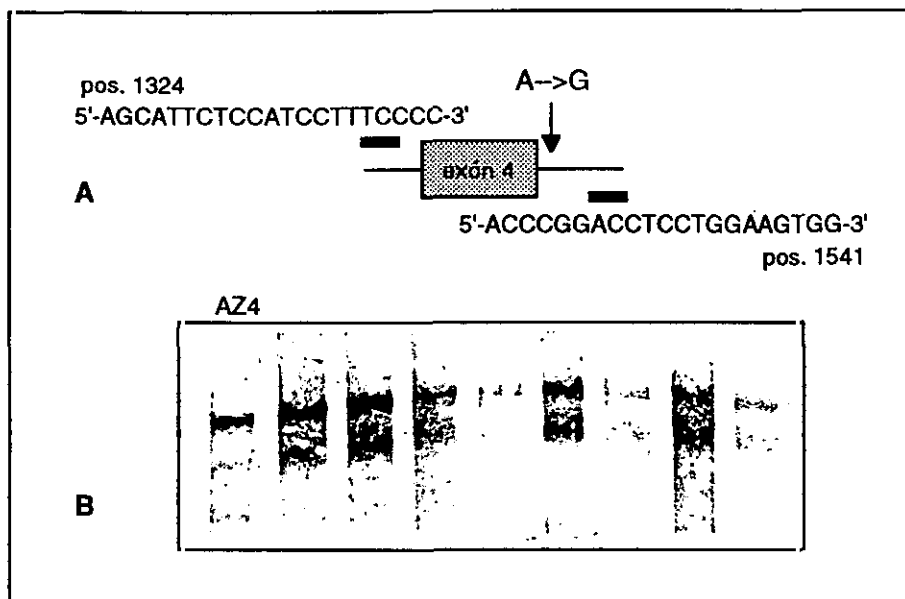
Estructura de la proteína calmodulina y del gen CALM3 que la codifica



Panel A: Estructura primaria y secundaria de la calmodulina. Las flechas indican los sitios donde empiezan las zonas codificadas por los distintos exones. Panel B: Estructura del gen de la CALM3. Las zonas sombreadas indican los distintos exones.

FIGURA 23

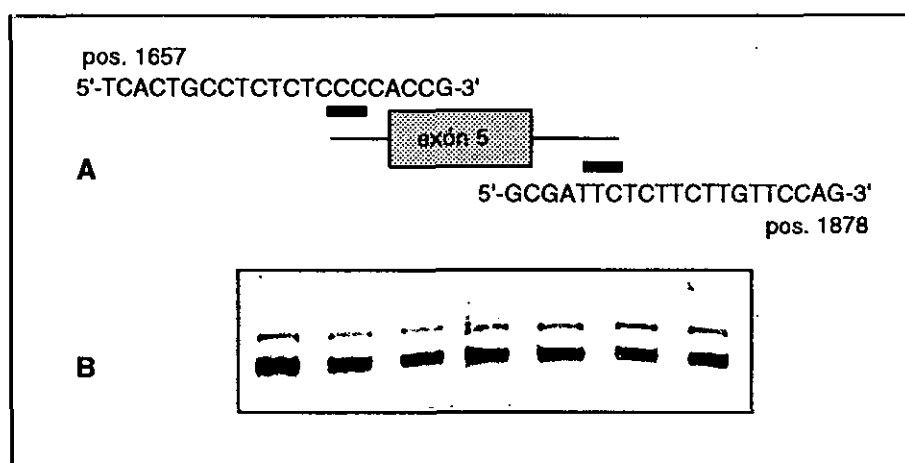
SSCP del exón 4 del gen de la calmodulina (CALM3)



Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar el exón 4 de CALM3 (panel A) y con el fragmento resultante de 237 pb se hizo electroforesis en cadena simple (panel B) donde se observó que algunos de los enfermos (AZ18 en la figura) presentaban una banda extra. En la posterior secuenciación de los fragmentos de DNA se pudo comprobar que estos enfermos presentaban una sustitución A→G en el intrón, señalado en el esquema del panel A.

FIGURA 24

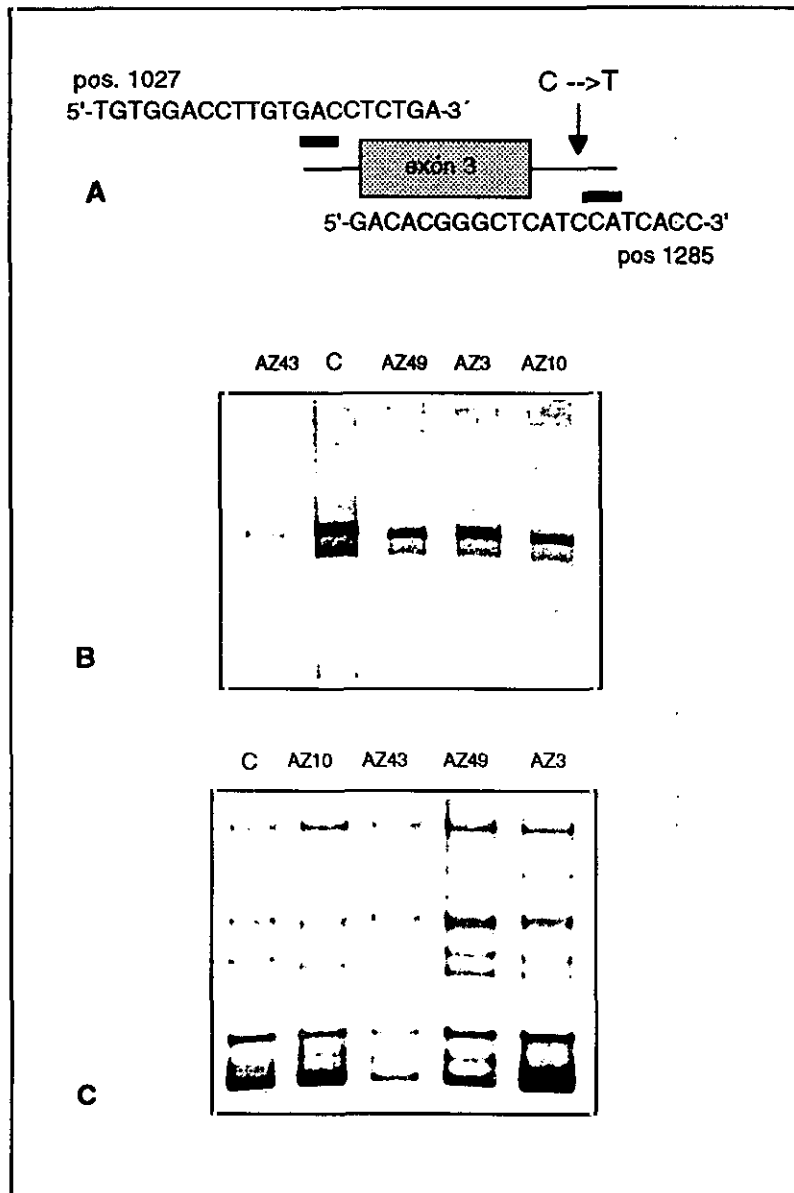
SSCP del exón 5 de la CALM3



El exón 5 se amplificó por PCR con los oligonucleótidos descritos en el panel A, dando lugar a un fragmento de 243 pb. El panel B muestra los patrones de SSCP de una serie de muestras de enfermos sin alteración alguna.

FIGURA 22

SSCP del exón 3 del gen de la calmodulina (CALM3)



Se diseñaron oligonucleótidos que flanquean el exón 3 del gen CALM3 de la calmodulina (panel A) y se amplificó un fragmento de 279 pb con el que se llevó a cabo electroforesis de SSCP como se describe en el apartado de métodos. La resolución de las bandas sugería alguna diferencia entre las distintas muestras de enfermos (panel B) pero el fragmento era demasiado grande por lo que se digirió con *Bcl I* en dos fragmentos de 145 pb y 134 pb que sí presentaron patrones claramente distintos (panel C) cuando se sometieron a electroforesis en cadena simple. La secuenciación de las muestras demostró la presencia de un cambio C->T en el intrón, homocigoto en el enfermo AZ3 y heterocigoto en AZ10, AZ43 y AZ49 (panel A).

DISCUSSION

1. ALTERACIONES ESTRUCTURALES EN LOS GENES IMPLICADOS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

La importancia de la herencia en la aparición de la EA ha sido un tema de discusión durante los últimos diez años. Los estudios epidemiológicos demostraron que las familias con enfermos de EA tiene más casos de EA entre los parientes cercanos que las familias control (Van Dujin y col, 1991). El seguimiento de la enfermedad en hermanos gemelos sugirió que la herencia de los genes defectuosos era importante en la patogénesis de la EA (Nee y col, 1987; Rapoport y col, 1991). Sin embargo, los estudios realizados sobre la base de grandes poblaciones no parecen mostrar de forma unívoca la forma de herencia que puede estar implicada. Algunos autores han sugerido que la EA es autosómica dominante (Mohs y col, 1987), sin embargo, esta hipótesis es difícil de demostrar. La EA aparece tardíamente y los parientes de los enfermos fallecen a menudo de otras causas antes de alcanzar la edad de riesgo. La evidencia más convincente de que hay genes defectuosos implicados en la EA se obtuvo mediante los estudios realizados con familias con casos de EA de aparición precoz, en las que la enfermedad se transmite de una forma autosómica dominante (Bird y col, 1987; Bird y col, 1989; Van Broeckhoven y col, 1987; St. George-Hyslop y col, 1987; Heston y col, 1991). En algunas de las familias estudiadas la edad de aparición esta entre los 30 y 40 años, siendo el riesgo de padecer la enfermedad de un 50 % (Van Broeckhoven y col, 1987).

1.1 Alteraciones estructurales en el gen de la APP

En los últimos años se ha avanzado considerablemente en la identificación de mutaciones responsables de estos casos de EA familiar de aparición precoz, con la identificación de mutaciones en el gen de la proteína precursora del péptido β -amiloide (Goate y col, 1991; Naruse y col. 1991; Yoshioka y col. 1991; Hendriks y col, 1992; Murrell y col. 1991; Chartier-Harlin y col. 1991).

Estas mutaciones aparecen en tres zonas determinadas del gen, todas ellas en zonas correspondientes al péptido β -amiloide: la

zona amino terminal, la región central y el extremo carboxilo. Nosotros abordamos el estudio de posibles alteraciones estructurales en el gen de la APP haciendo un rastreo de los exones 16 y 17 de la APP, que codifican la región de la proteína que corresponde al péptido β -amiloide (Kang y col, 1987). La técnica utilizada para hacer este rastreo se considera que tiene una fiabilidad muy alta (Myers y col, 1985). Por tanto, parece improbable que hayamos pasado por alto la existencia de alguna mutación. El hecho de que no encontramos ninguna alteración estructural en los 50 casos de EA de aparición tardía, aunque algunos de ellos (12) parecen tener un componente familiar (Tabla V) confirma la hipótesis de que estas alteraciones estructurales dan lugar a una forma de EA de aparición precoz.

El estudio que hemos realizado incluye también 20 casos de EA de aparición precoz, de los cuales 4 reconocían la existencia de historia familiar de demencia senil (Tabla V). En ninguno de ellos pudimos encontrar alteraciones en los exones 16 y 17 del gen de la APP. Los datos existentes en la literatura coinciden en señalar que la aparición de estas mutaciones es rara, incluso dentro de las familias de EA de aparición precoz. Cuatro mutaciones han sido descritas hasta el momento, asociadas con la EA. Tres de ellas en el codon 717 (Chartier-Harlin y col, 1991; Goate y col. 1992; Murrell y col. 1991). Una de ellas solo ha sido encontrada en once familias en todo el mundo, mientras que las otras dos solamente se han encontrado en una familia cada una (Houlden y col, 1993; Tanaka y col, 1993). La cuarta mutación encontrada en casos de EA de aparición precoz, es en realidad una mutación doble en los codones 670/671 (Mullen y col. 1992), que ha sido encontrada solamente en una familia (Lannfelt y col, 1993). Por tanto, la observación de que no existe una alteración estructural del gen de la APP en los enfermos estudiados por nosotros está de acuerdo con la baja frecuencia de mutaciones en EA.

La existencia de estas mutaciones, aunque sea con tan baja frecuencia, demuestra que la molécula de APP, por si misma, puede ser responsable de la enfermedad. La pregunta que queda por contestar es de qué forma la alteración estructural de la APP puede ser causa de la enfermedad. Existen varias teorías para

intentar responder a esta pregunta, aunque todavía no se ha conseguido una respuesta definitiva. Algunos autores han observado que la transfección de ADNc que codifica el péptido β -amiloide conteniendo la doble mutación da lugar a un aumento de 5-8 veces en la secreción del péptido β -amiloide al medio de cultivo de las células transfectadas (Citron y col, 1992; Cai, y col, 1993). La transfección de ADNc conteniendo la mutación alanina-glicina en la región central del péptido β -amiloide no da lugar a un aumento en la secreción del péptido, sin embargo, da lugar a un péptido truncado al que le faltan los aminoácidos polares y cargados del extremo N-terminal y que puede tener mayor facilidad de agregación (Haass y col, 1994). Por último, la tercera clase de mutaciones, localizadas en el extremo carboxilo del péptido β -amiloide, tampoco parecen aumentar la producción de péptido, pero se ha sugerido que puede dar lugar a un péptido β -amiloide que contenga aminoácidos adicionales en el extremo carboxilo con una mayor capacidad de agregación (Jarret y Lansbury, 1993).

Las mutaciones en el gen de la APP dan cuenta de algunos de los casos en los que previamente se había observado un ligamiento de la enfermedad con el cromosoma 21q21.1. Sin embargo, existen casos descritos de EA con ligamiento genético al cromosoma 21 en una región centromérica, distinta de la del APP (St. George-Hyslop y col. 1987; Tanzi y col. 1992), lo que sugiere un segundo *locus* en este mismo cromosoma. Lo que parece más frecuente es la asociación de la EA de aparición precoz con el cromosoma 14. Muy recientemente se ha descrito el gen responsable de la enfermedad en este cromosoma (Sherrington y col, 1995) así como un gen similar en el cromosoma 1 (Sherrington y col, 1995b; Levy-Lahad y col, 1995), que también aparece mutado en una familia con EA de aparición precoz. Es posible que algún(os) de los casos estudiados por nosotros tengan estas mutaciones. Aunque, en principio parece claro que existen mutaciones asociadas en estos dos genes en casos de EA de aparición precoz, todavía no hay estudios en la literatura que aclaren la posibilidad de que exista alguna mutación en estos genes asociada a EA de aparición tardía. De los casos de EA de aparición tardía estudiados por nosotros, solamente un 34%

muestran asociación con el alelo 4 de la apoE (tabla VI), lo cual indica que en estos casos existe un ligamiento genético con el cromosoma 19. El resto de los casos, de los cuales 11% tienen historia familiar de demencia, no tienen el alelo 4 de la ApoE, por tanto, la posibilidad de que puedan estar asociados a otro cromosoma sigue abierta.

1.2 Asociación de la EA con el alelo 4 de la apoE.

El papel de la apoE en la patogénesis de EA se basa en su capacidad de formar estructuras monofibrilares con el péptido β -amiloide, siendo el alelo $\epsilon 4$ más eficaz que el $\epsilon 3$ (Sanan y col, 1994). La observación de que las demencias seniles de otro origen distinto a EA (Noguchi y col, 1993; Betard y col, 1994) y el declive cognoscitivo de los ancianos (Feskens y col, 1994) también están asociadas a un aumento en la frecuencia del alelo $\epsilon 4$ ha planteado dudas sobre la especificidad del papel de la apoE en la patogénesis de EA. En el estudio que hemos realizado los controles obtenidos sin selección alguna, esto es, los donantes de sangre procedente de diversos hospitales de Madrid, muestran una frecuencia del alelo $\epsilon 4$ (6 %) muy baja en comparación con la descrita en otras poblaciones de origen caucásico (10-16 %) (Mayeux y col, 1993; Houlden y col, 1993; Saunders y col, 1993) y similar a la encontrada en la población de centenarios franceses (5.2 %) (Schächter y col, 1994). También es similar a la población japonesa (6-9.5 %) en la que la prevalencia de la enfermedad es menor (Ueki y col, 1993; Kawamata y col, 1994; Yoshizawa y col, 1994; Okuizumi y col, 1994). Sin embargo, en la población española no parece que la prevalencia de EA sea menor que en el resto de los países cuya población es de origen caucásico (Rocca y col, 1991). Todas estas observaciones sugieren que existen otros factores, distintos de la frecuencia del alelo $\epsilon 4$, que son importantes para el desarrollo de la enfermedad. De acuerdo con esto, se ha un estudio reciente realizado en Nigeria ha mostrado por primera vez falta de asociación entre la frecuencia del alelo $\epsilon 4$ y la EA (Osontukun y col, 1995).

La frecuencia del alelo $\epsilon 4$ aumenta y la de $\epsilon 3$ disminuye en los enfermos de EA de forma similar a lo observado en otras

poblaciones (Strittmatter y col, 1993; Ueki y col, 1993; Anwar y col, 1993; Poirier y col 1993; Brousseau y col, 1994; Lehtimaki y col, 1995). Nuestros datos muestran que la distribución de los alelos de la apoE no es estadísticamente distinta en los enfermos de aparición precoz que en los controles (Tabla VII), lo que confirma los resultados descritos previamente, que indicaban una asociación del alelo $\epsilon 4$ sólo con la EA de aparición tardía (Saunders y col, 1993; Kawamata y col, 1994). Sin embargo, esto es en el momento actual motivo de controversia, porque existen bastantes grupos que han encontrado asociación del alelo $\epsilon 4$ con la EA de aparición precoz (Dai y col, 1994; Okuizumi y col, 1994; van Duijin y col, 1994; Yoshizawa y col, 1994; Lehtovirta y col, 1995). En lo que se refiere a la asociación entre el alelo $\epsilon 4$ y la EA de aparición tardía todos los autores están de acuerdo y nuestros resultados también coinciden (34%) con los datos existentes en la literatura (Strittmatter y col., 1993; Ueki y col, 1993; Anwar y col, 1993; Poirier y col, 1993; Brousseau y col, 1994; Lehtimaki y col, 1995). Nuestros resultados también apoyan la idea (Corder y col, 1993; Payami y col, 1994; Lehtovirta y col, 1995) de que la presencia del alelo $\epsilon 4$ da lugar a una adelanto en la edad de aparición de la EA de aparición tardía.

Algunos autores han sugerido que el alelo $\epsilon 2$ podría tener un efecto protector contra la EA (Corder y col, 1994; Chartier-Harlin y col, 1994; Talbot y col, 1994; Rubinsztein y col, 1994). Nuestros resultados no están de acuerdo con ello, puesto que no pudimos observar ninguna disminución en la frecuencia de este alelo en los enfermos de EA (Tabla VI).

La asociación de patología neurofibrilar con el alelo $\epsilon 4$ (Hansen y col, 1994) y la observación de que hay una sobrerrepresentación del alelo $\epsilon 4$ (Galasko y col, 1994) en la variante de EA con cuerpos Lewy (Hansen y col., 1990) nos sugirió la posibilidad de incluir en nuestro estudio un grupo de pacientes de enfermedad de Parkinson. La patología de la enfermedad de Parkinson se caracteriza por la aparición de cuerpos de Lewi y entramados neurofibrilares similares a los descritos en la EA (Hakim y Mathieson, 1979). Sin embargo, de acuerdo con otros autores (Marder y col, 1994; Rubinsztein y col, 1994), no pudimos

Klein, 1982). Por tanto, una interpretación posible es que las células B derivadas de los controles probablemente presentan un fenotipo más maduro que la de los pacientes EA.

2.1 Expresión de la APP.

El modelo experimental utilizado, la preparación de linfoblastos de los pacientes, nos ha permitido obviar las dificultades inherentes a la obtención de material de estudio procedente del sistema nervioso, asumiendo que las mismas anomalías estructurales o de procesamiento de la proteína precursora de β -amiloide deben de manifestarse en todas las células que la expresen, a pesar de que las repercusiones funcionales sean distintas en cada tipo celular. De hecho hemos podido comprobar que en los linfoblastos se expresan las dos isoformas de la APP, APP751 y APP770, características de los tejidos periféricos (Kang y col, 1990b; Neve y col, 1988; Tanaka y col, 1989). Los datos existentes en la literatura no permiten definir si variaciones en la expresión de alguna de las isoformas de la APP juega algún papel en el desarrollo de la enfermedad. Algunos autores han sugerido que la proporción APP751/APP695, es mayor en EA (Tanzi y col, 1988b; Tanaka y col, 1988, 1989; Johnson y col, 1989, 1990), sin embargo, estudios posteriores de expresión de las isoformas 695, 751 y 770 en la corteza cerebral de enfermos de EA y controles sanos no mostraron diferencia alguna (Ohyaigi 1992). Por tanto, el hecho de que los linfoblastos no expresen la APP695, no parece que sea óbice para su utilización en el estudio de posibles factores implicados en la EA.

2.2 Crecimiento celular

Una observación interesante es que los linfoblastos EA muestran una velocidad de crecimiento significativamente superior a los linfoblastos control (Fig. 7). El hecho de que este aumento en la velocidad de crecimiento no vaya acompañada de un aumento en la proporción de células que están en la fase de síntesis de DNA, indica que puede existir un aumento de la velocidad a través de todo el ciclo sin que se pueda observar un

efecto específico en alguna de las diferentes etapas. Una observación similar se ha realizado en linfoblastos obtenidos de enfermos de hipertensión esencial. Estos linfoblastos tienen una velocidad de crecimiento superior a la de los controles (Rosskopf y col, 1993; Rosskopf y col, 1995). De la misma forma los linfoblastos de pacientes con diabetes de tipo I con nefropatía muestran una mayor velocidad de crecimiento celular (Ng y col, 1994). Existen diversos estudios que han mostrado que distintos tipos celulares de enfermos de hipertensión esencial muestran un aumento en el transporte de protones (Livne y col, 1987; Ng y col, 1989; Canessa y col, 1991) que parece ser debido a un cambio en las propiedades cinéticas del intercambiador Na^+/H^+ (Canessa y col., 1991). Esta observación junto con el hecho de que el pH intracelular parece ser importante para la proliferación celular (Pouyssegur y col, 1985; Grinstein y col, 1989) sugirió que los linfoblastos de enfermos con hipertensión esencial tienen una mayor velocidad de crecimiento debido a la mayor actividad del intercambiador Na^+/H^+ . Sin embargo, éste no parece ser el caso, ya que experimentos realizados con cultivos de linfoblastos en medios alcalinos ha permitido disociar estos dos fenómenos, llevando a la conclusión de que la mayor proliferación celular no está relacionada con el aumento de la actividad del intercambiador Na^+/H^+ (Rosskopf y col, 1995).

Los linfoblastos EA no muestran diferencias significativas en el pH intracelular con los linfoblastos control. Por tanto, no parece que el aumento de la velocidad de proliferación celular esté directamente relacionado con el pH intracelular. Tampoco parece que exista una correlación con la actividad del intercambiador Na^+/H^+ , ya que la velocidad de transporte de H^+ no está alterada en los linfoblastos EA. Por tanto, parece que existen otros factores implicados. Una posibilidad estriba en la mayor concentración de Ca^{2+} libre citosólico detectado en los linfoblastos de EA. El papel del Ca^{2+} en el ciclo celular es ejercido a través de la proteína quinasa de tipo II, dependiente de calmodulina y se cree que actuaría impidiendo la degradación de ciclinas y favoreciendo la salida de la metafase (Lorca y col, 1994).

2.3 Homeostasis de Ca^{2+} en linfoblastos.

Una de las hipótesis existentes sobre las causas que conducen a la EA es que los procesos que conducen a la disfunción y muerte neuronal convergen en una misma vía con un aumento de la $[Ca^{2+}]$ libre citosólico (Kachaturian, 1993). Esta hipótesis asume que el aumento de la $[Ca^{2+}]$ libre citosólico puede tener lugar crónicamente o de forma aguda pero, en cualquier caso, lleva a la célula a un camino irreversible de necrosis y muerte. La $[Ca^{2+}]$ libre citosólico también ha sido implicada en las acciones neurotóxicas del péptido β -amiloide. Este péptido produce un aumento en la $[Ca^{2+}]$ libre citosólico en distintos tipos celulares (Mattson, y col, 1992; Joseph y col, 1992; Hartman y col, 1993; Eckert y col, 1993). Cuando se incorpora en una bicapa lipídica forma canales selectivos de cationes con capacidad para transportar Ca^{2+} (Arispe y col, 1993; Arispe y col, 1993). Podemos, por tanto, concluir que existe suficiente evidencia para implicar al Ca^{2+} en la etiopatogenia de la EA. De acuerdo con esta hipótesis, los linfoblastos de pacientes de EA estudiados por nosotros muestran un aumento significativo de la $[Ca^{2+}]$ libre citosólico (Tabla XII). Este aumento se observa principalmente en los linfoblastos de células que se mantienen en un estado proliferativo. Cuando las células se mantienen en ausencia de suero fetal bovino en el medio de cultivo, pasan a un estado no proliferativo y la $[Ca^{2+}]$ libre citosólico pasa a ser similar a la de los controles. Estos resultados sugieren que el aumento de $[Ca^{2+}]$ libre citosólico acompaña la respuesta a la activación de la proliferación celular causada por factores presentes en el suero fetal bovino. El hecho de que la activación de los linfoblastos mantenidos en estado no proliferativo mediante la administración de α IgM dé lugar a un aumento de la $[Ca^{2+}]$ libre citosólico mayor en los linfoblastos EA que en los controles (Tabla XIII) apoya esta posibilidad. Por tanto, nuestros resultados están de acuerdo con la hipótesis de que la $[Ca^{2+}]$ libre citosólico está implicada en la etiopatogenia de la EA.

El hecho de que el aumento de $[Ca^{2+}]$ libre citosólico en respuesta al péptido β -amiloide sea también mayor en los

linfoblastos EA que en los controles (Tabla XIII), sugiere que no son los mecanismos implicados en la señalización intracelular de la respuesta a α IgM los que están alterados. La interpretación más simple es que existe una alteración en la cinética de fijación de Ca^{2+} a las estructuras intracelulares. En apoyo de esta hipótesis están las observaciones de que la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{max}}$ calculada sobre la base de la cinética de restauración de los niveles de Ca^{2+} intracelular es mayor y la $[\text{Ca}^{2+}]_{0.5}$ menor en los linfoblastos EA que en los controles (Tablas XIV y XV). Algunos autores (Colvin y col, 1994) han encontrado que en distintas zonas del cerebro EA existe un aumento de la actividad del intercambiador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$. Esta observación sugiere que el aumento de la actividad del intercambiador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ jugaría un papel neuroprotector en EA y podría ser consecuencia del aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ libre citosólico. En nuestro caso (Fig. 14), el mayor aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]$ libre citosólico se observa cuando el intercambiador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ está inhibido por la presencia de benzamil, (Kaczorowski y col, 1989), lo que indica que una posible alteración en la actividad de este intercambiador no está implicada en el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]$ libre citosólico. Diferencias en la expresión de proteínas fijadoras de Ca^{2+} se han descrito en cerebros EA (Heizmann y Braun, 1992; Van Eldik y Griffin, 1994); sin embargo los datos son bastante inconsistentes, probablemente debido a que los protocolos experimentales o los intervalos portmortem fueran distintos. Los experimentos realizados con fibroblastos no mostraron diferencias en la expresión de las proteínas fijadoras de Ca^{2+} (Föhr, y col, 1994). Sin embargo, el hecho de que esta observación se haya realizado con fibroblastos obtenidos de EA de aparición precoz y que nuestros datos estén realizados mayoritariamente con linfoblastos de EA de aparición tardía, no permite descartar esta posibilidad, especialmente sobre la base de publicaciones anteriores en las que no se encontraron alteraciones en la homeostasis de calcio en linfoblastos EA de aparición precoz (Paterson y col, 1986).

2.4 Homeostasis de H^+ en linfoblastos.

La mayor parte de las células de mamíferos poseen mecanismos, aparentemente redundantes, para defender al compartimiento citosólico de cambios agudos de pH. Quizás el mecanismo más importante para controlar el pH intracelular es la actividad del intercambiador Na^+/H^+ (Grinstein y col, 1989). La respuesta celular a muchos activadores parece estar acompañada de una activación de este intercambiador (Little y col, 1988; Moolenaar y col, 1984; Hatori, N. y col, 1987; Urcelay y col, 1994), incluso en ausencia de alcalinización intracelular (Ganz y col, 1989) lo que sugiere que el papel de la activación del intercambiador Na^+/H^+ es proteger a la célula de una acidificación aguda.

El mecanismo común a la mayor parte de los agonistas que inducen la activación del intercambiador Na^+/H^+ es que estimulan fosfolipasa C, dando lugar a un aumento en la $[Ca^{2+}]$ libre citosólico y activación de proteína quinasa C. La activación de proteína quinasa C parece estar implicada en la activación del intercambiador (Moolenaar, 1986; Grinstein y col, 1989; Urcelay y col, 1993), pero el aumento de $[Ca^{2+}]$ libre citosólico también puede activar el intercambiador mediante la activación de proteína quinasas dependientes de Ca^{2+} -calmodulina (Wakabayashi y col, 1994) o bien a través de un mecanismo que implica la activación de la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática que intercambiaría H^+ extracelular por Ca^{2+} intracelular. De esta forma se neutralizaría el aumento transitorio de $[Ca^{2+}]$ libre citosólico, cuya consecuencia sería un aumento en la carga ácida de las células, que induciría la activación del intercambiador Na^+/H^+ . En base a los datos anteriormente expuestos, el hecho de que los linfoblastos EA respondan a la activación por α IgM con una acidificación del medio intracelular, en lugar de la pequeña alcalinización observada en los linfoblastos control (Fig. 18), puede ser interpretada como que fallan los mecanismos de activación del intercambiador. Una posibilidad sería que no sean capaces de responder a una sobrecarga de ácido. Sin embargo, los resultados obtenidos por dos procedimientos

distintos, indican que la velocidad de respuesta del pH a una carga ácida es significativamente mayor en los linfoblastos EA que en los controles (Figs. 21 y 22). Por tanto, la diferencia de la respuesta de los dos tipos de linfoblastos a la activación por α IgM, no puede ser interpretada sobre la base de diferencias cinéticas en la actividad del intercambiador. Parece más probable que la alteración resida en los mecanismos implicados en la señalización intracelular implicada en la respuesta a α IgM. La respuesta de la $[Ca^{2+}]$ libre citosólico a este agonista es sensible a W-7, lo que implica a los mecanismos mediados por la activación de calmodulina. Es interesante señalar que, al igual que ocurre con la $[Ca^{2+}]$ libre citosólico, los linfoblastos EA tienen menor capacidad de tamponar los cambios agudos de pH que los linfoblastos control (Tabla XVIII) y que la calmodulina es una proteína con capacidad para fijar ambos Ca^{2+} y H^+ . Incluso algunos autores consideran que la calmodulina debería de ser considerada como una proteína fijadora de Ca^{2+} y de H^+ , y que puede servir de sensor de los cambios en ambos iones (Busa y Nuccitelli, 1984). Por tanto una alteración estructural o funcional de esta proteína podría explicar los resultados obtenidos hasta ahora. Los esfuerzos realizados en este sentido no nos han permitido detectar alteraciones estructurales en uno de los genes de la calmodulina, CALM3. Sin embargo, no podemos descartar que otras alteraciones, como una menor expresión del ARN mensajero o una alteración de los mecanismos de activación de la calmodulina pudieran estar alterados.

2.5 Significado funcional de las alteraciones en la homeostasis de Ca^{2+} y H^+ .

Una de las características de la EA es la muerte neuronal (Terry y col, 1981; Coleman y Flood, 1987; Mountjoy y Evans, 1983). Existen dos mecanismos básicos de muerte celular, necrosis y apoptosis. La necrosis se considera un mecanismo de degeneración celular pasiva como consecuencia de la pérdida de la función celular, mientras que en la apoptosis se supone que la célula participa activamente mediante un proceso de suicidio celular dirigido por genes específicos (Kerr y col, 1972). Hay

evidencia convincente de que el Ca^{2+} puede tener un papel importante en la muerte celular, tanto en el sistema nervioso central como en otros tejidos. El papel del Ca^{2+} sería importante tanto en el caso de necrosis como de apoptosis, siendo especialmente crítico en el sistema nervioso central y en el sistema inmune (Orrenius y Nicotera, 1994).

Durante el proceso de apoptosis se produce un aumento en $[\text{Ca}^{2+}]$ libre citosólico (McConkey y col, 1988) y una disminución del pH intracelular (Barry y Eastman, 1992), y estos dos acontecimientos se consideran importantes para el comienzo del proceso. Los resultados obtenidos con las líneas celulares lintoblásticas muestran que en respuesta a estimulación celular los linfoblastos EA tienen una respuesta mayor de $[\text{Ca}^{2+}]$ libre citosólico que los linfoblastos control (Fig. 12). Así mismo, en los linfoblastos EA se produce una acidificación celular en respuesta a activación celular mientras que los linfoblastos control muestran una ligera alcalinización (Fig. 18). Estos datos sugieren que las características ionotrópicas de los linfoblastos EA son más próximas a las de una célula apoptótica que las de los linfoblastos control. Obviamente, no se pueden extrapolar los datos obtenidos con los linfoblastos a lo que ocurre en las neuronas, pero esta observación apoya la posibilidad de que exista una muerte neuronal por apoptosis en la EA. También apoya esta posibilidad el hecho de que el péptido $\beta\text{A4}(25-35)$ de lugar a un aumento del $[\text{Ca}^{2+}]$ libre citosólico mayor en linfoblastos EA que en controles, esto es, la enfermedad EA va acompañada de una amplificación de la respuesta celular al péptido. La posible acción neurotóxica del péptido β -amiloide ha sido sugerido por varios autores (Yankner y col, 1990; Kowall y col, 1991; Pike y col, 1991; Emre y col, 1992; Pike y col, 1993). El estudio de ratones transgénicos que expresan este péptido en las neuronas ha mostrado que produce una degeneración neuronal extensa (LaFerla y col, 1995). Por tanto, el hecho de que su acción esté amplificada en EA sugiere que otros factores además de la presencia del péptido están implicados en la enfermedad, y que este péptido tendría una acción neurotóxica más importante en EA que en controles. El reciente descubrimiento de alteraciones genéticas en genes distintos del de la APP, asociadas a la enfermedad de Alzheimer, que codifican

proteínas de membrana con posible actividad de transporte de iones (Sherrington y col, 1995), abre nuevas perspectivas al estudio de las bases estructurales para entender la diferente respuesta ionotrópica de los dos tipos celulares.

Conclusiones

CONCLUSIONES

- 1- El análisis estructural de regiones relevantes del gen que codifica la proteína precursora del péptido β -amiloide de más de 100 casos de enfermos de Alzheimer y de un número significativo de controles normales no ha desvelado la existencia de anomalías. Estas observaciones confirman la escasa frecuencia de alteraciones en este gen asociadas a la demencia de Alzheimer.
- 2- La frecuencia del alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E en la población del área de Madrid varía de un 6% en la población normal a un 50% en los casos familiares de la enfermedad de Alzheimer de aparición tardía.
- 3- La presencia del alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E es mucho menor en la población madrileña que en poblaciones de países en los que la prevalencia de la enfermedad de Alzheimer es la misma. Esta observación parece indicar que factores ajenos a esta proteína, genéticos o ambientales, deben de estar involucrados en la etiopatogenia de la demencia de Alzheimer.
4. No hemos hallado relación entre frecuencia del alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E y la enfermedad de Parkinson en pacientes sin signos detectables de demencia de Alzheimer.
- 5- Hemos establecido un banco de líneas celulares inmortales de enfermos de Alzheimer mediante transformación linfoblástica de linfocitos B con virus de Epstein Barr. Estas líneas celulares, además de ser una fuente inagotable de DNA, permiten la ejecución de experimentos que de otra forma sería imposible llevar a cabo por las dificultades de obtención de material, sobre todo de forma repetida.

- 6- Los linfoblastos de enfermos de Alzheimer presentan las siguientes singularidades:
 - A) Su velocidad de crecimiento es mayor que la de los linfoblastos control.
 - B) Expresan las isoformas 770 y 751 del precursor de proteína amiloide.
 - C) Tienen unos niveles basales de Ca^{2+} libre citosólico significativamente más altos que los controles.

- 7- La activación de linfoblastos de enfermos de Alzheimer inducida por αIgM produce un aumento de la concentración de Ca^{2+} libre citosólico significativamente mayor que en linfoblastos control.

- 8- El tratamiento con el péptido $\beta\text{A25-35}$ también produce un mayor aumento en la concentración de Ca^{2+} libre citosólico en linfoblastos de enfermos de Alzheimer que en controles, lo cual indica que la respuesta a αIgM no es debida a un efecto específico mediado por su receptor.

- 9- La cinética de repleción de los niveles de Ca^{2+} libre citosólico en células previamente deprivadas de Ca^{2+} muestra que en linfoblastos de enfermos de Alzheimer se alcanzan valores de calcio libre citosólico máximos a concentraciones menores de Ca^{2+} extracelular que en linfoblastos de controles de edades similares.

Los linfoblastos de enfermos de Alzheimer también mostraron una menor capacidad para tamponar cambios agudos de Ca^{2+} libre citosólico, dado que los niveles máximos de concentración de Ca^{2+} fueron mayores que en los controles.

- 10- El estudio de linfoblastos de individuos sanos de edades media y avanzada ha puesto de manifiesto que el envejecimiento se acompaña de cambios en la cinética de repleción de Ca^{2+} similares a los observados en linfoblastos de pacientes de Alzheimer, aunque sin afectar los niveles máximos Ca^{2+} libre citosólico.

- 11- La activación de linfoblastos de enfermos de Alzheimer inducida por α IgM da lugar a una acidificación intracelular en lugar de la alcalinización observada en linfoblastos control. Los linfoblastos de pacientes de Alzheimer mostraron la misma eficiencia que los controles para eliminar una sobrecarga intracelular de H^+ . Esta observación indica que la diferencia en la respuesta a α IgM no puede ser causada por una alteración en la capacidad del intercambiador Na^+/H^+ sino a una alteración en las vía(s) de señalización intracelular responsable de la activación del intercambiador Na^+/H^+ .
- 12- Los linfoblastos de enfermos de Alzheimer muestran una menor capacidad para tamponar cambios agudos de pH intracelular, lo que sugiere la existencia de alteraciones cualitativas o cuantitativas en la expresión de proteínas fijadoras de H^+ .
- 13- El análisis estructural del gen de la calmodulina que mapea en la misma zona del cromosoma 19 que la enfermedad de Alzheimer (CALM3), no ha mostrado cambios que pudieran alterar sus propiedades de proteína fijadora de Ca^{2+} y de H^+ .
- 14- En resumen, la inmortalización de linfocitos humanos es un modelo adecuado para el estudio de perturbaciones funcionales de índole variada. Hemos puesto de manifiesto que en la demencia de Alzheimer existen cambios significativos en la homeostasis de Ca^{2+} y de H^+ que podrían estar implicados en la etiopatogenia de este proceso. Cambios de esta naturaleza en el "medio interno" celular pueden ser capaces de alterar tasas de expresión, procesamiento, solubilidad, y/o función de múltiples proteínas.

Bibliografía

BIBLIOGRAFIA

- Adler, M.J.; Coronel, C.; Shelton, E.; Seegmiller, J.E. y Dewji, N.N. (1991). "Increased gene expression of Alzheimer disease beta-amyloid precursor protein in senescent cultured fibroblasts ". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88; 16-20
- Aggerbeck, L.P.; Wetterau, J.R.; Weisgraber, K.H.; Wu, C.S. y Lindgren, F.T. (1988). "Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. II. Properties of the amino- and carboxyl-terminal domains ". *J Biol Chem.* 263; 6249-58
- Allsop, D.; Haga, S.I.; Haga, C.; Ikeda, S.I.; Mann, D.M. y Ishii, T. (1989). "Early senile plaques in Down's syndrome brains show a close relationship with cell bodies of neurons ". *Neuropathol Appl Neurobiol.* 15; 531-42
- Aman, P.; Ehlin, H.B. y Klein, G. (1984). "Epstein-Barr virus susceptibility of normal human B lymphocyte populations ". *J Exp Med.* 159; 208-20
- Anderson, J.P.; Esch, F.S.; Keim, P.S.; Sambamurti, K.; Lieberburg, I. y Robakis, N.K. (1991). "Exact cleavage site of Alzheimer amyloid precursor in neuronal PC-12 cells ". *Neurosci Lett.* 128; 126-8
- Anderson, J.P.; Chen, Y.; Kim, K.S. y Robakis, N.K. (1992). "An alternative secretase cleavage produces soluble Alzheimer amyloid precursor protein containing a potentially amyloidogenic sequence ". *J Neurochem.* 59; 2328-31
- Anwar, N.; Lovestone, S.; Cheetham, M.E.; Levy, R. y Powell, J.F. (1993). "Apolipoprotein E-epsilon 4 allele and Alzheimer's disease [letter] ". *Lancet.* 342; 1308-9
- Arispe, N.; Pollard, H.B. y Rojas, E. (1993a). "Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid beta-protein [A beta P-(1-40)] in bilayer membranes ". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90; 10573-7
- Arispe, N. y Rojas, E.a.P.H. (1993b). "Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum ". *Proc Natl Acad Sci U S A.*
- Baas, P.W.; Pienkowski, T.P. y Kosik, K.S. (1991). "Processes induced by tau expression in Sf9 cells have an axon-like microtubule organization ". *J Cell Biol.* 115; 1333-44
- Bachman, D.L.; Wolf, P.A.; Linn, R.; Knoefel, J.E.; Cobb, J.; Belanger, A.; D'Agostino, R.B. y White, L.R. (1992). "Prevalence of dementia and probable senile dementia of the Alzheimer type in the Framingham Study ". *Neurology.* 42; 115-9
- Barker, P.E.; Rabin, M.; Watson, M.; Breg, W.R.; Ruddle, F.H. y Verma, I.M. (1984). "Human c-fos oncogene mapped within chromosomal region 14q21----q31 ". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81; 5826-30
- Baudier, J. y Cole, R.D. (1987). "Phosphorylation of tau proteins to a state like that in Alzheimer's brain is catalyzed by a calcium/calmodulin-dependent kinase and modulated by phospholipids ". *J Biol Chem.* 262; 17577-83
- Baudier, J.; Lee, S.H. y Cole, R.D. (1987). "Separation of the different microtubule-associated tau protein species from bovine brain and their mode II phosphorylation by Ca²⁺/phospholipid-dependent protein kinase C ". *J Biol Chem.* 262; 17584-90

- Berchtold, M.W.; Egli, R.; Rhyner, J.A.; Hameister, H. y Strehler, E.E. (1993). "Localization of the human bona fide calmodulin genes CALM1, CALM2, and CALM3 to chromosomes 14q24-q31, 2p21.1-p21.3, and 19q13.2-q13.3 ". *Genomics*. 16; 461-5
- Bertrand, B.; Wakabayashi, S.; Ikeda, T.; Pouyssegur, J. y Shigekawa, M. (1994). "The Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 (NHE1) is a novel member of the calmodulin-binding proteins. Identification and characterization of calmodulin-binding sites ". *J Biol Chem*. 269; 13703-9
- Bird, T.D.; Boehnke, M.; Anderson, J.; Lampe, T.H.; Schellenberg, G. y Larson, E.B. (1987). "The frequency of C4B variants of complement in familial and sporadic Alzheimer disease ". *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 1; 251-5
- Bird, T.D.; Sumi, S.M.; Nemens, E.J.; Nochlin, D.; Schellenberg, G.; Lampe, T.H.; Sadovnick, A.; Chui, H.; Miner, G.W. y Tinklenberg, J. (1989). "Phenotypic heterogeneity in familial Alzheimer's disease: a study of 24 kindreds ". *Ann Neurol*. 25; 12-25
- Birnboim, H.C. y Doly, J. (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA". *Nucl. Acids Res*. 7:1513-1523.
- Boyles, J.K.; Pitas, R.E.; Wilson, E.; Mahley, R.W. y Taylor, J.M. (1985). "Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system ". *J Clin Invest*. 76; 1501-13
- Boyles, J.K.; Zoellner, C.D.; Anderson, L.J.; Kosik, L.M.; Pitas, R.E.; Weisgraber, K.H.; Hui, D.Y.; Mahley, R.W.; Gebicke, H.P.; Ignatius, M.J. y et, a.l. (1989). "A role for apolipoprotein E, apolipoprotein A-I, and low density lipoprotein receptors in cholesterol transport during regeneration and remyelination of the rat sciatic nerve ". *J Clin Invest*. 83; 1015-31
- Bourget, I.; Breittmayer, J.P.; Grenier, B.N. y Cousin, J.L. (1993). "CD20 monoclonal antibodies down-regulate IgM at the surface of B cells ". *Eur J Immunol*. 23; 768-71
- Bradford, M.M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal Biochem*. 72; 248-254
- Bramblett, G.T.; Goedert, M.; Jakes, R.; Merrick, S.E.; Trojanowski, J.Q. y Lee, V.M. (1993). "Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding ". *Neuron*. 10; 1089-99
- Brion, J.P.; Hanger, D.P.; Bruce, M.T.; Couck, A.M.; Flament, D.J. y Anderton, B.H. (1991a). "Tau in Alzheimer neurofibrillary tangles. N- and C-terminal regions are differentially associated with paired helical filaments and the location of a putative abnormal phosphorylation site ". *Biochem J*.
- Brion, J.P.; Hanger, D.P.; Bruce, M.T.; Couck, A.M.; Flament, D.J. y Anderton, B.H. (1991b). "Tau in Alzheimer neurofibrillary tangles. N- and C-terminal regions are differentially associated with paired helical filaments and the location of a putative abnormal phosphorylation site ". *Biochem J*.
- Brion, J.P. (1992). "The pathology of the neuronal cytoskeleton in Alzheimer's disease ". *Biochim Biophys Acta*. 1160; 134-42
- Brousseau, T.; Legrain, S.; Berr, C.; Gourlet, V.; Vidal, O. y Amouyel, P. (1994). "Confirmation of the epsilon 4 allele of the apolipoprotein E gene as a risk factor for late-onset Alzheimer's disease ". *Neurology*. 44; 342-4
- Busa, W.B. y Nuccitelli, R. (1984). "Metabolic regulation via intracellular pH ". *Am J Physiol*. 246, R409-R438

- Burdick, D.; Soreghan, B.; Kwon, M.; Kosmoski, J.; Knauer, M.; Henschen, A.; Yates, J.; Cotman, C. y Glabe, C. (1992). "Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs ". *J Biol Chem.* 267; 546-54
- Buxbaum, J.D.; Gandy, S.E.; Cicchetti, P.; Ehrlich, M.E.; Czernik, A.J.; Fracasso, R.P.; Ramabhadran, T.V.; Unterbeck, A.J. y Greengard, P. (1990). "Processing of Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein: modulation by agents that regulate protein phosphorylation ". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87; 6003-6
- Cai, X.D.; Golde, T.E. y Younkin, S.G. (1993). "Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor [see comments] ". *Science.* 259; 514-6
- Cambier, J.C.; Newell, M.K.; Justement, L.B.; McGuire, J.C.; Leach, K.L. y Chen, Z.Z. (1987). "Ia binding ligands and cAMP stimulate nuclear translocation of PKC in B lymphocytes ". *Nature.* 327; 629-32
- Canessa, M.; Morgan, K.; Goldszer, R.; Moore, T.J. y Spalvins, A. (1991). "Kinetic abnormalities of the red blood cell sodium-proton exchange in hypertensive patients ". *Hypertension.* 17; 340-8
- Carafoli, E. (1992). "The Ca²⁺ pump of the plasma membrane ". *J Biol Chem.* 267; 2115-8
- Chartier, H.M.; Crawford, F.; Houlden, H.; Warren, A.; Hughes, D.; Fidani, L.; Goate, A.; Rossor, M.; Roques, P. y Hardy, J.a.e.a. (1991). "Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene ". *Nature.*
- Citron, M.; Oltersdorf, T.; Haass, C.; McConlogue, L.; Hung, A.Y.; Seubert, P.; Vigo, P.C.; Lieberburg, I. y Selkoe, D.J. (1992). "Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production ". *Nature.* 360; 672-4
- Coleman, P.D. y Flood, D.G. (1987). "Neuron numbers and dendritic extent in normal aging and Alzheimer's disease ". *Neurobiol Aging.* 8; 521-45
- Colvin, R.A., Davis, N., Wu, A., Murphy, C.A. y Levengod, J. (1994) *Brain Res.* 665, 192-200
- Corder, E.H.; Saunders, A.M.; Strittmatter, W.J.; Schmechel, D.E.; Gaskell, P.C.; Small, G.W.; Roses, A.D.; Haines, J.L. y Pericak, V.M. (1993). "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families [see comments] ". *Science.* 261; 921-3
- Corder, E.H.; Saunders, A.M.; Risch, N.J.; Strittmatter, W.J.; Schmechel, D.E.; Gaskell, P.J.; Rimmler, J.B.; Locke, P.A.; Conneally, P.M.; Schmechel, K.E. y et, a.l. (1994). "Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease ". *Nat Genet.* 7; 180-4
- Crowther, R.A.; Olesen, O.F.; Jakes, R. y Goedert, M. (1992). "The microtubule binding repeats of tau protein assemble into filaments like those found in Alzheimer's disease ". *Febs Lett.* 309; 199-202
- Cruts, M.; Backhovens, H.; Martin, J.J. y Van Broeckhoven, C. (1994). "Genetic analysis of the cellular oncogene fos in patients with chromosome 14 encoded Alzheimer's disease ". *Neurosci Lett.* 174; 97-100
- Davignon, J.; Gregg, R.E. y Sing, C.F. (1988). "Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis ". *Arteriosclerosis.* 8; 1-21
- Doering, L.C. (1993). "Probing modifications of the neuronal cytoskeleton ". *Mol Neurobiol.* 7; 265-91
- Eckert, A.; Hartmann, H. y Muller, W.E. (1993). "beta-Amyloid protein enhances the mitogen-induced calcium response in circulating human lymphocytes ". *Febs Lett.* 330; 49-52

- Elshourbagy, N.A.; Liao, W.S.; Mahley, R.W. y Taylor, J.M. (1985). "Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets ". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82; 203-7
- Emi, M.; Wu, L.L.; Robertson, M.A.; Myers, R.L.; Hegele, R.A.; Williams, R.R.; White, R. y Lalouel, J.M. (1988). "Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoforms ". *Genomics.* 3; 373-9
- Emre, M.; Geula, C.; Ransil, B.J. y Mesulam, M.M. (1992). "The acute neurotoxicity and effects upon cholinergic axons of intracerebrally injected beta-amyloid in the rat brain ". *Neurobiol Aging.* 13; 553-9
- Esch, F.S.; Keim, P.S.; Beattie, E.C.; Blacher, R.W.; Culwell, A.R.; Oltersdorf, T.; McClure, D. y Ward, P.J. (1990). "Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor ". *Science.* 248; 1122-4
- Estus, S.; Golde, T.E. y Younkin, S.G. (1992a). "Normal processing of the Alzheimer's disease amyloid beta protein precursor generates potentially amyloidogenic carboxyl-terminal derivatives ". *Ann N Y Acad Sci.* 674; 138-48
- Estus, S.; Golde, T.E.; Kunishita, T.; Blades, D.; Lowery, D.; Eisen, M.; Usiak, M.; Qu, X.M.; Tabira, T.; Greenberg, B.D. y et, a.l. (1992). "Potentially amyloidogenic, carboxyl-terminal derivatives of the amyloid protein precursor [see comments] ". *Science.* 255; 726-8
- Fohr, U.G.; Gibson, G.E.; Tofel, G.B.; Schafer, B.W. y Heizmann, C.W. (1994). "Expression of intracellular calcium-binding proteins in cultured skin fibroblasts from Alzheimer and normal aged donors ". *Biochim Biophys Acta.* 1223; 391-7
- Fitch, N.; Becker, R. y Heller, A. (1988). "The inheritance of Alzheimer's disease: a new interpretation ". *Ann Neurol.* 23; 14-9
- Galasko, D.; Saitoh, T.; Xia, Y.; Thal, L.J.; Katzman, R.; Hill, L.R. y Hansen, L. (1994). "The apolipoprotein E allele epsilon 4 is overrepresented in patients with the Lewy body variant of Alzheimer's disease ". *Neurology.* 44; 1950-1
- Gandy, S.; Czernik, A.J. y Greengard, P. (1988). "Phosphorylation of Alzheimer disease amyloid precursor peptide by protein kinase C and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II ". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85; 6218-21
- Ganz, M.B.; Boyarsky, G.; Sterzel, R.B. y Boron, W.F. (1989). "Arginine vasopressin enhances pHi regulation in the presence of HCO₃⁻ by stimulating three acid-base transport systems ". *Nature.* 337; 648-51
- Garcia, M.L.; King, V.F.; Shevell, J.L.; Slaughter, R.S.; Suarez, K.G.; Winkquist, R.J. y Kaczorowski, G.J. (1990). "Amiloride analogs inhibit L-type calcium channels and display calcium entry blocker activity ". *J Biol Chem.* 265; 3763-71
- Gardella, J.E.; Gorgone, G.A.; Munoz, P.C.; Ghiso, J.; Frangione, B. y Gorevic, P.D. (1992). "Beta protein precursor expression in human platelets and a megakaryocyte cell line. Possible implications for the origin of cerebral amyloidosis in Alzheimer's disease ". *Lab Invest.* 67; 303-13
- Gelfand, E.W.; Cheung, R.K. y Grinstein, S. (1986). "Mitogen-induced changes in Ca²⁺ permeability are not mediated by voltage-gated K⁺ channels ". *J Biol Chem.* 261; 11520-3
- Glenner, G.G. y Wong, C.W. (1984). "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein ". *Biochem Biophys Res Commun.* 120; 885-90

Goate, A.; Chartier, H.M.; Mullan, M.; Brown, J.; Crawford, F.; Fidani, L.; Giuffra, L.; Haynes, A.; Irving, N.; James, L. y col. (1991). "Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease [see comments] ". *Nature*. 349; 704-6

Gobel, B.O.; Hoffmann, G.; Ruppert, M.; Stumpe, K.O.; Vetter, H.; Siffert, W. y Dusing, R. (1994). "The lymphocyte Na⁺/H⁺ antiport: activation in primary hypertension and during chronic NaCl-loading [see comments] ". *Eur J Clin Invest*. 24; 529-39

Goedert, M.; Wischik, C.M.; Crowther, R.A.; Walker, J.E. y Klug, A. (1988). "Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau ". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85; 4051-5

Goedert, M.; Spillantini, M.G.; Jakes, R.; Rutherford, D. y Crowther, R.A. (1989a). "Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease ". *Neuron*. 3; 519-26

Goedert, M. y Jakes, R. (1990). "Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization ". *Embo J*.

Goedert, M.; Spillantini, M.G. y Crowther, R.A. (1992a). "Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system ". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89; 1983-7

Goedert, M.; Spillantini, M.G.; Cairns, N.J. y Crowther, R.A. (1992b). "Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms ". *Neuron*. 8; 159-68

Goedert, M. (1993). "Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease ". *Trends Neurosci*. 16; 460-5

Golde, T.E.; Estus, S.; Younkin, L.H.; Selkoe, D.J. y Younkin, S.G. (1992). "Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives [see comments] ". *Science*. 255; 728-30

Goldgaber, D.; Lerman, M.I.; McBride, O.W.; Saffiotti, U. y Gajdusek, D.C. (1987a). "Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease ". *Science*. 235; 877-80

Grynkiewicz, G.; Poenie, M. y Tsien, R.Y. (1985). "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties ". *J Biol Chem*. 260; 3440-50

Grinstein, S.; Rotin, D. y Mason, M.J. (1989). "Na⁺/H⁺ exchange and growth factor-induced cytosolic pH changes. Role in cellular proliferation ". *Biochim Biophys Acta*. 988; 73-97

Haass, C.; Schlossmacher, M.G.; Hung, A.Y.; Vigo, P.C.; Mellon, A.; Ostaszewski, B.L.; Lieberburg, I.; Koo, E.H.; Schenk, D.; Teplow, D.B. y et, a.l. (1992a). "Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism [see comments] ". *Nature*. 359; 322-5

Haass, C.; Hung, A.Y.; Selkoe, D.J. y Teplow, D.B. (1994). "Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid beta-protein precursor ". *J Biol Chem*. 269; 17741-8

Handelmann, G.E.; Boyles, J.K.; Weisgraber, K.H.; Mahley, R.W. y Pitas, R.E. (1992). "Effects of apolipoprotein E, beta-very low density lipoproteins, and cholesterol on the extension of neurites by rabbit dorsal root ganglion neurons in vitro ". *J Lipid Res*. 33; 1677-88

- Hansen, L.; Salmon, D.; Galasko, D.; Masliah, E.; Katzman, R.; DeTeresa, R.; Thal, L.; Pay, M.M.; Hofstetter, R.; Klauber, M. y et, a.l. (1990). "The Lewy body variant of Alzheimer's disease: a clinical and pathologic entity [see comments] ". *Neurology*. 40; 1-8
- Hansen, P.S.; Gerdes, L.U.; Klausen, I.C.; Gregersen, N. y Faergeman, O. (1994). "Genotyping compared with protein phenotyping of the common apolipoprotein E polymorphism ". *Clin Chim Acta*. 224; 131-7
- Hardy, J.; Chartier, H.M. y Mullan, M. (1992). "Alzheimer disease: the new agenda [letter] ". *Am J Hum Genet*. 50; 648-51
- Hartmann, H.; Eckert, A. y Muller, W.E. (1993). "beta-Amyloid protein amplifies calcium signalling in central neurons from the adult mouse ". *Biochem Biophys Res Commun*. 194; 1216-20
- Hatori, N.; Fine, B.P.; Nakamura, A.; Cragoe, E.J. y Aviv, A. (1987). "Angiotensin II effect on cytosolic pH in cultured rat vascular smooth muscle cells ". *J Biol Chem*. 262; 5073-8
- Heizmann, C.W. y Braun, K. (1992). "Changes in Ca(2+)-binding proteins in human neurodegenerative disorders ". *Trends Neurosci*. 15; 259-64
- Hendriks, L.; van, D.C.; Cras, P.; Cruts, M.; Van, H.W.; van, H.F.; Warren, A.; McInnis, M.G.; Antonarakis, S.E.; Martin, J.J. y et, a.l. (1992). "Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the beta-amyloid precursor protein gene ". *Nat Genet*. 1; 218-21
- Hesketh, T.R.; Moore, J.P.; Morris, J.D.; Taylor, M.V.; Rogers, J.; Smith, G.A. y Metcalfe, J.C. (1985). "A common sequence of calcium and pH signals in the mitogenic stimulation of eukaryotic cells ". *Nature*. 313; 481-4
- Heston, L.L.; Orr, H.T.; Rich, S.S. y White, J.A. (1991). "Linkage of an Alzheimer disease susceptibility locus to markers on human chromosome 21 ". *Am J Med Genet*. 40; 449-53
- Hidaka, H.; Inagaki, M.; Kawamoto, S. y Sasaki, Y. (1984). "Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C ". *Biochemistry*. 23; 5036-41
- Hixson, J.E. y Vernier, D.T. (1990). "Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI ". *J Lipid Res*. 31; 545-8
- Hofman, A.; Schulte, W.; Tanja, T.A.; van, D.C.; Haaxma, R.; Lameris, A.J.; Otten, V.M. y Saan, R.J. (1989). "History of dementia and Parkinson's disease in 1st-degree relatives of patients with Alzheimer's disease ". *Neurology*. 39; 1589-92
- Hongyo, T., Buzard, G.S., Calvert, R.J., y Weghorst, M. (1993). "Cold SSCP": a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism". *Nucl. Acids Res*. 21; 3637-3642.
- Houlden, H.; Crawford, F.; Rossor, M. y Mullan, M. (1993). "Screening for the APP codon 670/671 mutations in Alzheimer's disease ". *Neurosci Lett*. 154; 161-2
- Jarrett, J.T. y Lansbury, P.J. (1993). "Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? ". *Cell*. 73; 1055-8
- Johnson, S.A. y Rogers, J.a.F.C. (1989). "APP-695 transcript prevalence is selectively reduced during Alzheimer's disease in cortex and hippocampus but not in cerebellum [corrected and republished article originally printed in *Neurobiol Aging* " 10(3):267-72

- Johnson, S.A.; McNeill, T.; Cordell, B. y Finch, C.E. (1990). "Relation of neuronal APP-751/APP-695 mRNA ratio and neuritic plaque density in Alzheimer's disease ". *Science*. 248; 854-7
- Joseph, R. y Han, E. (1992). "Amyloid beta-protein fragment 25-35 causes activation of cytoplasmic calcium in neurons ". *Biochem Biophys Res Commun*. 184; 1441-7
- Kaczorowski, G.J.; Slaughter, R.S.; King, V.F. y Garcia, M.L. (1989). "Inhibitors of sodium-calcium exchange: identification and development of probes of transport activity ". *Biochim Biophys Acta*. 988; 287-302
- Kamboh, M.I. (1995). "Apolipoprotein E polymorphism and susceptibility to Alzheimer's disease ". *Hum Biol*. 67; 195-215
- Kanai, Y.; Chen, J. y Hirokawa, N. (1992). "Microtubule bundling by tau proteins in vivo: analysis of functional domains ". *Embo J*. 11; 3953-61
- Kang, J.; Lemaire, H.G.; Unterbeck, A.; Salbaum, J.M.; Masters, C.L.; Grzeschik, K.H.; Multhaup, G.; Beyreuther, K. y Muller, H.B. (1987). "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor ". *Nature*. 325; 733-6
- Kang, J. y Muller, H.B. (1990). "Differential splicing of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor RNA in rat tissues: PreA4(695) mRNA is predominantly produced in rat and human brain ". *Biochem Biophys Res Commun*. 166; 1192-200
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. y Currie, A.R. (1972) "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics". *Br. J. Cancer* 26, 239-257
- Koh, J.Y.; Yang, L.L. y Cotman, C.W. (1990). "Beta-amyloid protein increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage ". *Brain Res*. 533; 315-20
- Kondo, J.; Honda, T.; Mori, H.; Hamada, Y.; Miura, R.; Ogawara, M. y Ihara, Y. (1988). "The carboxyl third of tau is tightly bound to paired helical filaments ". *Neuron*. 1; 827-34
- Koo, E.H.; Sisodia, S.S.; Archer, D.R.; Martin, L.J.; Weidemann, A.; Beyreuther, K.; Fischer, P.; Masters, C.L. y Price, D.L. (1990). "Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport ". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87; 1561-5
- Kopke, E.; Tung, Y.C.; Shaikh, S.; Alonso, A.C.; Iqbal, K. y Grundke, I.I. (1993). "Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease ". *J Biol Chem*. 268; 24374-84
- Kosik, K.S.; Joachim, C.L. y Selkoe, D.J. (1986). "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; 4044-8
- Kowall, N.W.; Beal, M.F.; Busciglio, J.; Duffy, L.K. y Yankner, B.A. (1991). "An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P ". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88; 7247-51
- Krawczak, M.; Reiss, J. y Cooper, D.N. (1992). "The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences". *Hum. Genet*. 90; 41-54
- Krishnan, A.(1975) "Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining". *J. Cell Biol*. 66; 188-193
- Ksiezak, R.H.; Liu, W.K. y Yen, S.H. (1992). "Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments ". *Brain Res*. 597; 209-19

- LaFerla, F.M.; Tinkle, B.T.; Bieberich, C.J.; Haudenschild, C.C. y Jay, G. (1995). "The Alzheimer's A beta peptide induces neurodegeneration and apoptotic cell death in transgenic mice ". *Nat Genet.* 9; 21-30
- Lannfelt, L.; Viitanen, M.; Johansson, K.; Axelman, K.; Lilius, L.; Almqvist, E. y Winblad, B. (1993). "Low frequency of the APP 670/671 mutation in familial Alzheimer's disease in Sweden ". *Neurosci Lett.* 153; 85-7
- Lehtimäki, T.; Pirttilä, T.; Mehta, P.D.; Wisniewski, H.M.; Frey, H. y Ninkari, T. (1995). "Apolipoprotein E (apoE) polymorphism and its influence on ApoE concentrations in the cerebrospinal fluid in Finnish patients with Alzheimer's disease ". *Hum Genet.* 95; 39-42
- Lehtovirta, M.; Helisalmi, S.; Mannermaa, A.; Soininen, H.; Koivisto, K.; Ryyänen, M. y Riekkinen, P.S. (1995). "Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease in eastern Finland ". *Neurosci Lett.* 185; 13-5
- Lee, V.M.; Balin, B.J.; Otvos, L.J. y Trojanowski, J.Q. (1991). "A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau ". *Science.* 251; 675-8
- Lee, G. y Sl. (1992). "Expression of tau protein in non-neuronal cells: microtubule binding and stabilization ". *J Cell Sci.*
- Lesburg, C.; Li, S.; Cragoe, E.J. y Deth, R.C. (1990). "Influence of amiloride derivatives on alpha-1 adrenergic receptor-induced contractions of the rabbit aorta ". *J Pharmacol Exp Ther.* 253; 530-6
- Levy, E.; Carman, M.D.; Fernandez, M.I.; Power, M.D.; Lieberburg, I.; van, D.S.; Bots, G.T.; Luyendijk, W. y Frangione, B. (1990). "Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type ". *Science.* 248; 1124-6
- Lindwall, G. y Cole, R.D. (1984). "Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly ". *J Biol Chem.* 259; 5301-5
- Little, P.J.; Weissberg, P.L.; Cragoe, E.J. y Bobik, A. (1988). "Dependence of Na⁺/H⁺ antiport activation in cultured rat aortic smooth muscle on calmodulin, calcium, and ATP. Evidence for the involvement of calmodulin-dependent kinases". *J Biol Chem.* 263; 16780-16786
- Liu, W.K.; Dickson, D.W. y Yen, S.H. (1993a). "Heterogeneity of tau proteins in Alzheimer's disease. Evidence for increased expression of an isoform and preferential distribution of a phosphorylated isoform in neurites ". *Am J Pathol.* 142; 387-94
- Livne, A.; Balfe, J.W.; Veitch, R.; Marquez, J.A.; Grinstein, S. y Rothstein, A. (1987). "Increased platelet Na⁺-H⁺ exchange rates in essential hypertension: application of a novel test ". *Lancet.* 1; 533-6
- Lorca, T.; Abrieu, A.; Means, A. y Doree, M. (1994). "Ca²⁺ is involved through type II calmodulin-dependent protein kinase in cyclin degradation and exit from metaphase ". *Biochim Biophys Acta.* 1223; 325-32
- Luo, L.Q.; Martin, M.L. y White, K. (1990). "Identification, secretion, and neural expression of APPL, a Drosophila protein similar to human amyloid protein precursor ". *J Neurosci.* 10; 3849-61
- Maggio, J.E.; Stimson, E.R.; Ghilardi, J.R.; Allen, C.J.; Dahl, C.E.; Whitcomb, D.C.; Vigna, S.R.; Vinters, H.V.; Labenski, M.E. y Mantyh, P.W. (1992). "Reversible in vitro growth of Alzheimer disease beta-amyloid plaques by deposition of labeled amyloid peptide ". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89; 5462-6

- Mahley, R.W. (1988). "Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology ". *Science*. 240; 622-30
- Main, B.F.; Jones, P.J.; MacGillivray, R.T. y Banfield, D.K. (1991). "Apolipoprotein E genotyping using the polymerase chain reaction and allele-specific oligonucleotide primers ". *J Lipid Res*. 32; 183-7
- Mant, R.; Asherson, P.; Gill, M.; McGuffin, P.; Owen, M.; Wert, S.E.; Gregory, R.J.; Smith, A.E.; Cohn, J.A.; Wilson, J.M. y et, a.l. (1992). "Schizophrenia scepticism [letter; comment] ". *Nat Genet*. 2;
- Marchuk, D.; Drumm, M.; Saulino, A. y Collins, F.S. (1991). "Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products ". *Nucleic Acids Res*. 19;
- Marder, K.; Maestre, G.; Cote, L.; Mejia, H.; Alfaro, B.; Halim, A.; Tang, M.; Tycko, B. y Mayeux, R. (1994). "The apolipoprotein epsilon 4 allele in Parkinson's disease with and without dementia ". *Neurology*. 44; 1330-1
- Mattson, M.P.; Cheng, B.; Davis, D.; Bryant, K.; Lieberburg, I. y Rydel, R.E. (1992). "beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity ". *J Neurosci*. 12; 376-89
- Mattson, M.P.; Cheng, B.; Culwell, A.R.; Esch, F.S.; Lieberburg, I. y Rydel, R.E. (1993a). "Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein ". *Neuron*. 10; 243-54
- Mattson, M.P.; Barger, S.W.; Cheng, B.; Lieberburg, I.; Smith, S.V. y Rydel, R.E. (1993b). "beta-Amyloid precursor protein metabolites and loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis in Alzheimer's disease ". *Trends Neurosci*. 16; 409-14
- Mayeux, R.; Stern, Y.; Ottman, R.; Tatemichi, T.K.; Tang, M.X.; Maestre, G.; Ngai, C.; Tycko, B. y Ginsberg, H. (1993). "The apolipoprotein epsilon 4 allele in patients with Alzheimer's disease [see comments] ". *Ann Neurol*. 34; 752-4
- McKee, A.C.; Kosik, K.S.; Kennedy, M.B. y Kowall, N.W. (1990). "Hippocampal neurons predisposed to neurofibrillary tangle formation are enriched in type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase ". *J Neuropathol Exp Neurol*. 49; 49-63
- McConkey, D.J.; Hartzell, P.; Duddy, S.K.; Hakansson, H. y Orrenius, S. (1988). "2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin kills immature thymocytes by Ca²⁺-mediated endonuclease activation ". *Science*. 242; 256-9
- McKhann, G.; Drachman, D.; Folstein, M.; Katzman, R.; Price, D. y 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; 939-44
- Mohs, R.C.; Breitner, J.C.; Silverman, J.M. y Davis, K.L. (1987). "Alzheimer's disease. Morbid risk among first-degree relatives approximates 50% by 90 years of age ". *Arch Gen Psychiatry*. 44; 405-8
- Moolenaar, W.H.; Tertoolen, L.G. y de, L.S. (1984). "Phorbol ester and diacylglycerol mimic growth factors in raising cytoplasmic pH ". *Nature*. 312; 371-4
- Moolenaar, W.H. (1986). "Effects of growth factors on intracellular pH regulation". *Annu Rev Physiol*. 48; 363-376
- Mori, H.; Kondo, J. y Ihara, Y. (1987). "Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease ". *Science*. 235; 1641-4

- Mountjoy, C.Q., Roth, M., Evans, J.R. y Evans, H.M. (1983) *Neurobiol. Aging* 4, 1-11
- Mullis, K.B., Faalona, F.A., Scharf, S.J., Saiki, R.K., Horn, G.T., y Erlich, H.A.(1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polimerase chain reaction". *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51: 263-273.
- Mullis, K.B. y Faalona, F.A.(1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polimerase-catalyzed chain reaction". *Methods Enzymol.* 155: 335-350.
- Mullan, M.; Crawford, F.; Axelman, K.; Houlden, H.; Lilius, L.; Winblad, B. y Lannfelt, L. (1992a). "A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid ". *Nat Genet.* 1; 345-7
- Mullan, M.; Houlden, H.; Windelspecht, M.; Fidani, L.; Lombardi, C.; Diaz, P.; Rossor, M.; Crook, R.; Hardy, J.; Duff, K. y et, a.l. (1992). "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; 340-2
- Murrell, J.; Farlow, M.; Ghetti, B. y Benson, M.D. (1991). "A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease ". *Science.* 254; 97-9
- Myers, R.M.; Lumelsky, N.; Lerman, L.S. y Maniatis, T. (1985). "Detection of single base substitutions in total genomic DNA ". *Nature.* 313; 495-8
- Namba, Y.; Tomonaga, M.; Kawasaki, H.; Otomo, E. y Ikeda, K. (1991). "Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease ". *Brain Res.* 541; 163-6
- Naruse, S.; Igarashi, S.; Kobayashi, H.; Aoki, K.; Inuzuka, T.; Kaneko, K.; Shimizu, T.; Iihara, K.; Kojima, T.; Miyatake, T. y et, a.l. (1991). "Mis-sense mutation Val---Ile in exon 17 of amyloid precursor protein gene in Japanese familial Alzheimer's disease [letter] ". *Lancet.* 337; 978-9
- Nathan, B.P.; Bellosta, S.; Sanan, D.A.; Weisgraber, K.H.; Mahley, R.W. y Pitas, R.E. (1994). "Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro ". *Science.* 264; 850-2
- Nee, L.E.; Eldridge, R.; Sunderland, T.; Thomas, C.B.; Katz, D.; Thompson, K.E.; Weingartner, H.; Weiss, H.; Julian, C. y Cohen, R. (1987). "Dementia of the Alzheimer type: clinical and family study of 22 twin pairs ". *Neurology.* 37; 359-63
- Neve, R.L.; Finch, E.A. y Dawes, L.R. (1988). "Expression of the Alzheimer amyloid precursor gene transcripts in the human brain ". *Neuron.* 1; 669-77
- Nilsson, K. y Klein, G. (1982) *Adv. Cancer Res.* 37, 319-380
- Nishimoto, I.; Okamoto, T.; Matsuura, Y.; Takahashi, S.; Okamoto, T.; Murayama, Y. y Ogata, E. (1993). "Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o) [see comments] ". *Nature.* 362; 75-9
- Ng, L.L.; Dudley, C.; Bomford, J. y Hawley, D. (1989). "Leucocyte intracellular pH and Na⁺/H⁺ antiport activity in human hypertension ". *J Hypertens.* 7; 471-5
- Ng, L.L.; Davies, J.E.; Siczkowski, M.; Sweeney, F.P.; Quinn, P.A.; Krolewski, B. y Krolewski, A.S. (1994). "Abnormal Na⁺/H⁺ antiporter phenotype and turnover of immortalized lymphoblasts from type 1 diabetic patients with nephropathy ". *J Clin Invest.* 93; 2750-7
- Noguchi, S.; Murakami, K. y Yamada, N. (1993). "Apolipoprotein E genotype and Alzheimer's disease [letter][see comments] ". *Lancet.* 342;

Ohyagi, Y.; Takahashi, K.; Kamegai, M. y Tabira, T. (1990). "Developmental and differential expression of beta amyloid protein precursor mRNAs in mouse brain ". *Biochem Biophys Res Commun.* 167; 54-60

Ohyagi, Y.; Takahashi, K.; Satoh, Y.; Makifuchi, T. y Tabira, T. (1992). "Cerebral cortical amyloid protein precursor mRNA expression is similar in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases ". *J Neurol Sci.* 111; 33-8

Okuizumi, K.; Onodera, O.; Tanaka, H.; Kobayashi, H.; Tsuji, S.; Takahashi, H.; Oyanagi, K.; Seki, K.; Tanaka, M.; Naruse, S. y et, a.l. (1994). "ApoE-epsilon 4 and early-onset Alzheimer's [letter] ". *Nat Genet.* 7; 10-1

Oltersdorf, T.; Fritz, L.C.; Schenk, D.B.; Lieberburg, I.; Johnson, W.K.; Beattie, E.C.; Ward, P.J.; Blacher, R.W.; Dovey, H.F. y Sinha, S. (1989). "The secreted form of the Alzheimer's amyloid precursor protein with the Kunitz domain is protease nexin-II ". *Nature.* 341; 144-7

Oltersdorf, T.; Ward, P.J.; Henriksson, T.; Beattie, E.C.; Neve, R.; Lieberburg, I. y Fritz, L.C. (1990). "The Alzheimer amyloid precursor protein. Identification of a stable intermediate in the biosynthetic/degradative pathway ". *J Biol Chem.* 265; 4492-7

Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., y Sekiya, T. (1989a). "Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2766-2770.

Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., y Hayashi, K. (1989b). "Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction". *Genomics.* 5: 874-879.

Orrenius, S. y Nicotera, P. (1994) "The calcium ion and cell death". *J. Neural Transm.* 43, 1-11

Ounanian, A.; Guilbert, B. y Seigneurin, J.M. (1992). "Characteristics of Epstein-Barr virus transformed B cell lines from patients with Alzheimer's disease and age-matched controls ". *Mech Ageing Dev.* 63; 105-16

Parkinson Study Group (1989). "DATATOP: a multicenter controlled clinical trial in early Parkinson's disease. ". *Arch Neurol.* 46; 1052-60

Payami, H.; Montee, K.R.; Kaye, J.A.; Bird, T.D.; Yu, C.E.; Wijsman, E.M. y Schellenberg, G.D. (1994). "Alzheimer's disease, apolipoprotein E4, and gender [letter] ". *Jama.* 271; 1316-7

Pericak, V.M.; Bebout, J.L.; Gaskell, P.J.; Yamaoka, L.H.; Hung, W.Y.; Alberts, M.J.; Walker, A.P.; Bartlett, R.J.; Haynes, C.A.; Welsh, K.A. y et, a.l. (1991). "Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage ". *Am J Hum Genet.* 48; 1034-50

Pike, C.J.; Walencewicz, A.J.; Glabe, C.G. y Cotman, C.W. (1991). "In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity ". *Brain Res.* 563; 311-4

Pike, C.J.; Burdick, D.; Walencewicz, A.J.; Glabe, C.G. y Cotman, C.W. (1993). "Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state ". *J Neurosci.* 13; 1676-87

Poirier, J.; Davignon, J.; Bouthillier, D.; Kogan, S.; Bertrand, P. y Gauthier, S. (1993). "Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease [see comments] ". *Lancet.* 342; 697-9

Podlisny, M.B.; Stephenson, D.T.; Frosch, M.P.; Lieberburg, I.; Clemens, J.A. y Selkoe, D.J. (1992). "Synthetic amyloid beta-protein fails to produce specific neurotoxicity in monkey cerebral cortex ". *Neurobiol Aging.* 13; 561-7

- Ponte, P.; Gonzalez, D.P.; Schilling, J.; Miller, J.; Hsu, D.; Greenberg, B.; Davis, K.; Wallace, W.; Lieberburg, I. y Fuller, F. (1988). "A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors ". *Nature*. 331; 525-7
- Potter, H. (1991). "Review and hypothesis: Alzheimer disease and Down syndrome--chromosome 21 nondisjunction may underlie both disorders [see comments] ". *Am J Hum Genet*. 48; 1192-200
- Pouyssegur, J.; Franchi, A.; L'Allemain, G. y Paris, S. (1985). "Cytoplasmic pH, a key determinant of growth factor-induced DNA synthesis in quiescent fibroblasts ". *Febs Lett*. 190; 115-9
- Prasad, K.V.; Severini, A. y Kaplan, J.G. (1987). "Sodium ion influx in proliferating lymphocytes: an early component of the mitogenic signal ". *Arch Biochem Biophys*. 252; 515-25
- Quon, D.; Catalano, R. y Cordell, B. (1990). "Fibroblast growth factor induces beta-amyloid precursor mRNA in glial but not neuronal cultured cells ". *Biochem Biophys Res Commun*. 167; 96-102
- Rapoport, S.I.; Pettigrew, K.D. y Schapiro, M.B. (1991). "Discordance and concordance of dementia of the Alzheimer type (DAT) in monozygotic twins indicate heritable and sporadic forms of Alzheimer's disease ". *Neurology*. 41; 1549-53
- Rocca, W.A.; Hofman, A.; Brayne, C.; Breteler, M.M.; Clarke, M.; Copeland, J.R.; Dartigues, J.F.; Engedal, K.; Hagnell, O.; Heeren, T.J. y col (1991). "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; 381-90
- Rogaev, E.I.; Sherrington, R.; Rogaeva, E.A.; Levesque, G.; Ikeda, M.; Liang, Y.; Chi, H.; Lin, C.; Holman, K.; Tsuda, T. y col (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; 775-8
- Rosoff, P.M. y Cantley, L.C. (1985). "Stimulation of the T3-T cell receptor-associated Ca²⁺ influx enhances the activity of the Na⁺/H⁺ exchanger in a leukemic human T cell line ". *J Biol Chem*. 260; 14053-9
- Roskopf, D.; Fromter, E. y Siffert, W. (1993). "Hypertensive sodium-proton exchanger phenotype persists in immortalized lymphoblasts from essential hypertensive patients. A cell culture model for human hypertension ". *J Clin Invest*. 92; 2553-9
- Roskopf, D.; Schroder, K.J. y Siffert, W. (1995). "Role of sodium-hydrogen exchange in the proliferation of immortalised lymphoblasts from patients with essential hypertension and normotensive subjects ". *Cardiovasc Res*. 29; 254-9
- Saiki, R., Scharf, S., Faalona, F.A., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., y Arnheim, N.(1985). "Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia". *Science*. 230; 1350-1354.
- Saitoh, T.; Sundsmo, M.; Roch, J.M.; Kimura, N.; Cole, G.; Schubert, D.; Oltersdorf, T. y Schenk, D.B. (1989). "Secreted form of amyloid beta protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts ". *Cell*. 58; 615-22
- Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, A.R.(1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.74: 5463-5467.
- Sanger, F., Coulson, A.R., Barrel, B.G., Smith, A.J.M., y Roe, B.A.(1980). "Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing". *J. Mol. Biol*. 143: 161-178.

- Saunders, A.M.; Strittmatter, W.J.; Schmechel, D.; George, H.P.; Pericak, V.M.; Joo, S.H.; Rosi, B.L.; Gusella, J.F.; Crapper, M.D.; Alberts, M.J. y et, a.l. (1993a). "Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease ". *Neurology*. 43; 1467-72
- Saunders, A.M. y Roses, A.D. (1993b). "Apolipoprotein E4 allele frequency, ischemic cerebrovascular disease, and Alzheimer's disease [letter; comment] [see comments] ". *Stroke*. 24; 1416-7
- Schachter, F.; Faure, D.L.; Guenot, F.; Rouger, H.; Froguel, P.; Lesueur, G.L. y Cohen, D. (1994). "Genetic associations with human longevity at the APOE and ACE loci ". *Nat Genet*. 6; 29-32
- Schellenberg, G.D.; Deeb, S.S.; Boehnke, M.; Bryant, E.M.; Martin, G.M.; Lampe, T.H. y Bird, T.D. (1987). "Association of an apolipoprotein CII allele with familial dementia of the Alzheimer type ". *J Neurogenet*. 4; 97-108
- Schellenberg, G.D.; Anderson, L.; O'dahl, S.; Wisjman, E.M.; Sadovnick, A.D.; Ball, M.J.; Larson, E.B.; Kukull, W.A.; Martin, G.M.; Roses, A.D. y et, a.l. (1991). "APP717, APP693, and PRIP gene mutations are rare in Alzheimer disease [see comments] ". *Am J Hum Genet*. 49; 511-7
- Schellenberg, G.D.; Bird, T.D.; Wijsman, E.M.; Orr, H.T.; Anderson, L.; Nemens, E.; White, J.A.; Bonnycastle, L.; Weber, J.L.; Alonso, M.E. y et, a.l. (1992). "Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14 ". *Science*. 258; 668-71
- Schubert, D.; Cole, G.; Saitoh, T. y Oltersdorf, T. (1989). "Amyloid beta protein precursor is a mitogen ". *Biochem Biophys Res Commun*. 162; 83-8
- Shivers, B.D.; Hilbich, C.; Multhaup, G.; Salbaum, M.; Beyreuther, K. y Seeburg, P.H. (1988). "Alzheimer's disease amyloidogenic glycoprotein: expression pattern in rat brain suggests a role in cell contact ". *Embo J*. 7; 1365-70
- Sherrington, R.; Rogae, E.I.; Liang, Y.; Rogae, E.A.; Levesque, G.; Ikeda, M.; Chi, H.; Lin, C.; Li, G.; Holman, K. y et, a.l. (1995). "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease [see comments] ". *Nature*. 375; 754-60
- Shoji, M.; Golde, T.E.; Ghiso, J.; Cheung, T.T.; Estus, S.; Shaffer, L.M.; Cai, X.D.; McKay, D.M.; Tintner, R.; Frangione, B. y et, a.l. (1992). "Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing ". *Science*. 258; 126-9
- Smith, R.P.; Higuchi, D.A. y Broze, G.J. (1990). "Platelet coagulation factor XIa-inhibitor, a form of Alzheimer amyloid precursor protein ". *Science*. 248; 1126-8
- Soto, C. y Frangione, B. (1995). "Two conformational states of amyloid beta-peptide: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease ". *Neurosci Lett*. 186; 115-8
- St, George-Hyslop P.; Tanzi, R.E.; Polinsky, R.J.; Haines, J.L.; Nee, L.; Watkins, P.C.; Myers, R.H.; Feldman, R.G.; Pollen, D.; Drachman, D. y et, a.l. (1987a). "The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21 ". *Science*. 235; 885-90
- St, George-Hyslop P.; Polinsky, R.; Haines, J.; Nee, L.; Tanzi, R.; Conneally, P.; Growdon, J.; Myers, R.; Pollen, D.; Drachman, D. y col (1987b). "Search for the familial Alzheimer's disease gene ". *J Neural Transm Suppl*. 24; 13-21
- St, George-Hyslop, P.; Haines, J.; Rogae, E.; Mortilla, M.; Vaula, G.; Pericak, V.M.; Foncin, J.F.; Montesi, M.; Bruni, A.; Sorbi, S. y et, a.l. (1992). "Genetic evidence for a novel familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14 ". *Nat Genet*. 2; 330-4
- Strittmatter, W.J.; Weisgraber, K.H.; Huang, D.Y.; Dong, L.M.; Salvesen, G.S.; Pericak, V.M.; Schmechel, D.; Saunders, A.M.; Goldgaber, D. y Roses, A.D. (1993b). "Binding of human

apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease ". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90; 8098-102

Strittmatter, W.J.; Saunders, A.M.; Schmechel, D.; Pericak, V.M.; Englund, J.; Salvesen, G.S. y Roses, A.D. (1993a). "Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease ". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90; 1977-81

Strittmatter, W.J.; Weisgraber, K.H.; Goedert, M.; Saunders, A.M.; Huang, D.; Corder, E.H.; Dong, L.M.; Jakes, R.; Alberts, M.J.; Gilbert, J.R. y et, a.l. (1994). "Hypothesis: microtubule instability and paired helical filament formation in the Alzheimer disease brain are related to apolipoprotein E genotype ". *Exp Neurol.* 125; 163-71

Talbot, C.; Lendon, C.; Craddock, N.; Shears, S.; Morris, J.C. y Goate, A. (1994). "Protection against Alzheimer's disease with apoE epsilon 2 [letter] [see comments] ". *Lancet.* 343; 1432-3

Tanaka, S.; Nakamura, S.; Ueda, K.; Kameyama, M.; Shiojiri, S.; Takahashi, Y.; Kitaguchi, N. y Ito, H. (1988). "Three types of amyloid protein precursor mRNA in human brain: their differential expression in Alzheimer's disease ". *Biochem Biophys Res Commun.* 157; 472-9

Tanaka, S.; Shiojiri, S.; Takahashi, Y.; Kitaguchi, N.; Ito, H.; Kameyama, M.; Kimura, J.; Nakamura, S. y Ueda, K. (1989). "Tissue-specific expression of three types of beta-protein precursor mRNA: enhancement of protease inhibitor-harboring types in Alzheimer's disease brain ". *Biochem Biophys Res Commun.* 165; 1406-14

Tanaka, H.; Naruse, S.; Seki, K.; Onodera, O.; Kobayashi, H.; Miyatake, T.; Shibata, A.; Sakaki, Y.; Kamino, K.; Miki, T. y et, a.l. (1993). "Absence of linkage disequilibrium at amyloid precursor protein gene locus in Japanese familial Alzheimer's disease with 717Val-->Ile mutation ". *Neurosci Lett.* 162; 63-6

Tanzi, R.E.; St, G.H.P.; Haines, J.L.; Polinsky, R.J.; Nee, L.; Foncin, J.F.; Neve, R.L.; McClatchey, A.I.; Conneally, P.M. y Gusella, J.F. (1987b). "The genetic defect in familial Alzheimer's disease is not tightly linked to the amyloid beta-protein gene ". *Nature.* 329; 156-7

Tanzi, R.E.; Gusella, J.F.; Watkins, P.C.; Bruns, G.A.; St, G.H.P.; Van, K.M.; Patterson, D.; Pagan, S.; Kurnit, D.M. y Neve, R.L. (1987a). "Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus ". *Science.* 235; 880-4

Tanzi, R.E.; Haines, J.L.; Watkins, P.C.; Stewart, G.D.; Wallace, M.R.; Hallewell, R.; Wong, C.; Wexler, N.S.; Conneally, P.M. y Gusella, J.F. (1988a). "Genetic linkage map of human chromosome 21 ". *Genomics.* 3; 129-36

Tanzi, R.E.; McClatchey, A.I.; Lamperti, E.D.; Villa, K.L.; Gusella, J.F. y Neve, R.L. (1988b). "Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease ". *Nature.* 331; 528-30

Tanzi, R.E. (1991a). "Genetic linkage studies of human neurodegenerative disorders ". *Curr Opin Neurobiol.* 1; 455-61

Terry, R.D., Peck, A., DeTheresa, R., Schechter, R. y Horoupian, D.S. (1981) *Ann. Neurol.* 10, 184-19

Tosato, G.; Blaese, R.M. y Yarchoan, R. (1985). "Relationship between immunoglobulin production and immortalization by Epstein Barr virus ". *J Immunol.* 135; 959-64

Trojanowski, Jq, a.L. y Vm. (1994). "Paired helical filament tau in Alzheimer's disease. The kinase connection ". *Am J Pathol.*

- Ueki, A.; Kawano, M.; Namba, Y.; Kawakami, M. y Ikeda, K. (1993). "A high frequency of apolipoprotein E4 isoprotein in Japanese patients with late-onset nonfamilial Alzheimer's disease ". *Neurosci Lett.* 163; 166-8
- Urcelay, E.; Butta, N.; Manchon, C.G.; Cipres, G.; Requero, A.M.; Ayuso, M.S. y Parrilla, R. (1993). "Role of protein kinase-C in the alpha 1-adrenoceptor-mediated responses of perfused rat liver ". *Endocrinology.* 133; 2105-15
- Urcelay, E.; Butta, N.; Cipres, G.; Martin, R.A.; Ayuso, M.S. y Parrilla, R. (1994). "Functional coupling of Na⁺/H⁺ and Na⁺/Ca²⁺ exchangers in the alpha 1-adrenoceptor-mediated activation of hepatic metabolism ". *J Biol Chem.* 269; 860-7
- Van Broeckhoven, C.; Genthe, A.M.; Vandenberghe, A.; Horsthemke, B.; Backhovens, H.; Raeymaekers, P.; Van, H.W.; Wehnert, A.; Gheuens, J.; Cras, P. y et, a.l. (1987). "Failure of familial Alzheimer's disease to segregate with the A4-amyloid gene in several European families ". *Nature.* 329; 153-5
- Van Broeckhoven, C.; Backhovens, H.; Cruts, M.; De, W.G.; Bruyland, M.; Cras, P. y Martin, J.J. (1992). "Mapping of a gene predisposing to early-onset Alzheimer's disease to chromosome 14q24.3 ". *Nat Genet.* 2; 335-9
- Van Broeckhoven. (1995). "Molecular genetics of Alzheimer disease: identification of genes and gene mutations ". *Eur Neurol.* 35; 8-19
- Van Duijn, C.; Clayton, D.; Chandra, V.; Fratiglioni, L.; Graves, A.B.; Heyman, A.; Jorm, A.F.; Kokmen, E.; Kondo, K.; Mortimer, J.A. y et, a.l. (1991). "Familial aggregation of Alzheimer's disease and related disorders: a collaborative re-analysis of case-control studies. EURODEM Risk Factors Research Group ". *Int J Epidemiol.* 20, S13-
- Van Duijn, C.; de, K.P.; Cruts, M.; Wehnert, A.; Havekes, L.M.; Hofman, A. y Van, B.C. (1994). "Apolipoprotein E4 allele in a population-based study of early-onset Alzheimer's disease ". *Nat Genet.* 7; 74-8
- Van Eldik, L.J. y Griffin, W.S. (1994). "S100 beta expression in Alzheimer's disease: relation to neuropathology in brain regions ". *Biochim Biophys Acta.* 1223; 398-403
- Van Nostrand, W.; Schmaier, A.H.; Farrow, J.S. y Cunningham, D.D. (1990). "Protease nexin-II (amyloid beta-protein precursor): a platelet alpha-granule protein ". *Science.* 248; 745-8
- Van Obberghen-Schilling, E.; Chambard, J.C.; Paris, S.; L'Allemain, G. y Pouyssegur, J. (1985). "alpha-Thrombin-induced early mitogenic signalling events and G0 to S-phase transition of fibroblasts require continual external stimulation ". *Embo J.* 4; 2927-32
- Wakabayashi, S.; Bertrand, B.; Ikeda, T.; Pouyssegur, J. y Shigekawa, M. (1994). "Mutation of calmodulin-binding site renders the Na⁺/H⁺ exchanger (NHE1) highly H(+)-sensitive and Ca²⁺ regulation-defective ". *J Biol Chem.* 269; 13710-5
- Weghorst, C.M. y Buzard, G.S. (1993). "Enhance single-strand conformation polymorphism (SSCP) detection of point mutations utilizing methylmercury hydroxide". *Biotechniques.* 15: 396-398.
- Weidemann, A.; Konig, G.; Bunke, D.; Fischer, P.; Salbaum, J.M.; Masters, C.L. y Beyreuther, K. (1989). "Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein ". *Cell.* 57; 115-26
- Weisgraber, K.H. (1994). "Apolipoprotein E: structure-function relationships ". *Adv Protein Chem.* 45; 249-302

- Weisgraber, K.H.; Roses, A.D. y Strittmatter, W.J. (1994). "The role of apolipoprotein E in the nervous system ". *Curr Opin Lipidol.* 5; 110-6
- Wetterau, J.R.; Aggerbeck, L.P.; Rall, S.J. y Weisgraber, K.H. (1988). "Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. I. Evidence for two structural domains ". *J Biol Chem.* 263; 6240-8
- Whitson, J.S.; Selkoe, D.J. y Cotman, C.W. (1989). "Amyloid beta protein enhances the survival of hippocampal neurons in vitro ". *Science.* 243; 1488-90
- Whitson, J.S.; Glabe, C.G.; Shintani, E.; Abcar, A. y Cotman, C.W. (1990). "Beta-amyloid protein promotes neuritic branching in hippocampal cultures ". *Neurosci Lett.* 110; 319-24
- Wilson, C.; Wardell, M.R.; Weisgraber, K.H.; Mahley, R.W. y Agard, D.A. (1991). "Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E ". *Science.* 252; 1817-22
- Wisniewski, T. y Frangione, B. (1992). "Molecular biology of Alzheimer's amyloid--Dutch variant ". *Mol Neurobiol.* 6; 75-86
- Wisniewski, T. y Frangione, B. (1992a). "Apolipoprotein E: a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid ". *Neurosci Lett.* 135; 235-8
- Wisniewski, T.; Golabek, A.; Matsubara, E.; Ghiso, J. y Frangione, B. (1993). "Apolipoprotein E: binding to soluble Alzheimer's beta-amyloid ". *Biochem Biophys Res Commun.* 192; 359-65
- Wisniewski, T.; Castano, E.M.; Golabek, A.; Vogel, T. y Frangione, B. (1994b). "Acceleration of Alzheimer's fibril formation by apolipoprotein E in vitro ". *Am J Pathol.* 145; 1030-5
- Wolozin, B.; Scicutella, A. y Davies, P. (1988). "Reexpression of a developmentally regulated antigen in Down syndrome and Alzheimer disease ". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85; 6202-6
- Yankner, B.A.; Dawes, L.R.; Fisher, S.; Villa, K.L.; Oster, G.M. y Neve, R.L. (1989). "Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease ". *Science.* 245; 417-20
- Yankner, B.A.; Caceres, A. y Duffy, L.K. (1990). "Nerve growth factor potentiates the neurotoxicity of beta amyloid ". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87; 9020-3
- Yoshioka, K.; Miki, T.; Katsuya, T.; Ogihara, T. y Sakaki, Y. (1991). "The 717Val----Ile substitution in amyloid precursor protein is associated with familial Alzheimer's disease regardless of ethnic groups ". *Biochem Biophys Res Commun.* 178; 1141-6