(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 31 557 T2** 2004.06.17

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 804 615 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 31 557.9**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/CA95/00240**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 916 530.9**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/029257**
(86) PCT-Anmeldetag: **26.04.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **02.11.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **05.11.1997**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **20.08.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **17.06.2004**

(51) Int Cl.[7]: **A61K 31/00**

(30) Unionspriorität:
9408465 **27.04.1994** **GB**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
McGill University, Montreal, Quebec, CA

(72) Erfinder:
POIRIER, Judes, Boisbriand, CA

(74) Vertreter:
Dr. Volker Vossius, Corinna Vossius, Tilman Vossius, Dr. Martin Grund, Dr. Georg Schnappauf, 81679 München

(54) Bezeichnung: **APOLIPOROTEIN E POLYMORPHISMEN UND BEHANDLUNG DER ALZHEIMERKRANKHEIT**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft das Gebiet der Behandlung von Alzheimer-Erkrankung und damit in Zusammenhang stehenden Zuständen.

[0002] Apolipoprotein E (apoE) wirkt als ein Ligand in dem Prozess der rezeptor-vermittelten Internalisierung von lipidreichen Lipoproteinen und ist wahrscheinlich auch in den umgekehrten Lipidtransport involviert (Mahley, R. W. et al., 1983 Biochem. Biophys. Acta. 737: 197–222). ApoE spielt in dem zentralen Nervensystem (ZNS) eine zentrale Rolle in der Mobilisierung und Umverteilung von Cholesterin und Phospholipid während der Membranumordnung, die mit synaptischer Plastizität assoziiert ist (Poirier J. et al., 1991, Mol. Brain. Res., 9: 191–195; Poirier J. et al., 1991, Mol. Brain. Res., 11: 97–106; Poirier J. et al., 1993, Neurosciencs, 55: 81–90). Die Wichtigkeit von apoE in dem Gehirn wird weiterhin durch die Abwesenheit von anderen Plasma Schlüssel-Apolipoproteinen wie apoA1 und apoB (Roheim, P. S. et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci., 76: 4646–4649) in diesem Gewebe unterstrichen. ApoE mRNA wird vornehmlich in Astrozyten in dem ZNS gefunden.

[0003] Das apoE-Gen auf Chromosom 19 hat drei übliche Allele (E2, E3, E4), die drei Haupt-aopE Isoformen kodieren. Kürzlich wurde gezeigt, dass die Häufigkeit des apoE Allels merklich gesteigert ist in sporadischer Alzheimer-Erkrankung (Poirier J. et al., 1993, Apolipoprotein E phenotype and Alzheimer's Disease, Lancet, 342: 697–699; Noguchi S. et al., 1993, Lancet (Brief), 342: 737) und im spätem Einsetzen von familiärer Alzheimer-Erkrankung (AD) (Corder E. H. et al., 1993, Science, 261: 921–923; Payami H. et al., 1993, Lancet (Brief), 342: 738). Eine Gen-Dosis-Wirkung wurde sowohl in sporadischen als auch familiären Fällen beobachtet (d. h. mit steigendem Alter des Einsetzens verringert sich die Kopien-Anzahl des E4 Alles). Frauen, die generell ein größeres Risiko zur Entwicklung von Alzheimer-Erkrankung tragen, zeigen eine gesteigerte Häufigkeit des E4 Allels im Vergleich zu Männern gleichen Alters.

[0004] Liddel et al., (1994), J. Med. Gen., 31: 197–200) zeigt nur die Anwesenheit von wenigstens zwei Sub-Populationen der Alzheimer-Erkrankung; diejenigen, die die apoE4 Mutation tragen, und diejenigen, die das normale apoE3 oder apoE2 Gen tragen.

[0005] Vorläufige Untersuchungen haben gezeigt, dass apoE mRNA-Spiegel in postmortalen Gehirnen von AD-Patienten verhältnismäßig unverändert sind. (Poirier J. et al., 1991, In: Basic and therapeutic strategies in Alzheimer's and Parkinson's diseases, T. Nagatsu, F. Abraham. Hrsg., New York, Plenum Press, 191–194) Diese Ergebnisse wurden von Patienten erhalten, deren Genotypen unbestimmt waren.

[0006] Wie nachstehend erklärt werden wird, können wir als ein Ergebnis unserer Arbeit Mittel zur Verfügung stellen, um die cholinergische Aktivität in dem Gehirn von Alzheimer-erkrankungs-Patienten zu bestimmen, um zu bestimmen, ob Therapien, die auf Cholinomimetika basieren durchgeführt werden sollten.

[0007] In Übereinstimmung mit einem ersten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird die Verwendung eines cholinomimetischen Agens zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung in der Behandlung von genetisch charakterisierten Alzheimer-Patienten zur Verfügung gestellt durch ein Verfahren einschließlich:

(a) Bestimmung der Anwesenheit des Allels für die Apolipoproteine E2 und E3 oder der Abwesenheit des Allels für Apolipoprotein E4 aus peripheren Geweben des Patienten, was auf den Grad der Beeinträchtigung des Gehirns in der Acetylcholin-Synthese und der Nikotinrezeptor-Aktivität hinweist; und

(b) Verabreichung des Medikaments, gemäß dem Grad der Beeinträchtigung, der in Schritt (a) bestimmt wurde.

[0008] Das cholinomimetische Agens kann ausgewählt sein aus Inhibitoren des Acetylcholin-Abbaus, Induktoren der Acetylcholin-Synthese, Acetylcholin-Agonisten oder Mimetika und muskarinischen M2-Rezeptor-Antagonisten.

[0009] In Übereinstimmung mit einem zweiten und alternativen Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Verfügung gestellt, um Daten zur Verfügung zu stellen, die für einen Kliniker nützlich sind, um einen Hinweis über die Prädisposition eines humanen Patienten mit kognitiven Beeinträchtigungen aufgrund von Alter, Alzheimer-Erkrankung oder anderen neurodegenerativen Erkrankungen, über das Ansprechen auf Cholinomimetika-basierte Therapien zu geben, wobei das Verfahren die Bestimmung der Anzahl von Kopien der apoE2 und apoE3 Gen Allele oder der Abwesenheit des apoE4 Gen Allels in einer biologischen Probe von dem Patienten umfasst, die Anwesenheit von apoE2 und/oder apoE3 Gen Allelen und die Abwesenheit von apoE4 weist auf eine Prädisposition zur Antwort auf Therapien, die auf Cholinomimetika basieren, hin.

[0010] In Übereinstimmung mit einem dritten alternativen Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Verfügung gestellt um Daten zur Verfügung zu stellen, die für einen Kliniker nützlich sind, um einen Hinweis auf Alzheimer-Patienten zu geben, die auf kognitive Verstärker und Cholinomimetika-Therapien ansprechen könnten, wobei das Verfahren die Bestimmung der Anzahl von Kopien der apoE2 und apoE3 Gen Allele in einer biologischen Probe von dem Patienten umfasst, wobei die Anwesenheit von apoE2 und/oder apoE3 Gen Allelen und die Abwesenheit von apoE4 auf eine Prädisposition hinweist, auf Therapien anzusprechen, die auf Cholinomimetika basieren.

[0011] Die Erfindung stellt in einem vierten und weiteren Aspekt die Verwendung eines cholinomimeti-

schen Agens zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung in der Behandlung eines humanen Patienten mit kognitiven Beeinträchtigungen aufgrund von Alter, Alzheimer-Erkrankung oder anderen neurodegenerativen Krankheiten zur Verfügung, einschließlich:

(a) Bestimmung der Anwesenheit des Allels für die Apolipoproteine E2 und E3 oder der Abwesenheit des Allels für Apolipoprotein E4 in einer biologischen Probe des Patienten, wobei die Anwesenheit von den Allelen der Apolipoproteine E2 und E3 oder die Abwesenheit des Allels für apoE4 auf eine Prädisposition des Patienten hinweist, auf eine Therapie mit dem cholinomimetischen Agens anzusprechen; und

(b) Verabreichung des Medikaments.

[0012] Zum Zweck der vorliegenden Erfindung werden die folgenden Ausdrücke nachstehend definiert.

[0013] Der Ausdruck „kognitive Verstärker" soll bedeuten, dass diese Arzneimittel a) die Gedächtnisleistung, ob es verbales Gedächtnis, räumliches Gedächtnis oder sachliches Gedächtnis ist und b) die Lernkapazität verstärken.

[0014] Der Ausdruck „ cholinomimetische Therapien" ist dazu gedacht, Arzneimittel zu beschreiben, die die Funktion von Acetylcholin nachahmen oder die Aktivität der übrigen Acetylcholinsynthetisierenden Zellen zu verstärken. Diese Arzneimittel schließen ein, sind jedoch nicht beschränkt auf Inhibitoren des Acetylcholin-Abbaus (Acetylcholinesterase-Inhibitoren, wie Tacrin), Arzneimittel, die Acetylcholin-Struktur und -Funktion nachahmen (Agonist: Muscarin-M1-Rezeptor-Agonist ist ein typisches Beispiel), Arzneimittel, die Acetylcholin-Aufnahme von Neuronen blockieren und Arzneimittel, die mit präsynaptischen Rezeptoren interagieren, um Acetylcholin-Entlassung aus cholinergischen Neuronen zu induzieren.

[0015] Der Ausdruck „geeignete apoE2- und apoE3-Sonden" bezieht sich auf Nukleinsäure-Primer-Sequenzen, die selektiv das apoE3- oder apoE2-Allel auf Chromosom 19 erkennen und die verwendet werden können, um selektiv (durch PCR) diese verschiedenen Mutationen des apoE Gens zu amplifizieren.

[0016] In den Abbildungen:

[0017] **Fig.** 1 ist eine Northern-Blot-Analyse von apoE mRNA-Expression in dem Hippokampus von Alzheimer- und Kontrollindividuen;

[0018] **Fig.** 2 ist eine Western-Blot-Analyse der apoE Proteinspiegel in dem Hippokampus von AD- und Kontrollindividuen;

[0019] **Fig.** 3 stellt die Apolipoprotein E4 Allel Kopienanzahl, Tangles (Knäule) und senile Plaquedichten in dem Hippokampus bei Alzheimer-Erkrankung dar;

[0020] **Fig.** 4 stellt die apoE4 Allel Kopienanzahl und Cholinacetyltransferase-Aktivität bei Alzheimer-Erkrankung dar;

[0021] **Fig.** 5 stellt den Verlust von Neuronen dar, die in dem Mynert'schen Nukleus Basalis und in dem Broca'schen Diagonalband Acetylcholin synthetisieren; und

[0022] **Fig.** 6 stellt jeweils die Wirkung der Apolipoprotein E4 (apoE4) Allel Kopienanzahl auf a) & f) Cholinacetyltransferase-Aktivität, b) & g) Nikotin-Rezeptordichte, c) & h) Gesamt-Muskarin- Rezeptordichte, d) & i) Muscarin-M1 (post-synaptisch) und e) & j) Muscarin-M2-Rezeptordichte in postmortalen Kontrollen und Alzheimer-erkankten Gehirnen in der Hippokampus- Bildung und dem temporalen Kortex, dar;

[0023] **Fig.** 7 stellt die individuellen neuroplastologischen und morphologischen Eigenschaften in Verbindung mit dem cholinergischen System in dem Gehirn von verschiedenen untersuchten Alzheimer-Erkrankungs- und Kontrollfällen dar; und

[0024] **Fig.** 8 stellt den Alzheimer-Erkrankungs- Beurteilungsmaßstab (ADAS) Delta-Wert (Endwerte minus Anzeigenwerte) in Tacrin-behandelten AD-Patienten mit verschiedenen apoE Genotypen dar.

[0025] Apolipoprotein E (apoE) ist wichtig zur Anpassung des Cholesterin- und Phospholipidtransports von einer Zelle zur anderen. ApoE bindet mit großer Affinität an den apoE-/apoB-LDL-Rezeptor, um die Internalisierung und den Katabolismus von Cholesterin und Phospholipid enthaltenden Lipoproteinen zu vermitteln. Es ist ein polymorphes Protein mit drei üblichen Allelen, die von apoE2, apoE3 und apoE4 kodiert werden. Kürzlich wurde gezeigt, dass das apoE4 Allel mit dem sporadischen und späten Einsetzen familiärer Alzheimer-Erkrankung (AD) assoziiert ist. Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass das apoE4 Allel geringe oder keine Wirkung auf apoE mRNA-Spiegel und Proteingehalt in dem Hippokampus von AD hat. Allerdings zeigen wir eine starke und signifikante Korrelation zwischen der apoE4 Allel-Kopienanzahl und den Amyloid-Plaque-Zahlen in den CA1-, Subiculum- und Parasubiculum-Bereichen. Noch wichtiger, wir haben gefunden, dass die Anwesenheit des apoE4 Allels eine dramatische Wirkung auf die Restaktivität von Cholinacetyltransferase (ChAT) hat, das Enzym, das in der Synthese von Acetylcholin involviert ist. Eine markante Reduktion in ChAT-Aktivität wurde sowohl im Hippokampus als auch im temporalen Kortex von Menschen mit dem apoE Genotyp 3/4 gfunden, im Vergleich zu denen mit dem Genotyp 3/3. Alle apoE4/3-Individuen (mit Ausnahme eines) litten an AD. Interessanterweise zeigten die meisten AD-Fälle mit dem apoE Genotyp 3/3 ChAT-Aktivitäten in der Nähe von Normalwerten. Die Reduktion der ChAT-Aktivität wird offensichtlich durch einen selektiven Verlust von Neuronen, die Acetylcholin in dem Mynert'schen Nukleus Basalis und in dem Broca'schen Diagonalband synthetisieren, verursacht. Diese Ergebnisse unterstützen die Beteiligung von apoE4 an der Pathogenese von AD und bieten zum ersten Mal eine mögliche Erklärung für die Heterogenität von cholinergischen Dysfunktio-

nen, von denen bei sporadischer AD berichtet wurde.

[0026] Da die apoE Expression (mRNA- und Protein-Spiegel) in dem Hippokampus von Ratten mit verletztem entorhinalem Kortex merklich gesteigert ist (Poirier J. et al. 1991, Mol. Brain. Res., 9: 191–195; Poirier J. et al., 1991, Mol. Brain. Res. 11: 97–106; Poirier J. et al., 1993, Neuroscience, 55: 81–90) und in Menschen mit Multipler Sklerose, untersuchten wir apoE mRNA- und Proteinspiegel in dem Hippokampus von AD-Patienten, deren Genotypen vorher bestimmt wurden.

[0027] **Fig.** 1 und 2 zeigen Northern- und Western-Blof-Analysen von apoE Spiegeln in dem Hippokampus von Kontroll- und AD-Patienten als eine Funktion ihres jeweiligen Genotyps.

[0028] Gefrorene Hippocampi von postmortalen Kontroll- und AD-Patienten wurden von der Gehirnbank des Douglas Hospitals in Montreal erhalten. Alter und Geschlecht passten zueinander und postmortale Verzögerungen waren in den zwei Gruppen ähnlich (ungefähr 14 Std.). Postmortale Verzögerungen von bis zu 24 Stunden haben geringe Wirkung auf apoE Stabilität (Lehtimaki T., 1991, Clin. Chim. Acta, 203: 177–182) und sie können ohne eine erkennbare Spur der Degradation bei –80°C für mehrere Monate gelagert werden. Hippokampus-Gesamt-RNA wurde extrahiert und durch Oligo-(dT)-Hybridisierung quantifiziert, wie vorher beschrieben (Poirier J. et al., 1991, Mol. Brain. Res., 11: 97–106). Das Hybridisierungsprotokoll der Gesamtlängen-apoE-cRNA-Sonde, das in diesem Experiment verwendet wurde, wurde vorher beschrieben (Poirier J. et al., 1991, Mol. Brain. Res., 9: 191–195). DNA mit hohem Molekulargewicht wurde aus gefrorenem Cerebellum oder dem temporalen Kortex isoliert, wie basierend auf Goelz et al., (Goelz S. E. et al., 186, Biochem. Biophys. Res. Comm., 130: 118–126).

[0029] Der apoE Genotyp wurde durch Allel-spezifische Verlängerung von gereinigter DNA des Gehirns bestimmt, unter Verwendung einer Modifikation des Verfahrens von Main et al. (Main R. F. et al., 1991, J. Lipid. Res., 32: 183–187). Die Primer, die mit D, E, F, G und H, markiert sind, wurden für uns von Genosys Biotech (The Woodland, TX) synthetisiert; die Primer-Sequenzen sind angegeben in Main et al. (Main R. F. et al., 1991, J. Lipid. Res., 32: 183–187). Die Reaktionen wurden ausgeführt in einem Volumen von 50 µl, enthaltend 1 µg DNA; Deoxyadenosintriphosphat, Deoxycytidintriphosphat, Deoxythymidintriphosphat und Deoxyguanosintriphosphat, jeweils 0,2 mmol/l; 10% Dimethylsulfoxid; 12,5 pmol von einem der Primer D, E, F, G; 25 pmol Primer H; und 10 µL 10 PCR-Reaktionspuffer (Vector Biosystem, Toronto, ONT). Die DNA des Reaktionsgemisches wurde zunächst für 10 min bei 96°C denaturiert und dann auf 4°C abgekühlt. Eine Einheit Taq-Polymerase (Vector Biosystem, Toronto, ONT) wurde dann jeder Probe zugesetzt. Jede Probe wurde wieder für 2 min bei 96°C erhitzt und dann 30 Zyklen in einem Thermalzykler unterworfen, wobei jeder Zyklus aus einer 10 sec Denaturierung bei 96°C, 30 sec Anlagerung bei 58°C und 1 min Verlängerung bei 65°C bestand. Die Reaktionsprodukte wurden dann durch Elektrophorese von 10 µL des Reaktionsgemisches in einem 1%-igen Agarosegel, enthaltend TPE-Puffer (0,08 mol/L Triphosphat, 0,002 mol/L ETTA) und Ethidiumbromid (0,15 µg/mL) für 1 Std. bei 67 V sichtbar gemacht. Das Gel wurde dann fotografiert und das Bandenprofil wurde mit bekannten Standards verglichen.

[0030] Kurz, 50 µg Hippokampus-Homogenat, vorbehandelt mit einer Einheit Neuraminidase, wurden auf ein 25 cm langes SDS-Polyacrylamid-Gel (10%) geladen und für 3 Stunden bei Raumtemperatur laufen gelassen. Die Proteine wurden auf Nitrocellulose-Filter in der BIORAD™-Transblot-Zelle transferiert und der Nachweis der apoE-Bande wurde mit polyklonalen Antikörpern, die gegen humanes apoE gerichtet waren, durchgeführt (International Immunology Corp., CA, Dil. 1: 2000). Die Absorption des Antikörpers mit gereinigtem apoE blockierte den Nachweis der humanen apoE-Bande bei einem Molekulargewicht von 34–36 kDa vollständig. Molekulargewichts-Marker (Rainbow Markers, Amersham) wurden in angrenzenden Vertiefungen laufen gelassen, während die Sichtbarmachung der Banden mit einem Chemiluminiszenz-Nachweis-Kit (Amersham, Cat. Nr. RPN 2100) durchgeführt wurde. Die Quantifizierung der autoradiografischen Signale wurde durchgeführt mit dem MCID-Image-Analysesystem (Ste-Catherine, Ontario), ausgestattet mit der 1D-Gel-Analyse-Software.

[0031] Die autoradiografischen Analysen der Banden, die mit apoE korrespondierten, offenbarten keine Unterschiede zwischen Kontroll- und AD Hippokampusgeweben, wenn das apoE Allel anwesend ist oder nicht. Diese Ergebnisse stimmen mit einem früheren Bericht (Poirier J. et al., 191, In: Basic and therapeutic strategies in Alzheimer's and Parkinson's diseases, T. Nagatsu, F. Abraham. Hrsg., New York, Plenum Press, 191–194) überein, der zeigte, dass trotz der Astrozyten-Hyperaktivität und dem Anstieg der astrozytiären giialen fibrillären sauren Protein mRNA-Spiegeln in dem Hippokampus von AD, die apoE Genexpression in dem Hippokampus unverändert blieb. Die gesteigerte Expression von GFAP wird häufig als Marken für anhaltende Differenzierung und/oder Neurodegeneration verwendet (Poirier J. et al., 1991, Mol. Brain. Res., 9: 191–195). Somit legen diese Ergebnisse nahe, dass trotz der markanten Deafferenzierung und dem Zellverlust im Hippokampus von AD (Hyman BT et al., 1984, Science, 225, 1168–1170), die apoE Genexpression unverändert bleibt. Vielmehr scheint die Anwesenheit einer Einzelkopie des E4-Allels in dem Gehirn geringe oder keine Wirkung auf die Gleichgewichtsspiegel von apoE in AD zu haben.

[0032] Es wurde gezeigt, dass der in-vivo Metabolismus von apoE4 in der Zirkulation kinetisch anders ist, als apoE3 in Menschen (Gregg R. E. et al., 1986, J. Clin. Invest., 87: 815–821). Das E4 Allel ist mit ab-

normal hohen Spiegeln zirkulierender Lipoproteine, gesteigerten Plasma- und LDL-Cholesterinmengen, veränderter Lipoprotein-Verteilung, verringertem Plasma apoE in Patienten, die homozygot für E4 sind und mit schnellem Katabolismus von apoE4, verglichen mit apoE3 assoziiert (Gregg R. E. et al., 1986, J. Clin. Invest., 87: 815–821). Dies kann nahe legen, dass apoE4 metabolisch anders ist, als apoE3 und könnte somit die Störungen der Lipidhomeostase, die von AD-Gehirnen berichtet wurde, erklären. Beispielsweise sind Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE) und Cholesterinspiegel in AD-Gehirnen alle signifikant reduziert (Pettegrew J. W., 1989, Ann. NY Acad. Sci., 568: 5–28). Darüber hinaus waren die Spiegel von Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Cholesterin umgekehrt korreliert mit der Anzahl von senilen Plaques zwischen Kortikalschichten II und IV (Pettegrew J. W., 1989, Ann. NY Acad. Sci., 568: 5–28). Entsprechend haben wir die Wirkung der apoE4-Allel-Kopienanzahl auf das Auftreten von senilen Plaques und neurofibrilläre Tangles (Knäule) in dem Hippokampus von 59 AD-Patienten untersucht.

[0033] **Fig.** 3 beschreibt die Korrelation zwischen apoE4 Allel Kopienzahl und senilen Plaques und neurofibrilären Tanglen in drei verschiedenen Bereichen des Hippokampus, nämlich dem CA1-Subfeld, Subiculum und dem Parasubiculum in Individuen mit verschiedenen apoE4-Allel-Kopienazahlen.

[0034] Der Genotyp wurde bestimmt wie beschrieben für **Fig.** 1. Die Messung seniler Plaque- und Tangledichte wurde durchgeführt wie vorher beschrieben (Aubert I. et al., 1992, J. Neurochem., 58: 529–541). Paraffin-eingebettete Hippokampusgewebe von 59 AD-Patienten, die einer Autopsie unterzogen wurden, wurden erhalten von der Gehirnbank des Douglas Hospitals und gefärbt mit Hematoxylin und Eosin, modifiziertem Bielchowsky und alkalischem Kongorot. Quantitative morphometrische Einschätzungen von neurofibrillären Bündeln und senilen Plaques wurde wie folgt durchgeführt. Ein Mikrometer-Maßstab wurde zur Kalibrierung verwendet. Lesungen wurden durchgeführt mit einem 10 X-Objektiv für Plaques und 25 X-Objektiv für Tangle. Diffuse Plaques wurden von diesen Messungen ausgeschlossen. Das Screening mit alkalischen Kongorot-Farbstoffen unter polarisierendem Licht wurde verwendet, um die Verlässlichkeit von Tanglefärbung zu kontrollieren und, zu einem geringeren Ausmaß, für senile Plaque-Affinität für die modifizierte Bielchowsky-Präparation. Idiopathische Parkinson-Erkrankung (IPD) wurde diagnostiziert gemäß der Anwesenheit von signifikantem Verlust von pigmentierten Neuronen, Lewy-Körpern in übrigen Neuronen, Makrophagen-klustern und Gliose in den kompakten Teilen der Substantia nigra. Diese sind normalerweise mit klassischen prä-mortalen Eigenschaften von IPD korreliert, wie ruhendem Tremor, Rigidität und Akinesie. Es wurde eine statistische Analyse durchgeführt unter Verwendung des Multivariate General Linear™-Modells als Teil des Systat Statistical Software™-Pakets.

[0035] Die Korrelation zwischen apoE4 Allel Kopienanzahl und der Dichte des senilen Plaques ist sehr stark in allen drei Hippokampus- Regionen die Korrelation zwischen der apoE4 Allel-Kopienanzahl und dem neurofibrillären Tangle- Index war auch signifikant für CA1 und die Subiculum-Bereiche. Diese Ergebnisse unterstützen das Konzept, dass apoE4 eine Rolle in der Pathophysiologie von AD spielt.

[0036] Es wurde gezeigt, dass Gehirnphospholipide, wie PC und PE eine wichtige Rolle in der Verfügbarkeit von Cholin, dem limitierenden Vorläufer von Acetylcholin (Ach), spielt. Cholin-Spiegel im Gehirn werden um 40–50% im. frontalen und parietalen Kortex von AD verringert (Nitch R. M. et al., 1992, Prod. Natl. Acad. Sci., 89: 1671–1675). Ähnlich ist Cholesterin offensichtlich erforderlich für die korrekte Funktion von einigen cholinergischen Rezeptor-Subtypen (Jones O. T. & McNamee M. G., 1988, Biochemistry, 27: 2364–2374). Auf der Basis des möglichen Zusammenhangs zwischen apoE4, senilem Plaque und neurofibrillären Tangle-Anzahlen und Ach haben wir die nächstmögliche Assoziation zwischen der Anwesenheit von apoE4 und cholinergischer Dysfunktion, einem klassischen Kennzeichen von AD, bewertet (Bowen D. M. et al., 1981, N. Engl. J. Med., 305: 1016; Whitehouse PJ et al., 1982, Science, 215: 1237), Wir haben unsere Aufmerksamkeit auf die Bestimmung von ChAT-Aktivität konzantriert, dem Schlüsselenzym, das in der Synthese von Ach involviert ist, im postmortalen Hippokampus und im temporalen Kortex von Individuen, die an AD litten, und in Kontrollpersonen.

[0037] **Fig.** 4 und 6 stellen die Wirkung der Anwesenheit der apoE4-Isoform auf die ChAT-Aktivität im hippokampalen und temporalen Kortex dar.

[0038] Die linke Hemisphäre, die geeignet ist für biochemische Assays, wurde schnell in dicke (10 mm) Koronalscheiben geschnitten und in 2-Methylbutan bei –40°C tiefgefroren, bevor sie bei –80°C gelagert wurden. Gewebe von hippokampalen und temporalen kortikalen Bereichen wurden homogenisiert und für 15 min inkubiert in Puffer mit [^{14}C] Acetyl-CoA, wie vorher an anderer Stelle beschrieben (Aubert I. et al., 1992, J. Neurochem. 58: 529–541). Die postmortale Diagnostik wurde durchgeführt, wie für **Fig.** 3 beschrieben. Der Apolipoprotein-E-Genotyp wurde wie für **Fig.** 1 beschrieben bestimmt.

[0039] In apoE4-Trägern wurden hoch signifikante Verringerungen der ChAT-Aktivität festgestellt. In dem Hippokampus (22 ADs und 7 Kontrollen) waren die ChAT-Aktivitätswerte jeweils 9,44 ± 0,93 (Kontroll-apoE3/3, kein apoE4-Allel), 6,09 ± 0,36 (AD apoE3/3, kein apoE4-Allel), 3,21 ± 0,31 (AD apoE4/3) und 2,94 ± 1,52 (AD apoE4/4) nmol Ach/mg Protein/h. Statistische Analysen weisen darauf hin, dass Kontroll-apoE3/3-ChAT-Werte sich signifikant von denen der AD-apoE3/3-Gruppe ($p < 0,05$) und denen der apoE4/3-Gruppe ($p < 0,0001$) unterscheiden, wo-

hingegen AD-apoE3/3-ChAT-Spiegel sich signifikant von der AD-apoE4/3-Gruppe ($p < 0,0001$) und wahrscheinlich der apoE4/4-Gruppe unterscheiden, obwohl aufgrund der begrenzten Anzahl von erhältlichen apoE4-Homozygoten eine statistische Auswertung nicht durchgeführt werden konnte. Ähnliche Ergebnisse wurden in temporalen Kortex erhalten (26 ADs und 7 Kontrollen) mit ChAT-Aktivitätswerten von jeweils 7,48 ± 0,74 (Kontroll-apoE3/3), 5,65 ± 0,33 (AD apoE3/3), 2,91 ± 0,66 (AD apoE4/3) und 1,56 ± 0,47 (AD apoE4/4) nmol Ach/mg Protein/h. Statistische Analysen weisen darauf hin, dass Kontroll-apoE3/3-ChAT-Werte sich signifikant von allen AD-Gruppen ($p < 0,05$) für apoE3/3 und $p < 0,001$ apoE4/3) unterscheiden, wohingegen AD apoE3/3 ChAT-Spiegel sich signifikant von der AD apoE4/3-Gruppe ($p < 0,002$) und der apoE4/4-Gruppe ($p < 0,02$) unterscheiden.

[0040] Die apoE4 Allel kopienanzahlabhängige Reduktion der ChAT-Aktivität könnte durch wienigstens zwei unterschiedliche Phänomene verursacht werden. Erstens, Phospholipide, wie PC und PE, die als Vorläufer von Cholin in der Synthese von Ach dienen können, könnten in Neuronen über den klassischen apoE-LDL-Rezeptor-Weg transportiert werden. Eine Isoform-abhängige verschlechterte Regulation des Transport von Phospholipiden in dem Gehirn von apoE4-Trägern könnte die reduzierten Spiegel von PC, PE und Cholin, die bei AD berichtet werden, erklären; dies führt dann zu verringerten ACh-synthetischen Kapazitäten. Alternativ könnte die Reduktion der neuronalen ChAt-Aktivitäten und Cholin-Spiegel zweitrangig für die Verluste von cholinergischen Neuronen in dem basalen Vorderhirn sein, einschließlich des Meynert'schen Nukleus Basalis (NBM), dem Broca'schen Diagonalband (DBB) und dem Septalbereich. Die Analyse der Anzahl von Acetylcholinesterase-positiven Neuronen in dem NBM und DBB von einer geringen Anzahl von AD-Patienten ($n = 7$) offenbarte markante Verluste von cholinergischen Neuronen in apoE4 im Vergleich zu apoE3-Homozygoten-AD-Fällen (↓70% in NBM und ↓45% in BDD, **Fig.** 5).

[0041] Diese Ergebnisse weisen klar darauf hin, dass es verschiedene genetische Einheiten in sporadischer AD gibt, die einen unterschiedlichen Grad der Veränderung der cholinergischen Aktivität zeigen, wie wenigstens durch ChAT-Aktivität offenbart. Unsere Daten legen auch nahe, dass die cholinergische Funktion in AD-E3/3-Trägern überflüssig sein könnte und dass diese Patienten besser auf eine cholinomimetisch basierte Therapie ansprechen könnten; diese Hypothese wird nachstehend im Detail diskutiert. Die cholinergische Hypothese der geriatrischen Erinnerungsdysfunktion, wie von Bartus und Kollegen vor mehr als 10 Jahren rezensiert (Bartus R. T. et al., 1982, Science, 217: 408–417) warf einige grundlegende Fragen bezüglich der Heterogenität des Ansprechens auf verschiedene Cholinomimetika in AD auf. Das Fehlen von deutlichen nützlichen Wirkungen von Cholin und Lezithin auf geriatrische Patienten mit und ohne Ad ist immer noch verblüffend. Weiterhin haben viele klinische Untersuchungen unter Verwendung von Esteraseinhibitoren, wie Physostigmin und Tracin, gezeigt, dass im Gegensatz zu jungen Testpersonen die optimale akute Dosis, die notwendig ist, um die Durchführung von Erinnerungsaufgaben zu erleichtern, beachtlich unter Testpersonen unterschiedlichen Alters variierten (Bartus R. T. et al., 1982, Science, 217: 408–417). Im nachstehenden Beispiel II wird die Wirkung des apoE Genotyps auf die Arzneimittelwirksamkeit untersucht.

[0042] Somit scheint es so zu sein, dass die Anwesenheit des apoE4-Allels einer der Schlüsselfaktoren zu sein scheint, der verantwortlich ist für individuelle Unterschiede, die im cholinergischen System des Gehirns auftreten und individuelles Ansprechen auf cholinergische Mittel sollten in Patienten, deren Gentyp bestimmt wurde, beobachtet werden. Dieses Ergebnis wird sicherlich signifikante Wirkung auf den Aufbau von zukünftigen klinischen Untersuchungen von AD haben. Vorausschauende-zurückschauende Analysen von AD-Patienten mit entweder gutem oder schlechtem Ansprechen auf Cholinomimetika sind in Beispiel II diskutiert.

[0043] Als Schlussfolgerung wurde gezeigt, dass die Anwesenheit von apoE4 eng mit drei Merkmalen der Pathophysiologie von AD assoziiert ist, nämlich senilen Plaques, Tanglen und ChAT-Aktivität. Der Zusammenhang zwischen apoE und diesen drei etablierten Markern der AD-Pathologie ist stark abhänaig von der Anzahl der Kopien des E4-Allels. Diese Ergebnisse könnten auch frühere Beobachtungen erklären, die darauf hinweisen, dass die apoE4-Allel-Kopienanzahl korreliert ist mit dem Alter des Einsetzens von familiärer (Corder E. H. et al., 1993, Science, 261: 921–923) und sporadischer AD (Pointer J. et al., 1993, Apolipoprotein E phenotype and Alzheimer's Disease, Lancet, 342: 697–699).

[0044] Da die Anwesenheit von apoE4 eine direkte Wirkung auf cholinergische Aktivität im Gehirn zu haben scheint, wird schließlich vorgeschlagen, dass klinische Untersuchungen, die auf Cholinomimetika-basierende Therapien einschließen, die Tatsache berücksichtigen sollten, dass genetisch unterschiedliche Gruppen bei sporadischer Alzheimer-Erkrankung existieren und dass sie das Vorkommen von entweder guten oder schlechten „Ansprechern" erklären können.

[0045] Da die cholinomimetischen Arzneimittel verwendet werden können, um kognitive Leistungen in nicht Alzheimer-erkrankten Testpersonen (jung und alt) zu steigern, können die Ergebnisse der vorliegenden Erfindung weiterhin darauf hinweisen, dass kognitive Leistung wiederhergestellt werden kann, sogar gesteigert werden kann durch die Verabreichung von Cholinomimetika, wie Acetylcholin-Agonisten (M1-Agonist: Xanomelin von Eli Lilly), M2-Rezeptor-Antagonist (BIBN-99 von Boehringer Ingelheim), Inhibitoren des Acetylcholin-Abbaus, wie Tacrin (Par-

ke-Davis) oder E-2020 (Pfizer) in Testpersonen, die apoE2 oder apE3 tragen, jedoch nicht apoE4.

[0046] Die vorliegende Erfindung ist leichter zu verstehen durch Bezugnahme auf die folgenden Beispiele, die gegeben sind, um die Erfindung zu erklären.

BEISPIEL I

Zusätzliche neurochemische Veränderungen und therapeutische Antwort in Testpersonen, die mit Cholinomimetika behandelt wurden

Postmortale Untersuchung von cholinergischem Marker

[0047] Fallauswahl und apoE Genotypisierung: Gefrorene Gewebe von 84 durch Autopsie bestätigten Fällen sporadischer AD (35 Frauen, 77,3 ± 8,7 Jahre: 49 Männer, 76,1 ± 9,5 Jahre) und von 14 Kontrollindividuen (8 Frauen, 71,6 ± 3,6 Jahre; E Männern, 66,4 ± 3,1 Jahre) wurden von der Douglas Hospital-Gehirnbank in Montreal, Kanada, erhalten. Die durchschnittliche postmortale Verzögerung war 17,2 ± 1,3 und 20,0 ± 4,6 Stunden für jeweils AD- und Kontroll-Tastpersonen. Es sollte zur Kenntnis genommen werden, dass die Erhältlichkeit von apoE4/4-homozygoten Testpersonenn sehr begrenzt ist, wahrscheinlich aufgrund der Tatsache, dass apoE4/4-homozygote Individuen weniger als 1% der Gesamtbevölkerung darstellen.

[0048] DNA mit hohem Molekulargewicht zur Genotyp-Analyse wurde von gefrorenem Cerebellum oder temporalem Kortex isoliert, wie übernommen von (Nalbantoglui J. et al., 1994, Predictive value of apolipoprotein E4 mutation in Alzheimer's Disease, Ann. Neurol. 36: 889– 895). Der apoE Genotyp wurde bestimmt durch Allel-spezifische Verlängerung von gereinigter Gehirn-DNA unter Verwendung von (Nalbantoglu J. et al., 1994, Predicitve value of apolipoprotein E4 mutation in Alzheimer's Disease, Ann. Neurol. 36: 889–895). Die Primer, die als D, E, F, G und N bezeichnet wurden, wurden für uns von Genosys Biotechn (The Woodland, TX) synthetisiert; Primer-Sequenzen wurden angegeben in Main et al. (Main R. F. et al., 1991, J. Lipid. Res., 32: 183–187). Die Reaktionen wurden durchgeführt in einem Volumen von 50 µl enthaltend 1 µg DNA; Deoxyadenosintriphosphat, Deoxycytidintriphosphat, Deoxythymidintrisphosphat und Deoxyguanosintriphsosphat (Pharmacia, Montreal, KANADA), jeweils 0,2 mmol/L; 10% Dimethylsulfoxid; 12,5 pmol von einem der Primer D, E, F, G; 25 pmol von Primer H; und 10 µL 10 PCR-REAktionspuffer (Vector Biosystem, Toronto, Kanada. Die DNA in dem Reaktionsgemisch wurde zunächst für 10 min denaturiert bei 96°C und dann auf 4°C abgekühlt. Eine Einheit Taq-Polymerase (Vector Biosystem, Toronto, Kanada) wurde dann in jedem Röhrchen zugegeben. Jede Probe wurde dann wieder für 2 min bei 96°C erhitzt und 30 Zyklen in einem Thermalzykler unterworfen, wobei jeder Zyklus aus einer 10-Sekunden-Danaturierung bei 96°C, 30 sec Anlagerung bei 58°C und 1 min Verlängerung bei 56°C bestand. Die Reaktionsprodukte wurden sichtbar gemacht durch Elektrophorese von 10 µL des Reaktionsgemisches in einem 1%-igen Agarose-Gel enthaltenden TPE-Puffer (0,08 mol/L Trisphosphat, 0,002 mol/L EDTA, Sigma, St.-Louis, USA) und Ethidiumbromid (0,15 µg/ml) für 1 Std. bei 67 V. Die Gele wurden dann fotografiert und die Bandenprofile wurden mit bekannten Standards verglichen.

[0049] Neuropathologische Analysen: Anzeichen für neurofibrilläre Tangle und senile Plaques wurden bestimmt wie im Detail woanders beschrieben (Aubert I. et al., 1992, J. Neurochem., 58: 529–541; Etienne P. et al., 1986, Neurosciencs, 19: 1279–1291). Fünfzehn Mikrometer paraffin-eingebettete Hippokampus- Schnitte wurden gefärbt mit entweder Hematoxylin oder Eosin, modifizierter Bielchowsky- Färbung und alkalischem Kongorot, um neurofibrilläre Tangle und senile Plaques sichtbar zu machen. Die quantitative morphometrische Auswertung von neurofibrillären Tangle und senilen Plaques wurde bestimmt: Ein Mikrometer-Maßstab für Kalibrierungslesungen wurden durchgeführt mir einem 10 X objektiv für senile Plaques und einem 25 X Objektiv für neurofibrilläre Tangle. Diffuse Plaques wurden von allen Messungen ausgeschlossen. Das Screening von Färbungen mit alkalischem Kongorot unter polarisiertem Licht wurde verwendet als Kontrolle für die Zuverlässigkeit von Bündelfärbung und zu einem geringeren Grad der Affinität der senilen Plaques für die modifizierte Bielchowsky-Präparation. Diese Kriterien sind übereinstimmend mit denen, die in der Klassifizierung von Khachaturian verwendet wurden (Aubert. I. et al., 1992, J. Neurochem., 58: 529–541).

Cholinergische Funktion in dem postmortalen Gehirn von Kontroll- und AD-Testpersonen

[0050] Materialien: [^{3}H]QNB (45,7 Ci/mmol), [^{3}H]PZ (87,0 Ci/mmol), [^{3}h]AF-DX 116 (49,3, 57,0 oder 70,0 Ci/mmol), [^{3}H]MCC (84,5 Ci/mmol) und [^{14}C] Acetyl-CoA (48,8 mCi/mmol) wurden von New England Nuclear (Boston, MA, U.S.A.) gekauft. Nikotin (freie Base), Atrpoinsulfat, Cholinchlorid und Eserinhemisulfat-Salze wurden von Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.) gekauft. ACh-Chlorid wurde zur Verfügung gestellt von Hoffmann-LaRoche (Basel, Schweiz). Unmarkiertes Acetyl-CoA wurde von Boehringer Mannheim (Mannheim, BRD) bezogen. Tetraphenylbor (Natriumsalz) und 3-Heptanon wurden von Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, U.S.A.) gekauft. Ethylacetat wurde gekauft von American Chemicals Co. (Montreal, Quebec, Kanada). Rinderserumalbumin (98% fettsäurefrei) und Ecolite-Szintillationscocktail wurde bezogen von ICN Biochemicals (Irvine, CA, U.S.A.). Triton™ X-100 (100%) Szintillationsklasse war von Amersham (Arlington, IL, U.S.A.). Alle anderen Chemikalien waren von Fisher Scientific

(Montreal, Quebec, Kanada).

[0051] Humane Gehirngewebe werden erhalten bei der Autopsie von Individuen, die klinisch als AD, PD oder PD/AD diagnostiziert sind und von neurologisch normalen Kontrollen passenden Alters. Die Gewebe werden zur Verfügung gestellt von der Gehirnbank des Douglas Hospitals Research Centers (Y. Robitaille, Neuropathologe). Die histopathologischen Kriterien wurden vorher beschrieben. Die Hemisphären, die für biochemische Assays verwendet werden sollen, werden schnell in dicke (10 mm) Koronalscheiben geschnitten und tiefgefroren in 2-Methylbutan bei –40°C vor der Lagerung bei –80°C. Vor den biochemischen Assays werden die Gehirnschnitte langsam auf einer kalten Plätte aufgetaut und die folgenden Strukturen werden wie folgt präpariert: frontal (Brodman-Bereiche 9 und 10) und temporal (Brodman-Bereiche 20, 21, 22, und 38) Kortizes, Hippokampus und Carebellum (Verwendung als ein gering-pathologischer Gehirnbereich).

Analyse der Ergebnisse:

[0052] Bindungsparameter (K_d- und B_{max}-Werte) wurden abgeleitet von den Sättigungsexperimenten, analysiert durch das computer-gestützte Verfahren LIGAND™ (Aubert I. et al., 1992, J. Neurochem., 58: 529–541). Die statistische Signifikanz von Unterschieden zwischen Kontroll- und AD- (0, 1, 2 Kopien der E4-Allele) Gehirn wurde ausgewertet unter Verwendung des „ungepaarten Studenten-t-Tests (Stutent's unpaired t test), wobei Werte von $p < 0,05$ als signifikant eingeschätzt wurden.

Assay der Cholinacetyltransferase (ChAT) Aktivität:

[0053] Gewebe von verschiedenen Gehirnregionen wurden homogenisiert und für 15 min inkubiert in Puffer, enthaltend [^{14}C]Acetyl-CoA, wie vorher im Detail beschrieben (Aubert I. et al., 1992, J. Neuorochem., 58: 529–541), um die ChAT-Aktivität zu bestimmen.

[0054] Viele biochemische und anatompathologische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Immunoreaktivitäten und Aktivitäten der cholinergischen Markerenzyme, wie ChAT, sich in dem Neokortex genauso wie in dem Hippokampus von Patienten mit AD verringern. Wie in **Fig.** 6 gezeigt, ist die apoE4-Allel-Kopienanzahl umgekehrt korreliert mit der ChAT-Aktivität im Hippokampus und im temporalen Kortex von im Alter übereinstimmenden Kontroll- und AD-Testpersonen. Jeder Balken aus **Fig.** 6 bezieht sich auf einen Mittelwert ± Standardabweichung (S.E.M.). Signifikante Unterschiede zwischen Gruppen sind durch die Anzahl von Sternen angezeigt: *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: <0,0001. Auffallende Reduktionen der ChAT-Aktivität wurden in apoE4-Trägern beobachtet. ChAT-Werte sind in **Fig.** 4 dargestellt im Hippokampus (23 ADs und 30 Kontrollen) und temporalen Kortex (30 ADs und 12 Kontrollen) von AD-Testpersonen mit unterschiedlichen Dosen der apoE4-Allel.

[0055] Statistische Analysen zeigen, dass ChAT-Spiegel in AD-Testpersonen (mit 1 oder 2 Kopien von apoE4) sich signifikant von AD von Kontrolltestpersonen (mit 0 oder 1 Kopie von apoE4) unterscheiden.

[0056] Acetylcholinesterase- positive Neuronendichte in den subkortikalen Bereichen, die zum temporalen Kortex und zu Hippokampus- Strukturen vorspringen, sind dargestellt in **Fig.** 7. Die neuronale Zelldichte in Ch2, Ch4a und Ch4i ist dargestellt als Prozent der Kontrollwerte. Das Nukleolus- Volumen ist dargestellt in μm^2. Die Plaque-Dichte ist dargestellt als Anzahl pro mm^3 in dem Hippokampus der gleichen Patienten. Teile dieser Ergebnisse wurden publiziert durch Etienne & Kollegen (1986, Neuroscience, 19: 1279–1291). Der Genotyp dir ursprünglichen Patienten war unbekannt und konnte dann nicht festgestellt werden. Seitdem naben wir die Daten reanalysiert in Testpersonen, von denen der Genotyp bestimmt werden konnte. Drei AD-Testpersonen waren apoE4-nagativ, wohingegen vier AD-Testpersonen apoE4-positiv waren. Diese Ergebnisse bestätigen klar vorherige Ergebnisse, dass AD-Testpersonen einen markanten Verlust von cholinergischen Neuronen in Ch2, Ch4a und Ch4i zeigen, allerdings betonen sie auch die Tatsache, dass die Anwesenheit des apoE4-Allels den Verlust von Neuronen in Ch2 und Ch2a ($p < 0,01$) und Ch4i ($p < 0,05$) signifikant potenziert.

Bindung von [^{3}H]QNB an Gesamtpopulationen von Muscarin-Stellen:

[0057] Ausgestanzte Proben von kortikalen und subkortikalen Geweben von Kontrolltestpersonen und AD-Gehirnen werden homogenisiert, zentrifugiert und in Krebspuffer, wie früher im Detail für [^{3}H]PZ-Assay beschrieben, resuspendiert. Die letzten Membranpellets werden in Puffer suspendiert bei einer Konzentration von etwa 3,0–5,0 mg Protein/ml. Aliquots von membranangereicherten Homogensten (0,6–1,0 mg Protein) werden in Krebspuffer in der Anwesenheit einer gesättigten Konzentration von [^{3}H]QNB (10 nmol) für 60 min bei Raumtemperatur (23°C) in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml inkubiert. Alle Assays werden zweifach durchgeführt. Gebundenes [^{3}H]QNB wird von dem freien Liganden getrennt durch schnelle Filtration unter reduziertem Druck durch Schleicher & Schuell Glasfilter Nr. 32, vorgetränkt in 0,1% Polyethylenimin-Lösung unter Verwendung einer Brandel-Zellerntevorrichtung (Harvester apparatus) (Brandet, Gaithersburg, MD, U.S.A.). Die Filter werden dann schnell mit eiskaltem Puffer gewaschen, dreifach mit 4,5 ml jeweils, bevor sie getrocknet werden. Die Radioaktivität der Filter wird bestimmt durch Flüssigkeitsszintillationszählung unter Verwendung eines Beckman-Modells LS7000 Szintillationszählers bei 48% Effizienz. Unspezifische Bindung, bestimmt in der Anwesenheit von 1 μM At-

ropinsulfat, stellt gewöhnlich <15% der Gesamtbindung dar.

Bindung von [^{3}H]PZ an humane Gehirn-Muscarin-M1-Stellen:

[0058] Gehirngewebe werden aufgearbeitet wie früher vorstehend beschrieben. Aliquots von Endhomogenaten werden in Krebspuffer mit verschiedenen Konzentrationen von [^{3}H]PZ (0,1–20 nM) für 60 min bei Raumtemperatur (23°C) inkubiert. Die Assays werden beendet und die Radioaktivität wird bestimmt, wie vorstehend für [^{3}H)] QNB-Bindung beschrieben. Nicht-spezifische Bindung, bestimmt in der Anwesenheit von Gesamtbindung bei Ligandenkonzentrationen von etwa K_d-Werten.

Bindung von [^{3}H]AF-DX 116 an mutmaßliche humane Gehirnmuscarin-M2-Stellen:

[0059] Gehirngewebe werden aufgearbeitet wie vorstehend für [^{3}H]QNB beschrieben. Aliquots von Endhomogenaten werden in Krebspuffer mit verschiedenen Konzentrationen von [^{3}H]AF-DX 116 (0,1–20 nM) für 60 min bei 4°C inkubiert. Die Assays werden beendet und die Radioaktivität wird bestimmt, wie vorstehend für [^{3}H)]QNB-Bindung beschrieben. Nichtspezifische Bindung, definiert in der Anwesenheit von 1 µM Atropinsulfat, stellt gewöhnlich < 40% der Gesamtbindung dar bei Ligandenkonzentrationen von etwa K_d-Werten.

[0060] Muskarinische Bindestellen (insgesamt M1 oder M2) sind im Hippokampus von AD im Vergleich zu Kontrolltestpersonen nicht verändert. Der apoE4-Genotyp hat keine signifikante Wirkung auf die Aktivität dieser Rezeptoren. Muskarinische M1 und M2-Rezeptorstellen sind im temporalen Kortex von AD im Vergleich zu Kontrolltestpersonen nicht verändert, wohingegen die sog. gesamt-(QNB)-muskarinischen Bindestellen leicht reduziert sind in AD im Vergleich zu Kontrolltestpersonen (keine Genotyp-Wirkung auf diese Rezeptorgruppe).

Bindung von [^{3}H]MCC an humane Gehirnnikotinstellen:

[0061] Gehirngewebe werden aufgearbeitet wie vorstehend für [^{3}H]QNB beschrieben mit der Ausnahme, dass die Proben in 50 mM Tris-HCl-Puffer homogenisiert wurden. Aliquots von Endhomogenaten wurden in 50 mM Tris-HCl-Puffer mit verschiedenen Konzentrationen von [^{3}H]MCC (0,1–20 nM) für 60 min bei 4°C inkubiert. Die Assays wurden beendet und die Radioaktivität wird bestimmt wie vorstehend für [^{3}H]QNB-Bindung beschrieben. Unspezifische Bindung, bestimmt durch die Anwesenheit von 10 µM Nikotin, stellt gewöhnlich <50% der Gesamtbindung dar bei Ligandenkonzentrationen von etwa K_d-Werten.

[0062] Nikotinrezeptor-Bindestellen sind signifikant reduziert in apoE4-AD-Testpersonenn, wohingegen AD-Testpersonen, die nicht apoE4 tragen, sich nicht von Kontrolltestpersonen unterscheiden. Dies gilt für sowohl die Hippokampus- als auch die temporalen Bereiche in AD.

[0063] Untersuchungen, die in unserem Labor durchgeführt wurden, weisen darauf hin, dass trotz deutlicher Deafferenzierung und neuralen Zellverlusten im Hippokampus von AD-Testpersonen die apoE-Proteinspiegel unverändert bleiben oder verringert in apoE4-Trägern; dies steht in Einklang mit unserem früheren Bericht unter Verwendung von nicht-phenotypisierten AD-Testpersonen. Das apoE4-Allel ist am Rande mit abnormal geringen Spiegeln von apoE und hohen Konzentrationen von zirkulierenden Lipoproteinen, gesteigerten Mengen von Plasma- und LDL-Colesterin, veränderter Lipoprotein-Verteilung und am wichtigsten mit dem schneilen Katabolismus von apoE4 im Vergleich zu apoE3 assoziiert (Gregg R. E. et al., 1986, J. Clin. Invest., 87: 815–821). Dies kann nahe legen, dass apoE4 anders metabolisiert wird als apoE3 und könnte somit die Störungen der Lipidhomeostase, die in AD-Gehirnen beobachtet wird, erklären. Beispielsweise sind Phosphatidylcholin- (PC), Phosphatidylethanolamin- (PE) und Cholesterinspiegel alle signifikant reduziert in AD-Gehirnen {Pettegrew J. W., 1989, Ann. NY Acad. Sci., 568: 5–28; Nitch R M et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci., 89: 1671–1675) und es wurde gezeigt, dass sie invers mit der Anzahl von senilen Plaques in Kontrollschichten II und IV korreliert sind (Pettegrew J. W., 1989, Ann. NY Acad. Sci., 568: 5–28).

[0064] Es wurde gezeigt, dass die Gehirnmembran-Phospholipide, insbesondere PC und PE, wichtige Rollen in der Erhältlichkeit von Cholin spielen, einem geschwindigkeits-(rate)-limitierenden Vorläufer von Acetylcholin (Ach) (Nitch R M et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci., 89: 1671–1675). Die Entlassung von freien Cholinvorläufern für ACh-Synthese aus PC wird in einem Ein-Schritt-Verfahren erreicht durch ein Enzym des Phospholipase-D-Typs in cholinergischen Neuronen (Lee H. E. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Aci. USA, 90: 10086– 10090). Spiegel von Cholin im Gehirn sind bis zu 40–50% in den frontalen und parietalen Kortizes von AD-Patienten verringert (Nitch R M et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 1671– 1675). Ähnlich wird Cholesterin offensichtlich für die ordnungsgemäße Funktion des Nikotin-Rezeptors benötigt (Jones O. T. & McNamee M. G., 1988, Biochemistry, 27: 2364–2374). Da Verluste der cholinergischen Neuronen und/oder ChAT-Aktivität gut bekannte klassische Merkmale von AD sind (Perry E. K. et al., 1977, J. Neurol. Sci., 34: 247–265; Davies P. et al., 1976, Lancet, 2: 1403), wurde eine mögliche Verbindung zwischen dem apoE4-Genotyp und cholinergischen Verlusten als hochrelevant zur Untersuchung erachtet. Wir beobachteten, J dass die Reduktion der ChAT-Aktivität in dem Hippokampus und temporalen Kortex von AD-Fällen invers proportional zu der apoE4-Allel-Kopienanzahl ist (d. h., die ChAT-Aktivität ist verringert wie die apoE4-Allel-Ko-

pienanzahl gesteigert ist). Unsere Ergebnisse weisen somit klar auf die Existenz von unterschiedlichen genetischen Gruppen in sporadischer AD hin, die einen unterschiedlichen Grad der Veränderung der cholinergischen Innervation zeigen, wenigstens wie durch zurückbleibende Postmortale ChAT-Aktivität gezeigt. Es wurde auch gefunden, dass, ein weiterer präsynaptischer Marker der cholinergischen Projektion, der Nikotinrezeptor, in apoE4-Ad-Testpersonenn merklich reduziert war. Umgekehrt war der typische post-synaptische Marker, M1-Muscarin-Rezeptor, unverändert in AD im Vergleich zu Kentrolltestpersonen, egal ob apoE4 anwesend ist oder nicht. Der M2-Muscarin-Rezeptor, der ein gemischter prä- und post-synaptischer Marker ist, ist auch durch die apoE4-Allel-Gendosierung unbeeinflusst.

[0065] Die Korrelation zwischen apoE4-Allel-Kopienanzahl und Reduktionen der ChAT-Aktivität und Nikotin-Rezeptoren kann erklärt werden durch wenigstens zwei unterschiedliche Phänomene. Erstens können Phospholipide, wie PC und PE, die als Vorläufer für Cholin in der Synthese von ACh dienen können, in Neuronen transportiert werden über den klassischen apoE-LDL-Rezeptor-Signalweg (Goldstein J. L. et al., 1977, Ann. Rev. Biochem., 46: 897–930). Eine isoformabhängige beeinträchtigte Regulation des Transports von Phospholipiden in dem Gehirn von apoE4-Trägern könnte die reduzierten Spiegel von PC, PE und Cholin erklären, die bei AD beobachtet werden (Pettegrew J. W., 1989, Ann. NY Acad. Sci., 568: 5–28; Nitch R M et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci., 89: 1671–1675), was umgekehrt zu verringerten ACh-Synthesekapazitäten führen könnte. Diese Hypothese ist in Übereinstimmung mit den Membrandefekten, die in AD-Testpersonen beobachtet wurden, wie Veränderungen der Membranfluidität in dem Hippokampus und den Blutplättchen von AD-Patienten. Der Verlust von Cholesterin, der bei AD berichtet wurde, und die Wirkung von apoE4 auf Nikotin-Bindungsaktivität ist in starker Übereinstimmung mit der apoE4/ beeinträchtigten Lipidhomeostase-Hypothese.

[0066] Zusätzlich könnte die Reduktion der neuronalen ChAT-Aktivitäten und Cholin-Spiegel parallel laufen zu dem Verlust von cholinergischen Neuronen in dem basalen Vorhirn, einschließlich des Meynert'schen Nukleolus Basalis (NBM), dem Broca'schen Diagonalband (DBB) und dem Septalbereich. Die Analyse der Anzahl von Acetylcholinesterase- positiven Neuronen in dem NBM und DBB in Genotyp-AD-Patienten offenbarte merkliche Verluste cholinergischer Neuronen in apoE4-Trägern im Vergleich zu apoE3-homozygoten AD-Fällen.

BEISPIEL II

Acetylcholinesterase-Inhibitor(Tracin, Parke-Davis)-Behandlung im Menschen mit Alzheimer-Erkrankung: Wirkung des apoE4-Genotyps

Aufbau der Untersuchung

[0067] Die Tracin-Untersuchungsergebnisse, die hier beschrieben sind, wurden ursprünglich von Knapp, Gracon et al. (1994, Journal American Medical Association, 271: 985–991) veröffentlicht, allerdings waran apoE-Genotypen zu dieser Zeit unbekannt. Die Studie war eine 30-Wochen-Studie, in der Patienten zufällig zu einer von vier Behandlungsgruppen zugeordnet wurden: Placebo- oder ansteigende Dosen von Tracin. In der Tracin-behandelten Gruppe begannen alle Patienten die Behandlung bei 40 mg/Tag. Eine Gruppe steigerte Tracin auf 80 mg/Tag, wobei sie bis zum Ende der Studie blieben. Die anderen zwei Gruppen erhielten Tracin in Dosierungen. die zwischen 80 mg/Tagen bis 120 und 160 mg/Tag gesteigert wurden. Nur die letztgenannte Gruppe von Patienten wurde in der vorliegenden Genotyp-Analyse in Betracht gezogen.

[0068] Vierzig Patienten mit Alzheimer-Erkrankung, die die Maximaldosis von Tracin erhielten (40 mg/Tag für 6 Wochen, 80 mg/Tag für 6 Wochen, 120 mg/Tag für 6 Wochen, 160 mg/Tag für 12 Wochen für insgesamt 30 Wochen) und die Arzneimitteluntersuchung beendeten, wurden ausgewählt, um den apoE-Phenotyp zu bestimmen unter Verwendung von Serumproteinen, wie vorstehend beschrieben (Poirier et al., 1993, Apolipoprotein E phenotype and Alzheimer's Disease, Lancet, 342: 697–699). Die Patientenauswahl erfolgte auf der Basis des Vorliegens oder der Abwesenheit von Arzneimittelantwort auf die Behandlung. Die Alzheimer-Erkrankungsbewertungsskala (ADAS) wurde verwendet, um die Behandlungswirkungen zu überwachen. Die Hälfte der ausgewählten Patienten zeigte ein Ansprechen auf das Medikament (positive ADAS-Unterschiede) oder kein Ansprechen (negative ADAS Delta). Wir untersuchten dann die Wirkung von verschiedenen Genotypen (apoE2/2, 3/2, 3/3, ¾, 2/4 und 4/4) auf therapeutisches Ansprechen unter Verwendung der ADAS-cog und der ADAS-Gesamttestergebnisse, die vor und nach Tracin-Verabreichung erhalten wurden. Der ADAS-cog ist ein objektiver Test, der Erinnerung, Aufmerksamkeit, logisches Denken, Orientierung und Praxis bewertet: ein verringerter Punktestand über die Zeit (oder ein positiver Unterschied) zeigt Verbesserung (Rosen W. G. et al., 1984, Am. J. Psychiatr., 141: 1356–1364). Das Gesamt-ADAS schließt den kognitiven und nicht-kognitiven Teil von ADAS ein.

Cholinergische Arzneimittelantwort in genotypisierten AD-Testpersonen:

[0069] **Fig.** 8 veranschaulicht die Arzneimittelantwort (ADAD-cog und ADAS-Gesamt) von AD-Testpersonen als eine Funktion des apoE4-Allels. Jeder Balken stellt eine individuelle Testperson dar. Positive Delta-Werte (Unterschied in der ADAS-Score am Ende minus ADAS-Score vor der Arzneimittelbehandlung) weist auf eine Verbesserung der kognitiven Funktion (ADAS-cog) hin und in der globalen Funktion (ADAS-Gesamt). Negative Werte stellen Patienten dar, deren zustand sich im Verlauf der Zeit und Arzneimittelbehandlung verschlechterte. All diese Testpersonen sind AD-Testpersonen, alle wurden mit dem gleichen Arzneimittel behandelt auf dem gleichen Niveau für die gleiche Dauer. Der einzige kritische Faktor, der sie unterscheidet, ist die Anwesenheit oder Abwesenheit des apoE4-Allels.

[0070] Die Ergebnisse zeigen klar, dass mehr als 85% der apoE4-nagativen Testpersonen eine Verbesserung mit der Tracin-Verabreichung (ADAS-Gesamt) zeigten, wohingegen sich bei 60% der apoE4-positiven Testpersonen der Zustand infolge der Arzneimittelbehandlung verschlechterte. In anderen Worten, 4 von 5 Testpersonen, die nicht auf Tracin ansprechen, sind apoE4-positiv. Die AD-AC-cog-Skala zeigt ähnliche Antwortprofile bei apoE4-Trägern und Nicht-Trägern.

[0071] Zusammengefasst legen unsere Daten klar nahe, dass cholinergische Funktion in AD-E3/3-, 3/2-, und 2/2-Testpersonenn wenigstens teilweise überflüssig ist im Vergleich zu AD-E4/3-, AD-E4/2- und AD-E4/4-Trägern. Am wichtigsten resultiert diese genetische Empfänglichkeit offensichtlich in Subgruppen von AD-Patienten, die unterschiedlich auf cholinomimetisch basierte Therapien ansprechen; wobei E4-Träger ein höheres Risiko des Verlusts ihrer synthetischen Ach-Kapazitäten haben. Diese Hypothese wurde ausdrücklich in Tracinbehandelten AD-Testpersonen getestet, die verschiedene apoE-Genotypen zeigten. Wie erwartet, wurde herausgefunden, dass apoE4-negative Testpersonen enorm gut auf den Acetylcholinesterase- Inhibitor Tracin ansprechen (einen Acetylmetabolismus-Verstärker) im Vergleich zu apoE4-Trägern.

[0072] Die cholinergische Hypothese der geriatrischen Erinnerungsdysfunktion (Bartus R. T. et al., 1982, Science, 217: 408–417) wirft einige fundamentale Fragen bezüglich der beobachteten Heterogenität von klinischem Ansprechen auf verschiedene Cholinomimetika in verschiedenen AD-Patienten auf. Die Abwesenheit von klaren Verbesserungswirkungen von Cholin und Lecithin in geriatrischen Patienten mit und ohne AD war immer sehr verwirrend. Weiterhin haben klinische Untersuchungen, die auf der Verwendung von Esteraseinhibitoren, wie Physostigmin (Davis, K. L. et al., 1979, N. Engl. J. Med., 301: 946–951) und Tracin (Davis K. L. et al., 1992, N. Engl. J. Med., 327: 1253–1259) basieren, gezeigt, dass im Gegensatz zu jungen Testpersonen die optimale, akut notwendige Dosis, um die Aufgabe von Erinnerungsfunktionen zu erleichtern, unter Kontrolltestpersonen individuellen Alters und AD-Patienten erheblich variierte.

[0073] Die Anwesenheit des apoE4-Allels scheint nun der wichtigste Faktor zu sein, der verantwortlich ist für individuelle Unterschiede in der cholinergischer Restgehirn-Innervation in AD und sagt das klinische Ergebnis von cholinergisch-basierten Therapien vorher. Das klinische Ansprechen auf cholinergische Mittel, das in genotypisierten AD-Patienten beobachtet wurde, demonstrierte, dass apoaE4-Träger wenigstens bei der Verwendung von ACh-Vorläufern und Esterase-basierten Therapien wahrscheinlich nicht gut ansprechen.

Patentansprüche

1. Verwendung eines cholinomimetischen Agens zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung bei der Behandlung genetisch charakterisierter Alzheimer-Patienten durch ein Verfahren, umfassend:
a) Bestimmung der Anwesenheit des Allels für die Apolipoproteine E2 und E3 oder der Abwesenheit des Allels für Apolipoprotein E4 in peripheren Geweben des Patienten, die das Ausmaß der Beeinträchtigung der Acetylcholinsynthese und der Aktivität des Nikotinrezeptors im Gehirn anzeigt; und
b) Verabreichung des Medikaments gemäß dem Ausmaß der Beeinträchtigung, das in Schritt a) bestimmt wurde.

2. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei das cholinomimetische Agens ausgewählt ist aus Inhibitoren des Acetylcholinabbaus, Induktoren der Acetylcholinsynthese, Acetylcholin-Agonisten oder -Mimetika, und muskarinischen M2-Rezeptor-Antagonisten.

3. Verwendung gemäß Anspruch 2, wobei die Anwesenheit des Allels für die Apolipoproteine E2 und E3 oder die Abwesenheit des Allels für Apolipoprotein E4 direkt durch Genotypisierung oder indirekt durch Phänotypisierung bestimmt wird.

4. Verfahren zur Bereitstellung von Daten, die für einen Krankenhausarzt nützlich sind, um eine Angabe bezüglich der Prädisposition eines menschlichen Patienten zu machen, auf Cholinomimetika-basierte Therapien anzusprechen, wobei der Patient kognitive Beeinträchtigungen aufgrund von Alter, Alzheimer-Erkrankung oder anderen neurodegenerativen Erkrankungen aufweist, umfassend die Bestimmung der Kopienzahl der apoE2 und apoE3 Gen-Allele oder der Abwesenheit des apoE4 Gen-Allels in einer biologischen Probe dieses Patienten und die Analyse dieser Daten, wobei die Anwesenheit der Gen-Allele für apoE2 und/oder apoE3 oder die Abwesenheit von apoE4 auf eine Prädisposition hinweist, auf Therapien anzusprechen, die auf Cholinomimetika basieren.

5. Verfahren gemäß Anspruch 4, wobei die Anwesenheit des Allels für die Apolipoproteine E2 und E3 oder die Abwesenheit des Allels für das Apolipoprotein E4 direkt durch Genotypisierung mit geeigneten apoE2- und apoE3-Sonden oder indirekt durch Phänotypisierung bestimmt wird.

6. Verfahren zur Bereitstellung von Daten, die für einen Krankenhausarzt nützlich sind, um eine Angabe bezüglich Alzheimer-Patienten zu machen, die auf kognitive Verstärker und cholinomimetische Therapien ansprechen können, umfassend die Bestimmung der Kopienzahl der apoE2 und apoE3 Gen-Allele oder der Abwesenheit des apoE4 Gen-Allels in einer biologischen Probe dieses Patienten und die Analyse dieser Daten, wobei die Anwesenheit der Gen-Allele für apoE2 und/oder apoE3 oder die Abwesenheit von apoE4 auf eine Prädisposition hinweist, auf Therapien, die auf Cholinomimetika basieren, anzusprechen.

7. Verfahren gemäß Anspruch 6, wobei die Anwesenheit des Allels für die Apolipoproteine E2 und E3 oder die Abwesenheit des Allels für das Apolipoprotein E4 direkt durch Genotypisierung mit geeigneten apoE2 und apoE3-Sonden oder indirekt durch Phänotypisierung bestimmt wird.

8. Verwendung eines cholinomimetischen Agens zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung bei der Behandlung menschlicher Patienten mit kognitiven Beeinträchtigungen aufgrund von Alter, Alzheimer-Erkrankung oder anderen neurodegenerativen Erkrankungen, umfassend:
a) Bestimmung der Anwesenheit des Allels für die Apolipoproteine E2 und E3 oder der Abwesenheit des Allels für Apolipoprotein E4 in einer biologischen Probe des Patienten, wobei die Anwesenheit des Allels für Apolipoprotein E2 und E3 oder die Abwesenheit des Allels für Apolipoprotein E4 auf eine Prädisposition des Patienten hinweist, auf eine Therapie mit dem cholinomimetischen Agens anzusprechen;
b) Verabreichung des Medikaments.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

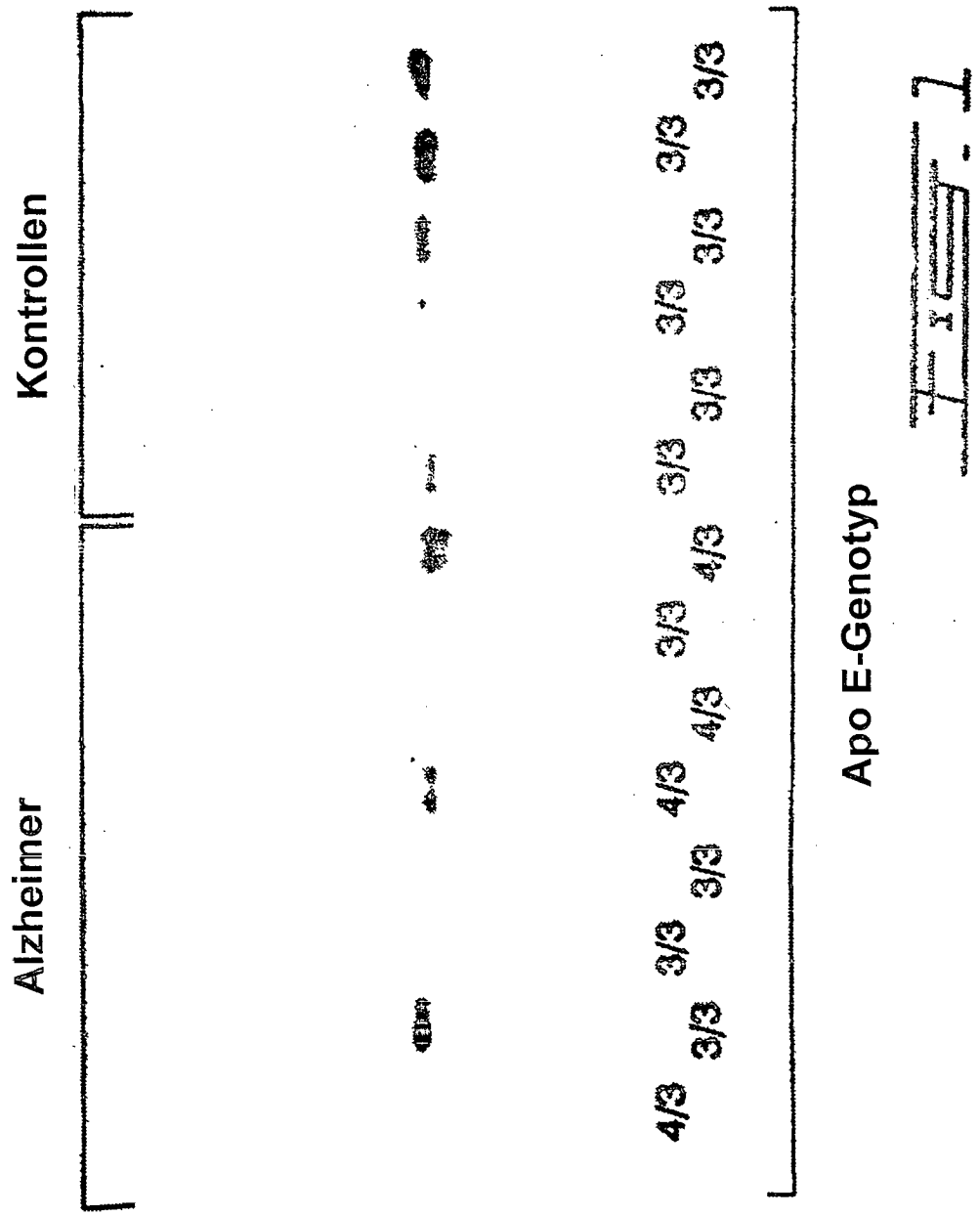


Fig. 1

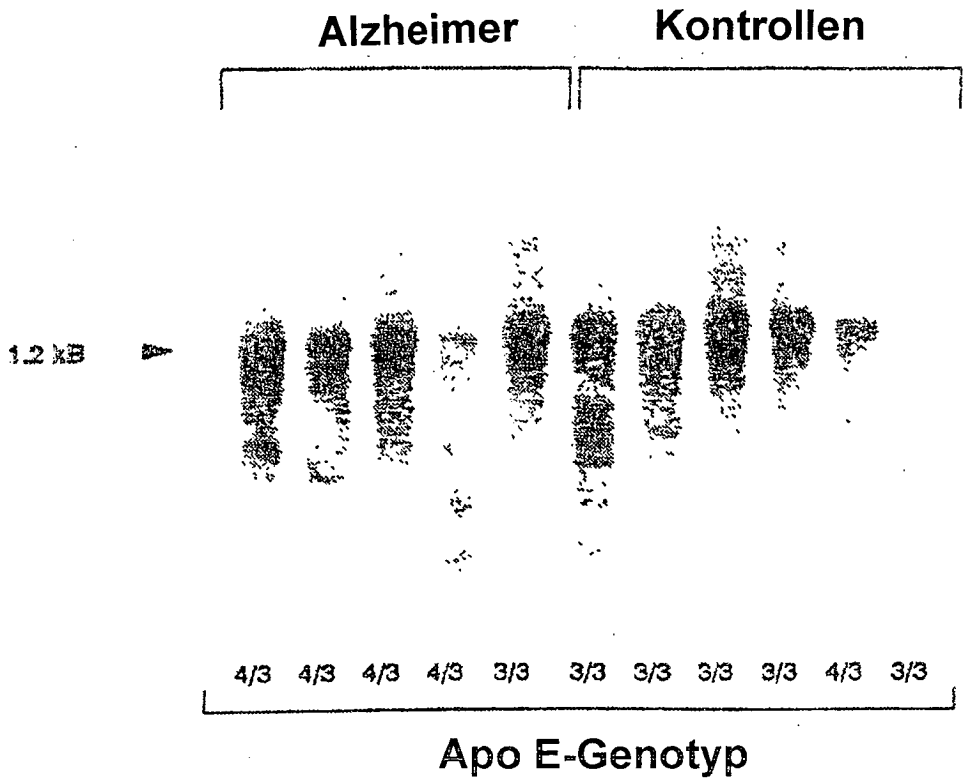
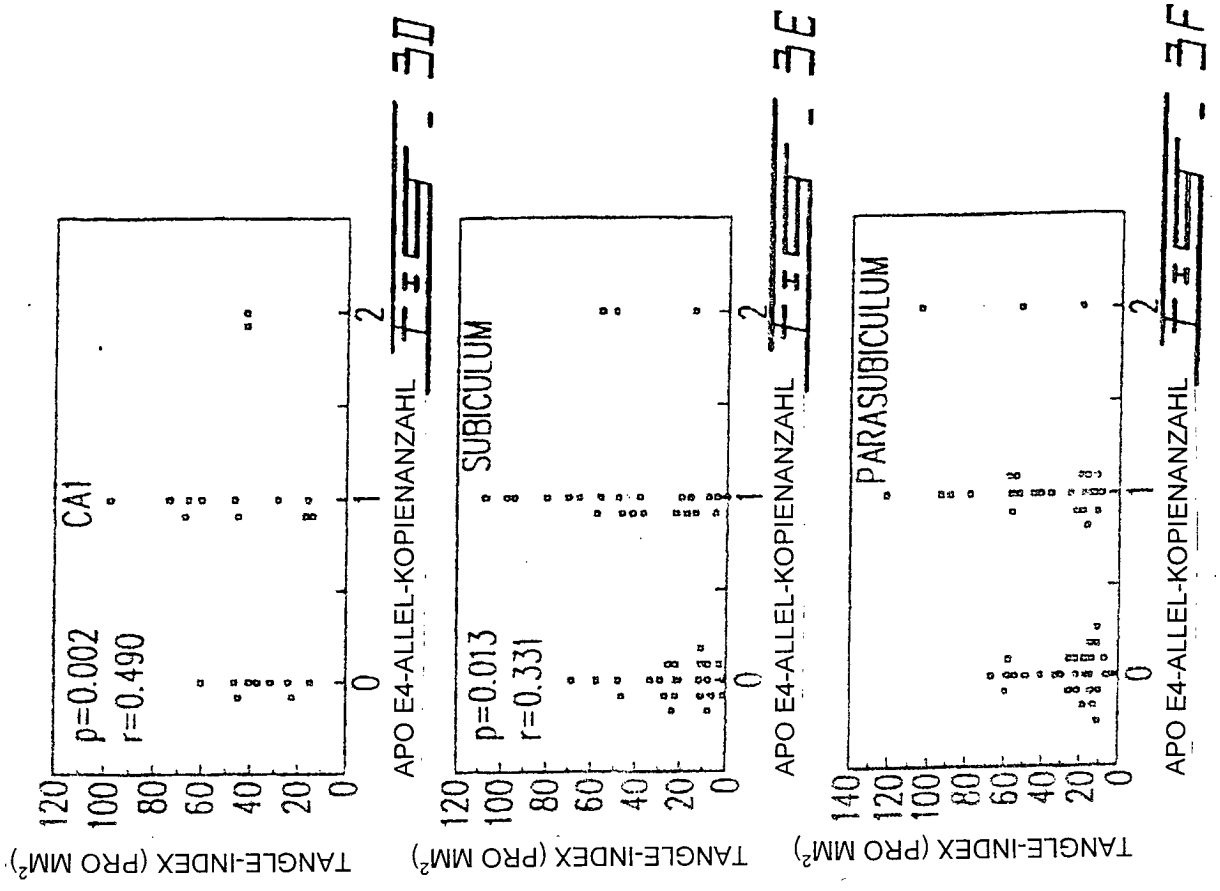
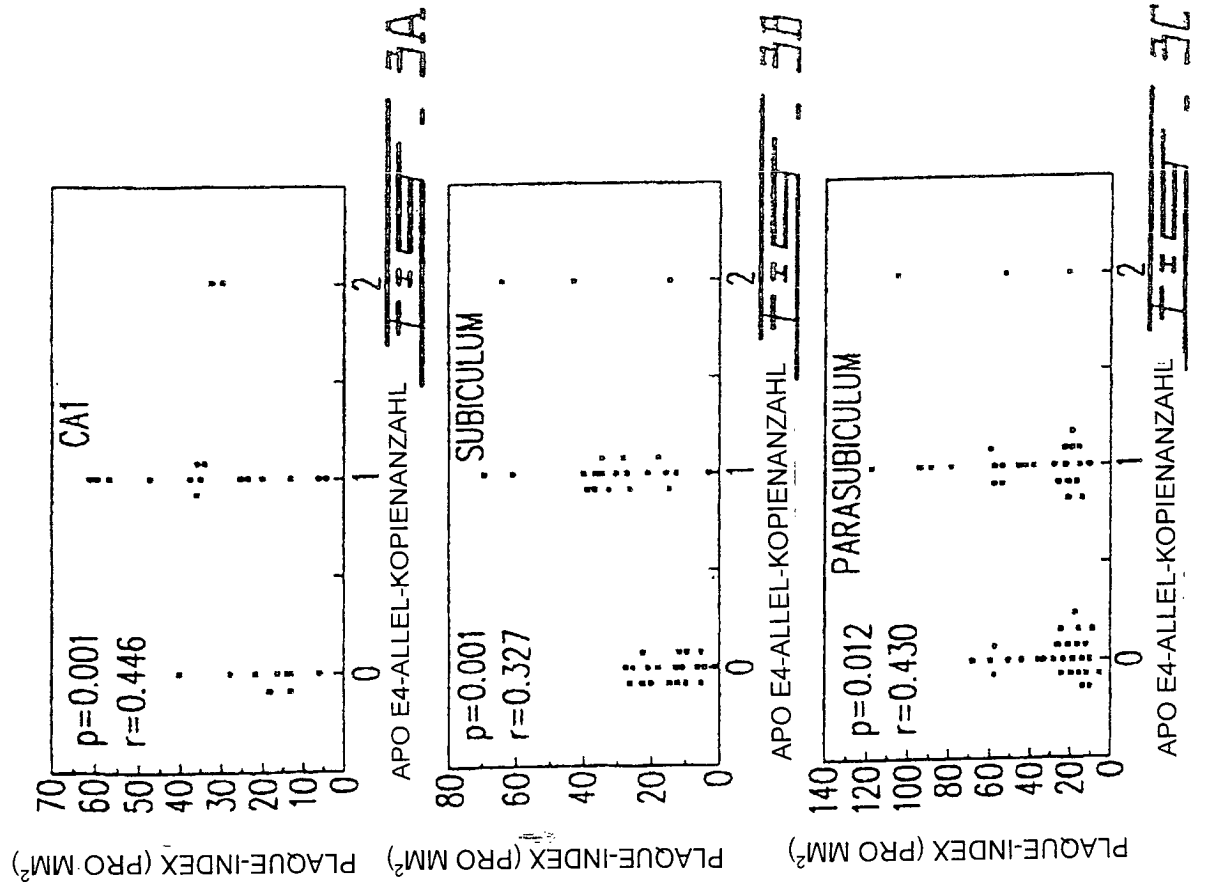

Alzheimer
Kontrollen
1.2 kB
4/3 4/3 4/3 4/3 3/3 3/3 3/3 3/3 3/3 4/3 3/3
Apo E-Genotyp

Fig. 2


CA1
p=0.002
r=0.490
SUBICULUM
p=0.013
r=0.331
PARASUBICULUM
TANGLE-INDEX (PRO MM²)
APO E4-ALLEL-KOPIENANZAHL
3D
3E
3F


CA1
p=0.001
r=0.446
SUBICULUM
p=0.001
r=0.327
PARASUBICULUM
p=0.012
r=0.430
PLAQUE-INDEX (PRO MM²)
APO E4-ALLEL-KOPIENANZAHL
3A
3B
3C

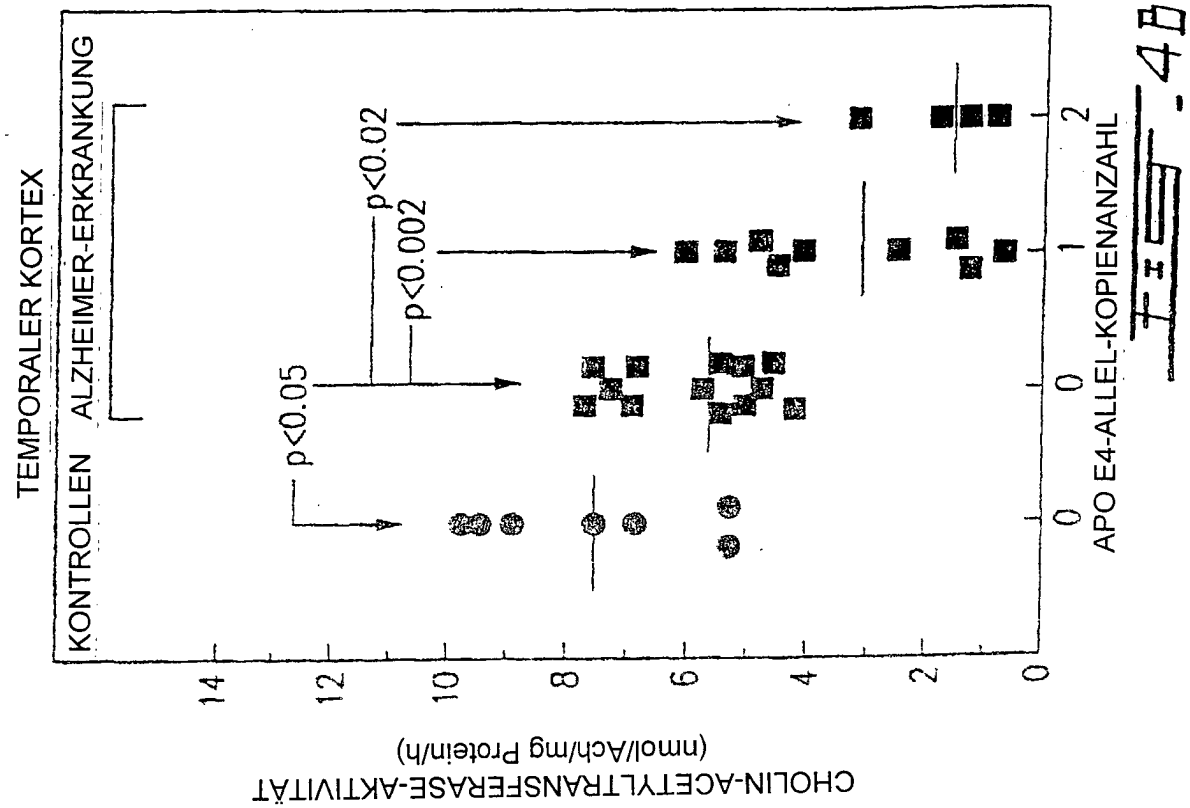

TEMPORALER KORTEX
KONTROLLEN
ALZHEIMER-ERKRANKUNG
p<0.05
p<0.002
p<0.02
CHOLIN-ACETYLTRANSFERASE-AKTIVITÄT
(nmol/Ach/mg Protein/h)
APO E4-ALLEL-KOPIENANZAHL

Fig. 4B

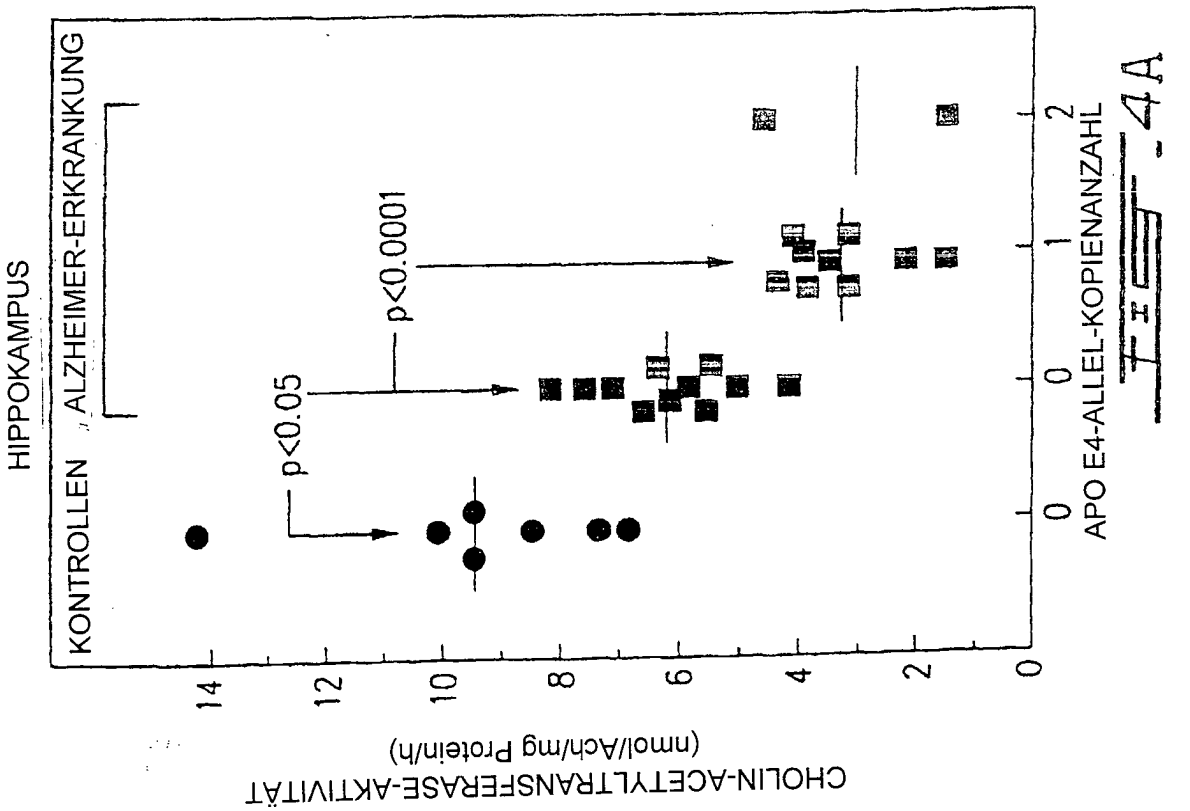

HIPPOKAMPUS
KONTROLLEN
ALZHEIMER-ERKRANKUNG
p<0.05
p<0.0001
CHOLIN-ACETYLTRANSFERASE-AKTIVITÄT
(nmol/Ach/mg Protein/h)
APO E4-ALLEL-KOPIENANZAHL

Fig. 4A

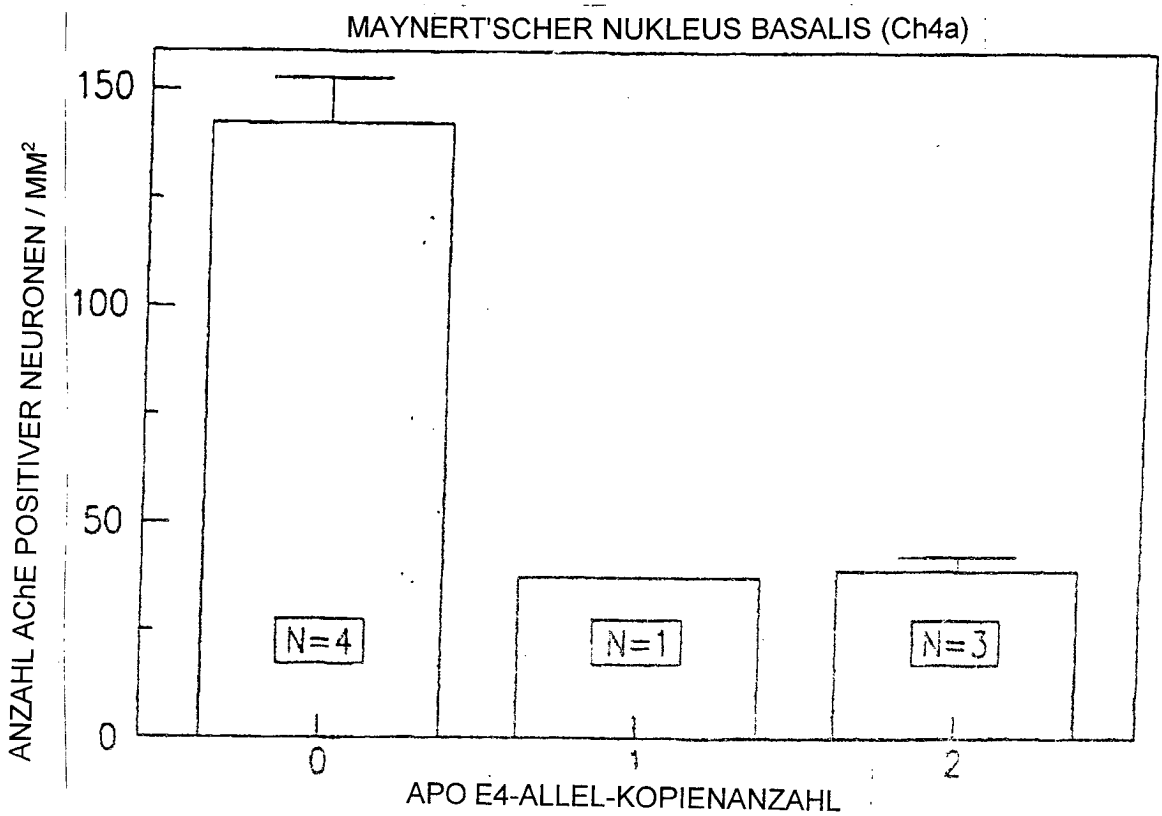

MAYNERT'SCHER NUKLEUS BASALIS (Ch4a)
ANZAHL AChE POSITIVER NEURONEN / MM²
150
100
50
0
N=4
N=1
N=3
0
1
2
APO E4-ALLEL-KOPIENANZAHL

FIG. 5A

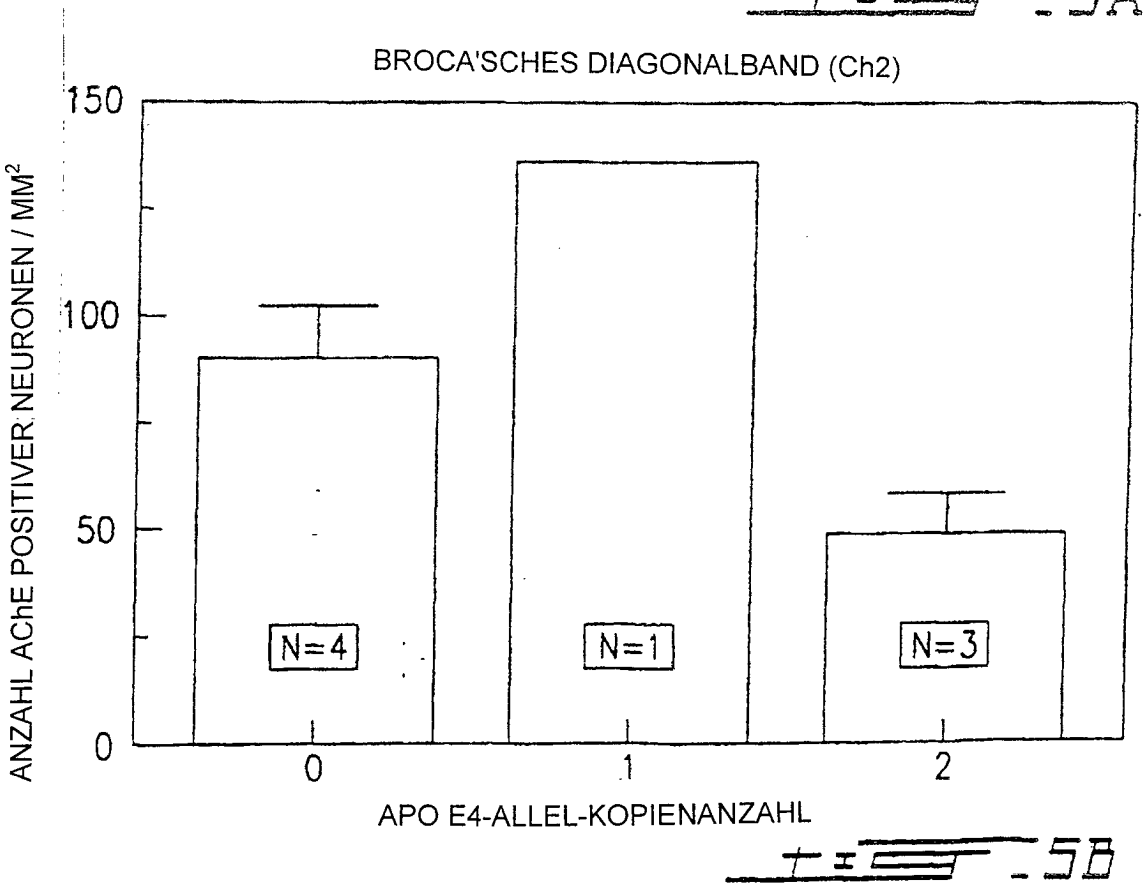
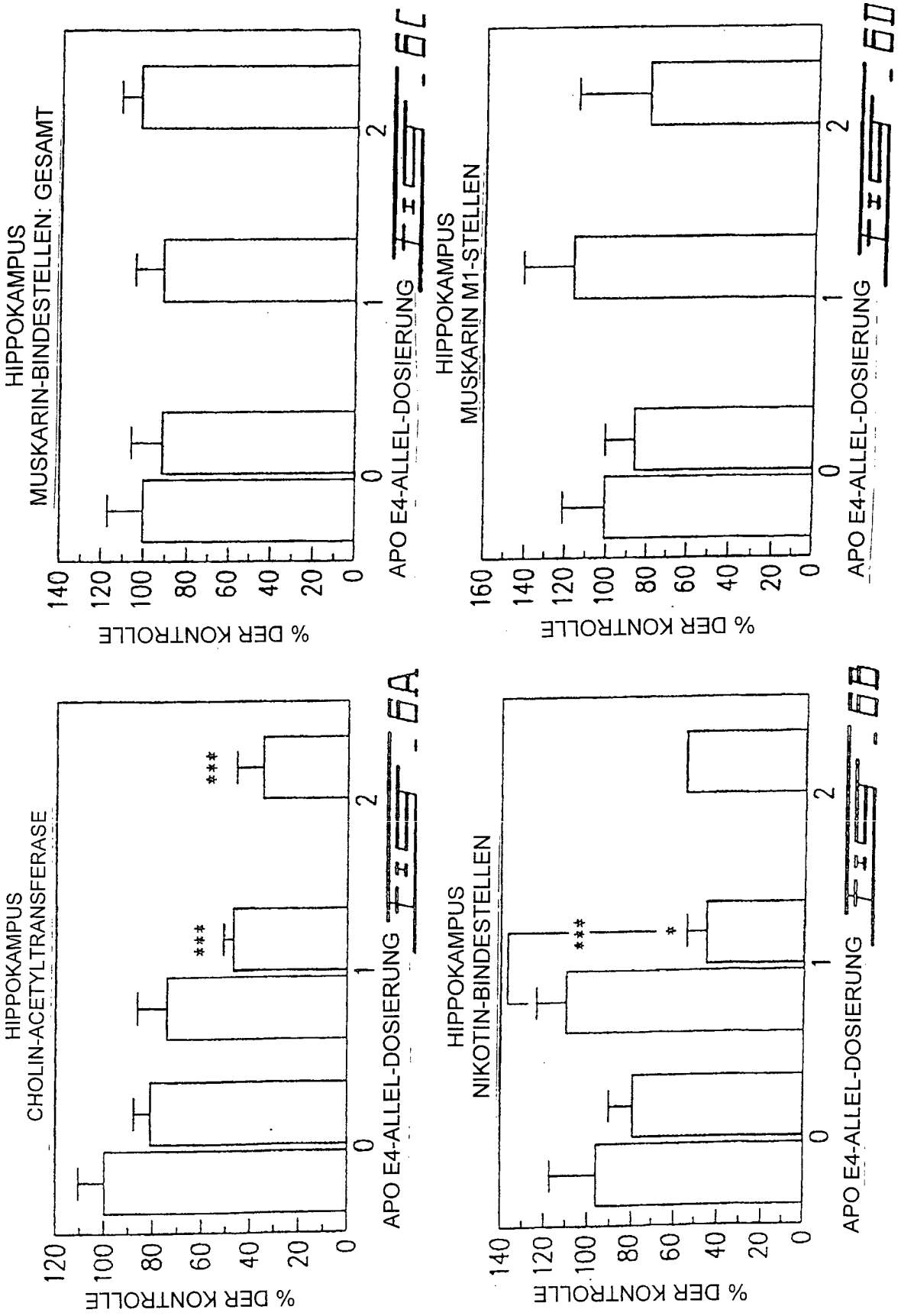

BROCA'SCHES DIAGONALBAND (Ch2)
ANZAHL AChE POSITIVER NEURONEN / MM²
150
100
50
0
N=4
N=1
N=3
0
1
2
APO E4-ALLEL-KOPIENANZAHL

FIG. 5B


HIPPOKAMPUS
CHOLIN-ACETYLTRANSFERASE
% DER KONTROLLE
APO E4-ALLEL-DOSIERUNG
***
***
FIG - 6A
HIPPOKAMPUS
NIKOTIN-BINDESTELLEN
% DER KONTROLLE
APO E4-ALLEL-DOSIERUNG
***
*
FIG - 6B
HIPPOKAMPUS
MUSKARIN M1-STELLEN
% DER KONTROLLE
APO E4-ALLEL-DOSIERUNG
FIG - 6D
HIPPOKAMPUS
MUSKARIN-BINDESTELLEN: GESAMT
% DER KONTROLLE
APO E4-ALLEL-DOSIERUNG
FIG - 6C

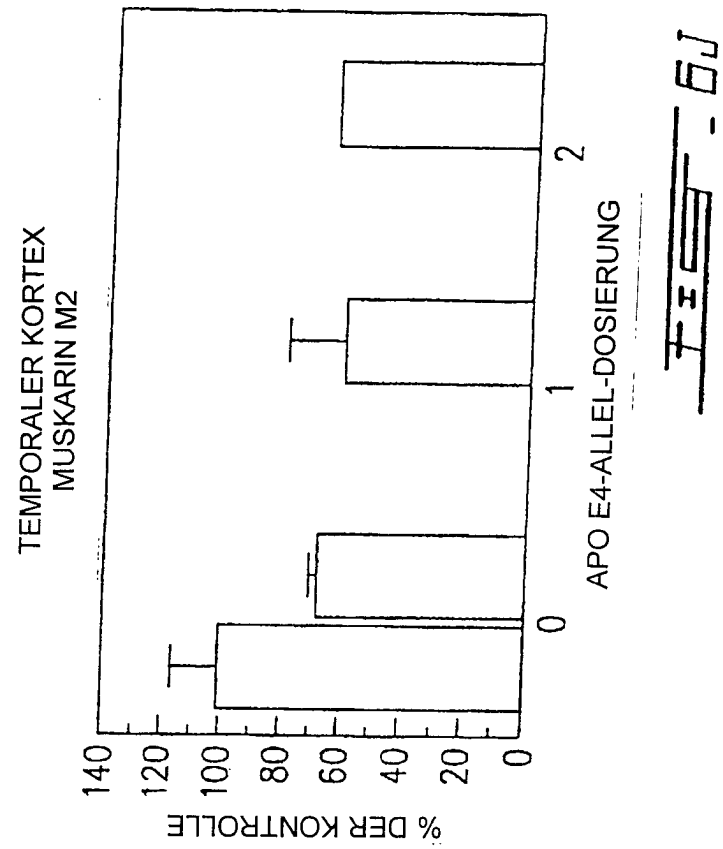

TEMPORALER KORTEX
MUSKARIN M2
% DER KONTROLLE
140
120
100
80
60
40
20
0
0
1
2
APO E4-ALLEL-DOSIERUNG

Fig. 6J

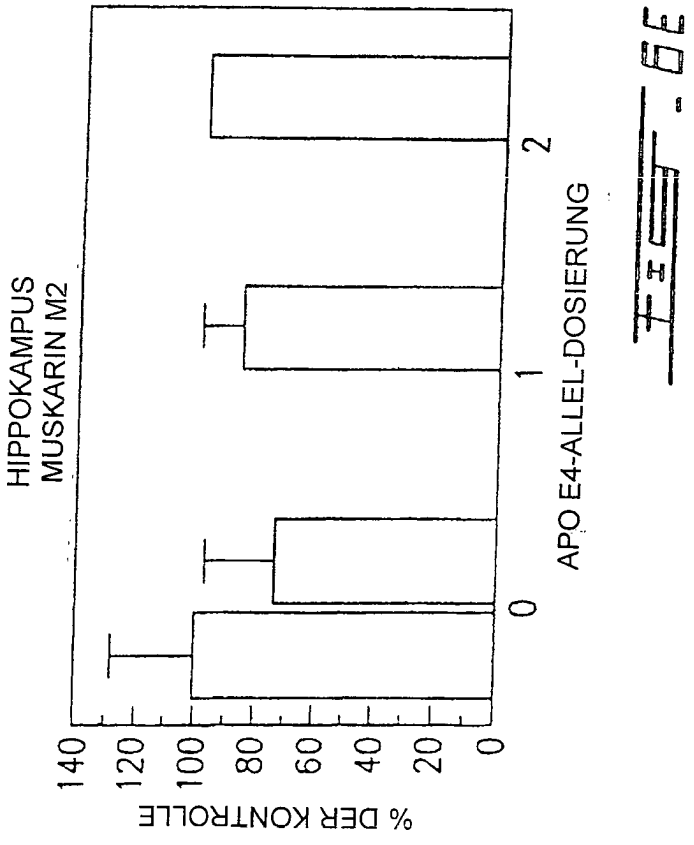
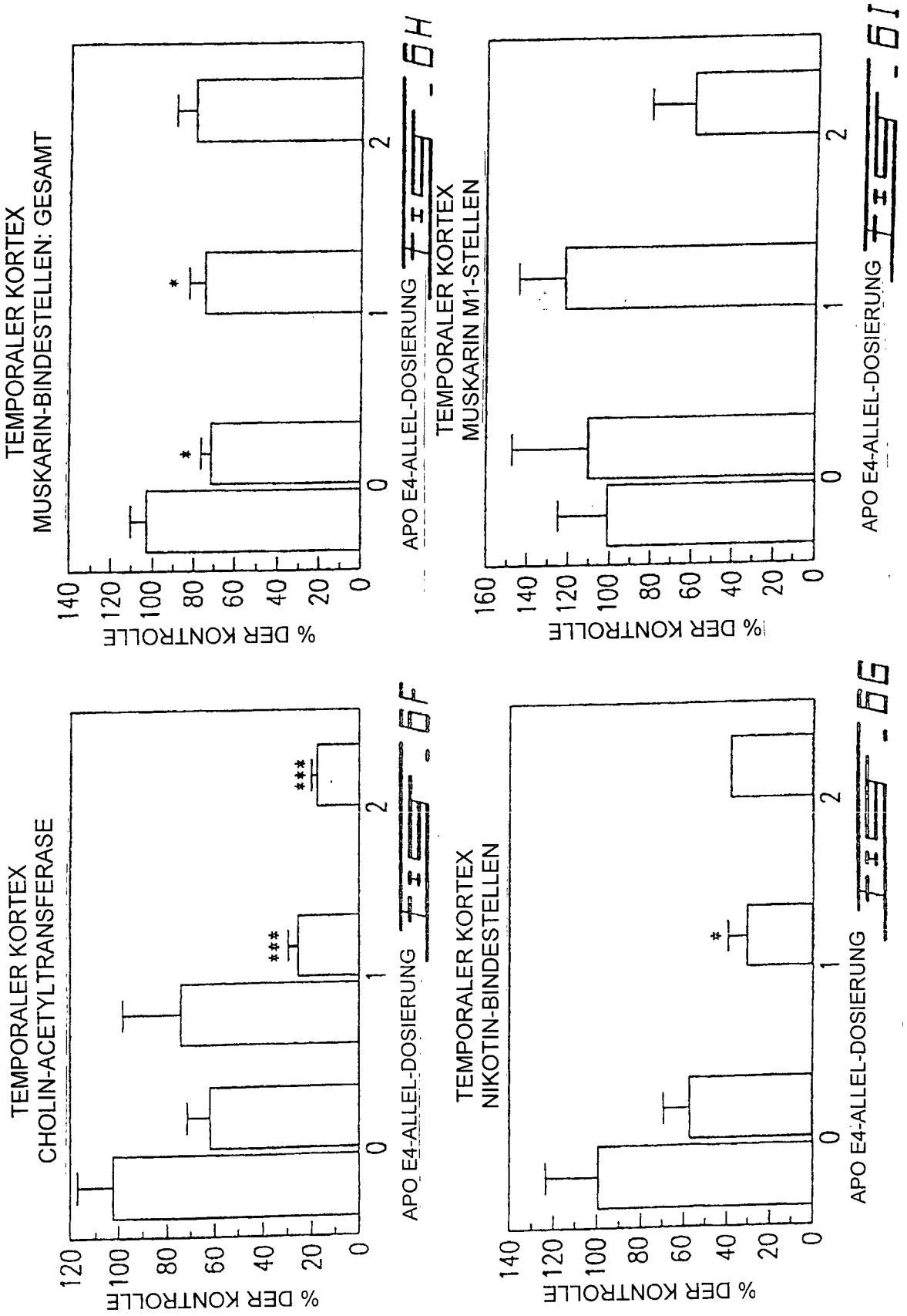

HIPPOKAMPUS
MUSKARIN M2
% DER KONTROLLE
140
120
100
80
60
40
20
0
0
1
2
APO E4-ALLEL-DOSIERUNG

Fig. 6E


TEMPORALER KORTEX
CHOLIN-ACETYLTRANSFERASE
% DER KONTROLLE
APO E4-ALLEL-DOSIERUNG
TEMPORALER KORTEX
MUSKARIN-BINDESTELLEN: GESAMT
% DER KONTROLLE
APO E4-ALLEL-DOSIERUNG
TEMPORALER KORTEX
NIKOTIN-BINDESTELLEN
% DER KONTROLLE
APO E4-ALLEL-DOSIERUNG
TEMPORALER KORTEX
MUSKARIN M1-STELLEN
% DER KONTROLLE
APO E4-ALLEL-DOSIERUNG

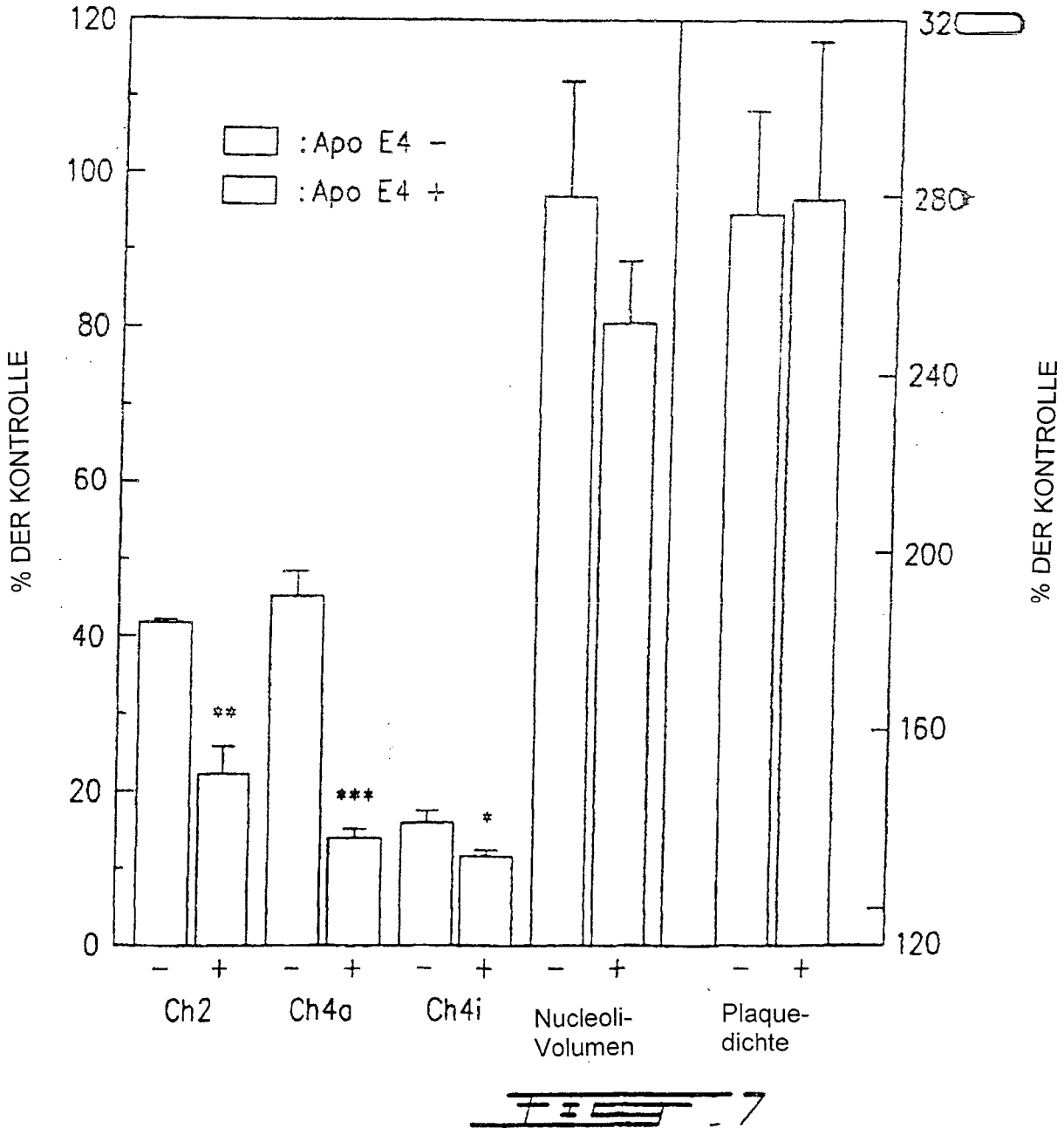

120
100
80
60
40
20
0
32
280
240
200
160
120
% DER KONTROLLE
% DER KONTROLLE
: Apo E4 −
: Apo E4 +
**
***
*
− + − + − + − + − +
Ch2
Ch4a
Ch4i
Nucleoli-
Volumen
Plaque-
dichte

FIG. 7

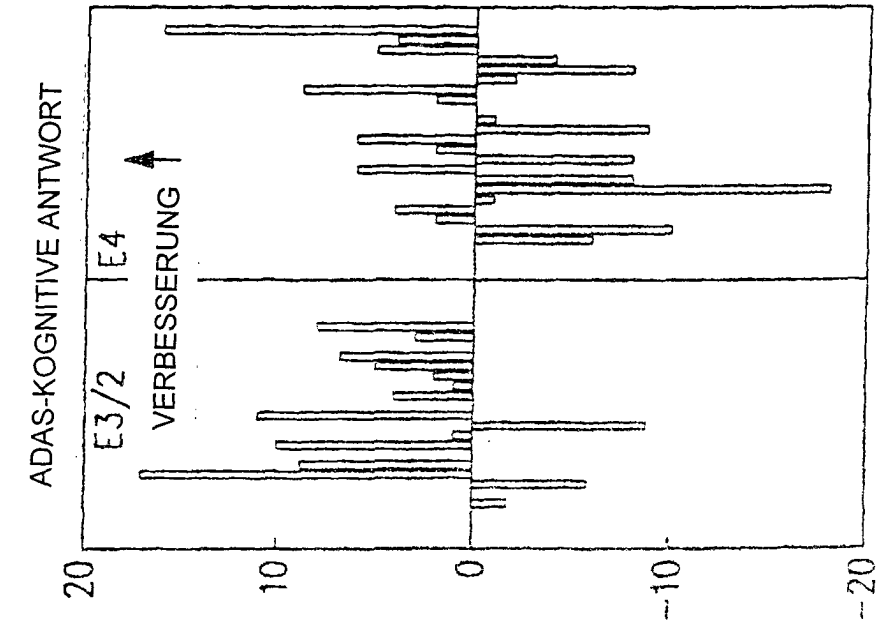

ADAS-KOGNITIVE ANTWORT
E3/2
E4
VERBESSERUNG
20
10
0
-10
-20
ADAS-VERÄNDERUNG WÄHREND DER ARZNEIMITTELUNTERSUCHUNG

Fig. 8B

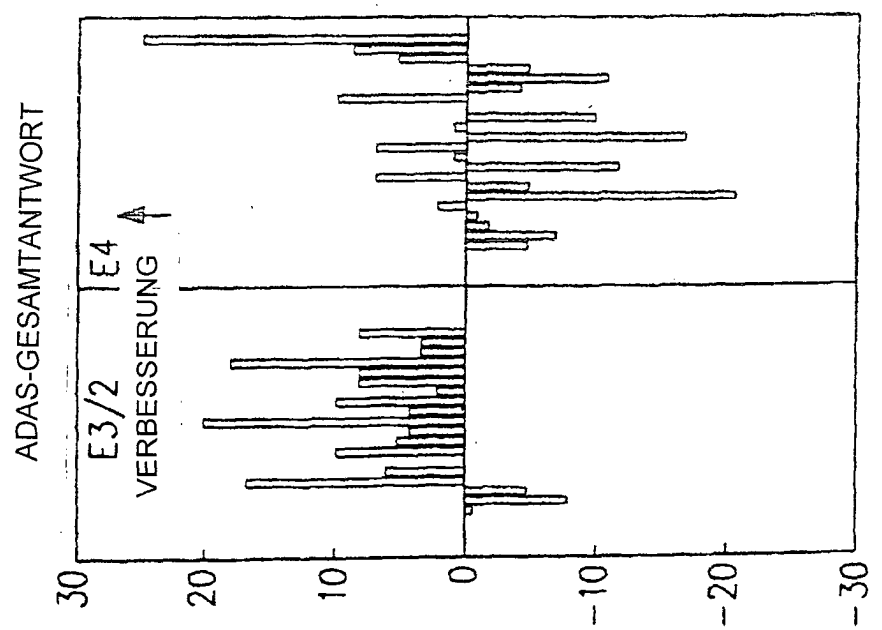

ADAS-GESAMTANTWORT
E3/2
E4
VERBESSERUNG
30
20
10
0
-10
-20
-30
ADAS-VERÄNDERUNG WÄHREND DER ARZNEIMITTELUNTERSUCHUNG

Fig. 8A