(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 964284 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 964284

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C12Q 1/68
A61K 31/645

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **26.04.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **24.10.1996**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **23.12.1996**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **26.04.1995 PCT/CA1995/000240**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

27.04.1994 GB 9408465

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • McGill University, 845 Sherbrooke Street West Montreal, Quebec H3A 1B1, Canada, KANADA, (CA)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Poirier, Judes, Canada, KANADA, (CA)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Apolipoproteiini E:n polymorfismi ja Alzheimerin taudin hoito
Polymorfism av apolipoprotein E och behandling av Alzheimers sjukdom

Apolipoproteiini E:n polymorfismi ja Alzheimerin taudin hoito

Keksinnön tausta

(a) Keksinnön ala

Keksintö koskee sellaista menetelmää potilaan Alzheimerin taudin hoitamiseksi, joka perustuu kolinergiseen aktiivisuuteen aivoissa.

(b) Tunnetun alan kuvaus

Apolipoproteiini E (apoE) toimii ligandina lipidirikkaiden lipoproteiinien reseptorin välittämän internalisaation prosessissa ja se osallistuu todennäköisesti myös käänteiseen lipidikuljetukseen [Mahley R.W. et al., Biochem. Biophys. Acta 737 (1983) 197 - 222]. Keskushermostojärjestelmässä (CNS) apoE näyttelee keskeistä osaa kolesterolin ja fosfolipidin saattamisessa liikkeelle ja uudelleenjärjestäytymisessä synaptiseen muovautuvuuteen liittyvän membraanin uudelleenmuotoutumisen aikana [Poirier J. et al., Mol. Brain. Res. 9 (1991) 191 - 195; Poirier J. et al., Mol. Brain. Res. 11 (1991) 97 - 106; Poirier J. et al., Neuroscience 55 (1993) 81 - 90]. ApoE:n tärkeyttä aivoissa korostaa edelleen muiden tärkeiden plasman apolipoproteiinien, kuten apo A1:n ja apo B:n, puuttuminen tästä kudoksesta [Roheim P.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 76 (1979) 4646 - 4649]. ApoE-mRNA:ta löytyy pääasiallisesti CNS:n astrosyyteistä.

ApoE-geenissä kromosomissa 19 on kolme yleistä alleelia (E2, E3, E4), jotka koodaavat kolmea pääasiallista apoE-isomuotoa. Viime aikoina apoE4-alleelin esiintyvyyden on osoitettu kasvaneen merkittävästi sporadisessa [Poirier J. et al., Apolipoprotein E phenotype and Alzheimer's Disease, Lancet 342 (1993) 697 - 699; Noguchi S. et al., Lancet (letter) 342 (1993) 737] ja myöhemmin puhjenneessa familiaalisessa Alzheimerin taudissa (AD) [Corder E.H. et al., Science 261 (1993) 921 - 923; Payami H. et al., Lan-

cet (letter) 342 (1993) 738]. Geeniannosvaikutus havaittiin sekä sporadisissa että familiaalisissa tapauksissa (ts. kun puhkeamisikä nousee, E4-alleelin kopioluku laskee). Naisilla, joilla on yleensä suurempi riski saada Alzheimerin tauti, on suurempi E4-alleelitaajuus verrattuna vastaavanikäisiin miehiin.

Liddel et al. [J. Med. Gen. 31 (1994) 197 - 200] osoittavat vain ainakin kahden Alzheimerin taudin alapopulaation olemassaolon; se, jossa on apoE4-mutaatio ja se, jossa on normaali apoE3- tai apoE2-geeni.

Alustavat tutkimukset ovat osoittaneet, että apoE-mRNA-tasot ovat suhteellisen muuttumattomia [Poirier J. et al., 1991, teoksessa: Basic and therapeutic strategies in Alzheimer's and Parkinson's diseases, T. Nagatsu, F. Abraham, toimittajat, New York, Plenum Press, 191 - 194] AD-potilaiden aivoissa kuoleman jälkeen. Nämä tulokset saatiin potilailta, joiden genotyyppejä ei ollut määritetty.

Olisi erittäin edullista saada käyttöön keino määrittää kolinerginen aktiivisuus Alzheimerin tautia sairastavien potilaiden aivoissa sen määrittämiseksi, tulisiko käyttää koliinivaikutuksen jäljittelemiseen perustuvaa hoitoa.

Keksinnön yhteenveto

Esillä olevan keksinnön eräänä päämääränä on antaa käyttöön keinoja arvioida kolinerginen aktiivisuus Alzheimerin tautia sairastavien potilaiden aivoissa sen arvioimiseksi tulisiko käyttää koliinivaikutuksen jäljittelemiseen perustuvaa hoitoa.

Esillä olevan keksinnön mukaisesti annetaan käyttöön menetelmä Alzheimerin taudin hoitamiseksi geneettisesti karakterisoidulla Alzheimerin tautia sairastavalla potilaalla, jolla on alttius vastata koliinivaikutuksen jäljittelemiseen perustuvaan hoitoon, jossa:

(a) määritetään apolipoproteiinien E2- ja E3-alleelin läsnäolo tai apolipoproteiini E4-alleelin puuttuminen

potilaan perifeerisistä kudoksista, mikä osoittaa aivojen asetyylikoliinisynteesin ja nikotiinireseptorin aktiivisuuden heikkenemisen asteen ja huononemisen aivojen asetyylikoliinisynteesissä ja nikotiinireseptoriaktiivisuudessa; ja

(b) annetaan potilaalle sopivaa hoitavaa ainetta suhteessa vaiheen a) heikkenemisen asteeseen.

Hoitavat aineet, joita voidaan käyttää esillä olevan keksinnön mukaisesti, voidaan valita ryhmästä, joka koostuu asetyylikoliinin hajoamisen inhibiittoreista, asetyylikoliinisynteesin edistäjistä, asetyylikoliiniagonisteista ja sitä jäljittelevistä aineista ja muskariini-M2-reseptoriantagonisteista.

Esillä olevan keksinnön mukaisesti annetaan myös käyttöön menetelmä tunnistaa ihmisyksilöt, joilla on ikään perustuvaa havaitsemiskyvyn heikkenemistä, Alzheimerin tauti tai muita neurodegeneratiivisia sairauksia, jotka vastaavat koliinivaikutusta jäljitteleviin hoitoihin, jolloin määritetään apoE2- ja apoE3-geenialleellien kopioiden lukumäärä tai apoE4-geenialleelin puuttuminen potilaan biologisesta näytteestä suoraan käyttämällä sopivaa apoE2- tai apoE3-koetinta tai epäsuoraan fenotyypittämällä, ja jolloin apoE2- ja/tai apoE3-geenialleelin läsnäolo ja apoE4:n puuttuminen osoittavat taipumusta vastata koliinivaikutuksen jäljittelemiseen perustuviin hoitoihin.

Esillä olevan keksinnön mukaisesti annetaan käyttöön menetelmä tunnistaa Alzheimerin tautia sairastava potilas, joka vastaa havaintokykyä edistäviin ja koliinivaikutusta jäljitteleviin hoitoihin, jolloin määritetään apoE2- ja apoE3-geenialleelien kopioiden lukumäärä potilaan biologisesta näytteestä suoraan käyttämällä sopivaa apoE2- tai apoE3-koetinta tai epäsuoraan fenotyypittämällä, ja jolloin apoE2- ja/tai apoE3-geenialleelien läsnäolo ja apoE4:n puuttuminen osoittaa taipumusta vastata koliinivaikutuksen jäljittelemiseen perustuviin hoitoihin.

Esillä olevan keksinnön tarkoitusta varten on tässä määritetty seuraavat termit:

Termin "käsityskykyä edistävä aine" on määrä tarkoittaa sitä, että nämä lääkkeet edistävät a) muistin suorituskykyä, olkoon se verbaalinen muisti, tilamuisti tai asiamuisti ja b) oppimiskykyä.

Termin "koliinivaikutusta jäljittelevät hoidot" on määrä tarkoittaa lääkkeitä, jotka jäljittävät asetyylikoliinin funktiota tai edistävät jäljellä olevien asetyylikoliinia syntetisoivien solujen aktiivisuutta. Nämä lääkkeet sisältävät, näihin rajoittumatta, asetyylikoliinin hajoamisen inhibiittoreita (asetyylikoliiniesteraasi-inhibiittoreita, kuten takriini), lääkkeitä, jotka jäljittelevät asetyylikoliinin rakennetta ja funktiota (agonisti: muskariini M1-reseptoriagonisti on tyypillinen esimerkki), lääkkeitä, jotka estävät neuronien asetyylikoliinin oton ja lääkkeitä, jotka ovat vuorovaikutuksessa presynaptisten reseptorien kanssa asetyylikoliinin vapautumisen indusoimiseksi kolinergisistä neuroneista.

Termi "sopivat apoE2- ja apoE3-koettimet" viittaavat nukleiinihappoalukesekvensseihin, jotka selektiivisesti tunnistavat apoE3- tai apoE2-alleelin kromosomissa 19 ja joita voidaan käyttää näiden apoE-geenin eri mutaatioiden amplifioimiseksi (PCR:llä) selektiivisesti.

Piirustusten lyhyt kuvaus

Kuviossa 1 on Northern blot -analyysi apoE-mRNA-ekspressiosta Alzheimer- ja kontrollihenkilöiden hippokampuksesta.

Kuviossa 2 on Western blot -analyysi apoE-proteiinitasoista AD- ja kontrollihenkilöiden hippokampuksesta.

Kuviossa 3 kuvataan apolipoproteiini E4 -alleelin kopioluku, kimppu- ja seniiliplakkitiheydet Alzheimerin tautipotilaan hippokampuksessa.

Kuviossa 4 kuvataan apolipoproteiini E4 -alleelin kopioluku ja koliiniasetyylitransferaasiaktiivisuus Alzheimerin taudissa.

Kuviossa 5 kuvataan sellaisten neuronien kato, jotka syntetisoivat asetyylikoliinia Maynertin tyvitumakkeessa ja Brocan diagonaalijuovassa; ja

Kuviossa 6 kuvataan apolipoproteiini E4 (apoE4) -alleelin kopioluvun vaikutus a) & f) koliiniasetyylitransferaasiaktiivisuuteen, b) & g) nikotiinireseptoritiheyteen, c) & h) kokonaismuskariinireseptoritiheyteen, d) & i) muskariini-M1- (jälkisynaptinen) ja e) & j) muskariini-M2-reseptoritiheyteen kontrollin ja Alzheimerin tautia sairastavan aivoissa kuoleman jälkeen, hippokampuksen rakenteessa ja ohimokuoressa, tässä järjestyksessä.

Kuviossa 7 kuvataan yksilöllisiä neuropatologisia ja -morfologisia ominaisuuksia, jotka liittyvät koliinivaikutuksen aiheuttavaan järjestelmään erilaisissa tutkituissa Alzheimerin tauti- ja kontrollitapausten aivoissa; ja

Kuviossa 8 kuvataan Alzheimerin taudin arviointiasteikon (ADAS) delta-arvoja (loppuarvot miinus seulonta-arvot) takriinilla hoidetuilla AD-potilailla, joilla on eri apoE-genotyypit.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Apolipoproteiini E (apoE) on tärkeä kolesterolin muodostuksessa ja fosfolipidin kuljetuksessa yhdestä solusta toiseen. ApoE sitoutuu suurella affiniteetilla apoE/apoB LDL -reseptoriin kolesterolia ja fosfolipidiä sisältävien lipoproteiinien internalisaation ja katabolian välittämiseksi. Se on polymorfinen proteiini, jolla on kolme yleistä alleelia, jotka koodaavat apoE2:a, apoE3:a ja apoE4:ää. Viime aikoina apoE4-alleelin osoitettiin liittyvän sporadiseen ja myöhään puhkeavaan familiaaliseen Alzheimerin tautiin (AD). Esillä oleva tutkimus osoittaa, että apoE4-alleelilla on vähän tai ei lainkaan vaikutusta apoE-mRNA-tasoihin ja proteiinisisältöön AD:n hippokampuksessa. Kuitenkin osoitamme voimakkaan ja merkittävän korrelaation apoE4-alleelin kopioluvun ja amyloidiplakkimää-

rien välillä CA1-, subikulum- ja parasubikulum-alueilla. Vieläkin tärkeämpi on se havainto, että apoE4-alleelin läsnäololla on dramaattinen vaikutus asetyylikoliinin synteesiin sisältyvän entsyymin, koliiniasetyylitransferaasin (ChAT) jäännösaktiivisuuteen. Merkittävä ChAT-aktiivisuuden aleneminen havaittiin sekä hippokampuksessa että ohimokuoressa ihmisillä, joiden apoE-genotyyppi oli 4/3 verrattuna niihin, joiden genotyyppi oli 3/3. Kaikki apoE4/3-yksilöt (yhtä lukuun ottamatta) kärsivät AD:stä. Mielenkiintoista on se, että suurimmalla osalla AD-tapauksista, joiden apoE-genotyyppi oli 3/3, oli lähes normaalit ChAT-aktiivisuusarvot. ChAT-aktiivisuuden aleneminen aiheutuu ilmeisesti asetyylikoliinia syntetisoivien neuronien selektiivisestä häviämisestä Maynertin tyvitumakkeessa ja Brocan diagonaalijuovassa. Nämä tulokset tukevat apoE4:n liittymistä AD:n patogeneesiin ja antavat ensimmäistä kertaa mahdollisen selityksen sporadisessa AD:ssä raportoidulle kolinergisten toimintahäiriöiden heterogeenisyydelle.

Koska apoE-ekspressio (mRNA- ja proteiinitasot) nousevat huomattavasti sellaisten rottien hippokampuksessa, joiden entorhinaalikuori on vaurioitunut [Poirier J. et al., Mol. Brain. Res. 9 (1991) 191 - 195; Poirier J. et al., Mol. Brain. Res. 11 (1991) 97 - 106; Poirier J. et al., Neuroscience 55 (1993) 81 - 90] ja ihmisillä, joilla on multippeli skleroosi, tutkimme apoE-mRNA-tasoja ja proteiinitasoja sellaisten AD-potilaiden hippokampuksessa, joiden genotyypit on aikaisemmin määritetty.

Kuvioissa 1 ja 2 kuvataan Northern blot- ja Western blot -analyysit apoE-tasoista kontrollien ja AD-potilaiden hippokampuksessa vastaavien genotyyppien funktiona.

Jäädytetyt hippokampukset saatiin kuoleman jälkeen kontrolli- ja AD-potilailta Douglas Hospital Brain Bankiltä Montrealista. Iät ja sukupuolet vastasivat toisiaan ja viiveet kuoleman jälkeen olivat samanlaisia kah-

dessa ryhmässä (~14 tuntia). Kuoleman jälkeisellä viiveellä aina 24 tuntiin saakka ei ole paljon merkitystä apoE-stabiilisuuteen [Lehtimäki T., Clin. Chim. Acta 203 (1991) 177 - 182] ja se voidaan säilöä -80 °C:seen useiksi kuukausiksi ilman havaittavaa jälkeä hajoamisesta. Hippokampuksen kokonais-RNA uutettiin ja kvantitoitiin oligo-(dT)-hybridisaatiolla, kuten akaisemmin on kuvattu [Poirier J. et al., Mol. Brain. Res. 11 (1991) 97 - 106]. Hybridisaatioprotokolla, jossa käytettiin täysipituista apoE-cDNA-koetinta, kuvattiin edellä [Poirier J. et al., Mol. Brain. Res. 9 (1991) 191 - 195]. Molekyylipainoltaan suuri DNA eristettiin jäädytetyistä pikkuaivoista tai ohimokuoresta Goelzin et al. sovellutuksen mukaan [Goelz S.E. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 130 (1986) 118 - 126].

ApoE-genotyyppi määritettiin puhdistetun aivo-DNA:n alleelispesifisellä ekstensiolla käyttäen Mainin et al. menetelmän muunnosta [Main R.F. et al., J. Lipid. Res. 32 (1991) 183 - 187]. Alukkeet, joita merkittiin kirjaimilla D, E, F, G ja H, syntetisoi meille Genosys Biotech (The Woodland, TX); alukesekvenssit annetaan Mainin et al. julkaisussa [Main R.F. et al., J. Lipid. Res. 32 (1991) 183 - 187]. Reaktiot suoritettiin 50 μl:n tilavuudessa, jossa oli 1 μg DNA:ta, deoksiadenosiinitrifosfaattia, deoksisytidiinitrifosfaattia, deoksitymidiinitrifosfaattia ja deoksiguanosiinitrifosfaattia, kutakin 0,2 mmol/l, 10 % dimetyylisulfoksidia, 12,5 pmol jotakin aluketta D, E, F, G, 25 pmol aluketta H ja 10 μl 10 PCR-reaktiopuskuria (Vector Biosystem, Toronto, ONT.). DNA:ta denaturoitiin ensin reaktioseoksessa 10 minuuttia 96 °C:ssa ja jäähdytettiin sen jälkeen 4 °C:seen. Sen jälkeen lisättiin yksi yksikkö Taq-polymeraasia (Vector Biosystem, Toronto, ONT.) kuhunkin näytteeseen. Kutakin näytettä kuumennettiin uudelleen 2 minuutin ajan 96 °C:ssa, jonka jälkeen ajettiin 30 sykliä monistuslaitteessa kunkin syklin sisältäessä 10

sekuntia denaturaatiota 96 °C:ssa, 30 sekuntia hybridisaatiota 58 °C:ssa ja 1 minuutti polymerisaatiota 65 °C:ssa. Reaktiotuotteet visualisoitiin ajamalla elektroforeesissa 10 µl reaktioseosta 1-%:isessa agaroosigeelissä, joka sisältää TPE-puskuria (0,08 mol/l Tris-fosfaattia, 0,002 mol/l EDTA:ta) ja etidiumbromidia (0,15 µg/ml) 1 tunti 67 V:ssa. Sen jälkeen geeli valokuvattiin ja juovaprofiilia verrattiin tunnettuihin standardeihin.

Lyhyesti sanottuna 50 µg hippokampushomogenaattia, jota oli esikäsitelty 1 U:lla neuraminidaasia, syötettiin 25 cm pitkään SDS-polyakryyliamidigeeliin (10 %) ja ajettiin 3 tuntia huoneenlämpötilassa. Proteiinit siirrettiin nitroselluloosasuodattimelle BIORAD™ Transblot -yksikössä ja apoE-juova osoitettiin polyklonaalisella vasta-aineella ihmisen apoE:tä vastaan (International Immunology Corp., CA, laimennos: 1:2 000). Vasta-aineen adsorptio puhdistetulla apoE:llä esti täydellisesti ihmisen apoE-juovan osoituksen molekyylipainon 34 - 36 kDa kohdalla. Molekyylipainomarkkereita (Rainbow markers, Amersham) ajettiin viereisissä kaivoissa, ja juovien visualisointi tehtiin kemiluminesenssiosoituskitillä (Amersham, kataloginumero RPN 2100). Autoradiografisten signaalien kvantitointi tehtiin MCID-kuvausanalyysijärjestelmällä (Ste-Catherine, Ontario), johon oli liitetty 1D-geelianalyysiohjelmisto.

ApoE:tä vastaavan juovan autoradiografiset analyysit eivät osoittaneet eroja kontrolli- ja AD-hippokampuskudosten välillä huolimatta siitä oliko apoE4-alleeli läsnä tai ei. Nämä tulokset ovat yhtäpitäviä aikaisemman raportin kanssa (Poirier J. et al., teoksessa: Basic and therapeutic strategies in Alzheimer's and Parkinson's diseases, T. Nagatsu, F. Abraham, toimittajat, New York, Plenum Press, 191 - 194), jossa osoitettiin, että huolimatta astrosyyttisestä hyperreaktiivisuudesta ja lisäyksistä astrosyyttisen hermotukikudoksen fibrillaarisen happaman proteiinin mRNA-tasoissa AD:n hippokampuksessa,

apoE-geenieksPressio ei muuttunut hippokampuksessa. GFAP:n lisääntynyttä ekspressiota käytetään usein markkerina meneillään olevasta differentiaatiosta ja/tai neurodegeneraatiosta [Poirier J. et al., Mol. Brain. Res. 9 (1991) 191 - 195]. Niinpä nämä tulokset antavat olettaa, että huolimatta merkittävästä deafferentaatiosta ja solutuhosta AD:n hippokampuksessa [Hyman BT et al., Science 225 (1984) 1168 - 1179], apoE-geenieksPressio jää muuttumattomaksi. Lisäksi E4-alleelin yhden kopion läsnäololla aivoissa on ilmeisesti vähän tai ei lainkaan vaikutusta apoE:n steady state -tasoihin AD:ssä.

ApoE4:n in vivo -metabolian verenkierrossa on osoitettu kineettisesti eroavan apoE3:n metaboliasta ihmisillä [Gregg R.E. et al., J. Clin. Invest. 87 (1986) 815 - 821]. E4-alleeli liittyy epänormaalin korkeisiin lipoproteiinitasoihin verenkierrossa, lisääntyneisiin plasma- ja LDL-kolesterolimääriin, muuntuneeseen lipoproteiinien jakautumiseen, matalampaan plasman apoE-tasoon potilailla, jotka ovat homotsygootteja E4:n suhteen ja nopeaan apoE4:n kataboliaan apoE3:een verrattuna [Gregg R.E. et al., J. Clin. Invest. 87 (1986) 815 - 821]. Tämä saattaa merkitä, että apoE4 eroaa metabolisesti apoE3:sta, mikä voisi näin selittää AD-aivoissa raportoidut lipidihomeostaasin häiriöt. Esimerkiksi fosfatidyylikoliini- (PC), fosfatidyylietanoliamiini- (PE) ja kolesterolitasot pienenevät kaikki merkittävästi AD-aivoissa [Pettegrew J.W., Ann. NY Acad. Sci. 568 (1989) 5 - 28]. Lisäksi fosfatidyylikoliini-, fosfatidyylietanoliamiini- ja kolesterolitasot ovat olleet käänteen verrannollisia seniiliplakkien runsauteen kortikaalisten kerrosten II ja IV välissä [Pettegrew J.W., Ann. NY Acad. Sci. 568 (1989) 5 - 28]. Niinpä tutkimme apoE4-alleelin kopioluvun vaikutusta seniiliplakkien ja neurofibrillikimppujen esiintymistiheyteen 59 AD-potilaan hippokampuksessa.

Kuviossa 3 kuvataan korrelaatio apoE4-alleelin kopioluvun sekä seniiliplakkien ja neurofibrillikimppujen välillä kolmella eri hippokampuksen alueella, nimittäin CA 1 -ala-kentällä, subikulumissa ja parasubikulumissa, henkilöillä, joilla oli erilaiset apoE4-alleelikopioluvut.

Genotyyppi määritettiin kuten kuvion 1 yhteydessä on kuvattu. Seniiliplakkien ja kimppujen tiheysmittaukset suoritettiin kuten edellä on kuvattu [Aubert I. et al., J. Neurochem. 58 (1992) 529 - 541]. Paraffiiniin valettu hippokampuskudos 59 ruumiinavauksessa avatusta AD-potilaasta saatiin Douglas Hospital Brain Bankilta, ja se värjättiin hematoksyliinillä ja eosiinilla, modifioidulla Bielchowskyllä ja alkalisella Kongo-punaisella. Kvantitatiiviset morfometriset arviot neurofibrillikimpuista ja seniiliplakeista tehtiin seuraavasti. Mikrometristä mittakaavaa käytettiin kalibraatioon. Lukemat otettiin 10 X objektiivilla plakeista ja 25 X objektiivilla kimpuista. Diffuusit plakit jätettiin näiden mittausten ulkopuolelle. Alkalisen Congo™-punainen-värin seulontaa polarisoidussa valossa käytettiin kontrolloimaan kimppuvärjäyksen luotettavuutta ja vähemmässä määrin seniiliplakin affiniteettia modifioidulle Bielchowsky-valmisteelle. Idiopaattinen Parkinsonin tauti (IPD) diagnosoitiin pigmentoituneiden neuronien, Lewy-kappaleet jäljelle jääneissä neuroneissa, makrofagien kerääntymien ja glioosien huomattavan menetyksen mukaan mustatumakkeen tiiviissä osassa. Yleensä nämä korreloivat IPD:n kuolemaa edeltävien klassisten piirteiden, kuten lepovapinan, jäykkyyden ja akinesian kanssa. Statistiset analyysit suoritettiin käyttäen Multivariate General Linear™ Modelsia osana Systat Statistical Software™ -pakettia.

Korrelaatio apoE4-alleelin kopioluvun ja seniiliplakkien tiheyden välillä on erittäin voimakas kaikissa kolmessa hippokampuksen alueessa. Korrelaatio apoE4-alleelin kopioluvun ja neurofibrillikimppujen indeksin välillä

oli myös huomattava CA1- ja subikulum-alueilla. Nämä tulokset tukevat olettamusta, että apoE4 osallistuu AD:n patofysiologiaan.

Aivojen fosfolipidit, kuten PC ja PE, joiden on osoitettu näyttelevän tärkeää osaa koliinin, asetyylikoliinin (Ach) määrää rajoittavan prekursorin, saatavuudessa. Koliinin tasot aivoissa laskevat 40 - 50 %:lla AD:n otsa- ja päälakikuoressa [Nitch RM et al., Proc. Natl. Acad. Aci 89 (1992) 1671 - 1675]. Samoin kolesterolia tarvitaan selvästi joidenkin kolinergisten reseptorien alatyyppien kunnolliseen toimintaan]Jones O.T. & McNamee M.G., Biochemistry 27 (1988) 2364 - 2374]. Mahdollisten apoE4:n, seniiliplakkien ja neurofibrillikimppujen määrien ja Ach:n välisten keskinäisten suhteiden perusteella evaluoimme seuraavan mahdollisen assosiaation apoE4:n läsnäolon ja kolinergisen toimintahäiriön välille, AD:n klassinen tuntomerkki [Bowen DM et al., N. Engl. J. Med. 305 (1981) 1016; Whitehouse PJ et al., Science 215 (1982) 1237]. Keskitimme havaintomme ChAT-aktiivisuuden määrittämiseen, avainentsyymin, joka osallistuu Ach:n synteesiin, kuoleman jälkeisessä hippokampuksessa ja ohimokuoressa AD:tä sairastavilla yksilöillä ja kontrolleilla.

Kuvioissa 4 ja 6 kuvataan apoE4-isomuodon läsnäolon vaikutus hippokampuksen ja ohimokuoren ChAT-aktiivisuuteen.

Biokemiallisissa määrityksissä käytettävästä vasemmasta aivopuoliskosta tehtiin paksuja (10 mm) kruunusiivuja, jotka nopeasti ja syvästi jäädytettiin 2-metyylibutaaniin -40 °C:ssa ennen säilöntää -80 °C:een. Kudokset hippokampuksen ja ohimokuoren alueilta homogenisoitiin ja niitä inkuboitiin 15 minuuttia puskurissa, joka sisältää [^{14}C]-asetyyli-CoA:ta, kuten aikaisemmin on toisaalla yksityiskohtaisesti kuvattu [Aubert I. et al., J. Neurochem. 58 (1992) 529 - 541]. Kuoleman jälkeinen diagnoosi tehtiin

kuten kuviota 3 varten on kuvattu. Apolipoproteiini E -genotyyppi määritettiin kuten kuviota 1 varten on kuvattu.

Erittäin huomattavaa vähenemistä ChAT-aktiivisuudessa havaittiin apoE4-kantajilla. Hippokampuksessa (22 AD:tä ja 7 kontrollia) ChAT-aktiivisuusarvot ovat 9,44 ± 0,93 (kontrolli apo E3/3, ei apoE4-alleelia), 6,09 ± 0,36 (AD apoE3/3, ei apoE4-alleelia), 3,21 ± 0,31 (AD apoE4/3) ja 2,94 ± 1,52 (AD apoE4/4) nmol ACh/mg proteiinia/tunti, tässä järjestyksessä. Statistiset analyysit osoittavat, että kontrolli-apoE3/3-ChAT-arvot ovat hyvin erilaiset kuin AD-apoE3/3-ryhmässä ($p < 0,05$) ja apoE4/3-ryhmässä ($p < 0,0001$), kun taas AD-apoE3/3-ChAT-tasot ovat hyvin erilaiset kuin AD-apoE4/3-ryhmässä ($p < 0,0001$) ja samoin apoE4/4-ryhmässä, vaikkei statistista arviota voitu suorittaa saatavilla olevien apoE4-homotsygoottien pienen määrän vuoksi. Samanlaisia tuloksia saatiin ohimokuoresta (26 AD:ta ja 7 kontrollia) ChAT-aktiivisuusarvojen ollessa 7,48 ± 0,74 (kontrolli apoE3/3), 5,65 ± 0,33 (AD apoE3/3), 2,91 ± 0,66 (AD apoE4/3) ja 1,56 ± 0,47 (AD apoE4/4) nmol ACh/mg proteiinia/tunti, tässä järjestyksessä. Statistiset analyysit osoittavat, että kontrolli apoE3/3-ChST-arvot eroavat huomattavasti kaikista AD-ryhmistä ($p < 0,05$ apoE3/3:lle ja $p < 0,001$ apoE4/3:lle), kun taas AD-apoE3/3-ChAT-tasot eroavat huomattavasti AD-apoE4/3-ryhmästä ($p < 0,002$) ja apoE4/4-ryhmästä ($p < 0,02$).

ApoE4-alleelin kopiolukuun liittyvän ChAT-aktiivisuuden alenemisen voisi aiheuttaa ainakin kaksi eri ilmiötä. Ensinnäkin fosfolipidit, kuten PC ja PE, jotka voivat toimia koliinin prekursoreina Ach:n synteesissä, voitiin kuljettaa neuroneihin klassisen apoE-LDL-reseptoritien kautta. Fosfolipidien kuljetuksen isomuodosta riippuvainen heikentynyt säätely apoE4-kantajien aivoissa voisi selittää AD:ssä raportoidut PC:n, PE:n ja koliinin alentuneet tasot, mikä edelleen johtaa Ach-synteesin kapasiteetin laskuun. Vaihtoehtoisesti neuronaalisten ChAT-aktiivisuuk-

sien ja koliinitasojen aleneminen voisi olla sekundaarivaikutusta kolinergisten neuronien kadosta etuaivojen pohjassa, Meynertin tyvitumake (NBM), Brocan diagonaalijuova (DBB) ja septaalialue mukaan luettuina. Asetyylikoliiniesteraasipositiivisten neuronien lukumäärän analyysi NBM:ssä ja DBB:ssä pienellä määrällä AD-potilaita (n = 7) osoitti kolinergisten neuronien merkittävää katoa apoE4-homotsygooteilla AD-tapauksilla apoE3-homotsygootteihin nähden (↓ 70 % NBM:ssä ja ↓ 45 % DBB:ssä, kuvio 5).

Nämä tulokset osoittavat selvästi, että sporadisessa AD:ssä on selvästi erotettavia geneettisiä kokonaisuuksia, joissa nähdään kolinergisessä aktiivisuudessa tunnusmerkillisiä muutoksen asteita, ainakin osoitettuna ChAT-aktiivisuutena. Tuloksemme antavat myös olettaa, että kolinerginen funktio AD-E3/3-kantajilla saattaa säästyä ja että nämä potilaat voisivat vastata paremmin koliinivaikutuksen jäljittelyyn perustuvaan hoitoon, hypoteesi, josta keskustellaan yksityiskohtaisemmin myöhemmin. Vanhuusiän muistihäiriön kolinerginen hypoteesi, kuten sen ovat kuvanneet Bartus ja hänen kolleegansa yli kymmenen vuotta sitten [Bartus R.T. et al., Science 217 (1982) 408 - 417], nostatti joitakin perustavaa laatua olevia kysymyksiä, jotka koskivat vasteiden heterogeenisyyttä eri koliinivaikutusta jäljitteleville aineille AD:ssä. Koliinin ja lesitiinin geriatrisiin AD- ja ei-AD-potilaisiin kohdistuvien selvien edullisten vaikutusten puuttuminen on vielä hämmentävää. Lisäksi useat kliiniset tutkimukset, joissa käytetään esteraasien inhibiittoreita, kuten fysostigmiiniä ja takriinia, ovat osoittaneet, että, toisin kuin nuorilla kohteilla, optimaalinen akuutti annos, joka riittää helpottamaan muistitehtävien suoritusta, vaihteli huomattavasti iäkkäiden yksilöiden keskuudessa [Bartus R.T. et al., Science 217 (1982) 408 - 417]. Jäljempänä olevassa esimerkissä II tutkitaan apoE-genotyypin vaikutusta lääkkeen tehoon.

Niinpä on ilmeistä, että apoE4-alleelin läsnäolo on yksi avaintekijöistä, joka aiheuttaa yksilöllisiä eroja, joita tapahtuu aivojen kolinergisissä järjestelmissä, ja yksilölliset vasteet kolinergisille aineille tulisi monitoroida potilailta, joiden genotyyppi on määritetty. Tällä asialla on varmasti merkittävää painoarvoa AD:n tulevaisuuden kliinisten kokeiden suunnittelussa. AD-potilaiden, jotka vastaavat joko hyvin tai huonosti koliinivaikutusta jäljitteleviin hoitoihin, prospektiivis-retrospektiivisiä analyysejä käsitellään esimerkissä II.

Johtopäätöksenä apoE4:n läsnäolon osoitettiin olevan läheisesti yhteydessä kolmeen AD:n patofysiologian tuntomerkkiin, nimittäin seniiliplakkeihin, kimppuihin ja ChAT-aktiivisuuteen. ApoE:n ja näiden kolmen AD-patologian tunnetun markkerin välinen suhde riippuu paljon E4-alleelin kopioiden lukumäärästä. Nämä tulokset voisivat yhtä hyvin selittää edeltävät havainnot, jotka osoittavat, että apoE4-alleelin kopioluvut korreloituvat familiaalisen [Corder E.H. et al., Science 261 (1993) 921 - 923] ja sporadisen AD:n [Poirier J. et al., Apolipoprotein E phenotype and Alzheimer's Disease, Lancet 342 (1993) 697 - 699] puhkeamisiän kanssa.

Lopuksi, koska apoE4:n olemassaololla on ilmeisesti suora vaikutus kolinergiseen aktiivisuuteen aivoissa, ehdotetaan, että kliinisissä kokeissa, joihin sisältyy koliinivaikutuksen jäljittelemiseen perustuva hoito, tulisi ottaa huomioon se tosiseikka, että geneettisesti erilaisia itsenäisiä kokonaisuuksia esiintyy sporadisessa Alzheimerin taudissa ja että ne voisivat selittää hyvä- ja huonovasteiset yksilöt.

Koska koliinivaikutusta jäljitteleviä lääkkeitä voidaan lisäksi käyttää käsityskyvyn edistämiseksi henkilöillä (nuorilla ja vanhoilla), jotka eivät sairasta Alzheimerin tautia, esillä olevan keksinnön tulokset osoittavat, että käsityskykyä voitaisiin palauttaa, jopa edistää,

antamalla koliinivaikutusta jäljitteleviä aineita, kuten asetyylikoliiniagonisteja (M1-agonisti: ksanomeliini Eli Lillystä), M2-reseptoriantagonisteja (BIBN-99 Boehringer Ingeilheimista), asetyylikoliinin hajoamisen inhibiittoreita, kuten takriinia (Parke-Davis) tai E-2020:aa (Pfizer), apoE2:a tai apoE3:a kantaville, mutta ei apoE4:ää kantaville yksilöille.

Esillä oleva keksintö tulee paremmin ymmärrettäväksi, kun viitataan seuraaviin esimerkkeihin, jotka annetaan keksinnön valaisemiseksi eikä sen suojapiirin rajoittamiseksi.

Esimerkki I

Neurokemialliset lisämuutokset ja terapeuttinen vaste henkilöillä, joita on hoidettu koliinivaikutusta jäljittelevillä aineilla

I- Kolinergisen markkerin kuoleman jälkeinen tutkimus

Tapauksen valinta ja apoE-genotyypitys: Jäädytettyjä kudoksia 84 autopsialla varmistetusta sporadisen AD:n tapauksesta (35 naista, 77,3 ± 8,7 vuotta; 49 miestä, 76,1 ± 9,5 vuotta) ja 14 kontrollista (8 naista, 71,6 ± 3,6 vuotta; 6 miestä, 66,4 ± 3,1 vuotta) saatiin Douglas Hospital Brain Bankilta, Montreal, Kanada. Keskimääräinen kuolemanjälkeinen viive oli 17,2 ± 1,3 ja 20,0 ± 4,6 tuntia AD- ja kontrollihenkilöillä, tässä järjestyksessä. Tulisi muistaa, että apo E4/4-homotsygoottien henkilöiden saatavuus on erittäin rajallista, todennäköisesti siksi, että apoE4/4-homotsygootit henkilöt edustavat alle 1 %:a koko populaatiosta.

Genotyyppianalyysiä varten suurimolekyylipainoinen DNA eristettiin jäädytetyistä pikkuaivoista ja ohimokuoresta seuraavan sovellutuksen mukaan: [Nalbantoglu J. et al., Predictive value of apolipoprotein E4 mutation in Alzheimer's Disease, Ann. Neurol. 36 (1994) 889 - 895]. ApoE-genotyyppi määritettiin puhdistetun aivo-DNA:n allee-

lispesifisellä ekstensiolla käyttäen seuraavaa menetelmää: [Nalbantoglu J. et al., Predictive value of apolipoprotein E4 mutation in Alzheimer's Disease, Ann. Neurol. 36 (1994) 889 - 895]. Alukkeet, joita merkittiin kirjaimilla D, E, F, G ja H syntetisoi meille Genosys Biotech (the Woodland, TX); alukesekvenssit annetaan Mainin et al. julkaisussa [Main R.F. et al., J. Lipid. Res. 32 (1991) 183 - 187]. Reaktiot suoritettiin 50 µl:n tilavuudessa, joka sisälsi 1 µg:n DNA:ta, deoksiadenosiinitrifosfaattia, deoksisytidiinitrifosfaattia, deoksitymidiinitrifosfaattia ja deoksiguanosiinitrifosfaattia (Pharmacia, Montreal, Kanada), kutakin pitoisuudessa 0,2 mmol/l, 10-%:ista dimetyylisulfoksidia, 12,5 pmol jotakin alukkeista D, E, F, G, 25 pmol aluketta H ja 10 µl 10 PCR-reaktiopuskuria (Vector Biosystem, Toronto, Kanada). Reaktioseoksessa olevaa DNA:ta denaturoitiin ensin 10 min 96 °C:ssa ja jäähdytettiin sen jälkeen 4 °C:seen. Kuhunkin putkeen lisättiin sen jälkeen yksi yksikkö Taq-polymeraasia (Vector Biosystem, Toronto, Kanada). Kutakin näytettä kuumennettiin sen jälkeen uudelleen 2 minuutin ajan 96 °C:ssa ja niitä ajettiin 30 sykliä monistuslaitteessa kunkin syklin sisältäessä 10 sekuntia denaturaatiota 96 °C:ssa, 30 sekuntia hybridisaatiota 58 °C:ssa ja 1 minuutti ekstensiota 65 °C:ssa. Reaktiotuotteet visualisoitiin elektroforeesilla ajamalla 10 µl reaktioseosta 1-%:isessa agaroosigeelissä, joka sisälsi TPE-puskuria (0,08 mol/l Tris-fosfaattia, 0,002 mol/l EDTA:ta, Sigma, St-Louis, USA) ja etidiumbromidia (0,15 µg/ml) yhden tunnin ajan 67 V:ssa. Sen jälkeen geelit valokuvattiin ja juovaprofiilia verrattiin tunnettuihin standardeihin.

Neuropatologiset analyysit: Neurofibrillikimppujen ja seniiliplakkien indeksit määritettiin kuten toisaalla yksityiskohtaisesti on kuvattu [Aubert I. et al., J. Neurochem. 58 (1992) 529 - 541; Etienne P. et al., Neuroscience 19 (1986) 1279 - 1291]. 15 mikronin paraffiiniin

valetut hippokampussektiot värjättiin joko hematoksyliinillä ja eosiinilla, modifioidulla Bielchowskyn värillä ja alkalisella Kongo-punaisella neurofibrillikimppujen ja seniiliplakkien visualisoimiseksi. Kvantitatiiviset morfometriset arviot neurofibrillikimpuista ja seniiliplakeista määritettiin: käyttäen mikrometristä mittakaavaa kalibraatioon lukemat otettiin 10 X objektiivilla seniiliplakeista ja 25 X objektiivilla neurofibrillikimpuista. Diffuusit plakit jätettiin kaikkien mittausten ulkopuolelle. Alkalisen Kongo-punainen-värin seulontaa polarisoidussa valossa käytettiin kontrolloimaan kimppuvärjäyksen luotettavuutta ja vähemmässä määrin seniiliplakin affiniteettia modifioidulle Bielchowsky-valmisteelle. Nämä kriteerit ovat yhtäpitäviä niiden kanssa, joita käytettiin Khachaturianin klassifikaatiossa [Aubert I. et al., J. Neurochem. 58 (1992) 529 - 541].

II- Koliinivaikutusfunktiot kontrollien ja AD-potilaiden aivoissa kuoleman jälkeen

Materiaalit: [^{3}H]QNB (45,7 Ci/mmol), [^{3}H]PZ [87,0 Ci|mmol], [^{3}H]AF-DX 116 (49,3, 57,0 tai 70,0 Ci/mmol), [^{3}H]MCC (84,5 Ci/mmol) ja [^{4}C]asetyyli-CoA (48,8 mCi/mmol) ostettiin New England Nuclearilta (Boston, MA, USA). Nikotiini (vapaa emäs), atropiinisulfaatti, koliinikloridi ja eseriinihemisulfaattisuolat ostettiin Sigma Chemical Co:lta (St. Louis, MO, USA). ACh-kloridi tarjottiin Hoffmann-LaRochelta (Basel, Sveitsi). Leimaamattomat asetyyli-CoA:t ostettiin Boehringer Mannheimilta (Mannheim, F.R.G.). Tetrafenyyliboori (natriumsuola) ja 3-heptanoni ostetaan Aldrich Chemical Co:lta (Milwaukee, WI, USA). Etyyliasetaatti ostettiin American Chemicals Co:lta (Montreal, Quebec, Kanada). Naudan seerumin albumiini (98-prosenttisesti rasvahapoista vapaa) ja Ecolite-nestetuikeseos ostetaan ICN Biochemicalsilta (Irvine, CA, USA). Triton™ X-100 (100 %), nestetuikelaskuluokka, oli Amershamilta

(Arlington, IL, USA). Kaikki muut kemikaalit olivat Fisher Scientificilta (Montreal, Quebec, Kanada).

Ihmisen aivokudokset saatiin ruumiinavauksessa henkilöiltä, joilla kliinisen diagnoosin mukaan oli AD, PD tai PD/AD, ja neurologisesti normaaleilta iältään vastaavilta kontrolleilta. Kudokset antoi käyttöön Brain Bank of the Douglas Hospital Research Center (Y. Robitaille, neuropatologi). Histopatologiset kriteerit on kuvattu aikaisemmin. Biologisiin määrityksiin käytettävät aivopuoliskot jaetaan paksuihin (10 mm) kruunusiivuihin, jotka nopeasti ja syvästi jäädytettiin 2-metyylibutaaniin -40 °C:ssa ennen säilöntää -80 °C:seen. Ennen biokemiallisia määrityksiä aivosiivut sulatettiin hitaasti kylmällä levyllä ja seuraavat rakenteet leikeltiin seuraavasti: otsa- (Brodmann-alueet 9 ja 10) ja ohimokuoret (Brodmann-alueet 20, 21, 22 ja 38), hippokampus ja pikkuaivot (käyttö vähän patologisena aivoalueena).

Tulosten tulkinta

Sitoutumisparametrit (K_d- ja B_{max}-arvot) johdettiin kyllästymiskokeista, jotka analysoitiin tietokonemenetelmällä LIGAND™ [Aubert I. et al., J. Neurochem. 58 (1992) 529 - 541]. Erojen statistinen merkittävyys kontrolli- ja AD-aivojen välillä (0, 1, 2 kopiota E4-alleelia) arvioitiin käyttäen Studentin paritonta t-testiä, jolloin p-arvoja $p < 0,05$ pidettiin merkittävinä.

Määritysmenetelmä koliiniasetyylitransferaasiaktiivisuudelle (ChAT):

Kudokset eri aivoalueilta homogenisoitiin ja niitä inkuboitiin 15 minuuttia puskurissa, joka sisältää [^{14}C]-asetyyli-CoA:ta, kuten edellä on kuvattu yksityiskohtaisemmin [Aubert I. et al., J. Neurochem. 58 (1992) 529 - 541] ChAT-aktiivisuuden määrittämiseksi.

Monet biokemialliset ja patologiset tutkimukset ovat osoittaneet, että kolinergisten markkerientsyymien, kuten ChAT:n, immunoreaktiivisuudet ja aktiivisuudet las-

kevat AD-potilaiden nuoressa kuoriosassa sekä hippokampuksessa. Kuten kuviosta 6 nähdään, apoE4-alleelin kopioluku on kääntäen verrannollinen ChAT-aktiivisuuteen iältään yhteen sopivien kontrollien ja AD-potilaiden hippokampuksessa ja ohimokuoressa. Kuviossa 6 kukin pylväs viittaa keskiarvoon ± S.E.M.. Huomattavat erot ryhmien välillä osoitetaan tähtien lukumäärällä: *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$. Silmiinpistävät ChAT-aktiivisuuden pienenemiset nähtiin apoE4-kantajilla. ChAT-arvot esitetään kuviossa 1 eri määriä apoE4-alleelia sisältävien AD-potilaitten hippokampuksesta (23 AD:ta ja 30 kontrollia) ja ohimokuoresta (30 AD:ta ja 12 kontrollia).

Statistiset analyysit osoittavat, että ChAT-tasot AD-potilailla (1 tai 2 kopiota apoE4:ää) eroavat huomattavasti kontrollihenkilöiden AD:stä (0 tai 1 apoE4-kopio).

Asetyylikoliiniesteraasipositiivisten neuronien tiheys subkortikaalialueilla, joka heijastuu ohimokuoren ja hippokampuksen rakenteisiin, esitetään kuviossa 7. Neuronaalinen solutiheys Ch2:ssa, Ch4a:ssa ja Ch4i:ssä ilmaistaan prosentteina kontrolliarvoista. Tumajyväsen tilavuus ilmaistaan μm^2:nä. Täplätiheys ilmaistaan lukumääränä mm^3:a kohden samojen potilaiden hippokampuksessa. Osan näistä tuloksista julkaisivat Etienne ja hänen kolleegansa [Neuroscience 19 (1986) 1279 - 1291]. Alunperin potilaiden genotyyppiä ei tiedetty eikä sitä voitu tuolloin määrittää. Tuon jälkeen analysoimme uudelleen tulokset henkilöille, joille genotyyppi voitiin määrittää. Kolme AD-henkilöä ovat apoE4-negatiivisia, kun taas neljä AD-henkilöä ovat apoE4-positiivisia. Tulokset selvästi vahvistavat edeltävät tulokset, joissa AD-henkilöillä osoitetaan merkittävää kolinergisten neuronien katoa Ch2:ssa, Ch4a:ssa ja Ch4i:ssä, ja se myös korostaa sitä tosiasiaa, että apoE4-alleelin läsnäolo mahdollistaa merkittävästi neuronien katoa Ch2:ssa ja Ch2a:ssa ($p < 0,01$) ja Ch4i:ssä ($p < 0,05$).

[^{3}H]QNB:n sitoutuminen muskariinikohtien kokonaispopulaatioon

Pistonäytteet kuoren ja alakuoren kudoksista kontrollihenkilöistä ja AD-aivoista homogenoitiin, sentrifugoitiin ja suspendoitiin uudelleen Krebs-puskuriin, kuten edellä on kuvattu yksityiskohtaisesti [^{3}H]PZ-määrityksessä. Lopulliset membraanipelletit suspendoidaan puskuriin noin pitoisuudessa 3,0 - 5,0 mg proteiinia/ml. Näytteitä membraanirikastetusta homogenaatista (0,6 - 1,0 mg proteiinia) inkuboidaan Krebs-puskurissa kyllästetyssä pitoisuudessa [^{3}H]QNB:tä (10 nM) 60 minuuttia huoneen lämpötilassa (23 °C) 0,5 ml:n kokonaistilavuudessa. Kaikki määritykset suoritetaan rinnakkaisina. Sitoutunut [^{3}H]QNB erotetaan vapaasta ligandista nopealla suodatuksella alipaineessa Schleicher & Schuellin lasisuodattimella nro 32, joka on esikastettu 0,1-%:iseen polyetyleeni-imiiniliuokseen käyttäen Brandel Cell Harvester -laitetta (Brandel, Gaithersburg, MD, USA). Sen jälkeen suodattimet pestään nopeasti jääkylmällä puskurilla kolme kertaa, 4,5 ml kerralla, ennen kuin se kuivataan. Suodattimien radioaktiivisuudet määritetään nestetuikelaskimella käyttäen Beckmanin malli LS7000 -nestetuikelaskinta 48 %:n teholla. Epäspesifinen sitoutuminen, joka on määritetty 1 μM atropiinisulfaatin läsnä ollessa, edustaa yleensä < 15 %:a kokonaissitoutumisesta.

[^{3}H]PZ:n sitoutuminen ihmisen aivojen muskariini-M_1-kohtiin

Aivokudokset käsitellään kuten aikaisemmin on kuvattu. Näytteitä lopullisista homogenaateista inkuboidaan Krebs-puskurissa erilaisilla pitoisuuksilla [^{3}H]PZ:aa (0,1 - 20 nM) 60 minuuttia huoneenlämpötilassa (23 °C). Määritykset lopetetaan ja radioaktiivisuus määritetään kuten edellä on kuvattu [^{3}H]QNB:n sitoutumiselle. Epäspesifinen sitoutuminen on määritetty kokonaissitoutumisen yh-

teydessä ligandipitoisuuksilla, jotka ovat lähellä K_d-arvoja.

[^{3}H]AF-DX 116:n sitoutuminen ihmisen aivojen oletettuihin muskariini M2-kohtiin

Aivokudoksia käsitellään kuten on edellä esitetty [^{3}H]QNB:lle. Näytteitä lopullisista homogenaateista inkuboidaan Krebs-puskurissa eri pitoisuuksilla [^{3}H]AF-DX 116:ta (0,1 - 20 nM) 60 minuuttia 4 °C:ssa. Määritykset lopetetaan ja radioaktiivisuus määritetään kuten on edellä kuvattu [^{3}H]QNB:n sitoutumiselle. Epäspesifinen sitoutuminen, joka on määritetty 1 μM atropiinisulfaatin läsnä ollessa, edustaa yleensä < 40 %:a kokonaissitoutumisesta ligandipitoisuuksissa, jotka lähestyvät K_d-arvoja.

Muskariinisitoutumiskohdat (kokonais-, M1- tai M2-) eivät muutu AD-henkilöillä kontrollihenkilöihin nähden hippokampuksessa. ApoE-genotyypillä ei ole merkittävää painoa näiden reseptorien aktiivisuuteen. Muskariini-M1- ja muskariini-M2-reseptorikohdat eivät muutu AD-henkilöillä kontrollihenkilöihin nähden ohimokuoressa, kun taas niin kutsutut kokonais-(QNB)-muskariinisitoutumiskohdat vähenevät hieman AD-henkilöillä kontrollihenkilöihin verrattuna (ei genotyyppivaikutusta tässä reseptoriryhmässä).

[^{3}H]MCC:n sitoutuminen ihmisen aivojen nikotiinikohtiin

Aivokudoksia käsitellään kuten edellä on kuvattu [^{3}H]QNB:lle sillä poikeuksella, että näytteet homogenisoitiin 50 mM Tris-HCl-puskurissa. Näytteitä lopullisista homogenaateista inkuboitiin 50 mM Tris-HCl-puskurissa eri [^{3}H]MCC-pitoisuuksilla (0,1 - 20 nM) 60 minuuttia 4 °C:ssa. Määritykset lopetetaan ja radioaktiivisuus määritetään kuten on edellä kuvattu [^{3}H]QNB:n sitoutumiselle. Epäspesifinen sitoutuminen, joka on määritetty 10 μM nikotiinin läsnä ollessa, edustaa yleensä < 50 %:a kokonaissitoutumisesta ligandipitoisuuksissa, jotka lähestyvät K_d-arvoja.

Nikotiinireseptorisitoutumiskohdat vähenevät huomattavasti apoE4-AD-henkilöillä, kun taas AD-henkilöt, jotka eivät kanna apoE4:ää, eivät eroa kontrollihenkilöistä. Tämä pätee AD:ssä sekä hippokampus- että ohimoalueilla.

Laboratoriossamme suoritettu analyysi osoittaa, että merkittävästä deafferentaatiosta ja neuronaalisten solujen kadosta huolimatta AD-henkilöiden hippokampuksessa, apoE-proteiinitasot eivät muutu tai ne vähenevät apoE4-kantajilla; tämä käy yksiin aikaisemman raporttimme kanssa, jossa käytettiin ei-fenotyypitettyjä AD-henkilöitä. E4-alleeli liittyy periferiassa epänormaalin alhaisiin apoE-tasoihin ja suuriin pitoisuuksiin kiertäviä lipoproteiineja, lisääntyviin plasma- ja LDL-kolesterolimääriin, muuntuneeseen lipoproteiinien jakautumiseen ja mikä tärkeintä apoE4:n nopeaan kataboliaan apoE3:n kataboliaan verrattuna [Gregg R.E. et al., J. Clin. Invest. 87 (1986) 815 - 821]. Tästä saatetaan vetää sellainen johtopäätös, että apoE4 eroaa metabolisesti apoE3:sta, ja tämä saattaa siten selittää häiriot lipidihomeostaasissa, joita on raportoitu AD-aivoissa. Esimerkiksi fosfatidyylikoliini- (PC), fosfatidyylietanoliamiini- (PE) ja kolesterolitasot pienenevät huomattavasti AD-potilaiden aivoissa [Pettegrew, J.W., Ann. NY Acad. Sci. 568 (1989) 5 - 28; Nitch RM et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 89 (1992) 1671 - 1675] ja niiden on osoitettu olevan kääntäen verrannollisia seniiliplakkien lukumäärän kanssa kortikaalikerroksissa II ja IV]Pettegrew, J.W., Ann. NY Acad. Sci. 568 (1989) 5 - 28].

Aivokalvon fosfolipidien, erityisesti PC:n ja PE:n, on osoitettu näyttelevän tärkeää osaa koliinin, asetyylikoliinin (ACh) määrää rajoittavan prekursorin, saatavuudessa [Nitch RM et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 89 (1992) 1671 - 1675]. Vapaan koliiniprekursorin vapautuminen PC:stä ACh-synteesiä varten toteutetaan yhden vaiheen

prosessina fosfolipaasi D -tyyppisen entsyymin avulla kolinergisissä neuroneissa [Lee H.E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 10086 - 10090]. Koliinin tasot aivoissa laskevat aina 40 - 50 %:lla AD-potilaiden otsan ja päälaen kuorissa [Nitch RM et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 89 (1992) 1671 - 1675]. Samoin tarvitaan ilmeisesti kolesterolia nikotiinireseptorin kunnon toimintaa varten [Jones O.T. & McNamee M.G., Biochemistry 27 (1988) 2364 - 2374]. Koska kolinergisten neuronien ja/tai ChAT-aktiivisuuden lasku ovat hyvin tunnettuja klassisia AD:n tuntomerkkejä [Perry E.K. et al., J. Neurol. Sci. 34 (1977) 247 - 265; Davies P. et al., Lancet 2 (1976) 1403], mahdollista suhdetta apoE4-genotyypin ja kolinergisten vajausten välillä pidettiin erittäin tarkoituksenmukaisena tutkimuksen kohteena. Havaitsimme, että ChAT-aktiivisuuden pieneneminen AD-tapausten hippokampuksessa ja ohimokuoressa on kääntäen verrannollinen apoE4-alleelin kopiolukuun (ts. kun apoE4-alleelin kopioluku nousi, ChAT-aktiivisuus laski). Tuloksemme osoittavat siis selvästi sellaisten selvien geneettisten kokonaisuuksien olemassaolon sporadisessa AD:ssa, jotka osoittavat tunnusmerkillisiä muutoksen asteita kolinergisessä hermotuksessa, jotka ilmenevät ainakin kuoleman jälkeisenä ChAT-aktiivisuuden jäännöksenä. Toisen presynaptisen koliinivaikutusta heijastavan markkerin, nikotiinireseptorin, havaittiin myös vähenevän merkittävästi apoE4-AD-henkilöillä. Tyypillinen postsynaptinen markkeri, M1-muskariinireseptori, säilyi AD-henkilöillä päinvastoin muuttumattomana kontrollihenkilöihin verrattuna, huolimatta siitä oliko apoE4 läsnä vai ei. M2-muskariinireseptoriin, joka edustaa yhdistettyä pre- ja postsynaptista markkeria, ei myöskään vaikuta apoE4-alleeligeeniannos.

Korrelaatio apoE4-alleelin kopioluvun ja ChAT-aktiivisuuden ja nikotiinireseptorien vähenemisen välillä voidaan selittää ainakin kahdella eri ilmiöllä. Ensinnäkin

fosfolipidejä, kuten PC:tä ja PE:tä, jotka voivat toimia koliinin prekursoreina ACh:n synteesissä, voitiin kuljettaa neuroneihin klassisen apoE-LDL-reseptoritien kautta [Goldstein J.L. et al., Ann. Rev. Biochem. 46 (1977) 897 - 930]. Fosfolipidien kuljetuksen isomuodoista riippuvainen heikennetty säätely apoE4-kantajien aivoissa voisi selittää AD:ssä raportoidun PC:n, PE:n ja koliinin matalammat tasot [Pettegrew J.W., Ann. NY Acad. Sci. 568 (1989) 5 - 28; Nitch RM et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 89 (1992) 1671 - 1675], joka puolestaa voisi johtaa ACh:n synteesikapasiteetin laskuun. Tämä hypoteesi on yhtäpitävä sellaisten AD-henkilöillä raportoitujen membraanivaurioiden kanssa, kuten muutokset membraanin fluiditeetissä AD-henkilöiden hippokampuksessa ja verihiutaleissa. AD:ssä raportoitu kolesterolihukka ja apoE4:n vaikutus nikotiinin sitoutumisaktiivisuuteen sopivat hyvin yhteen apoE4/heikennetty lipidihomeostaasi -hypoteesin kanssa.

Lisäksi neuronaalisten ChAT-aktiivisuuksien ja koliinitasojen lasku voisi olla rinnastettavissa kolinergisten neuronien kadon kanssa etuaivojen pohjassa, Meynertin tyvitumake (NBM), Brocan diagonaalijuova (DBB) ja septaalialue mukaan luettuina. Asetyylikoliiniesteraasipositiivisten neuronien lukumäärän analyysi NBM:ssä ja DBB:ssä, genotyypeissä, AD-potilailla osoitti merkittäviä kolinergisten neuronien katoa apoE4-kantajilla apoE3-homotsygootteihin AD-tapauksiin nähden.

Esimerkki II

Hoito asetyylikoliiniesteraasi-inhibiittorilla (takriini, Parke-Davis) Alzheimerin tautia sairastavalla ihmisellä: ApoE-genotyypin vaikutus.

Tutkimuksen suunnittelu

Tässä kuvatut takriinitutkimustulokset julkaisivat alunperin Knapp, Gracon et al. [Journal American Medical Association 271 (1994) 985 - 991]; apoE-genotyypit olivat kuitenkin tuolloin tuntemattomia. Tutkimus oli 30 viikon

tutkimus, jossa potilaat kuuluivat mielivaltaisesti yhteen neljästä hoitoryhmästä: lume tai asteittaiset takriiniannokset. Takriinihoitoryhmässä kaikki potilaat aloittivat hoidon 40 mg:lla päivässä. Eräässä ryhmässä takriinia lisättiin 80 mg:aan päivässä, jolle tasolle jäätiin tutkimuksen loppuun asti. Muut kaksi ryhmää saivat takriinia asteittaisina annoksina 80 mg:sta päivässä 120 ja 160 mg:aan päivässä. Vain jälkimmäinen ryhmä potilaita otettiin nykyiseen genotyyppianalyysiin.

Neljäkymmentä Alzheimerin tautipotilasta, jotka saivat maksimiannoksen takriinia (40 mg/päivä 6 viikkoa, 80 mg/päivä 6 viikkoa, 120 mg/päivä 6 viikkoa 160 mg/päivä 12 viikkoa yhteensä 30 viikkoa) ja kävivät loppuun asti lääkekokeilun, valittiin apoE-fenotyypin määritykseen, jossa käytettiin seerumin proteiineja kuten edellä on kuvattu [Poirier et al., Apolipoprotein E phenotype and Alzheimer's Disease, Lancet 342 (1993) 697 - 699]. Potilaiden valinta tehtiin sen mukaan oliko vastetta lääkehoidolle tai ei. Alzheimer's Disease Assessment Scalea (ADAS) käytettiin hoidon vaikutusten monitoroimiseen. Puolet valituista potilaista osoittivat vastetta lääkkeelle (positiiviset ADAS-erot) tai vasteen puuttumista (negatiivinen ADAS-delta). Sen jälkeen tutkimme eri genotyyppien vaikutusta (apoE2/2, 3/2, 3/3, 3/4, 2/4 ja 4/4) terapeuttiseen vasteeseen käyttäen ADAS-cog- ja ADAS-kokonais-testituloksia, jotka oli saatu ennen takriinin antamista ja antamisen jälkeen. ADAS-cog on objektiivinen testi, joka arvioi muistia, huomiokykyä, järkeilyä, sopeutumista ja käytäntöä: laskeva pistemäärä ajan funktiona (tai positiivinen ero) osoittaa paranemista [Rosen W.G. et al., Am. J. Psychiatr. 141 (1984) 1356 - 1364]. Kokonais-ADAS sisältää ADAS:n havainto-osan ja ei-havainto-osan.

Kolinerginen lääkevaste genotyypitetyillä AD-potilailla

Kuviossa 8 kuvataan AD-potilaiden lääkeainevaste (ADAD-cog ja kokonais-ADAS) apoE4-alleelin funktiona. Ku-

kin pylväs edustaa yksilöitä. Positiiviset delta-arvot (ero ADAS-arvossa lopussa miinus ADAS-arvo ennen lääkehoitoa) osoittavat paranemista havaitsemiskyvyssä (ADAS cog) ja kokonaisvaltaisissa suorituksissa (kokonais-ADAS). Negatiiviset arvot edustavat potilaita, jotka huononivat ajan ja lääkehoidon kuluessa. Kaikki henkilöt ovat AD-potilaita, kaikkia hoidettiin samalla lääkkeellä, samalla määrällä, saman ajan. Ainoa kriittinen tekijä, joka erottaa ne, on apoE4-alleelin läsnäolo tai puuttuminen.

Tulos osoittaa selvästi, että yli 85 % apoE4-negatiivisista henkilöistä osoittavat paranemista takriinin antamisen seurauksena (kokonais-ADAS), kun taas 60 % apoE4-positiivisista henkilöistä huononevat lääkeainehoidossa. Toisin sanoen neljä henkilöä viidestä, jotka eivät vastaa takriiniin, ovat apoE4-positiivisia. ADAS-cog-asteikko osoittaa samanlaista vasteprofiilia apoE4-kantajilla ja -ei-kantajilla.

Yhteenvedettyinä tuloksemme antavat selvästi olettaa, että kolinerginen funktio AD-E3/3-, 3/2- ja 2/2-henkilöillä säilyy ainakin osittain verrattuna AD-E4/3-, AD-E4/2- ja AD-E4/4-kantajiin. Mikä tärkeintä tämä geneettinen alttius johtaa ilmeisesti AD-potilaiden alaryhmiin, jotka vastaavat eri tavoin koliinivaikutuksen matkimiseen perustuviin hoitoihin, jolloin E4-kantajilla on suurempi riski menettää ACh-synteettiset kapasiteetit. Tämä hypoteesi testattiin muodollisesti takriinilla hoidetuilla AD-potilailla, joilla oli eri apoE-genotyypit. Kuten odotettavissa oli, apoE4-negatiivisten henkilöiden havaittiin vastaavan erittäin hyvin asetyylikoliiniesteraasi-inhibiittoriin, takriiniin, (asetyylikoliinimetabolian edistäjä) verrattuna apoE4-kantajiin.

Geriatrisen muistin huononemisen koliinivaikutushypoteesi [Bartus R.T. et al., Science 217 (1982) 408 - 417] nostattaa joitakin peruskysymyksiä koskien kliinisten vasteiden havaittua heterogeenisyyttä eri koliinivaikutusta

jäljitteleviin aineisiin eri AD-potilailla. Koliinin ja lesitiinin selvien edullisten vaikutusten puuttuminen geriatrisilla potilailla, joilla on AD tai joilla ei ole, on aina ollut melko hämmentävä. Lisäksi kliiniset kokeet, jotka perustuvat esteraasi-inhibiittorien, kuten fysostigmiinin käyttöön [Davis K.L. et al., N. Engl. J. Med. 301 (1979) 946 - 951] ja takriinin käyttöön [Davis K.L. et al., N. Engl. J. Med. 327 (1992) 1253 - 1259] ovat osoittaneet, että toisin kuin nuorilla henkilöillä, optimaalinen akuutti annos, joka riittää helpottamaan muistitehtävien suoritusta, vaihteli huomattavasti yksityisten iäkkäiden kontrollihenkilöiden ja AD-potilaiden keskuudessa.

ApoE4-alleelin läsnäolo on nyt ilmeisesti tärkein tekijä, josta seuraa yksilölliset erot aivojen koliinivaikutushermotuksen jäännöksessä, AD:ssa, ja se selvästi ennustaa koliinivaikutukseen perustuvien hoitojen kliinisen tuloksen. Genotyypitetyillä AD-potilailla monitoroitu kliininen vaste kolinergisiin aineisiin osoitti, että apoE4-kantajilla ei todennäköisesti ole hyvää vastetta, ainakaan käytettäessä ACh-prekursoreita ja esteraasipohjaisia hoitoja.

17

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä geneettisesti karakterisoidun Alzheimerin tautipotilaan hoitamiseksi, jolla on alttius vastata koliinivaikutusta jäljitteleviin hoitoihin, t u n n e t t u siitä, että

a) määritetään apolipoproteiini E2- ja E3 -alleelin läsnäolo tai apolipoproteiini E4 -alleelin puuttuminen mainitun potilaan perifeerisestä kudoksesta, mikä osoittaa heikkenemisen astetta aivojen asetyylikoliinisynteesissä ja nikotiinireseptoriaktiivisuudessa, ja

b) annetaan mainitulle potilaalle sopivaa terapeuttista ainetta suhteessa mainittuun vaiheen a) heikkenemisen asteeseen.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu terapeuttinen aine valitaan ryhmästä, joka sisältää asetyylikoliinin hajoamisen inhibiittoreita, asetyylikoliinin synteesin edistäjiä, asetyylikoliiniagonisteja tai sitä jäljitteleviä aineita ja muskariini-M2-reseptoriantagonisteja.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että apolipoproteiini E2- ja E3 -alleelin läsnäolo tai apolipoproteiini E4 -alleelin puuttuminen määritetään suoraan genotyypittämällä tai epäsuoraan fenotyypittämällä.

4. Menetelmä sellaisten ihmisyksilöiden osoittamiseksi, joissa tapahtuu käsityskyvyn heikkenemistä iän, Alzheimerin taudin tai muiden neurodegeneratiivisten sairauksien ansiosta, joilla voi olla vastetta koliinivaikutusta jäljitteleviin hoitoihin, t u n n e t t u siitä että määritetään apoE2- ja apoE3-geenialleelien kopioiden lukumäärä tai apoE4-geenialleelin puuttuminen mainitun potilaan biologisesta näytteestä, ja apoE2- ja/tai apoE3-geenialleelin läsnäolo ja apoE4:n puuttuminen osoittaa

alttiutta vastata koliinivaikutuksen jäljittelemiseen perustuviin hoitoihin.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että apolipoproteiini E2- ja E3 -alleelin läsnäolo tai apolipoproteiini E4 -alleelin puuttuminen määritetään suoraan genotyypityksellä käyttämällä sopivia apoE2- ja apoE3-koettimia tai epäsuoraan fenotyypityksellä.

6. Menetelmä sellaisen Alzheimerin tautipotilaan osoittamiseksi, joka saattaa vastata käsityskyvyn edistäjiin ja koliinivaikutusta jäljitteleviin hoitoihin, t u n n e t t u siitä, että määritetään apoE2- ja apoE3-geenialleelien kopioiden lukumäärä mainitun potilaan biologisesta näytteestä, ja apoE2- ja/tai apoE3-geenialleelien läsnäolo ja apoE4:n puuttuminen osoittavat alttiutta vastata koliinivaikutuksen jäljittelemiseen perustuviin hoitoihin.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että apolipoproteiini E2- ja E3 -alleelin läsnäolo tai apolipoproteiini E4 -alleelin puuttuminen määritetään suoraan genotyypittämällä käyttäen sopivia apoE2- ja apoE3-koettimia tai epäsuoraan fenotyypittämällä.

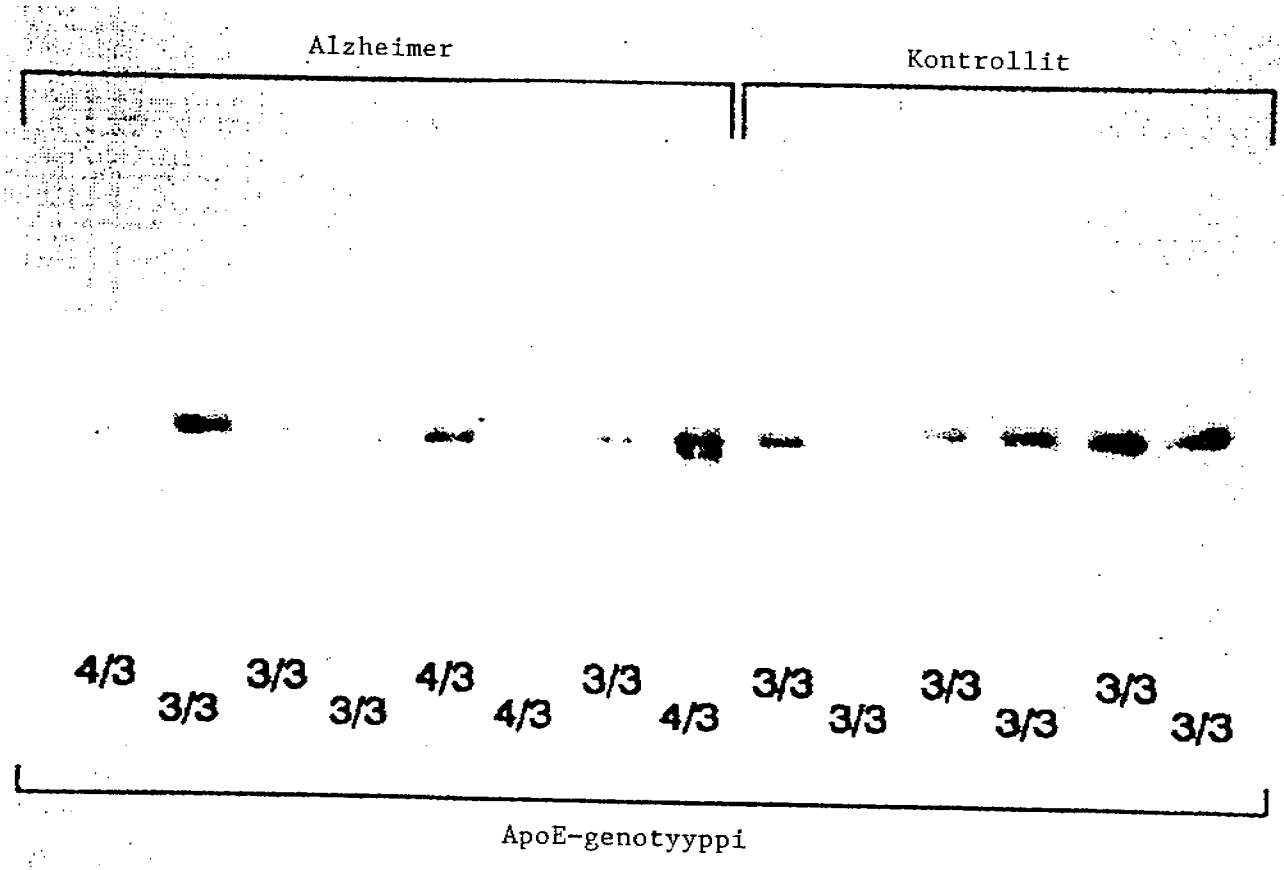
Alzheimer
Kontrollit
4/3
3/3
3/3
3/3
4/3
4/3
3/3
4/3
3/3
3/3
3/3
3/3
3/3
3/3
ApoE-genotyyppi

FIG. 1

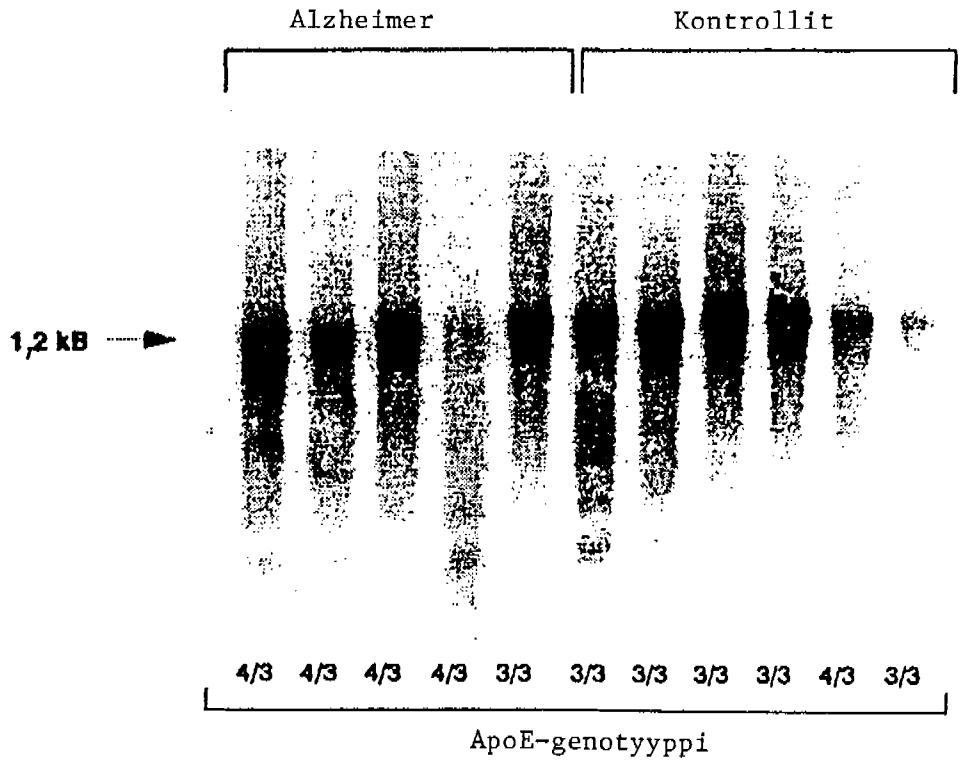
Alzheimer
Kontrollit
1,2 kB
4/3 4/3 4/3 4/3 3/3 3/3 3/3 3/3 3/3 4/3 3/3
ApoE-genotyyppi

Fig. 2

23.12.96 96204

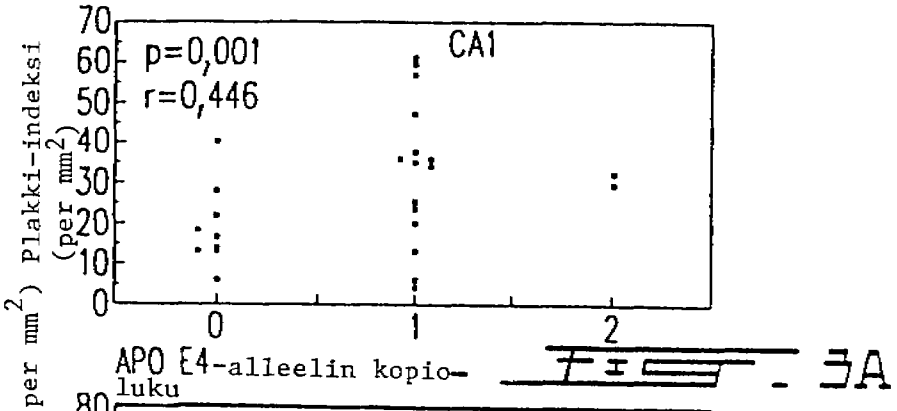

Fig. 3A

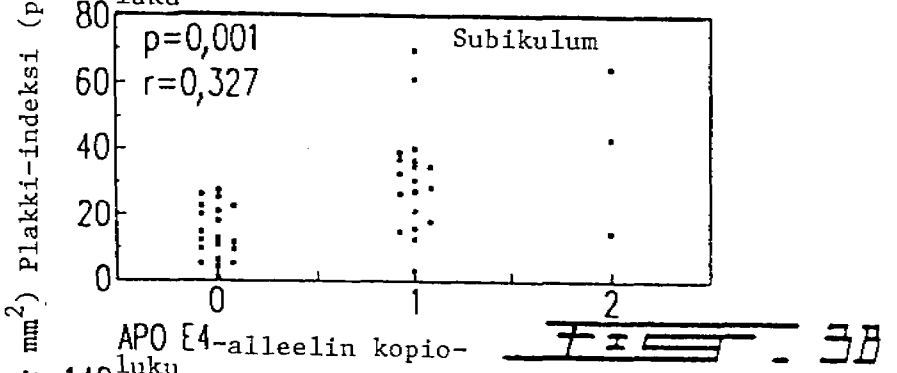

Fig. 3B

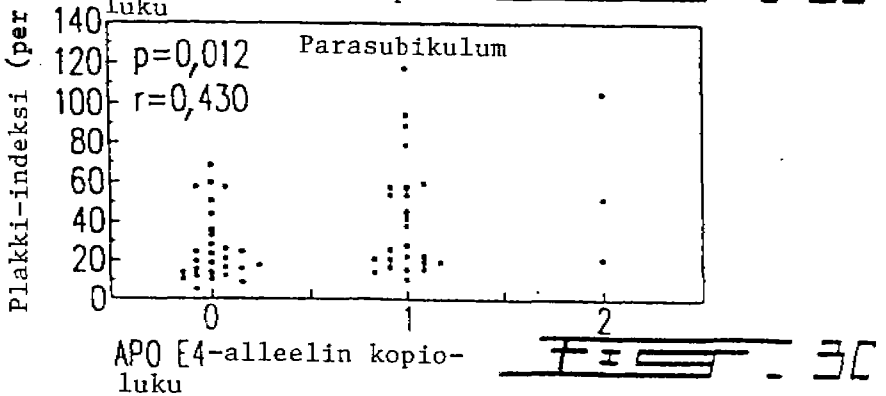

Fig. 3C

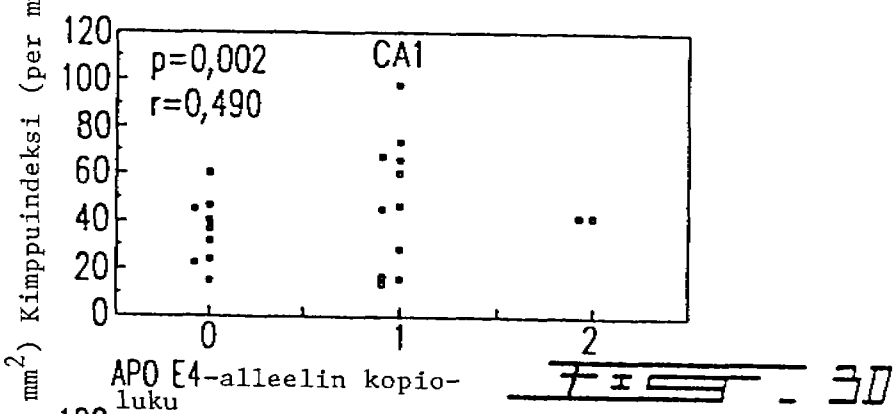

Fig. 3D

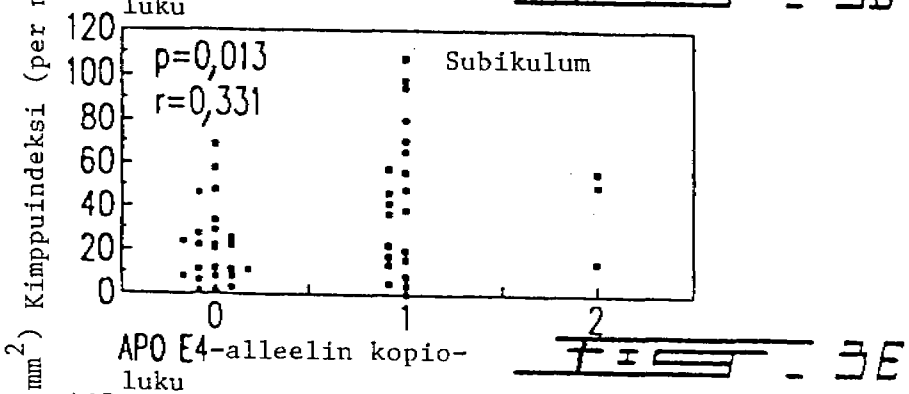

Fig. 3E

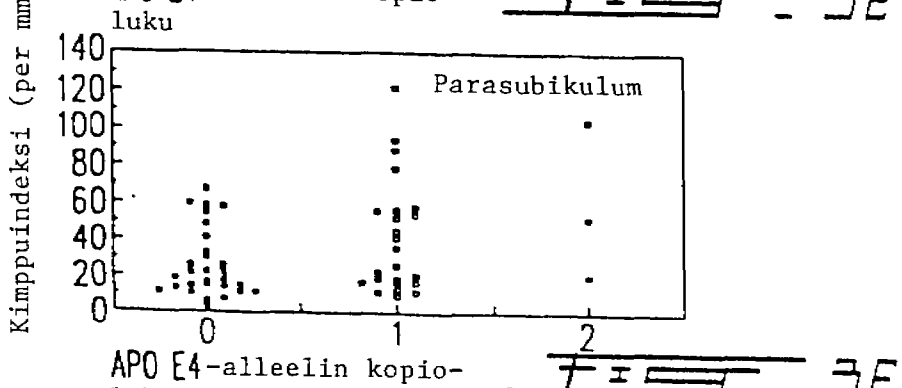

Fig. 3F

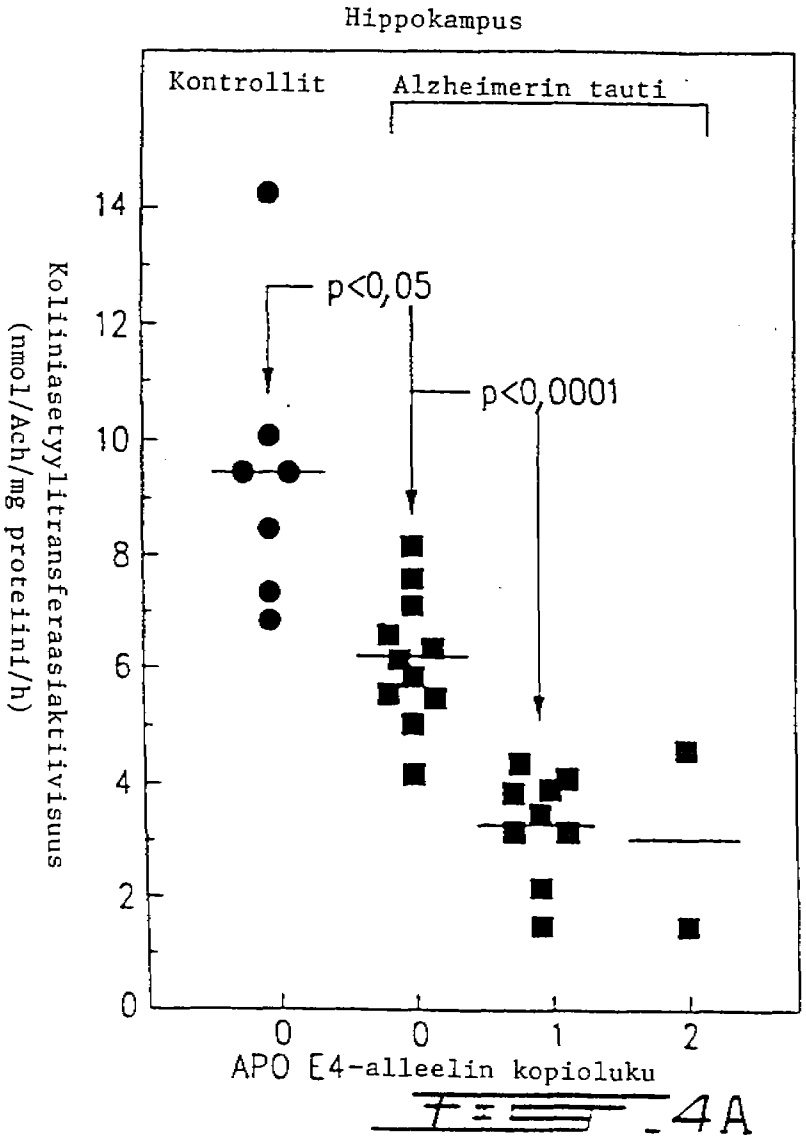
Hippokampus
Kontrollit
Alzheimerin tauti
p<0,05
p<0,0001
Koliiniasetyylitransferaasiaktiivisuus
(nmol/Ach/mg proteiini/h)
0
2
4
6
8
10
12
14
0
0
1
2
APO E4-alleelin kopioluku

Fig. 4A

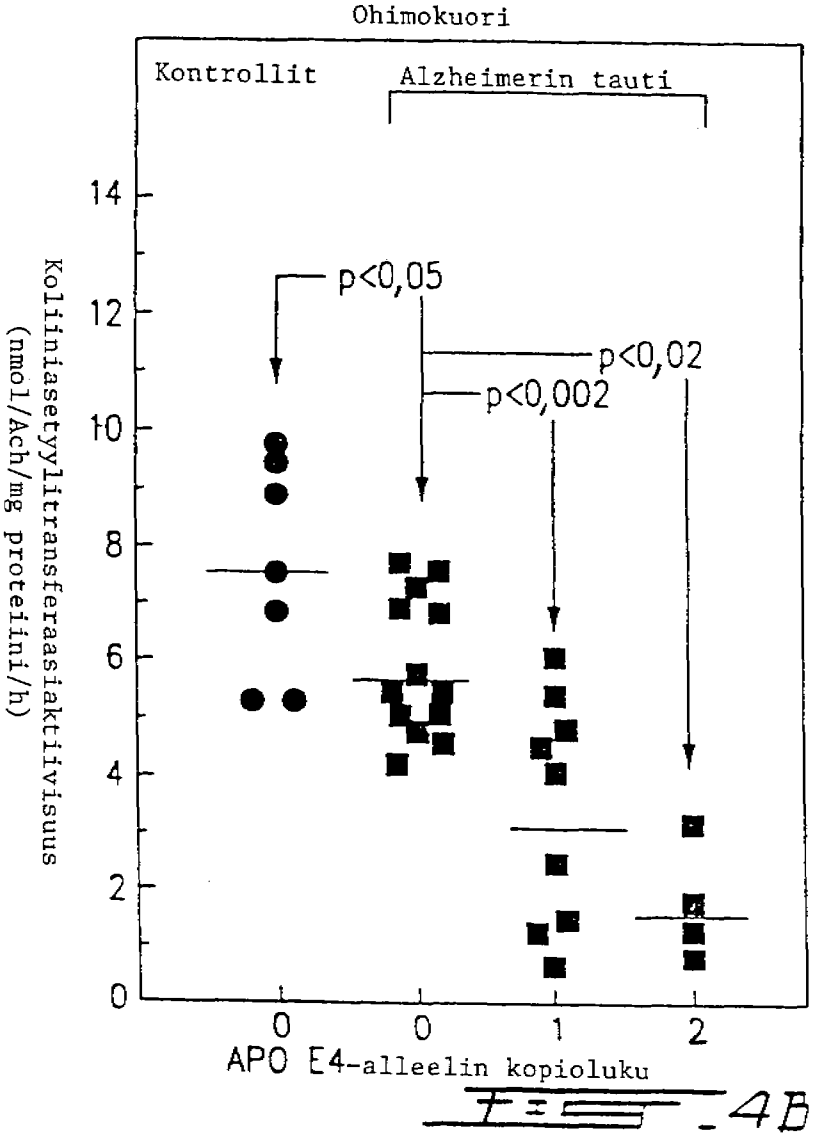
Ohimokuori
Kontrollit
Alzheimerin tauti
p<0,05
p<0,02
p<0,002
Koliiniasetyylitransferaasiaktiivisuus
(nmol/Ach/mg proteiini/h)
0
2
4
6
8
10
12
14
0
0
1
2
APO E4-alleelin kopioluku

Fig. 4B

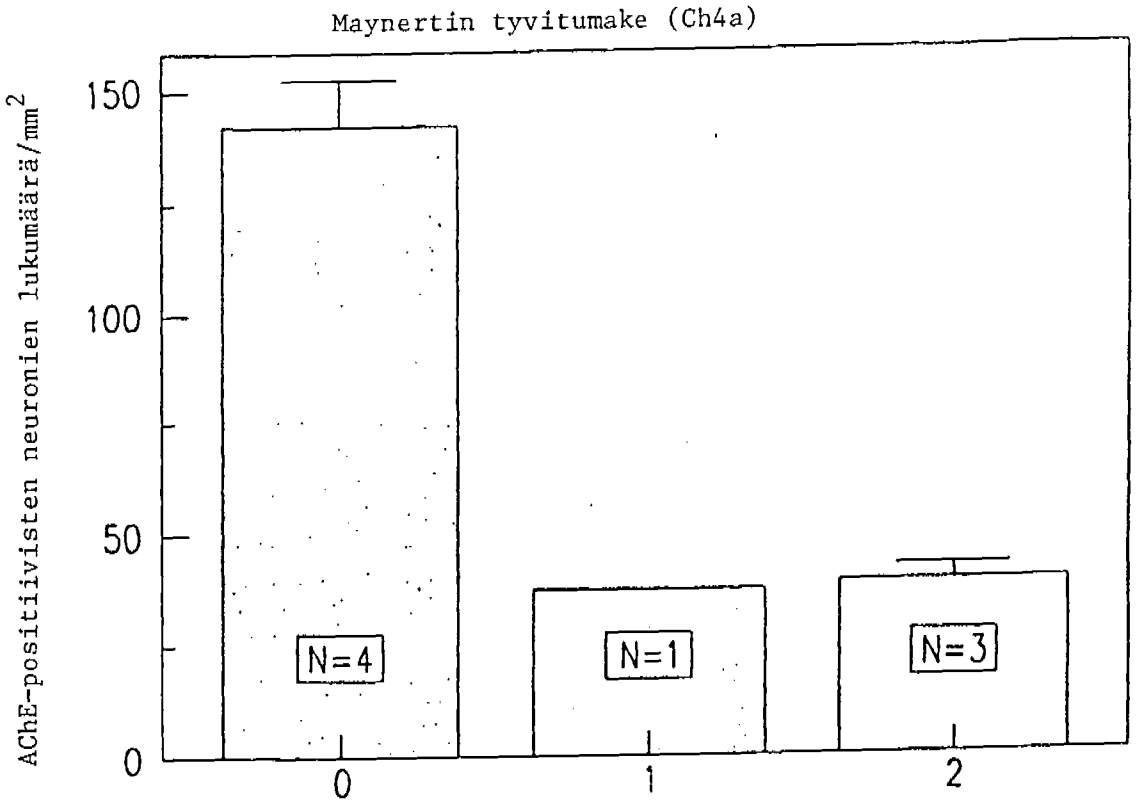
Maynertin tyvitumake (Ch4a)
AChE-positiivisten neuronien lukumäärä/mm2
150
100
50
0
N=4
N=1
N=3
0
1
2
APO-E4-alleelin kopioluku

FIG. 5A

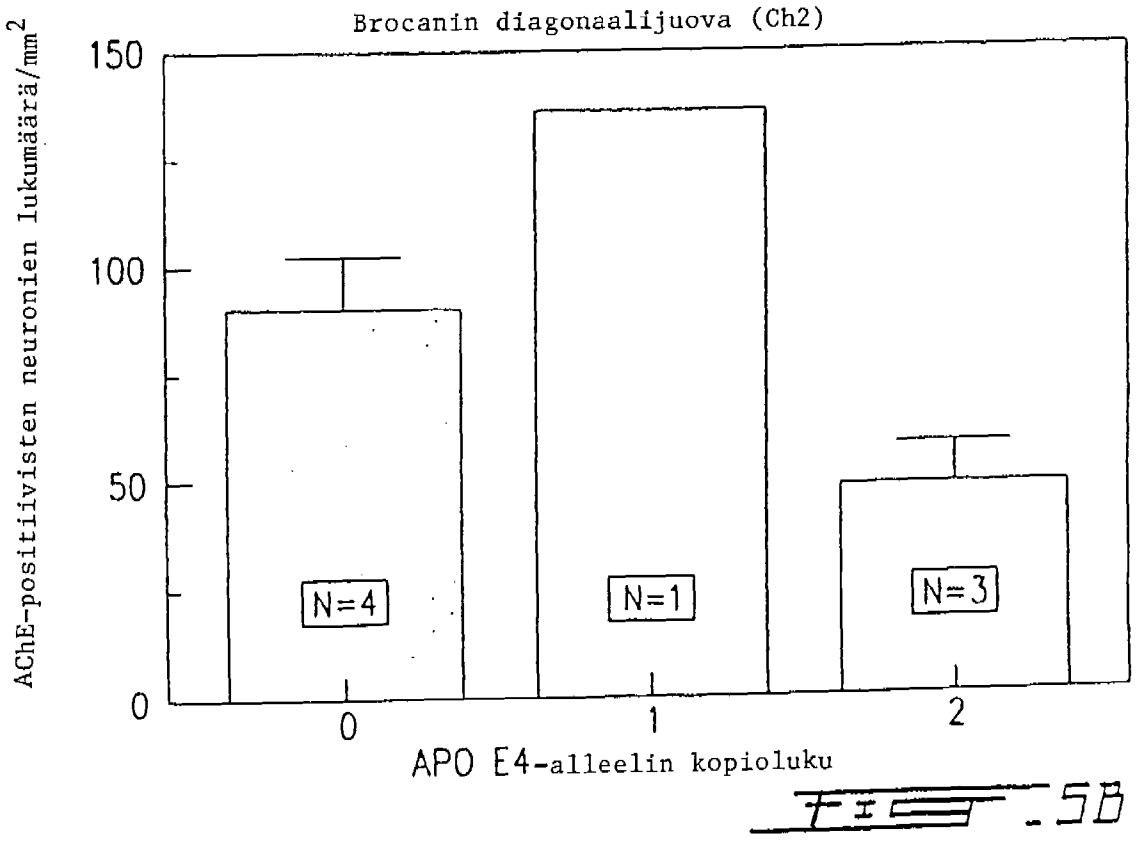
Brocanin diagonaalijuova (Ch2)
AChE-positiivisten neuronien lukumäärä/mm2
150
100
50
0
N=4
N=1
N=3
0
1
2
APO E4-alleelin kopioluku

FIG. 5B

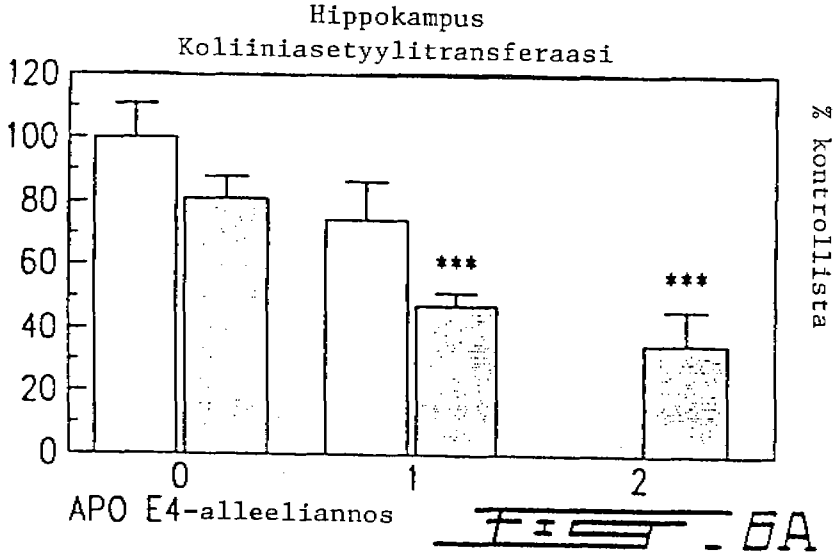

Fig. 6A

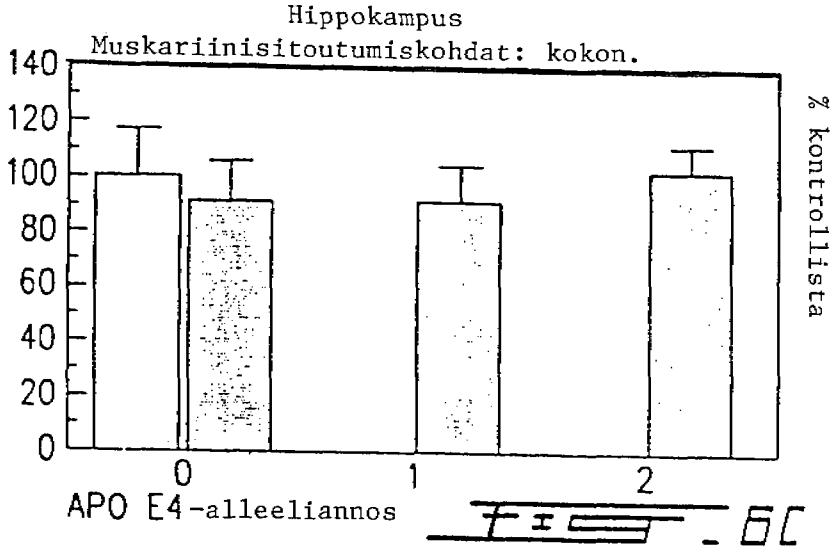

Fig. 6C

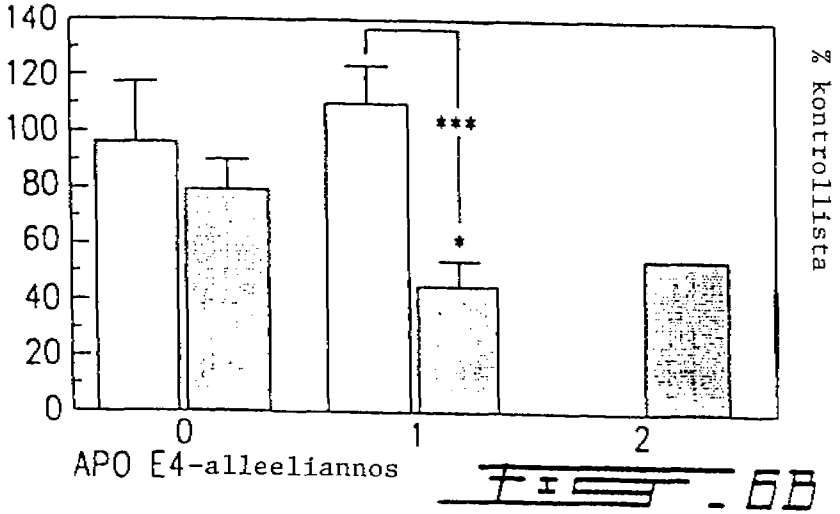

Fig. 6B

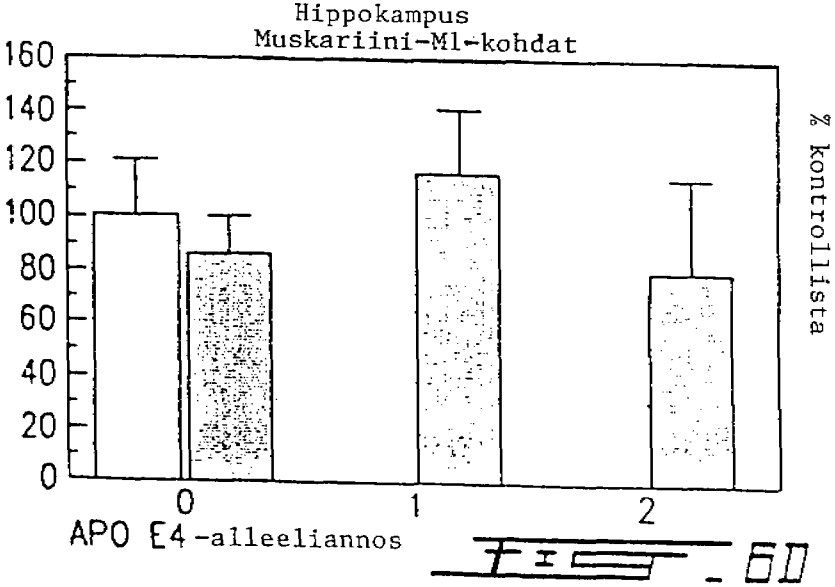

Fig. 6D

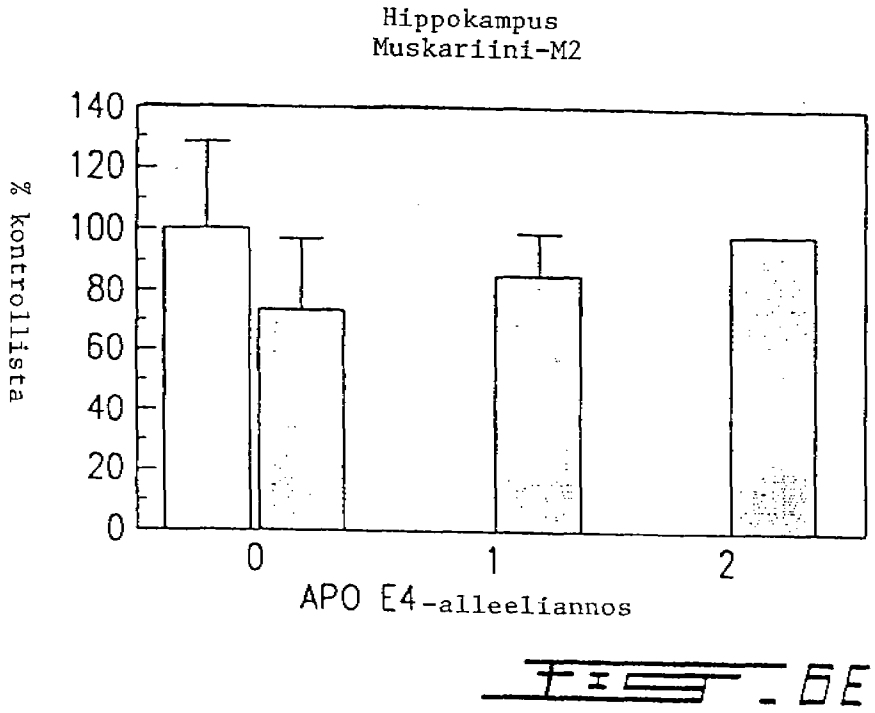
Hippokampus
Muskariini-M2
% kontrollista
140
120
100
80
60
40
20
0
0
1
2
APO E4-alleeliannos

Fig. 6E

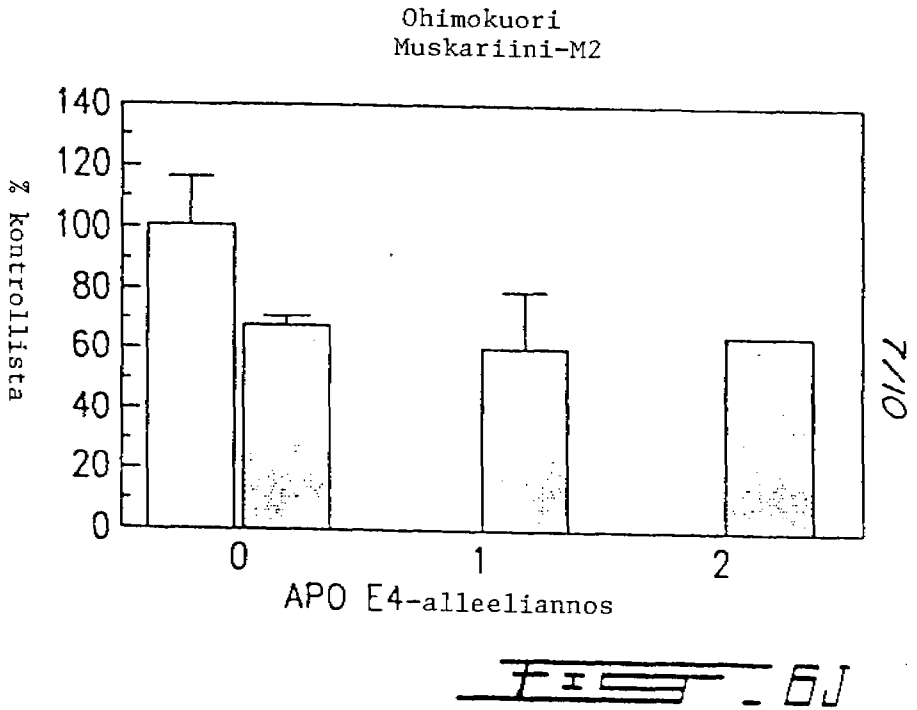
Ohimokuori
Muskariini-M2
% kontrollista
140
120
100
80
60
40
20
0
0
1
2
APO E4-alleeliannos

Fig. 6J

Ohimokuori
Koliiniasetyylitransferaasi

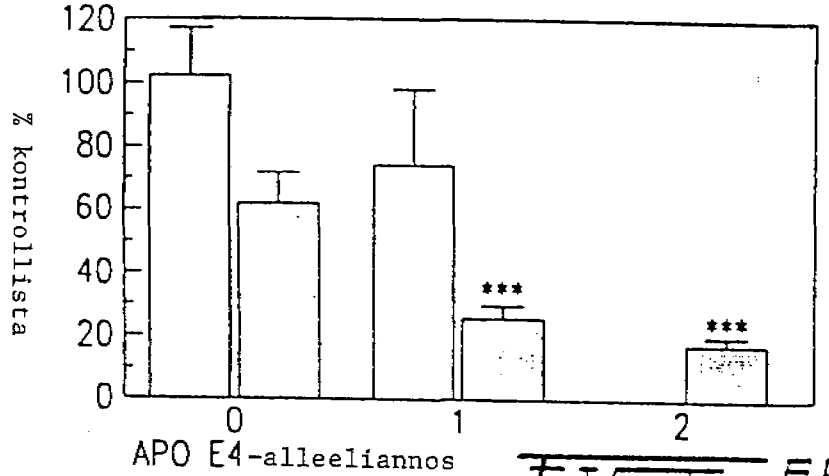

FIG. 6F

Ohimokuori
Muskariinisitoutumiskohdat: kokon.

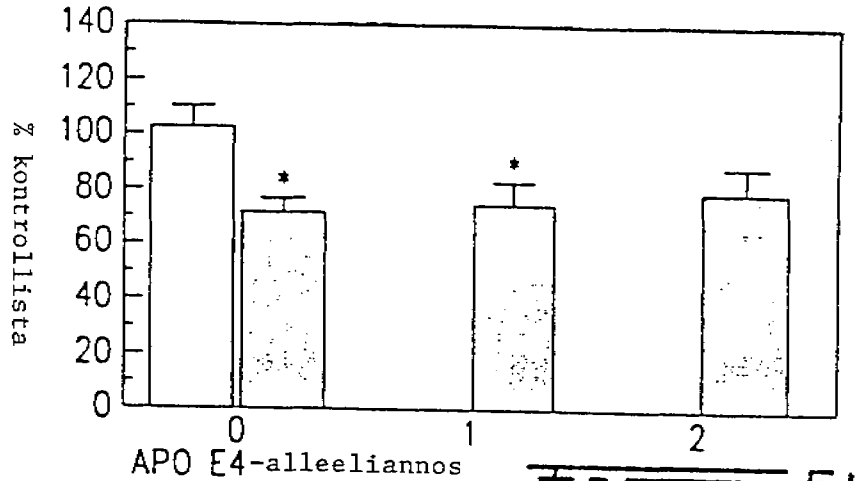

FIG. 6H

Ohimokuori
Nikotiinisitoutumiskohdat

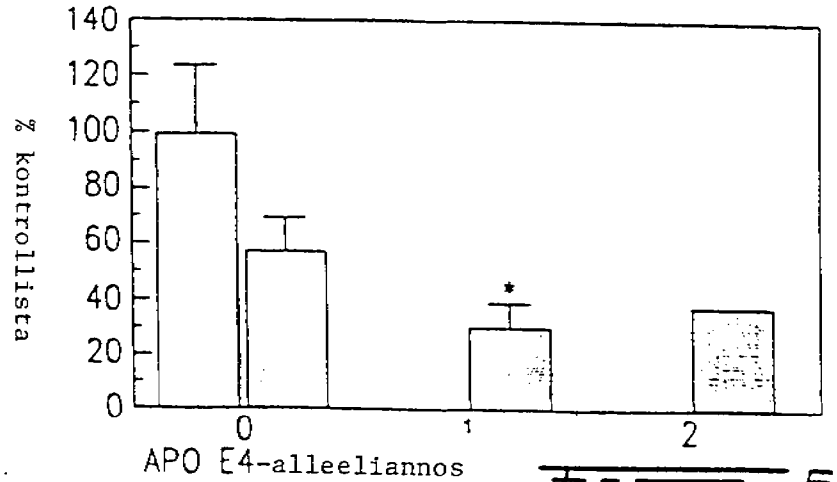

FIG. 6G

Ohimokuori
Muskariini-M1-kohdat

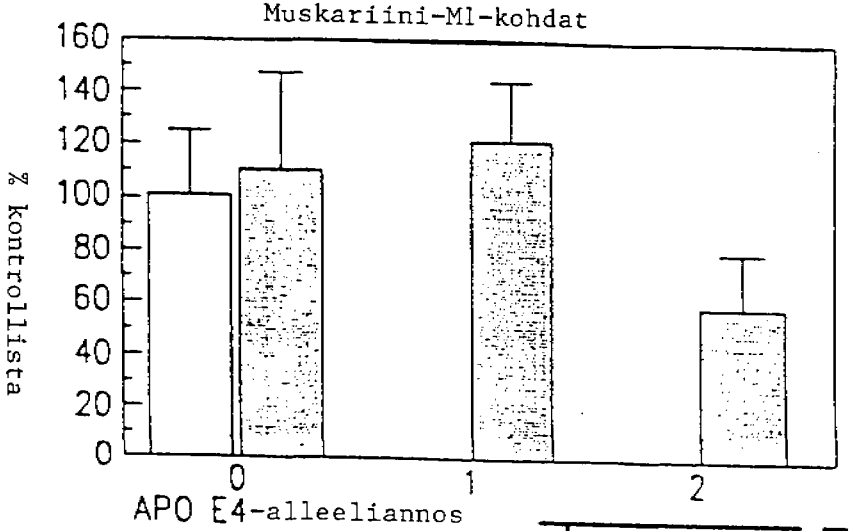

FIG. 6I

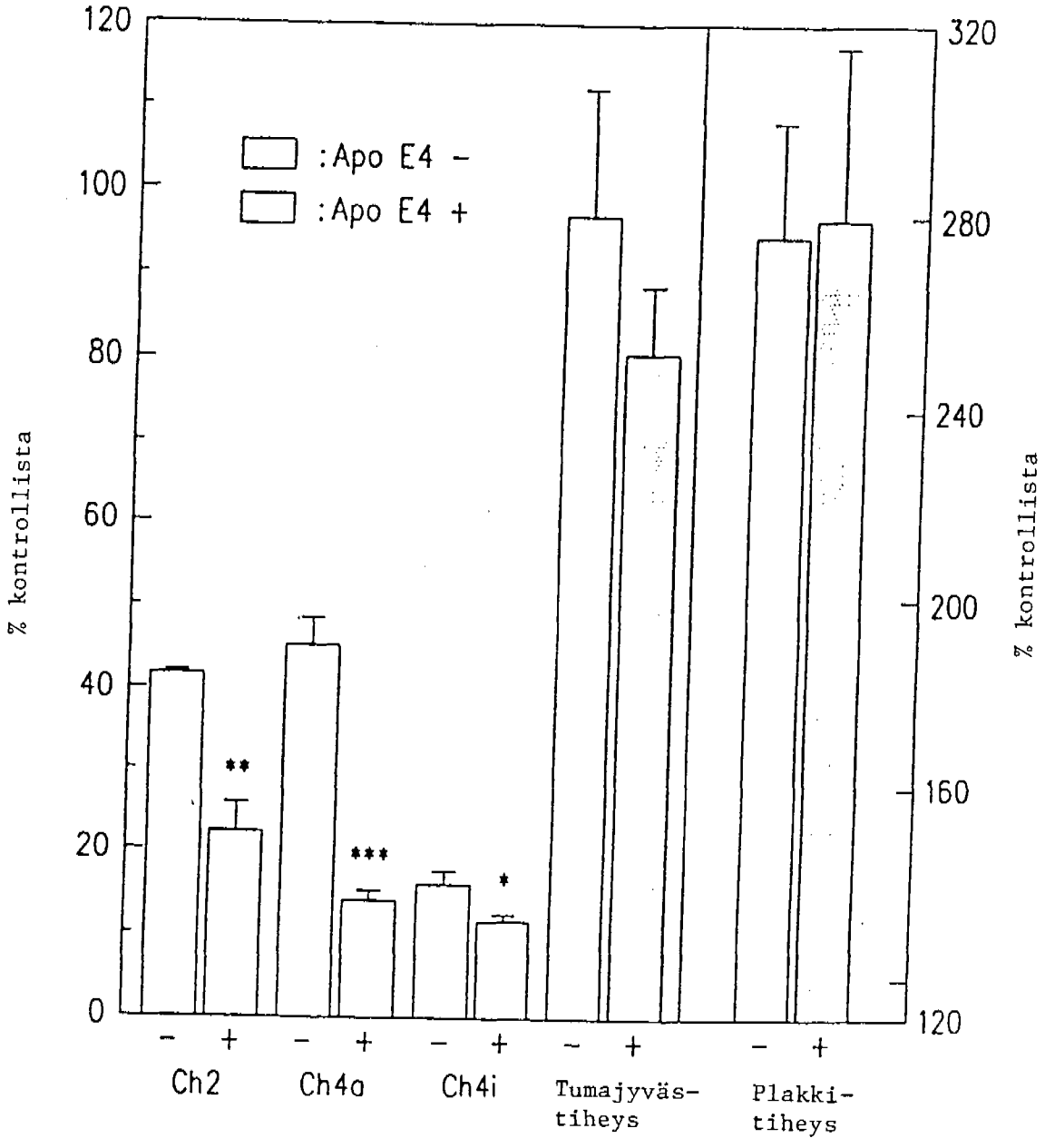
120
100
80
60
40
20
0
% kontrollista
320
280
240
200
160
120
% kontrollista
:Apo E4 -
:Apo E4 +
**
***
*
- + - + - + - + - +
Ch2
Ch4a
Ch4i
Tumajyväs-
tiheys
Plakki-
tiheys

Fig. 7

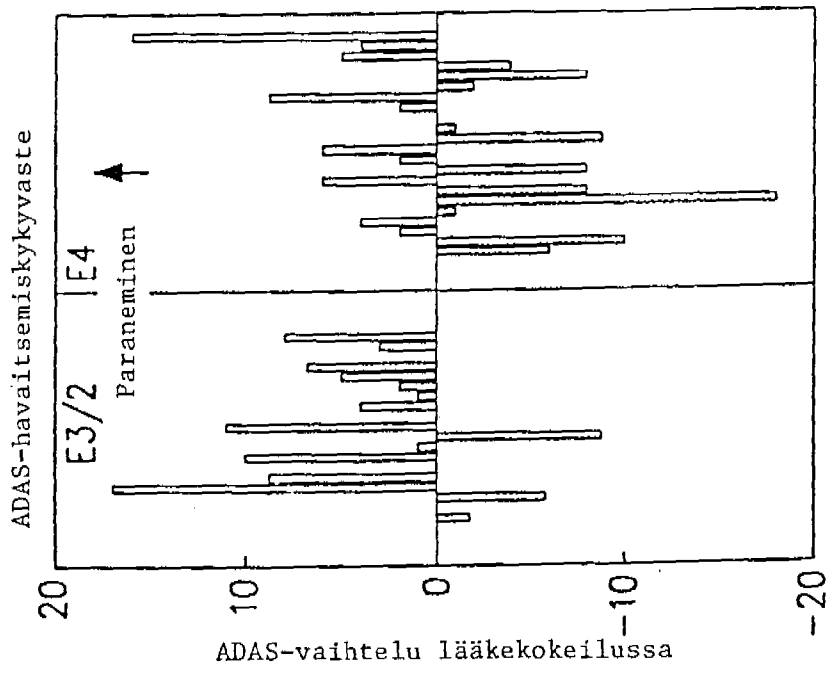
ADAS-havaitsemiskykyvaste
E3/2
E4
Paraneminen
20
10
0
-10
-20
ADAS-vaihtelu lääkekokeilussa

FIG - 8B

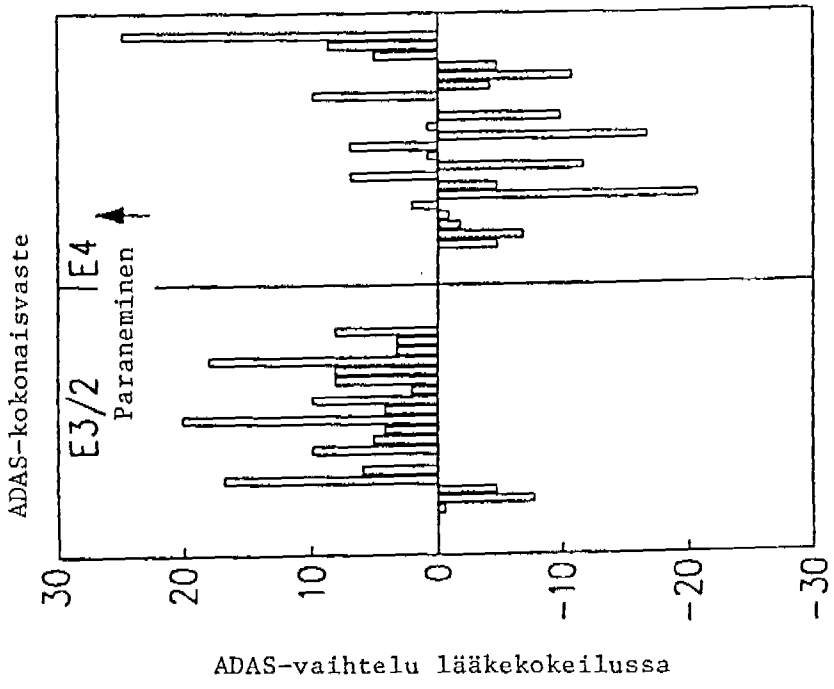
ADAS-kokonaisvaste
E3/2
E4
Paraneminen
30
20
10
0
-10
-20
-30
ADAS-vaihtelu lääkekokeilussa

FIG - 8A