(19)

SUOMI - FINLAND
(FI)

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

(10) **FI 951701 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 951701

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C12Q 1/68
C12P 19/34
C07K 16/18
G01N 33/53
G01N 33/68

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **30.09.1993**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **10.04.1995**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **10.04.1995**

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

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **30.09.1993 PCT/US1993/009310**

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

13.10.1992 US 959992 31.08.1993 US 114448

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Duke University,** Erwin Road, Durham NC 27706, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Roses, Allen D.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • **Strittmatter, Warren J.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 • **Salvesen, Guy S.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
4 • **Enghild, Jan,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
5 • **Schmechel, Donald E.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Menetelmät Alzheimerin taudin tunnistamiseksi
Förfaranden för att upptäcka Alzheimers sjukdom

Menetelmät Alzheimerin taudin tunnistamiseksi

Tämä keksintö tehtiin hallituksen NIH LEAD Award 5R35 AGO 7922 ja NIH Alzheimer's Disease Research Center 5P50 AGO 5128 -apurahojen tuella. Hallituksella on tiettyjä oikeuksia tähän keksintöön.

Läheiset patenttihakemukset

Tämä patenttihakemus on jatko-osa yhteisesti omistetulle haettavana olevalle patenttihakemukselle, jonka sarjanumero on 07/959 992, joka on rekisteröity 13.10. 1992, jonka sisältö on liitetty tähän viitteeksi kokonaisuudessaan.

Keksinnön alue

Esillä oleva keksintö koskee menetelmiä, joilla diagnosoidaan ja ennustetaan Alzheimerin tauti.

Keksinnön tausta

Seniiliplakki ja kongofiilinen verisuonitauti ovat epänormaaleja solunulkoisia rakenteita, joita löytyy runsain määrin Alzheimerin tautia sairastavien potilaiden aivoista. Näiden rakenteiden biokemiallista koostumusta on tutkittu laajasti, jotta niiden mahdollinen rooli tämän dementoivan taudin patogeneesissä ymmärrettäisiin paremmin. Kypsä seniiliplakki on monimutkainen rakenne, joka koostuu amyloidifibriilejä olevasta keskusytimestä, jota ympäröivät dystrofiset neuriitit, aksonien päät ja dendriitit, mikrogliat ja sidekudoksiset astrosyytit. Katso D. Selkoe, Neuron 6, 487 - 498 (1991). Verisuonia ympäröivän seniiliplakin, joka aiheuttaa kongofiilisen verisuonitaudin, amyloidiydin on 39 - 43 aminohapon pituinen peptidi, jota nimitetään ß-amyloidipeptidiksi (Aß). G. Glenner ja C. Wong, Biochem. Biophys. Res. Comm. 120, 885 - 890 (1984). Aß-peptidiä löydetään aivoista Alzheimerin taudissa, Downin syndroomassa, hollantilaistyyppisessä perinnöllisessä aivoverenvuodossa ja vanhuksilla. K. Kosik, Science 256, 780 - 783 (1992). Aß-peptidiä tuotetaan suu-

remman amyloidiesiasteproteiinin (APP) epänormaalilla proteolyyttisellä prosessoinnilla. Katso K. Beyreuther ja C. Masters, Brain Path. 1, 241 - 251 (1991).

Seniiliplakki ja kongofiilinen verisuonitauti sisältävät proteiineja ßA-peptidin lisäksi. APP-proteiini itsessään muiden muassa on tunnistettu seniiliplakissa histokemiallisilla tutkimuksilla käyttäen vasta-aineita, jotka tunnistavat joko esiasteproteiinin amino- tai karboksipään. Katso esim. F. Tagliavine et al., Neurosci. Lett. 128, 117 - 120 (1991); C. Joachim et al., Amer. Jour. Path. 138, 373 - 384 (1991). Mekanismeja, joilla nämä proteiinit aggregoituvat solunulkoiseen tilaan yhdistyäkseen seniiliplakin ja kongofiilisen verisuonitaudin kanssa, ei tunneta.

Samalla, kun on tehty huomattavasti tutkimuksia Alzheimerin taudin mekanismien suhteen, on jatkuvasti olemassa tarve uusista tavoista tutkia tätä häiriötä ja taistella sitä vastaan.

Keksinnön yhteenveto

On esitetty menetelmät Alzheimerin taudin diagnosoimiseksi tai sen ennustamiseksi potilaassa. Eräs suoritustapa sisältää sellaisen DNA:n läsnä- tai poissaolon tunnistamisen, joka koodittaa apolipoproteiini E tyyppi 4-isomuotoa (ApoE4) potilaassa. Toinen suoritustapa sisältää ApoE4-isomuodon läsnä- tai poissaolon tunnistamisen. ApoE4-isomuodon tai ApoE4-isomuotoa koodittavan DNA:n läsnäolo osoittaa, että potilaalla on Alzheimerin tauti tai riski saada Alzheimerin tauti.

Edellä esitetyt ja muut esillä olevan keksinnön aiheet ja näkökohdat on esitetty yksityiskohtaisesti tässä olevissa piirroksissa ja alla esitetyssä selostuksessa.

Piirrosten lyhyt kuvaus

Kuvion 1 yläpaneeli esittää aivo-selkäydinnesteen proteiinit, jotka sitoutuvat immobilisoituun ßA-peptidiin ja verrokkipeptidiin ("even-hydro-peptidi" tai "E.H.")

inkubaation jälkeen ja sen jälkeen, kun on eluoitu fosfaatilla puskuroidulla suolaliuoksella, kaista 1; 5 % natriumdodekyylisulfaatilla, kaista 2; 4 molaarisella urealla, kaista 3; tai 6 molaarisella guanidiinivetykloridilla, kaista 4. Apolipoproteiini E -proteiinin sitoutuminen on esitetty alapaneelissa immunohistokemiallisella värjäyksellä.

Kuvion 2 yläpaneeli esittää aivo-selkäydinnesteen proteiinien sitoutumisen erilaisiin immobilisoituihin peptideihin. Apolipoproteiini E -proteiinin sitoutuminen on jälleen esitetty alapaneelissa immunohistokemiallisella värjäyksellä.

Kuvio 3 esittää sellaisten potilaiden iät taudin alkaessa, joilla on 0, 1 ja 2 ApoE4-alleelia. Kuhunkin käyrään on merkitty ApoE4-alleelien määrä. Merkki '*' osoittaa useita diagnooseja lyhyellä aikavälillä. Alkamiskäyrät arvioitiin Kaplan-Meier-tulosraja-arvojakautumilla ja ne olivat selvästi erilaisia (khi-neliön log-arvo = 53,8, vapausaste 2, $p < 0,0001$).

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Kuten yllä on huomautettu, esillä oleva keksintö esittää menetelmän Alzheimerin taudin seulomiseksi (esim. diagnosoimiseksi tai ennustamiseksi) potilaassa. Menetelmä sisältää vaiheen, jossa tunnistetaan ApoE4-isomuodon tai ApoE4-isomuotoa koodittavan DNA:n läsnä- tai poissaolo potilaassa. Sellaisen isomuodon tai DNA:n läsnäolo osoittaa, että potilaalla on Alzheimerin tauti tai hänellä on riski saada Alzheimerin tauti. Sopivat potilaat ovat niitä, joilla ei aiemmin ole diagnosoitu Alzheimerin tautia, niitä, joilla on aiemmin määritetty olevan riski saada Alzheimerin tauti ja niitä, joiden on alunperin diagnosoitu sairastavan Alzheimerin tautia, joilla halutaan saada vahvistavia tietoja. Esimerkiksi potilaat, joiden on diagnosoitu tai heidän on määritetty sairastavan dementiaa, erikoisesti potilaat, jotka ovat aiemmin olleet kliinises-

ti normaaleja, joiden on määritetty sairastavan progressiivista dementiaa, ovat sopivia potilaita. Näin ollen esillä olevaa keksintöä voidaan käyttää tunnistettaessa sekä perinnöllistä Alzheimerin tautia (myöhäinen taudin alkaminen ja aikainen taudin alkaminen) kuin myös satunnaista Alzheimerin tautia.

Vaihe, jossa tunnistetaan ApoE4-isomuodon tai sellaista koodittavan DNA:n läsnä- tai poissaolo, voidaan suorittaa joko suoraan tai epäsuorasti millä tahansa sopivalla tavalla. Alan asiantuntijat tuntevat monia menetelmiä. Kaikki ne sisältävät yleensä vaiheen, jossa potilaasta kerätään biologisen materiaalin näyte, joka sisältää joko DNA:ta tai ApoE4-muotoa, ja sitten tunnistetaan, onko potilaalla ApoE4-muotoa tai sellaista isomuotoa koodittavaa DNA:ta siinä näytteessä vai ei. Tunnistusvaihe voidaan suorittaa esimerkiksi keräämällä ApoE4-näyte potilaasta (esimerkiksi aivo-selkäydinnesteestä tai mistä tahansa muusta nesteestä tai kudoksesta, joka sisältää ApoE-proteiinia) ja sitten määrittämällä ApoE4-isomuodon läsnä- tai poissaolo ApoE-näytteessä (esim. isoelektrisellä fokusoinnilla tai immuunitestillä). Tunnistusvaihe voidaan vaihtoehtoisesti suorittaa keräämällä biologinen näyte, joka sisältää potilaan DNA:ta, ja sitten määrittää biologisessa näytteessä sellaisen DNA:n läsnä- tai poissaolo, joka koodittaa ApoE4-isomuotoa. Mitä tahansa biologista näytettä, joka sisältää kyseisen potilaan DNA:ta, voidaan käyttää sisältäen kudosnäytteet ja verinäytteet niin, että verisolut ovat erityisen suositeltava lähde. ApoE4-isomuotoa koodittavan DNA:n läsnä- tai poissaolon määritys voidaan suorittaa oligonukleotidikoettimella, joka on leimattu sopivalla tunnistettavalla ryhmällä, tai amplifikaatioreaktiolla, kuten polymeraasiketjureaktiolla tai ligaasiketjureaktiolla (jonka amplifikaatioreaktion tuote voidaan sitten tunnistaa leimatulla oligonukleotidikoettimella). Tunnistusvaihe voi lisäksi sisältää vaiheen, jossa tunnis-

tetaan, onko potilas heterotsygootti tai homotsygootti ApoE4-isomuotoa koodittavan geenin suhteen. Tunnetaan useita erilaisia oligonukleotidikoetintestimuotoja, joita voidaan käyttää esillä olevan keksinnön suorituksessa. Katso esim. US-patentti nro 4 302 204, joka on myönnetty ryhmälle Wahl et al.; US-patentti nro 4 358 535, joka on myönnetty ryhmälle Falkow et al.; US-patentti nro 4 56 3419, joka on myönnetty ryhmälle Ranki et al.; ja US-patentti nro 4 994 373, joka on myönnetty ryhmälle Stavrianopoulos et al. (patentinhakijoiden erityinen tarkoitus on, että kaikkien tässä viitattujen US-patenttien sisältö liitetään tähän viitteeksi).

Valitun, tai kohde-, nukleiinihapposekvenssin amplifikaatio voidaan suorittaa millä tahansa sopivalla tavalla. Katso yleisesti D. Kwoh ja T. Kwoh, Am. Biotechnol. Lab. 8, 14 - 25 (1990). Esimerkit sopivista amplifikaatiomenetelmistä sisältävät, mutta eivät ole rajoittuneet, polymeraasiketjureaktion, ligaasiketjureaktion, juostekorvausamplifikaation (katso yleisesti G. Walker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 392 - 396 (1992); G. Walker et al., Nucleic Acids Res. 20, 1 691 - 1 696 (1992)), transkriptioon perustuvan amplifikaation (katso D. Kwoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1173 - 1177 (1989)), itseään ylläpitävän sekvenssireplikaation (tai "3SR") (katso J. Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1 874 - 1 878 (1990)), QB-replikaasisysteemin (katso P. Lizardi et al., BioTechnology 6, 1 197 - 1 202 (1988)), nukleiinihapposekvenssiin perustuvan amplifikaation (tai "NASBA") (katso R. Lewis, Genetic Engineering News 12 (9), 1 (1992)), korjausketjureaktion (tai "RCR") (katso R. Lewis, yllä) ja bumerangi-DNA-amplifikaation (tai "BDA") (katso R. Lewis, yllä). Tällä hetkellä polymeraasiketjureaktio on suositeltava.

Yleensä edellä mainitut DNA-amplifikaatiomenetelmät sisältävät koettimen, koetinparin tai kahden koetinparin

käytön, joka (jotka) spesifisesti sitoutuu (sitoutuvat) ApoE4-proteiinia koodittavaan DNA:han, mutta ei (eivät) sitoudu ApoE2- tai ApoE3-proteiinia koodittavaan DNA:han samoissa hybridisaatio-olosuhteissa, ja joka (jotka) toimii (toimivat) alukkeena tai alukkeina ApoE4-DNA:n tai sen osan amplifikaatiolle amplifikaatioreaktiossa (samalla tavalla voidaan käyttää koetinta, koetinparia tai kahta koetinparia, joka (jotka) spesifisesti sitoutuu (sitoutuvat) ApoE2-proteiinia koodittavaan DNA:han, mutta ei (eivät) sitoudu ApoE3- tai ApoE4-proteiinia koodittavaan DNA:han samoissa hybridisaatio-olosuhteissa, ja joka (jotka) toimii (toimivat) alukkeena tai alukkeina ApoE2-DNA:n tai sen osan amplifikaatiolle amplifikaatioreaktiossa; ja voidaan käyttää koetinta, koetinparia tai kahta koetinparia, joka (jotka) spesifisesti sitoutuu (sitoutuvat) ApoE3-proteiinia koodittavaan DNA:han, mutta ei (eivät) sitoudu ApoE2- tai ApoE4-proteiinia koodittavaan DNA:han samoissa hybridisaatio-olosuhteissa, ja joka (jotka) toimii (toimivat) alukkeena tai alukkeina ApoE3-DNA:n tai sen osan amplifikaatiolle amplifikaatioreaktiossa).

Yleensä oligonukleotidikoetin, jota käytetään tunnistamaan ApoE4-proteiinia koodittava DNA, on oligonukleotidikoetin, joka sitoutuu ApoE4-proteiinia koodittavaan DNA:han, mutta ei sitoudu ApoE2- tai ApoE3-proteiinia koodittavaan DNA:han samoissa hybridisaatio-olosuhteissa. Oligonukleotidikoetin leimataan sopivalla tunnistettavalla ryhmällä, kuten sellaisella, jotka on kuvattu alla vasta-aineiden yhteydessä. Samalla tavalla oligonukleotidikoetin, jota käytetään tunnistamaan ApoE2-proteiinia koodittava DNA, on oligonukleotidikoetin, joka sitoutuu ApoE2-proteiinia koodittavaan DNA:han, mutta ei sitoudu ApoE3- tai ApoE4-proteiinia koodittavaan DNA:han samoissa hybridisaatio-olosuhteissa, ja oligonukleotidikoetin, jota käytetään tunnistamaan ApoE3-proteiinia koodittava DNA, on oligonukleotidikoetin, joka sitoutuu ApoE3-proteiinia koo-

dittavaan DNA:han, mutta ei sitoudu ApoE2- tai ApoE4-proteiinia koodittavaan DNA:han samoissa hybridisaatio-olosuhteissa.

Polymeraasiketjureaktio (PCR) voidaan suorittaa tunnettujen menetelmien mukaisesti. Katso esim. US-patentit nrot 4 683 195, 4 683 202, 4 800 159 ja 4 965 188. PCR sisältää yleensä ensiksi nukleiinihapponäytteen (esim. lämpöstabiilin DNA polymeraasin läsnä ollessa) tunnistettavan spesifisen sekvenssin kummankin juosteen käsittelyn yhdellä oligonukleotidialukkeella hybridisaatio-olosuhteissa niin, että syntetisoidaan kummankin alukkeen pidennystuote, joka on komplementaarinen kummallekin nukleiinihappojuosteelle niin, että alukkeet ovat riittävän komplementaarisia kummallekin spesifisen sekvenssin juosteelle hybridisoituakseen niihin niin, että kummastakin alukkeesta syntetisoitunut pidennystuote, kun se erotetaan komplementistaan, voi toimia synteesitemplaattina toisen alukkeen pidennystuotteelle, ja sitten käsitellään näytettä denaturaatio-olosuhteissa alukepidennystuotteiden erottamiseksi niiden templaateista, jos tunnistettavaa sekvenssiä tai tunnistettavia sekvenssejä on läsnä. Näitä vaiheita toistetaan syklisesti, kunnes saadaan aikaan haluttu amplifikaatiotaso. Amplifioituneen sekvenssin tunnistus voidaan suorittaa lisäämällä reaktiotuotteeseen oligonukleotidikoetin, joka kykenee hybridisoitumaan reaktiotuotteeseen (esim. esillä olevan keksinnön oligonukleotidikoetin), koettimen sisältäessä tunnistettavan leiman, ja sitten tunnistetaan leima tunnetuilla menetelmillä.

Ligaasiketjureaktio (LCR) suoritetaan myös tunnetuilla menetelmillä. Katso esim. R. Weiss, Science 254, 1292 (1991). Yleensä reaktio suoritetaan kahdella oligonukleotidikoetinparilla: toinen pari sitoutuu tunnistettavan sekvenssin toiseen juosteeseen, toinen pari sitoutuu tunnistettavan sekvenssin toiseen juosteeseen. Kumpikin pari yhdessä menee täydellisesti päällekkäin sen juosteen

kanssa, jota se vastaa. Reaktio suoritetaan ensin denaturoimalla (esim. erottamalla) tunnistettavan sekvenssin juosteet, sitten antamalla juosteiden reagoida kahden oligonukleotidikoetinparin kanssa lämpöstabiilin ligaasin läsnäollessa niin, että kumpikin oligonukleotidikoetinpari ligoituu yhteen, sitten erotetaan reaktiotuote ja sitten toistetaan syklisesti menetelmää, kunnes sekvenssi on amplifioitunut halutulle tasolle. Tunnistus voidaan sitten suorittaa samalla tavalla kuin on kuvattu PCR:n suhteen yllä.

On helposti ymmärrettävissä, että tässä kuvatut tunnistusvaiheet voidaan suorittaa suorasti tai epäsuorasti. Näin ollen, esimerkiksi jos potilaalta tunnistetaan myös joko ApoE2 tai ApoE3 määritellään, ettei potilas ole homotsygootti ApoE4-proteiinin suhteen; ja jos sekä ApoE2 ja ApoE3 tunnistetaan potilaalla määritellään, ettei potilas ole homotsygootti eikä heterotsygootti ApoE4-proteiinin suhteen.

Vaihtoehtona isoelektriselle fokusoinnille ja alleelitunnistusmenetelmille voidaan suorittaa vaihe, jossa määritetään ApoE4-isomuodon läsnä- tai poissaolo näytteessä, vasta-ainetestillä käyttäen vasta-ainetta, joka selektiivisesti sitoutuu ApoE4-proteiiniin (se on vasta-aine, joka sitoutuu ApoE4-proteiiniin, mutta ei sisällä oleellisesti mitään sitoutumista ApoE2- tai ApoE3-proteiiniin samoissa sitoutumisolosuhteissa). Kun halutaan määrittää potilaan tarkka ApoE-komplementti ja se, onko kyseinen potilas homotsygootti tai heterotsygootti ApoE4-proteiinin suhteen, voidaan myös käyttää vasta-aineita, jotka selektiivisesti sitoutuvat ApoE2- ja ApoE3-proteiiniin (se on vasta-aine, joka sitoutuu ApoE2-proteiiniin, mutta ei sisällä oleellisesti mitään sitoutumista ApoE3- tai ApoE4-proteiiniin samoissa sitoutumisolosuhteissa; vasta-aine, joka sitoutuu ApoE3-proteiiniin, mutta ei sisällä oleelli-

sesti mitään sitoutumista ApoE2- tai ApoE4-proteiiniin samoissa sitoutumisolosuhteissa).

Vasta-aineet, joita käytetään selektiiviseen sitoutumiseen ApoE2-, ApoE3- ja ApoE4-proteiiniin, voidaan tuottaa millä tahansa sopivalla menetelmällä. Monoklonaaliset vasta-aineet voidaan esimerkiksi tuottaa hybridoomasolulinjassa niiden menetelmien mukaisesti, jotka ovat kuvanneet Kohler ja Milstein, Nature 265, 495 - 97 (1975). ApoE2, ApoE3 tai ApoE4 voidaan saada ihmispotilaalta, jonka on määritetty olevan niiden suhteen homotsygootti, sitten puhdistamalla menetelmällä, jonka ovat kuvanneet S. Rall et al., Methods in Enzymol. 128, 273 (1986), ja niitä voidaan käyttää immunogeenina monoklonaalisten tai polyklonaalisten vasta-aineiden tuotossa. Puhdistetut ApoE-isomuodot voidaan tuottaa yhdistelmä-DNA-menetelmillä niin, että ekspressoidaan biologisesti aktiivista isomuotoa, tai jopa sen immunogeenista fragmenttia voidaan käyttää immunogeenina. Monoklonaaliset Fab-fragmentit voidaan tuottaa Escherichia coli -bakteerissa tunnetuista sekvensseistä yhdistelmä-DNA-menetelmillä, jotka alan asiantuntija tuntee. Katso esim. W. Huse, Science 246, 1 275 - 81 (1989)(rekombinantti-Fab-menetelmät); P. Wenham et al., Lancet 337, 1158 (1991)(Apo-PCR-alukkeet). DNA, joka koodittaa yhtä ApoE-alatyyppiä, voidaan saada aikaan ja muuttaa toiseksi kohdennetulla mutageneesillä. Katso esim. T. Kunkel et al., Methods in Enzymol. 154, 367 - 382 (1987); T. Kunkel, US-patentti nro 4 873 192.

Termi "vasta-aineet" tässä käytettynä viittaa kaikkiin immunoglobuliinityyppeihin sisältäen IgG-, IgM-, IgA-, IgD- ja IgE-immunoglobuliinit. Vasta-aineet voivat olla monoklonaalisia tai polyklonaalisia ja ne voivat olla peräisin mistä lajista tahansa sisältäen (esimerkiksi) hiiren, rotan, kanin, hevosen tai ihmisen, tai ne voivat olla kimeerisiä vasta-aineita ja sisältää sellaisia vasta-ainefragmentteja, kuten esimerkiksi Fab-, $F(ab')_2$- ja Fv-

fragmentit ja vastaavat fragmentit, jotka saadaan muista kuin IgG-vasta-aineista.

Vasta-ainetestit voivat yleensä olla homogeenisiä tai heterogeenisiä testejä. Homogeenisessä testissä immunologinen reaktio sisältää tavallisesti spesifisen vasta-aineen, leimatun analyytin ja tutkittavan näytteen. Leimasta tuleva signaali modifioituu suoraan tai epäsuorasti vasta-aineen sitoutuessa leimattuun analyyttiin. Immunologinen reaktio ja sen määrän tunnistus suoritetaan homogeenisessä liuoksessa. Immunokemialliset leimat, joita voidaan käyttää, sisältävät vapaat radikaalit, radioaktiiviset isotoopit, fluoresoivat värit, entsyymit, bakteriofaagit, koentsyymit ja niin edelleen.

Heterogeenisessä testitavassa reagenssit ovat tavallisesti näyte, keksinnön mukainen vasta-aine ja tunnistettavan signaalin tuottotavat. Samanlaisia näytteitä kuin on kuvattu yllä, voidaan käyttää. Vasta-aine on tavallisesti immobilisoitu kantajaan, kuten helmeen, levyyn tai objektilasiin, ja se saatetaan kosketukseen nestefaasissa sellaisen näytteen kanssa, jonka epäillään sisältävän antigeenia. Sitten kantaja erotetaan nestefaasista ja tutkitaan joko kantajafaasi tai nestefaasi tunnistettavan signaalin suhteen käyttäen keinoja, joilla sellainen signaali saadaan aikaan. Signaali liittyy analyytin läsnäoloon näytteessä. Tunnistettavan signaalin tuottotavat sisältävät radioaktiivisten leimojen, fluoresoivien leimojen, entsyymileimojen ja niiden kaltaisten käytön. Esimerkiksi, jos tunnistettava antigeeni sisältää toisen sitoutumiskohdan vasta-aine, joka sitoutuu tähän kohtaan, voidaan konjugoida tunnistettavaan ryhmään ja lisätä nestefaasireaktioliuokseen ennen erotusvaihetta. Kiinteällä kantajalla olevan tunnistettavan ryhmän läsnäolo osoittaa antigeenin läsnäolon testinäytteessä. Esimerkit sopivista immuunitesteistä ovat radioimmuunitesti, immunofluoresenssi menetel-

mät, entsyymivälitteiset immuunitestit ja niiden kaltaiset.

Alan asiantuntijat tuntevat useita spesifisiä immuunitestimuotoja ja niiden variaatioita, jotka voivat olla käyttäkelpoisia tässä kuvatun menetelmän suorittamiseksi. Katso yleisesti E. Maggio, Enzyme-Immunoassay (1980)(CRC Press, Inc., Boca Raton, FL); katso myös Skold et al. -ryhmän US-patentti numero 4 727 022, jonka otsikko on "Methods for Modulating Ligand-Receptor Interactions and their Application", Forrest et al. -ryhmän US-patentti nro 4 659 678, David et al. -ryhmän US-patentti nro 4 376 110, Litman et al. -ryhmän US-patentti nro 4 275 149, Maggio et al. -ryhmän US-patentti nro 4 233 402 ja Boguslaski et al. -ryhmän US-patentti nro 4 230 767.

Vasta-aineet, jotka selektiivisesti sitoutuvat ApoE-isomuotoon (se on, sitoutuu yhteen ApoE2-, ApoE3- tai ApoE4-proteiineista ilman, että sillä on mitään sitoutumista muihin samoissa sitoutumisolosuhteissa), voidaan konjugoida kiinteään kantajaan, joka on sopiva diagnostista testiä varten (esim. helmiin, levyihin, objektilaseihin tai kuoppiin, jotka on muodostettu sellaisista materiaaleista, kuten lateksista tai polystyreenistä), millä tahansa tunnetulla menetelmällä, kuten saostamalla. Vasta-aineet, jotka sitoutuvat ApoE-isomuotoon, voidaan samalla tavalla konjugoida tunnistettaviin ryhmiin, kuten radioaktiivisiin leimoihin (esim. ^{35}S, ^{125}I, ^{131}I), entsyymileimoihin (esim. piparjuuriperoksidaasi, alkalinen fosfataasi) ja fluoresoiviin leimoihin (esim. fluoreskeiini) tunnetuilla menetelmillä.

Diagnostiset käyttöpakkaukset vasta-ainetestien suorittamiseksi voidaan tuottaa monilla tavoilla. Eräässä suoritustavassa diagnostinen käyttöpakkaus sisältää (a) vasta-aineen, joka sitoutuu ApoE2-, ApoE3- tai ApoE4-proteiiniin, joka on konjugoitu kiinteään kantajaan, ja (b) toisen vasta-aineen, joka sitoutuu ApoE2-, ApoE3- tai

ApoE4-proteiiniin, joka on konjugoitu tunnistettavaan ryhmään. Reagenssit voivat myös sisältää apuaineita, kuten puskuroivia aineita ja proteiineja stabiloivia aineita, esim. polysakkarideja ja niiden kaltaisia. Diagnostinen käyttöpakkaus voi edelleen sisältää tarpeen mukaan muita signaalia tuottavan systeemin jäseniä, josta systeemistä tunnistettava ryhmä on jäsen (esim. entsyymisubstraatit), häiritsevää testitaustaa alentavia aineita, verrokkiaineita, testin suorituslaitteen ja niiden kaltaisia. Testikäyttöpakkauksen toinen suoritustapa sisältää (a) yllä kuvatun kaltaisen vasta-aineen, ja (b) vasta-aineelle spesifisen sitoutumiskumppanin, joka on konjugoitu tunnistettavaan ryhmään. Yllä kuvatun kaltaisia apuaineita voidaan sisällyttää samalla tavalla. Testikäyttöpakkaus voidaan pakata millä tahansa sopivalla tavalla tyypillisesti niin, että kaikki elementit ovat yhdessä säiliössä niin, että mukana on painetut ohjeet testin suorittamiseksi.

Esillä oleva keksintö on selostettu yksityiskohtaisemmin seuraavissa ei-rajoittavissa esimerkeissä.

Esimerkki 1

Aivo-selkäytimen apolipoproteiini E-proteiinin sitoutuminen immobilisoituihin ß-amyloidiesiasteproteiinifragmentteihin

ßA-peptidit (Bachem), muut peptidit tai etanoliamiini immobilisoitiin kovalenttisesti Immobilon AV -affiniteettimembraanille (Millipore). Membraani on kemiallisesti aktivoitua hydrofiilistä mikrohuokoista membraania, joka kovalenttisesti immobilisoi peptidit ja proteiinit amino- ja tioliryhmien avulla. ßA-peptidit tai verrokkipeptidit liuotettiin tislattuun veteen konsentraatioksi 1 mg peptidiä/100 µl. Kymmenen mikrolitraa (joka sisälsi 100 µg peptidiä) laitettiin 13 mm halkaisijaltaan olevalle Immobilon-kiekolle ja inkuboitiin kuivaksi yli yön huoneenlämpötilassa. Peptidiä oli suuri ylimäärä membraanilla olevien toiminnallisten sitoutumisryhmien määrän suhteen.

Verrokkimembraanit valmistettiin inkuboimalla membraania 2,0 M etanoliamiinissa 1,0 M $NaHCO_3$:ssa, pH 9,5, Immobilon AV-membraanilla olevien reaktiivisten ryhmien blokeeraamiseksi. Membraaneita säilytettiin -20 °C:ssa eksikaattorissa. Ennen käyttöä membraanit pestiin fosfaatilla puskuroidulla suolaliuoksella. 12 - 28 Hydropathic Mimic -peptidi ja Even-Hydro-peptidi syntetisoitiin käyttäen standardia f-Moc-synteesiä Applied Bio-Science 430A -peptidisyntetisaattorissa. Aminohapot suojattiin blokeerausryhmillä ja niistä poistettiin suojaus ja ne pestiin ennen irrotusta käsin. Peptidien puhtaus varmistettiin korkean erotuskyvyn käänteisfaasinestekromatografialla.

CSF-proteiinien sitoutuminen immobilisoituihin peptideihin

Immobilon AV -membraaneja, joihin oli aiemmin sidottu βA-peptidit, etanoliamiini tai hydromimic- tai even-hydro-peptidit, inkuboitiin 100 µl kanssa aivo-selkäydinnestettä (suodatettu aiemmin 0,22 µm suodattimen läpi) yhdessä 50 µl kanssa fosfaatilla puskuroitua suolaliuosta, pH 7,3, 30 minuuttia huoneenlämpötilassa. Inkubaation jälkeen membraanit laitettiin Millipore-suodatinpitimeen (Swinnex) ja ne pestiin 3,0 ml:lla fosfaatilla puskuroitua suolaliuosta, sitten 700 µl:lla 5 % natriumdodekyylisulfaattia (SDS). Membraanit poistettiin suodatinpitimestä, leikattiin puoliksi ja laitettiin 150 µl:aan Laemmli-puskuria (2 % natriumdodekyylisulfaatti, 5 % β-merkaptoetanoli, pH 6,8) ja niitä keitettiin viisi minuuttia jäljelle jääneiden proteiinien liuottamiseksi. 45 µl Laemmli-puskuria, jossa oli liuenneet proteiinit, ladattiin kuhunkin kymmeneen Bio-Rad Minigel -laitteen kaistaan niin, että tiivistysgeeli oli 4 % ja erottava geeli oli 12 % polyakryyliamidin suhteen yhdessä 2 % SDS:n kanssa.

ApoE-proteiinin immunotunnistus

Elektroforeesissa ajetut proteiinit siirrettiin Immobilon P -membraanille käyttäen standardia Western-

siirtomenetelmää. Siirron jälkeen membraania inkuboitiin Blotto-puskurissa (5 % kuivamaito Tris-puskuroidussa suolaliuoksessa, pH 7,6, yhdessä 0,5 % Tween-20:n kanssa (Pierce)) huoneenlämpötilassa yhden tunnin ajan. Seuraavaksi membraania inkuboitiin kanin anti-ihmis-apolipoproteiini E-vasta-aineen 1:1 000 laimennoksessa (ystävällisesti saatu tohtori Joel Morrisett'lta, Dept. of Medicine, Baylor College of Med., Houston, TX) Blotto-puskurissa yli yön 4 °C:ssa, sitten se pestiin viisi kertaa Blotto-puskurissa. Membraani altistettiin vuohen anti-kani-sekundaarivasta-aineen, joka oli konjugoitu piparjuuriperoksidaasiin, 1:10 000 laimennokselle yhden tunnin ajaksi huoneenlämpötilassa, sitten pestiin seitsemän kertaa Blotto-puskurissa. Sitten piparjuuriperoksidaasi tehtiin silmin näkyväksi Enhanced Chemiluminesce Detection Kit -käyttöpakkauksella (Amersham) ja valotettiin Hyperfilm ECL -filmille (Amersham).

Aivo-selkäydinnestenäytteet

Aivo-selkäydinneste saatiin kliinisistä diagnostisista lannepunktioista, jotka tehtiin ihmispotilaille tietoisen suostumuksen jälkeen, ja niitä säilytettiin -80 °C:ssa.

Tulokset

Aivo-selkäydinneste sisältää monia proteiineja, jotka sitoutuvat immobilisoituun βA-peptidiin ja verrokkipeptidiin ("even-hydro-peptidi") inkuboitaessa ja eluoitaessa fosfaatilla puskuroidulla suolaliuoksella, kuvio 1, yläosa, kaista 1. Näiden jäljelle jääneiden proteiinien joukossa on apolipoproteiini E, kuten on esitetty kuviossa 1, alaosa, kaista 1. Monet näistä proteiineista eluoituvat molemmista immobilisoiduista peptideistä 5 % natriumdodekyylisulfaatilla, kaista 2; 4 molaarisella urealla, kaista 3; tai 6 molaarisella guanidiinivetykloridilla, kaista 4. Guanidiinivetykloridi ei kuitenkaan eluoinut apolipoproteiini E -proteiinia $βA_{(1-28)}$-peptidistä, mutta eluoi oleel-

lisesti kaikki apolipoproteiini E -proteiinin, joka oli aiemmin sitoutunut verrokkipeptidiin, kuten on esitetty kuviossa 1, alaosa, kaista 4.

Apolipoproteiini E -proteiinin sitoutuminen eri immobilisoituihin peptideihin on esitetty kuviossa 2. Aivo-selkäydinnesteessä oleva apolipoproteiini E sitoutuu korkealla affiniteetilla immobilisoituun $\beta A_{(1-40)}$-, $\beta A_{(1-28)}$- ja $\beta A_{(12-28)}$-peptidiin sen jälkeen, kun on inkuboitu ja pesty PBS:lla ja 5 % natriumdodekyylisulfaatilla. "12 - 28 even-hydro-peptidi" sisältää samat aminohapot kuin $\beta A_{(12-28)}$-peptidi, mutta sillä on erilainen hydropaattisuusprofiili. Apolipoproteiini E -proteiini ei sitoutunut tähän immobilisoituun peptidiin, kuten on esitetty kuvion 2 alaosassa. 12 - 28 hydropaattinen mimic-peptidi sisältää erilaiset aminohapot kuin $\beta A_{(12-28)}$-peptidi, mutta sen hydropaattisuusprofiili on hyvin samanlainen kuin $\beta A_{(12-28)}$-peptidin ja se sitoo myös apolipoproteiini E -proteiinia.

Esimerkki 2

ApoE-proteiinin immunotunnistus Alzheimerin potilaiden ja verrokkipotilaiden CSF:ssa

Sekä Alzheimerin tautia sairastavien potilaiden että verrokkipotilaiden aivo-selkäydinneste sisältää immunoreaktiivista apolipoproteiini E -proteiinia. Kunkin verrokki-CSF:n apolipoproteiini E sitoutui immobilisoituun $\beta A_{(1-28)}$-peptidiin. Alzheimerin tautia sairastavien aivo-selkäydinnestenäytteiden apolipoproteiini E kuitenkin osoitti merkittäviä variaatioita sitoutumisessaan βA-peptidiin.

Esimerkki 3

ApoE-isomuotojen tunnistus Alzheimerin taudin CSF:ssa isoelektrisellä fokusoinnilla

Sen määrittämiseksi, voisiko yllä mainittu variaatio sitoutumisessa βA-peptidiin olla selitettävissä apolipoproteiini E -proteiinin itsensä heterogeenisuudella, CSF-proteiinit erotettiin isoelektrisellä fokusoinnilla ja immunoreaktiivinen apolipoproteiini E tehtiin näkyväksi.

Aivo-selkäydinnesteen (CSF) proteiineista poistettiin lipidit ravistelemalla 30 µl:aa CSF:ää saman tilavuuden kanssa kloroformi:metanoliliuosta, jossa suhde oli 2:1 (v/v). CSF:lle, josta lipidit oli poistettu, tehtiin sitten isoelektrinen fokusointi käyttäen standardeja menetelmiä urea-polyakryyliamidigeelissä Biorad pH 3 - 10-amfolyyttien kanssa vertikaalisessa levygeelilaitteessa (Biorad Minigel). Elektroforeesin jälkeen proteiinit siirrettiin Immobilon P -membraanille käyttäen Western-menetelmää ja ne tunnistettiin, kuten yllä on kuvattu. Useita apolipoproteiini E -isomuotoja tunnistettiin isoelektrisellä fokusoinnilla.

Esimerkki 4

ApoE tyyppi 4 -isomuotoa koodittavan DNA:n tunnistus Alzheimerin tautia sairastavien potilaiden verisoluissa

Apolipoproteiini E -proteiinin populaatioassosiaatiotutkimukset suoritettiin yli 85:llä verinäytteellä sellaisista potilaista, joilla oli perinnöllinen Alzheimerin tauti, joilla Alzheimerin taudin diagnoosi oli varmistettu autopsialla.

Verinäytteiden genominen DNA uutettiin standardimenetelmien mukaisesti ja se amplifioitiin polymeraasiketjureaktiolla joko Stratagene SCS-96 tai Techne MW-2-lämpöhauteessa käyttäen 96-kuoppaisia Techne HI-TEMP-levyjä ja alukkeita, jotka ovat kuvanneet O. Wenham et al., Lancet 337, 1158 (1991). Polymeraasiketjureaktion protokolla oli oleellisesti sellainen kuin ovat kuvanneet Wenham et al., yllä, ja J. Hixson ja D. Vernier, J. Lipid Res. 31, 545 (1990). Kukin amplifikaatioreaktio sisälsi 20 ng genomista DNA:ta, 1,0 pmol kutakin aluketta/µl, 10 % dimetyylisulfoksidia (Sigma), 200 µM kutakin dNTP:tä (Pharmacia), 2,0 µCi (α-^{32}P)dCTP:tä (800 Ci/mol 10 mM Tricine-puskurissa, NEN Research Products), 0,05 yksikköä Taq DNA polymeraasia/µl ja mukana tullutta 1 x inkubaatio-

puskuria (Boehringer Mannheim) 15 µl lopputilavuudessa. Viiden minuutin alkudenaturaatiota 94 °C:ssa seurasi 35 sykliä, joissa hybridisaatio oli 65 °C:ssa 0,5 minuuttia, pidennys oli 70 °C:ssa 1,5 minuuttia, denaturaatio oli 94 °C:ssa 0,5 minuuttia, ja loppupidennys oli 70 °C:ssa 10 minuuttia. Amplifikaation jälkeen kuhunkin kuoppaan lisättiin suoraan 5 yksikköä HhaI-entsyymiä (Pharmacia) ja levyjä inkuboitiin ainakin kolme tuntia 37 °C:ssa. Kolme mikrolitraa kutakin reaktiota ladattiin 6 % ei-denaturoivaan geeliin (0,4 mm paksu x 43 cm pitkä) ja sitä ajettiin elektroforeesissa yksi tunti vakiovirralla (45 mA). Elektroforeesin jälkeen geeli siirrettiin Whatman 3M -kromatografiapaperille, kuivattiin ja suoritettiin autoradiografia yhden tunnin ajan käyttäen Kodak XAR-5-filmiä.

Tulokset on esitetty alla olevassa taulukossa 1. Tulokset osoittivat, että muutoin ei-yleinen tyyppi 4 -isomuoto liittyi erittäin tiiviisti Alzheimerin tautiin verrattuna normaalipopulaatioon. Tämän apolipoproteiini E tyyppi 4 -isomuodon geenifrekvenssi on yleisessä populaatiossa 16 %, kun taas tutkituilla Alzheimerin tautia sairastavilla potilailla geenifrekvenssi oli 51 %.

Taulukko 1

ApoE-isotyyppi normaaleilla ja Alzheimerin tautia sairastavilla potilailla

Apolipoproteiini E-isotyyppi (kumpikin kromosomi)	Potilaspopulaatio	
	Alzheimerin tauti	Normaali
2/2	0%	1%
3/3	20,7%	60%
4/4	24,4%	3%
2/3	3,6%	12%
2/4	3,6%	2%
3/4	47,6%	23%

Nämä tulokset osoittavat, että apolipoproteiini E tyyppi 4 -isomuotoa koodittavan DNA:n tunnistus on käyttökelpoinen ennustavana ja diagnostisena testinä perinnölliselle Alzheimerin taudille.

Esimerkki 5

ApoE4-proteiinin liittyminen sekä myöhään alkavaan perinnölliseen että satunnaiseen Alzheimerin tautiin

Nämä tulokset tukevat edelleen ApoE4-alleelin (ApoE-e4) osallisuutta myöhään alkavan perinnöllisen ja satunnaisen Alzheimerin taudin patogeneesissä.

Perheet

Verinäytteet genomisia DNA-tutkimuksia varten saatiin perheiltä, jotka on kuvattu aiemmin (J. Murrell et al., Science 254, 97 - 99 (1991); H. Karlinsky et al., Neurology 42, 1 445 - 1 453 (1992); P. St. George-Hyslop et al., Nature Genet. 2, 330 - 334 (1992); M. Pericak-Vance et al., Am. J. Hum. Genet. 48, 1 034 - 1 050 (1991); ja P. St. George-Hyslop et al., Nature 347, 194 - 197 (1990)). Kaikki tutkittavat potilaat, jotka oli diagnosoitu mahdollisiksi Alzheimerin tautia sairastaviksi (AD) potilaiksi, tutki neurologi ja mukana oleva diagnostinen henkilökunta Joseph and Kathleen Bryan Alzheimer's Disease Research Center (ADRC) Memory Disorders Clinic -laitoksella Duken yliopistossa, Centre for Neurodegenerative Diseases -laitoksella Toronton yliopistossa tai Departments of Neurology -laitoksella Massachusetts General Hospital -sairaalassa ja Harvard Medical School -laitoksessa. Kliininen diagnoosi tehtiin NINCDS-ADRDA-kriteerien (C. McKhann et al., Neurology 34, 939 - 944 (1984)) mukaisesti. Duken suvut olivat pääasiassa myöhään alkavan Alzheimerin taudin perheitä, joiden keski-ikä 35 perheessä oli 66,1 ± 10,3 vuotta. Kolme perheistä voitiin luokitella aikaisin alkavan Alzheimerin taudin perheiksi (M < 60 vuotta). Yksi perhe segregoitui APP717val-ile-mutaation

suhteen (A. Goate et al., Nature 349, 704 - 706 (1991)), toinen segregoitui APP717val-phe-mutaation suhteen (J. Murrell et al., Science 254, 97 - 99 (1991)) ja eräs on kytkeytynyt kromosomin 14 markkereihin niin, että maksimaalinen lod-pistemäärä on 3,5 (G. Schellenberg et al., Science 258, 668 - 671 (1992) ja P. St. George-Hyslop et al., Nature Genet 2, 330 - 334 (1992)). Toronton suvut luokiteltiin pääasiassa aikaisin alkavan Alzheimerin taudin perheiksi (13 perhettä 17 perheestä). Viisi perheistä oli kytkeytynyt kromosomiin 14 niin, että lod-pistemäärät olivat suurempia kuin 3,0 kussakin perheessä (P.H. St. George-Hyslop et al., Nature Gent 2, 330 - 334 (1992)), kun taas kuudennella suvulla oli APP17val-ile-mutaatio (H. Karlinsky et al., Neurology 42, 1 445 - 1 453 (1992)). Perhe- ja genotyyppitulokset prosessoitiin PEDIGENE™-systeemillä (C. Haynes et al., Genet. Epidemiol. 3, 235 - 239 (1986)).

Joidenkin potilaiden, joiden on diagnosoitu olevan mahdollisen Alzheimerin taudin satunnaisia tapauksia Dukessa, Torontossa ja Bostonissa, genomista DNA:ta on talletettu viimeisten kuuden vuoden aikana. Satunnaista Alzheimerin tautia sairastavat potilaat määriteltiin sellaisiksi, joilla ei ollut tunnettua Alzheimer- tai dementiaperhehistoriaa. Kaikki talletetut DNA:t satunnaisista mahdollisista Alzheimerin tautia sairastavista potilaista olivat DNA:ta, joita talletettiin Toronton ja Duken pankkeihin marraskuusta 1992 lähtien lukuunottamatta meneillään olevaa prospektiivista sarjaa, joka aloitettiin Bryan ADRC Memory Disorders Clinic -laitoksella elokuussa 1992. Näiden yksilöiden DNA:ta on kerätty umpimähkäisesti ennen kuin oli mielenkiintoa ApoE-isotyypitystä kohtaan. Kaikkien näissä klinikoissa arvioitujen satunnaista Alzheimerin tautia sairastavien potilaiden DNA:ta ei talletettu rutiinisti. Mahdollisen Alzheimerin diagnoosin tässä ryhmässä voidaan odottaa olevan 80 - 90 % tarkkuusvälillä,

joka on havaittu useimmissa spesialisoituneissa Alzheimer-klinikoissa. Aivo-DNA:ta saatiin autopsialla varmistetuista kaukasialaisista Alzheimerin tapauksista, jotka oli talletettu Kathleen Bryan Brain Bank -kokoelmaan Duken yliopistossa, Toronton yliopistoon ja Harvard Medical School -laitokseen. Kuusi mustaihoisen tai Amerikan intiaanin autopsiaa poistettiin satunnaisen Alzheimerin autopsioiden sarjasta, koska assosiaatioanalyysit ovat herkkiä verrokkiryhmälle. Tutkimuksessa käytettiin kahta verrokkiryhmää. Ensimmäinen ryhmään kuului 91 ei-sukua olevaa isovanhempaa Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH) -viiteperheistä (J. Dausett et al., Genomics 6, 575 - 577 (1990)). Nämä perheet kerättiin ihmisen geenikartoitusta varten ja niille on ominaista, että DNA-kartoitusta varten on saatavissa isovanhemmat, vanhemmat ja monia lastenlapsia. Isovanhemmat edustavat umpimähkäistä kaukasialaista ikäverrokkiryhmää, joilla on eurooppalainen ja amerikkalainen tausta, joka on samanlainen kuin myöhään alkavan FAD:n perheissä ja autopsialla varmistetussa satunnaisessa Alzheimer-populaatiossa. Potilaiden, jotka ottavat osaa meneillään olevaan mahdollista Alzheimerin tautia sairastavien potilaiden prospektiiviseen analyysiin, 21 kaukasialaista aviopuolisoa ja aviopuolisoita käytettiin myös verrokkiryhmänä.

Genominen DNA

Suurimolekyylipainoinen DNA saatiin transformoiduista lymfoblasteista tunnettujen menetelmien mukaisesti (M. Pericak-Vance et al., Neurology 36, 1 418 - 1 423 (1986) ja M. Pericak-Vance et al., Exp. Neurol. 102, 271 - 279 (1988)) tai GENEPURE 341™ -nukleiinihappoekstraktorin mukana tulleen ohjeen mukaan (Applied Biosystems). Genominen DNA aivokudoksesta eristettiin pulverisoimalla noin 300 mg jäädytettyä aivokudosta nestetypen alla, lisäämällä 4 ml lyysipuskuria (Applied Biosystems) ja 1 mg proteinaasi K -entsyymiä (Applied Biosystems), ja varovasti hei-

luttamalla yli yön 37 °C:ssa ennen uuttamista GENEPURE 341™ -laitteessa.

ApoE-DNA:n amplifikaatio ja restriktioisotyypitys

Genominen DNA amplifioitiin polymeraasiketjureaktiolla (PCR) Techne MW-2-lämpöhauteessa käyttäen 96-kuoppaisia HI-TEMP-levyjä (Techne) ja alukkeita, jotka ovat kuvanneet P. Wenham et al., Lancet 337, 1 158 - 1 159 (1991). PCR-reaktion suoritus perustui niihin menetelmiin, jotka ovat kuvanneet Wenham et al. ja J. Hixson et al., J. Lipid Res. 31, 545 - 548 (1990). Kukin amplifikaatioreaktio sisälsi 20 ng genomista DNA:ta, 1,0 pmol kutakin aluketta/µl, 10 % dimetyylisulfoksidia (Sigma), 200 µM kutakin dNTP:tä (Pharmacia), 1,0 µCi (α-^{32}P)dCTP:tä (800 Ci/mol 10 mM Tricine-puskurissa, NEN Research Products), 0,05 yksikköä Taq DNA polymeraasia/µl ja mukana tullutta 1 x inkubaatiopuskuria (Boehringer Mannheim) 15 µl lopputilavuudessa. Viiden minuutin alkudenaturaatiota 94 °C:ssa seurasi 35 sykliä, joissa hybridisaatio oli 65 °C:ssa 0,5 minuuttia, pidennys oli 70 °C:ssa 1,5 minuuttia, denaturaatio oli 94 °C:ssa 0,5 minuuttia, ja loppupidennys oli 70 °C:ssa 10 minuuttia. Amplifikaation jälkeen kuhunkin kuoppaan lisättiin suoraan 5 yksikköä HhaI-entsyymiä (Gibco) ja levyjä inkuboitiin ainakin kolme tuntia 37 °C:ssa. 15 µl tyypin III -lopetusväriä (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press B.24 (1989)) lisättiin kuhunkin kuoppaan ja 3 µl kutakin reaktiota ladattiin 6 % ei-denaturoivaan polyakryyliamidigeeliin (0,4 mm paksu x 43 cm pitkä) ja sitä ajettiin elektroforeesissa yksi tunti vakiovirralla (45 mA). Elektroforeesin jälkeen geeli siirrettiin Whatman 3M -kromatografiapaperille, kuivattiin ja suoritettiin autoradiografia yhden tunnin ajan käyttäen Kodak XAR-5-filmiä. Kunkin autoradiografian luki erikseen kaksi eri tarkkailijaa.

Tilastollinen analyysi

Verokki- ja Alzheimer-ryhmien alleelifrekvenssit arvioitiin laskemalla alleelit ja laskemalla näytesuhteet. Alleelifrekvenssiarviot aikaisin ja myöhään alkavan FAD:n perheille laskettiin käyttäen yhtä umpimähkään valittua sairasta potilasta kustakin perheestä. Laskettiin Z-tilasto kahden suhteen vertaamiseksi (R. Elston ja W. Johnson, Essentials of Biostatistics (1987) ja G. Schellenberg et al., J. Neurogenet. 4, 97 - 108 (1987)). Z:n ääriarvo verrattuna standardin normaalijakautuman todennäköisyyksiin antaa ehdottaa sen nollahypoteesin hylkäämistä, jonka mukaan alleelifrekvenssit kahdessa ryhmässä ovat samanlaiset. ApoE-alleelifrekvenssien vertaamiseksi eri populaatioissa, se on, AD:t vastaan verrokit, ja verrokkiryhmien välillä tehtiin seuraavat vertailut: 1) CEPH-verrokit vastaan aviopuolisoverrokit; 2) CEPH-verrokit vastaan kirjallisuudessa olevat verrokit; 3) CEPH-verrokit vastaan myöhään alkavat; 4) CEPH-verrokit vastaan aikaisin alkavat; 5) CEPH-verrokit vastaan kliiniset (mahdolliset) satunnaiset AD:t; ja 6) CEPH-verrokit vastaan autopsialla varmistetut satunnaiset AD:t. Sairastuneen sukujäsenen kytkentäanalyysi (APM) ApoE:lle analysoitiin tunnettujen menetelmien mukaisesti (M. Pericak-Vance et al., Am. J. Hum. Genet. 48, 1 034 - 1 050 (1991) ja D. Weeks et al., Am. J. Hum. Genet. 42, 315 - 326 (1988)). Kahden pisteen lod-pistemäärät laskettiin käyttäen LINKAGE™ Program Package -tietokoneohjelmaa (versio 5,0)(G. Lanthropet al., Am. J. Hum. Gent. 36, 460 - 465 (1984) ja G. Lanthrop et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3 443 - 3 446 (1984)). Lod-pistemäärien laskelmissa käytetyt taudin alkamisikä- ja tautiparametrit olivat, kuten aiemmin on määritelty (M. Pericak-Vance et al., yllä).

Tulokset

Taulukko 2 kuvaa ApoE4-alleelifrekvenssien arviot kolmessa verrokkipopulaatiossa: 1) CEPH-viiteperheiden 91

isovanhemmassa; 2) 21 aviopuolisossa, jotka ovat meneillään olevasta prospektiivisesta tutkimuksesta, jossa tutkitaan yhdenmukaisia satunnaisia mahdollisia AD-potilaita ja 3) edustavassa verrokkiryhmässä, joka on peräisin samanlaisesta populaatiosta kirjallisuudesta (G. Lanthrop et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3 443 - 3 446 (1984)). On myös kuvattu ApoE4-alleelifrekvenssiarviot useille erilaisille Alzheimerin tautia sairastaville ryhmille: 1) yhdelle, joka on valittu umpimähkään sairaista yksilöistä yhdistetyistä Duke ja Toronto/Boston FAD -perheistä, joilla tauti alkaa myöhään; 2) yhdelle, joka on valittu sairaista yksilöistä yhdistetyistä Toronto/Boston ja Duke FAD -perheistä, joilla tauti alkaa aikaisin; 3) talletetuille DNA-näytteille, jotka ovat peräisin potilaista, jotka on diagnosoitu mahdollisiksi satunnaisiksi AD-potilaiksi Duke- ja Toronto/Boston-klinikoilla; ja 4) 176 autopsialla varmistetun satunnaista Alzheimerin tautia sairastavan potilaan DNA:lle Dukesta ja Torontosta/Bostonista.

Yhdenmukaisesti yllä olevien esimerkkien 1 - 4 kanssa, ApoE e4-alleelifrekvenssi umpimähkään valituista sairaista potilaista FAD-perheissä, joissa tauti alkaa pääasiassa myöhään, oli merkittävästi erilainen verrattuna CEPH-verrokkien vastaavaan; 0,50 ± 0,06 vastaan 0,16 ± 0,027 (alleelifrekvenssiarvio ± standardivirhe, Z = 2,44, P = 0,014). Samalla tavalla tässä esitetty yhdistetty Duke ja Toronto/Boston FAD -ryhmä, jossa tauti alkaa myöhään, on merkittävästi erilainen verrattuna CEPH-verrokkeihin (P = 0,000017). Yhdistetyn Toronto/Boston ja Duke FAD -ryhmän (0,19 ± 0,069), jossa tauti alkaa aikaisin, ApoE-e4-frekvenssi ei eronnut merkittävästi (P = 0,069) CEPH-verrokkien frekvenssistä. Tilastolliset analyysit osoittavat erittäin merkittävät erot ApoE-e4-alleelifrekvensseissä sekä satunnaisissa (mahdollisissa) AD-tapauksissa (P = 0,00031) että autopsialla varmistetuissa satunnaisissa AD-

tapauksissa (P < 0,00001), kun niitä verrataan CEPH-verrokkeihin.

Taulukko 2

ApoE-e4-alleelifrekvenssiarviot

Populaatio	e4-alleeli[1]	Z[2]	P-arvo
Normaaliverrokit			
CEPH[3] (182)	0,16±0,027		
Aviopuolisot[4] (42)	0,10±0,046	0,59	0,56
Menzel[5] (2000)	0,14±0,008	0,71	0,48
Alzheimerin tauti (AD)			
LOAD[6] (72)	0,42±0,058	4,30	0,000017
EOAD[7] (32)	0,19±0,069	0,40	0,069
Kliinisesti satunnainen			
AD[8] (138)	0,36±0,042	4,17	0,00031
Autopsialla varmistettu satunnainen			
AD[9] (352)	0,40±0.026	6,49	<0,00001

[1]Alleelifrekvenssiarviot ± standardivirhe; laskettujen kromosomien määrä on esitetty suluissa.

[2]Z-arvot on esitetty CEPH-verrokkiryhmää vastaan.

[3]91 ei-sukua olevaa isovanhempaa kokoelmasta Centre D'Etude du Polymorphism Humain (CEPH).

[4]Aviopuolisoverrokit Bryan ADRC Memory Disorders Clinic -klinikalta, Duken yliopisto.

[5]Populaatio julkaisussa H. Menzel et al., Apolipoprotein E polymorphism and Coronary Artery Disease, Arteriosclerosis 3, 310 - 315 (1983).

[6]"LOAD" tarkoittaa myöhään alkavaa Alzheimerin tautia; yksi umpimähkään valittu sairas kustakin 32:sta Duke ja 4:stä Toronto/Boston FAD -perheestä, joilla tauti alkaa myöhään.

[7]"EOAD" tarkoittaa aikaisin alkavaa Alzheimerin tautia; yksi umpimähkään valittu sairas kustakin 13:sta Toronto/

Boston ja 3:sta Duke FAD -perheestä, joilla tauti alkaa aikaisin.

^{8}39 Duke ja 30 Toronto/Boston satunnaista (mahdollista) AD-potilasta.

^{9}143 Duke ja 33 Toronto/Boston satunnaista AD-potilasta, joilla tauti on varmistettu autopsialla.

Esimerkki 6

Amyloidi-ß-peptidin saostumisen liittyminen apolipoproteiini E -tyyppiin kuoleman jälkeisessä kudoksessa

Tässä esimerkissä ryhmää aivoja, jotka olivat peräisin potilaista, joilla oli myöhään alkava satunnainen AD, joiden ApoE-genotyyppi tunnettiin, tutkittiin sen määrittämiseksi, oliko AD-aivoissa, joissa oli ApoE-e4-alleeli, erilainen amyloidisaostumakuvio. Sellaisten potilaiden aivojen, jotka olivat homotsygootteja ApoE-e4-alleelin suhteen, havaittiin sisältävän kohonneen verisuonten amyloidisaostumisen ja kohonneen amyloidi- ja neuriittiplakkimäärän ja tiheyden verrattuna ApoE-e3-homotsygootteihin. Immunokemiallisissa tutkimuksissa ß-peptidi kohosi merkittävästi niissä potilaissa, joilla oli yksi tai kaksi ApoE-e4-alleelia. Kolmen pääasiallisen tutkitun ApoE-genotyypin (e3/3, e3/4 ja e4/4) välillä ei ollut mitään tilastollisesti merkittävää eroa sukupuolen, taudin alkamisiän tai sairauden keston suhteen. Myöhään alkavissa AD-tapauksissa, jotka liittyivät yhteen tai kahteen ApoE-e4-alleeliin, oli näin ollen erilainen neuropatologinen fenotyyppi verrattuna tapauksiin, jotka olivat homotsygootteja ApoE-e3-alleelin suhteen.

Tapausten valinta

143 autopsialla varmistettua myöhään alkavan Alzheimerin taudin (AD) tapausta, jotka täyttivät NIH:n ja CERAD:n kriteerit (C. McKhann et al., Neurology 34, 939 - 944 (1984) ja S. Mirra et al., Neurology 41, 479 - 486

(1991)) ja joilla ei ollut sairaita perheen jäseniä tai muita neurologisia tauteja, saatiin Kathleen Bryan Brain Bank -kokoelmasta Duken yliopistosta ja ne analysoitiin ApoE-genotyypin suhteen. Nämä tapaukset oli talletettu 1985 - 1992. Keskimääräinen kuolinikä näissä 143 tapauksessa oli 77,2 ± 8,9 vuotta niin, että taudin keskimääräinen kesto oli 8,6 ± 4,2 vuotta, ja 63 % potilaista oli naisia.

ApoE-genotyypitys

Genominen DNA saatiin eristämällä DNA noin 300 mg:sta jäädytettyä aivokudosta kussakin tapauksessa. Kunkin potilaan ApoE-genotyypitys suoritettiin, kuten on kuvattu yllä käyttäen amplifikaatiota polymeraasiketjureaktiolla ApoE-alukkeilla ja HhaI-restriktioisotyypitystä autoradiografisella tunnistuksella. ApoE-genotyypitys osoitti, että 47 tapausta oli tyyppiä ApoE e3/3, 64 tapausta oli tyyppiä ApoE e3/4, 23 tapausta oli tyyppiä ApoE e4/4, 3 tapausta oli tyyppiä ApoE e2/3 ja 6 tapausta oli tyyppiä ApoE e2/4.

Neurologinen analyysi

Tiedot kuoliniästä, sairauden kestosta, sukupuolesta, aivojen painosta, amyloidisaostumien läsnäolosta aivoverisuonissa (käyttäen kongonpunaväriä) ja kuvaus neuriittiplakkitiheydestä ja hermoalkusäieverkon määrästä (modifioitu Kingin hopeaväri [B. Lloyd et al., J. Histochem. 8, 155 - 156 (1985)] otettiin alkuperäisistä neuropatologisista raporteista. Neuriittiplakkilaskennat mainittiin 100 tapauksessa ja hermoalkusäieverkkolaskennat 95 tapauksessa. Kukin laskenta edusti sellaista yksittäistä mikroskoopin kenttää, joka tuntui olevan sairain osa-alue siinä alueessa. Plakit laskettiin 10 x objektiivilla (kentän koko 2,92 mm^2), kun taas verkot laskettiin 20 x objektiivilla (kentän koko 0,72 mm^2). Plakkilaskennat typistettiin 100:ksi per 10 x kenttä. Kaikki nämä tiedot on laitettu

potilaan sairaskertomukseen 1 - 5 vuotta ennen ApoE-genotyyppianalyysiä.

Kongonpunavärillä värjätyn materiaalin analyysi verisuonten amyloidin suhteen

53 potilaan alaryhmä valittiin valitsemalla aikajärjestyksessä ne tapaukset, joista jo oli olemassa kongonpunavärjätyt objektilasit. Valinta päättyi, kun 17 potilasta, joilla oli ApoE-genotyyppi e4/4 (kaiken kaikkiaan 23 potilaasta), 20 potilasta, joilla oli ApoE-genotyyppi e3/3 (kaiken kaikkiaan 49 potilaasta) ja 16 potilasta, joilla oli ApoE-genotyyppi e3/4 (kaiken kaikkiaan 65 potilaasta), oli valittu. 40 autopsiaraportissa 53:sta mainittiin spesifisesti verisuonten amyloidi ja ne muodostivat yhden sokkohavaintosarjoista, jotka suoritettiin loppuun ennen genotyypitystä. Verisuonten amyloidin läsnäolo jaettiin kolmeen tasoon: ei mitään ilmeisiä amyloidisaostumia (taso 0), pieniä määriä amyloidisaostumia sisältäen yhden positiivisen verisuonen (taso 1) ja helposti tunnistettavan verisuonten amyloidin (taso 2). Lisäksi kongonpunavärjätyt otsakuoren ja aivoturson, sisältäen entorinaalikuoren, objektilasit kaikista 53 tapauksesta tutkittiin kolmen havainnoitsijan toimesta verisuonten amyloidin suhteen käyttäen samaa tasosysteemiä. Nämä havainnot analysoitiin erikseen ja kaksoissokkona niin, että keskimääräinen arvioijien välinen yhtäpitävyys oli 8,5 %.

Immunosytokemialliset menetelmät

Aivoturson alueen, otsalohkon ja päälakilohkon paraffiiniblokit saatiin 7 ApoE e4/4 -tapaukselle, 8 ApoE e3/3 -tapaukselle ja 4 ApoE e3/4 -tapaukselle. Tapaukset valittiin umpimähkäisesti ilman tietoa neuropatologisesta raportista. Leikattiin 6 - 8 mikronin paraffiinileikkeet ja ne kiinnitettiin päällystetyille objektilaseille immunosytokemiaa varten. Leikkeistä poistettiin paraffiini, niitä käsiteltiin 90 % muurahaishapolla 3 minuuttia, pestiin ja sitten inkuboitiin monoklonaalisen vasta-aineen

kanssa amyloidi-ß-peptidin paikantamiseksi immunologisesti (vasta-aine on kuvattu julkaisussa S. Ikeda et al., Prog. Clin. Biol. Res. 317, 313 - 323 (1989), joka saatiin tohtoreilta George Glenner ja David Allsop). Rinnakkaisten leikkeiden annettiin reagoida identtisen vasta-ainelaimennoksen ja entsymaattisten tunnistusvaiheiden kanssa käyttäen ABC-menetelmää (Vectorstain, Burlingame, CA), ja peitinlasi laitettiin paikoilleen Permountin päälle sen jälkeen, kun vesi oli poistettu. Lähellä olevilta alueilta peräisin olevia leikkeitä (ei käsitelty muurahaishapolla) käytettiin osoittamaan neuriittiplakit 164 kD neurofilamenttiproteiinia vastaan olevalla monoklonaalisella vasta-aineella (laimennos 1:1 000)(SMI-34, Sternberger-Meyer Immunocytochemicals, Inc.) ja ApoE-proteiini käyttäen ihmisen ApoE-proteiinia vastaan olevaa polyklonaalista vasta-ainetta (laimennos 1:20 000), joka tunnistaa ApoE2-, ApoE3- ja ApoE4-isomuodot Western-bloteissa (saatiin tohtori Joel Morrisett'lta, Baylor College of Medicine). Rinnakkaiset verrokit eivät värjäytyneet näissä kokeissa.

Immunosytokemiallisen materiaalin analyysi

Valittiin alueet, joissa oli maksimaalinen plakkitiheys kussakin leikkeessä, ja graafinen analyysi suoritettiin piirtämällä plakin ääriviivat läpikuultokameralla määritellylle suorakulmiolle, jonka pinta-ala oli 0,25 mm^2, joka oli jaettu 160 yhtä suureen ristikkoon. Kaikki ristikkokehykset, jotka sisälsivät kokonaisen plakin tai osan immunoreaktiivisesta plakista, laskettiin ja summa hajautettiin todelliselle genotyypille. Arvioijien välinen luotettavuus on 85 % näissä menetelmissä ja varianssi erillisten kenttien välillä samasta leikkeestä on 15 %. Edustavat kentät valokuvattiin Zeiss-valokuvausmikroskoopilla.

Tilastollinen analyysi

Tulokset syötettiin Statgraphics-ohjelmaan ja varianssianalyysiä käytettiin kuvaamaan variaabelien välistä suhdetta. Mitään merkittäviä eroja ei ollut olemassa yllä

olevien ApoE e3/3, ApoE e3/4 ja ApoE e4/4 -genotyyppien 143 tapauksen pääryhmän, 53 tapauksen alaryhmän tai pienempien alaryhmien, jotka valittiin kongonpuna-analyysiin tai immunosytokemialliseen analyysiin, kesken mitä tulee kuolinikään, sukupuolisuhteeseen tai aivojen painoon. Plakki- ja hermoalkusäieverkkolaskujen vertaamiseksi käytettiin Kruskal-Wallis-yksisuunta-analyysiä, koska havainnot eivät sopineet normaalijakautumaan.

ß-peptidi-amyloidisaostumien immunologinen paikantaminen sellaisten satunnaisten AD-potilaiden aivoissa, jotka ovat homotsygootteja ApoE e3 tai e4 -alleelin suhteen

ß-peptidin immunosytokemia sellaisten potilaiden aivoissa, joilla oli satunnainen myöhään alkava AD, osoitti yhdenmukaiset erot immunovärjättyjen aivokuorileikkeiden välillä ApoE e3/3 ja ApoE e4/4 -tapauksissa (tuloksia ei esitetty). ApoE e3/3 -tapausten leikkeiden ß-peptidin immunoreaktiivisuus paljastaa hyvin vähäisen verisuonten värjäytyvyyden tai sen poissaolon ja heikosti värjäytyvät plakit, kun taas leikkeet ApoE e4/4 -tapauksista ovat tummaksi värjäytyneet niin, että aivopinnalla on runsaasti immunoreaktiivisia verisuonia ja peruskudoksessa on voimakkaasti immunoreaktiivisia plakkeja ja verisuonia. Ero on tyypillisesti sellaista tasoa, että immunovärjäytyneet ß-peptidialueet ApoE e4/4 -aivoista voidaan erottaa ApoE e3/3 -aivojen alueista ilman mikroskooppia.

ApoE-proteiinin immunologinen paikantaminen sellaisten AD-potilaiden aivoissa, jotka ovat homotsygootteja ApoE e3 tai e4 -alleelin suhteen

ApoE-immunoreaktiivisuutta havaittiin aivoverisuonissa, neuroneissa, gliasoluissa, seniiliplakeissa ja hermoalkusäieverkossa, kuten on kuvattu aiemmissa julkaisuissa (J. Diedrich et al., J. Virol. 65, 4 759 - 4 768 (1991) ja Y. Namba et al., Brain Res. 541, 163 - 166 (1991)). Kuten ß-peptidin immunoreaktiivisuus, ApoE-immunoreaktii-

visuus kohoaa muurahaishappokäsittelyn jälkeen. ApoE-immunoreaktiivisuuden sijainnissa tai voimakkuudessa ei ollut mitään suuria eroja ApoE e3/3 -tapauksissa verrattuna ApoE e4/4 -tapauksiin (huomaa, että tämä ApoE-proteiinia vastaan oleva polyklonaalinen antiseerumi tunnistaa sekä ApoE3- että ApoE4-isomuodot). Erityisesti useimmat suuret aivoverisuonet olivat ApoE-immunoreaktiivisia sekä ApoE e4/4 että ApoE e3/3 -tapauksissa.

Verisuonten amyloidin määrä ApoE e3/3, e4/4 ja e3/4 -genotyypeissä - retrospektiivinen analyysi autopsiaraporteista

40 tapauksessa 53 tapauksesta verisuonten amyloidin läsnä- tai poissaolo, joka oli tunnistettu kongonpunavärjäyksellä, mainittiin selvästi autopsiaraportissa. Näiden autopsiaraporttien retrospektiivinen pisteytys verisuonten amyloidisaostumien määrän suhteen paljasti merkittävän verisuonten amyloidin assosiaation ApoE e4 -alleelien määrään ($p < 0,0001$). Tyypillisesti mitään verisuonten amyloidia ei mainittu ApoE e3/3 -tapauksille, vähäisiä määriä verisuonten amyloidia e3/4-tapauksille ja suuria määriä havaittiin useimmissa e4/4-tapauksissa (alla oleva taulukko 3.A.1).

Kongonpunavärjätyn materiaalin prospektiivinen analyysi

Verisuonten amyloidoosin määrän prospektiiviseksi tutkimiseksi 53 tapauksen kokonaisryhmässä, suoritettiin aivoturson ja otsakuoren kongonpunavärjättyjen leikkeiden uusi kaksoissokkotarkastelu. Tämä analyysi varmisti erittäin merkittävän assosiaation kongonpunapositiivisen amyloidiverisuonitaudin läsnäolon ja ApoE e4 -alleelimäärän välillä 53 tapauksessa (taulukko 3.A.1). Sellaiset amyloidoottiset verisuonet eivät olleet välttämättä läsnä koko tutkitussa kuorialueessa ApoE e4/4 -homotsygooteilla, mutta usein ne hallitsivat uurteiden alaosia, kuten aivoturson uurretta.

ß-peptidin suhteen immunoreaktiivisten verisuonten analyysi

Kun 53 potilaan ryhmän alaryhmän leikkeiden annettiin reagoida immunologisesti ß-peptidin suhteen ja ne pisteytettiin samalla tavalla, löydettiin sama tilastollisesti merkittävä assosiaatio verisuonten amyloidin ja ApoE e4 -alleelin määrän välillä (taulukko 3.C.1). Amyloidoottisiin verisuoniin ApoE e4 -homotsygooteissa kuuluivat pehmyt- ja lukinkalvon verisuonet ja aivokuorilevyn suuret ja pienet verisuonet niin, että niitä ympäröi plakinkaltainen amyloidikasautuma (plakinkaltainen verisuonitauti, jonka on kuvannut Scholze [W. Scholze, Z. Gesamte Neurol. Psych. 162, 694 - 715 (1938)]).

Neuriittiplakkien määrä on kohonnut ApoE e4 -homotsygooteissa verrattuna ApoE e3 -homotsygootteihin

Neljässä viidestä aivokuorialueesta keskimääräinen neuriittiplakkien määrä hopeavärjätyssä materiaalissa oli suurempi ApoE e4 -homotsygooteissa kuin ApoE e3 -homotsygooteissa (taulukko 1.A.2). Kruskal-Wallis-yksisuunta-analyysi paljasti, että neuriittiplakkien kohonnut keskimääräinen määrä assosioitui ApoE e4 -alleelimäärään kolmella alueella, otsakuoressa, ohimokuoressa ja päälakikuoressa, ja että assosiaatio läheni merkittävyyttä aivoturson CA1-osa-alueessa. Neuriittiplakkimäärät eivät korreloineet sairauden kestoon.

Hermoalkusäieverkkomäärät kohoavat hieman ApoE e4 -homotsygooteissa verrattuna ApoE e3 -homotsygootteihin

Kaikissa yllä kuvatuissa viidessä aivokuorialueessa hermoalkusäieverkkojen keskimääräinen määrä oli suurempi ApoE e4 -homotsygooteissa verrattuna ApoE e3 -homotsygootteihin (taulukko 3.A.3). Mahdollisuus, että kaikki viisi aluetta sisältäisivät kohonneen hermoalkusäieverkkojen keskimääräisen määrän ApoE e4/4 -tapauksissa verrattuna ApoE e3/3 -tapauksiin, on 3 % (ei-parametrinen parinäytetesti). Erot kunkin alueen keskimääräisissä määrissä ovat

vaatimattomia eivätkä merkittäviä Kruskal-Wallis-testin mukaan. Kuitenkin hermoalkusäieverkkojen keskimääräinen määrä kullakin aivokuorialueella vaihtelee merkittävästi ($p < 0,01$) sairauden keston suhteen koko potilasryhmässä ja ApoE-genotyyppialaryhmissä. Keskimääräisen hermoalkusäieverkkojen määrän kohoamisen ApoE e4 -homotsygooteissa selittää ilmeisesti sairauden keston nouseva suuntaus, joka on assosioitunut ApoE e4 -alleeliin.

Satunnaisten AD-tapausten amyloidisaostumien immunosytokemiallinen analyysi

Suuri kohoaminen amyloidisaostumien määrässä satunnaisissa AD-tapauksissa, joka mainittiin ApoE e4 -homotsygooteilla, verrattuna ApoE e3 -homotsygootteihin, sisältää sekä verisuonten amyloidisaostumisen että saostumisen seniiliplakkeihin. Näiden erojen kvalitatiiviseksi ja kvantitatiiviseksi varmistamiseksi 7 potilaan ryhmää, jotka olivat homotsygootteja ApoE e4 -alleelin suhteen, verrattiin 8 potilaan ryhmään, jotka olivat homotsygootteja ApoE e3 -alleelin suhteen. Myös neljä heterotsygoottia (ApoE e3/4) tutkittiin mahdollisten Apo-määrien vaikutusten määrittämiseksi. Aivokuoren pienisuurennoksiset näkökentät paljastivat tyypillisen eron ß-peptidin kokonaisimmunoreaktiivisuudessa, joka havaittiin ß-peptidin suhteen immunoreagoineilla aivokuorialueilla ApoE e3 -homotsygooteilla verrattuna e4-homotsygootteihin (tuloksia ei esitetty). Nämä erot löydetään yhtäläisesti jopa silloin, kun ß-peptidin suhteen immunovärjättyjä alueita tutkitulla aivokuorialueella etsitään sellaisia mikroskooppikenttiä varten, joilla on maksimaalinen immunoreaktiivisten plakkien tiheys. Plakkien määrä ApoE e4/4 -tapauksissa oli suurempi, ne olivat jonkinverran isompia usein sisältäen verisuonen ja ne olivat tummempia kuin ne, jotka havaittiin ApoE e3/3 -tapauksissa.

Plakkien kvantitatiivinen analyysi ß-peptidin immunoreaktiivisuuden suhteen

15 satunnaisen AD-tapauksen otsakuorileikkeiden annettiin reagoida immunologisesti ß-peptidin paikantamiseksi ja suoritettiin kussakin tapauksessa sellaisten mikroskooppikenttien kvantitatiivinen analyysi, jotka sisälsivät maksimaalisen ß-peptidin suhteen immunoreaktiivisten plakkien tiheyden (taulukko 3.B.2). ApoE e4/4 -homotsygooteissa oli erittäin merkittävä 7 kertaa suurempi keskimääräinen alue, jonka vahvasti ß-peptidin suhteen immunoreaktiiviset plakit peittivät verrattuna ApoE e3/3 -homotsygootteihin ($p < 0,002$). ApoE e3/4 -tapaukset ovat tältä väliltä.

Useissa ApoE e3/3 -tapauksissa heikosti immunoreaktiivisia plakkeja oli myös läsnä ja niiden määrä oli merkittävästi korkeampi kuin ApoE e4/4 -tapauksissa ($p = 0,04$). Siitä huolimatta, kaikkien ß-peptidin suhteen immunoreaktiivisten plakkien peittämä keskimääräinen kokonaisalue oli 2 kertaa suurempi ($p < 0,008$) ApoE e4/4 -homotsygooteissa verrattuna ApoE e3/3 -homotsygootteihin (taulukko 3.B.2).

Taulukko 3

Satunnaista Alzheimerin tautia sairastavien potilaiden neuropatologiset ja immunokemialliset ominaisuudet

ApoE-genotyyppi	ε3/3	ε3/4	ε4/4
Kuolinikä (v)	76,4	79,1	75,8 NS
Taudin kesto (v)	7,7	8,5	9,0 p=,06
A. Tiedot autopsiaraporteista			
1. Kongofiilinen amyloidiverisuonitauti: Keskimääräinen taso (0 ei mitään, 1 = vähän, 2 läsnä)			
Raportin mukaan	0,27	0,80	1,92 p<,0001
Uudelleen tarkastelun mukaan	0,40	1,16	1,76 p<,0001
	n = 20	n = 16	n = 17
2. Neuriittiplakit: keskimääräinen plakkimäärä per pienen suurennoksen näkökenttä 10 x objektiivilla (2,92 mm^2)			
otsakuori	59	81	87 p<,0003
ohimokuori	62	77	87 p<,009
päälakikuori	61	68	86 p<,007
entorinaalikuori	27	30	25 p=,69
aivoturso (CA1)	12	13	18 p=,13
	n = 30	n = 48	n = 22
3. Hermoalkusäieverkot: Keskimääräinen määrä per suuren suurennoksen näkökenttä 20 x objektiivilla (0,72 mm^2)			
otsakuori	6	7	8 p=,34
ohimokuori	7	9	13 p=,16
päälakikuori	7	10	8 p=,15
entorinaalikuori	31	35	42 p=,22
aivoturso (CA1)	26	37	48 p=,07
	n = 28	n = 46	n = 21
B. Immunosytokemialliset tutkimukset			
1. β-peptidin suhteen immunoreaktiiviset verisuonet: keskimääräinen taso (0 = ei mitään, 1 = vähän, 2 = läsnä)			
	0,50	0,50	2,00 p<,0001
	n = 8	n = 4	n = 7
2. β-peptidin suhteen immunoreaktiiviset plakit: % alueesta peittynyt			
erittäin immunoreaktiivinen	4,5	9,4	31,7 p<,002
heikosti immunoreaktiivinen	12,9	4,0	6,1 p=,04
plakkien kokonaismäärä	17,4	13,4	37,8 p<,008
	n = 8	n = 4	n = 7

Neuriittiplakkien määrä

Lisää otsakuoren lähellä olevia leikealueita kahdeksasta yllä olevasta tapauksesta värjättiin immunologisesti neurofilamenttiproteiinia vastaan olevalla vasta-aineella (SMI-34) sen testaamiseksi, vaihteliko neuriittiplakkitiheys ApoE e3 ja ApoE e4 -homotsygoottien välillä. SMI-34-immunoreaktiivisuus paljasti neuriittihaarakkeet ja neuronit yhdessä hermoalkusäieverkon kanssa. Neuriittiplakit voidaan tunnistaa niiden neuriittihaarakesisällön avulla.

Vaikka neuriittiplakkien määrä ja niiden peittämä kokonaisalue (määritettynä SMI-34-immunoreaktiivisuudella) on pienempi kuin amyloidiplakkien vastaava (määritettynä ß-peptidin immunoreaktiivisuudella) (tuloksia ei esitetty), lähellä olevissa leikkeissä olevien plakkialueiden mittausten vertailu osoittaa merkittävän ja lineaarisen korrelaation kahdelle plakkitunnistusmenetelmälle näissä kahdeksassa tapauksessa ($p < 0,006$, $r = 0,73$). Neuriittiplakkien peittämä alue on myös merkittävästi suurempi ApoE e4 -homotsygooteissa kuin ApoE e3 -homotsygooteissa ($p < 0,02$).

Esimerkki 7

ApoE4-geenimäärän ja Alzheimerin tautiriskin suhde

Tässä esimerkissä kvantitoidaan sekä kohonnut riski Alzheimerin taudille että taudin alkamiselle varhaisemmalla iällä, jonka ApoE4-alleelit aiheuttavat AD-perheissä, joissa tauti alkaa myöhään. Riski kohosi 20 %:sta 90 %:iin ja taudin alkamisen keski-ikä aleni 84 vuodesta 68 vuoteen, kun ApoE4-alleelien määrä kohosi. Nämä tulokset osoittavat, että ApoE4-geenimäärä on pääasiallinen riskitekijä myöhään alkavalle Alzheimerin taudille ja että homotsygoottisuus ApoE4-alleelin suhteen on todella riittävä aiheuttamaan Alzheimerin taudin 80 vuoden ikään mennessä.

Tähän mennessä testatuista 46 perheestä 4 on sellaisia, joissa tauti alkaa varhain, kahdella on kromosomin

21 APP-mutaatioita ja kaksi on kytkeytynyt kromosomiin 14. ApoE4-frekvenssi ei kohonnut näissä perheissä. Arvioitiin 42 perheen, joissa tauti alkaa myöhään, sellaisia tunnetun ApoE-genotyypin sisältäviä jäseniä, joiden on diagnosoitu sairastavan Alzheimerin tautia tai jotka on tutkittu ja joiden on havaittu olevan terveitä 60 ikävuoden jälkeen. Ennen rekisteröintiä tutkimukseemme kultakin potilaalta tai, kun oli tarpeen, heidän lailliselta holhoojaltaan, saatiin tietoinen suostumus. Kaikki tutkimusmenetelmät hyväksyi Duke University Medical Center Institutional Review Board -lautakunta. Kuvaavat tilastot sairaista ja terveistä potilaista on annettu taulukossa 4. Naiset elivät keskimääräisesti kauemmin kuin miehet olivatpa sairaita ($p = 0,02$) tai terveitä ($p = 0,13$).

Koskien taulukkoa 4 huomatkaa, että enemmän kuin 90 % kliinisesti diagnosoiduista tapauksista oli varmistettu autopsialla. Kliinisen tutkimuksen ennustava arvo on lähes 100 %, kun perheen jäsenellä on autopsialla varmistettu AD-diagnoosi. Neljä potilasta, joilla oli AD-diagnoosi, ja 30 potilasta, jotka oli tutkittu ennen 60 ikävuotta, jätettiin pois analyysistä. Perheet, joilla tauti alkaa myöhään, eivät olleet kytkeytyneet kromosomiin 21 tai kromosomiin 14 sen alueen 19 % rekombinaatiotarkkuudella, joka on aiemmin kytketty Alzheimerin tautiin, joka alkaa varhain. Arvioitu maksimaalinen kahden pisteen LOD-pistemäärä AD:lle ja APOE:lle oli 2,61 6 % rekombinaatiolla.

Taulukko 4

Kuvaavat tilastot sairaille ja terveille potilaille

Sairaat potilaat (n = 95)			
	Taudin alkamisikä		
	n	keski-arvo	Standar-dipoikk.
Miehet	34	71,8	(8,4)
Naiset	61	70,4	(8,0)
Terveet potilaat (n = 139)			
	Kuolinikä		
	n	keski-arvo	Standardi-poikk.
Miehet	62	77,7	(8,0)
Naiset	77	82,6	(9,2)

Sairaiden yksilöiden suhde kohosi ApoE4-alleelien määrän kanssa 20 %:sta sellaisilla potilailla, joilla oli 2/3- tai 3/3-genotyyppi, 47 %:iin sellaisilla potilailla, joilla oli 2/4- tai 3/4-genotyyppi, ja 91 %:iin sellaisilla potilailla, joilla oli 4/4-genotyyppi (taulukko 5). Tämä additiivinen suuntaus oli erittäin merkittävä (khineliö = 33,4 vapausasteella 1, $p < 0,00001$) (G. Koch et al., Analysis of Categorical Data (Les Presses de L'Universite de Montreal, Montreal, 1985) ja SAS Institute, Inc., SAS/STAT User's Guide, Release 6.03 Edition (SAS Institute, Cary NC, 1988)). Useampi nainen kuin mies oli sairas ($p = 0,04$). Tämä antoi ehdottaa, että naisilla voi ehkä olla suurempi riski sairastua Alzheimerin tautiin.

Taulukko 5

Sairastumisprosentti kussakin ApoE-genotyypissä

ApoE-genotyyppi	% miehistä sairaita	% naisista sairaita
2/2	---- (0)	---- (0)
2/3	28,6 (7)	11,1 (9)
3/3	7,1 (28)	28,6 (49)
2/4	50,0 (2)	0,0 (3)
3/4	38,3 (47)	54,5 (66)
4/4	91,7 (12)	90,9 (11)

Kuten on esitetty taulukossa 6, riski sairastua Alzheimerin tautiin kohosi tekijällä 2,84 (95 % luotettavuusväli (CI) 2,03 - 3,96) kunkin ApoE4-lisäalleelin mukana (D.R. Cox et al., Analysis of Survival Data (Chapman and Hall, Lontoo, 1984) ja L. Wei et al., JASA 84, 1065 (1989)). Näin ollen potilailla, joilla oli 4/4-genotyyppi, oli yli 8-kertainen todennäköisyys sairastua kuin sellaisilla potilailla, joilla oli 2/3- tai 3/3-genotyyppi. Kun erilliset arviot tehtiin sellaisille potilaille, joilla oli 0, 1 ja 2 ApoE4-alleelia, saatiin yhtäläinen todiste (joka ei saavuttanut tilastollista merkittävyyttä), että naisilla oli korkeampi riski kuin miehillä. Naisten riski miehiin verrattuna oli 1,33 (95 % CI 0,42 - 4,26), 1,39 (95 % CI 0,76 - 2,55) ja 1,30 (95 % CI 0,50 - 3,38) silloin, kun oli 0, 1 ja 2 ApoE4-geeniä, vastaavasti.

Taulukko 6

Sairaiden potilaiden prosentti ja suhteellinen riski ApoE4-alleelien määrän suhteen

ApoE4-geenimäärä	Miehet		Naiset		Yhdistetty		Riskisuhde
	% sairaita	(n)	% sairaita	(n)	% sairaita	(n)	Ratio
0	11,4	(35)	25,9	(58)	20,4	(93)	1,00
1	38,8	(49)	52,2	(69)	46,6	(118)	2,84+
2	91,7	(12)	90,9	(11)	91,3	(23)	8,07+

Riskiarviot taulukossa 6 johdettiin tulkitsemalla parametriarviot, jotka saatiin Coxin suhteellisuusriskimallista, joka salli riskin eroamisen naisilla ja miehillä (SAS Institute Inc., Analysis of Survival Data (Chapman and Hall, Lontoo, 1984) ja SAS Institute Inc., SAS Technical Report P-217, SAS/STAT Software: The PHREG Procedure, Version 6 (SAS Institute Inc., Cary, NC, 1991)). Merkki '+' osoittaa, että riski oli merkittävästi erilainen viitearvosta 1. Kunkin iältään 60 - 75 vuotiaan potilaan tietoja, joita käytettiin suhteellisen riskin olettamuksina, eivät pitäneet, kun diagnoosi tehtiin 75 ikään mennessä lähes kellään henkilöllä, jolla oli 2 ApoE e4 -alleelia. Tilastollisesti yhtenevät, jos ei täysin pätevät, arviot suhteellisesta riskistä muodostuvat suhteellisuusriskimalleista jopa silloin, kun arvioidaan toisilleen sukua olevia yksilöitä (L. Wei et al., JASA 84, 1065 (1989)). Näin ollen riskiarviot ovat lähes samanlaisia kuin arviot, jotka olisi löydetty tutkimalla ainoastaan yhtä henkilöä kustakin perheestä paljon suuremmasta perhemäärästä.

Mantel-Haenszel-korrelaatiotilastoa (SAS Institute, Inc., SAS/STAT User's Guide, Release 6.03 Edition (SAS Institute, Cary, NC, 1988) ja D.R. Cox et al., Analysis of Survival Data (Chapman and Hall, Lontoo, 1984)), joka oli ositettu perheen mukaan, käytettiin arvioitaessa riskin additiivista suuntausta kohoavan ApoE4-geenimäärän suhteen. Sairaiden potilaiden suhde kohosi merkittävästi ApoE4-geenimäärän suhteen (khi-neliö = 33,4 vapausasteella 1, $p < 0{,}00001$).

Seuraavaksi tutkittiin taudin alkamisikää sen määrittämiseksi, liittyikö se ApoE4-geenimäärään. Taudin alkamisjakautumat muodostettiin sairastuneiden potilaiden ikätiedoista taudin alkaessa ja sen terveiden potilaiden iän perusteella, jolloin heidät viimeksi tutkittiin, ja ne olivat erilaisia kullekin geenimäärälle (khi-neliö = 53,84 vapausasteella 2, $p < 0{,}00001$) (R.G. Miller Jr., Survival

Analysis (Whiley, New York, 1981) ja SAS Institute Inc., SAS User's Guide: Statistics, Version 5 Edition (SAS Institute, Cary, NC, 1985)) (kuvio 3). Kukin ApoE4-lisäalleeli siirsi taudin alkamista nuorempaan ikään, keskimääräinen alkamisikä oli 84,3 vuotta (SE 1,3) potilailla, joilla oli 1 ApoE4-alleeli ja 68,4 vuotta (1,2) potilailla, joilla oli 2 ApoE4-alleelia. Tauti tuntui alkavan aikaisemmin naisilla kuin miehillä ($p = 0,04$).

Samalla tavalla muodostettiin eloonjäämisjakautumat kuolinikätietojen perusteella sellaisilla potilailla, joiden tiedettiin olevan kuolleita, ja muilla potilailla sen iän perusteella, jolloin heidät oli viimeksi tutkittu riippumatta sairauden statuksesta. ApoE4-geenimäärä liittyi eloonjääntiin ($p = 0,004$); keskimääräinen eloonjääntiin oli 84,9 vuotta (SE 1,3) potilailla, joilla oli 0 ApoE4-alleelia, 78,8 vuotta (SE 0,8) potilailla, joilla oli 1 ApoE4-alleeli ja 78,1 vuotta (SE 1,4) potilailla, joilla oli 2 ApoE4-alleelia. Sellaisten yksilöiden aikaisempi kuolema, joilla oli 1 tai 2 ApoE4-alleelia, johtui pääasiassa useammin tapahtuvasta ja aikaisemmasta Alzheimerin taudin alkamisesta näissä potilaissa ($p = 0,001$).

Huolimatta siitä, että 1 tai 2 ApoE4-alleelia sisältävillä potilailla oli lyhyempi eloonjääntiaika, kunkin ApoE4-alleelin aiheuttama taudin aikaisempi alkaminen sai meidät epäilemään, että useimmat AD-diagnoosit ja yleisimmät tapaukset tapahtuvat potilaissa, joilla on 1 tai 2 ApoE4-alleelia. Ero keskimääräisen taudin alkamisen ja keskimääräisen eloonjääntiajan kesken oli 9,7 vuotta potilaissa, joilla oli 2 ApoE4-alleelia, 3,1 vuotta potilaissa, joilla oli 1 ApoE4-alleeli ja 0,6 vuotta potilaissa, joilla oli 0 ApoE4-alleelia.

Aiemmat julkaisut Alzheimerin taudin kytkeytymisestä markkereihin, jotka sijaitsevat lähellä ApoE-lokusta, voivat johtua Alzheimerin taudin alleelisesta assosiaatiosta ApoE4-alleelin kanssa. Vaikka nämä markkerit eivät

tunnu olevan epätasapainossa ApoE:n kanssa, niiden segregaatio voi matkia kytkentää perheissä, joissa segregoituu ainakin yksi ApoE4-alleeli (D.A. Greenberg, Am. J. Hum. Genet. 52, 135 - 143 (1993)). Vahva, mutta ei lopullinen todiste Alzheimerin taudin kytkeytymisestä ApoE-lokukseen ($Z = 2,61$, $\theta = 0,06$), tukee myös tätä selitystä.

On tärkeää ymmärtää, että 19 sairaalla potilaalla 95 sairaasta potilaasta sukujoukossamme ja 64 autopsialla varmistetulla satunnaisella AD-tapauksella 176 tapauksesta, jotka ovat kuvanneet Saunders et al. (R.G. Miller Jr., Survival Analysis (Wiley, New York, 1981)), ei ollut yhtään ApoE4-alleelia. 42 perheestä, joilla tauti alkaa myöhään, 12 perheessä oli sairaita jäseniä, joilla oli 0 ApoE4-alleelia. Se tosiasia, että nämä tuntuivat olevan suurimpia, ja simulaatiotutkimuksiin perustuvia, mahdollisesti informatiivisimpia perheitä kytkennälle, antaa voimakkaasti ehdottaa, että muita geneettisiä riskilähteitä on olemassa. Nämä muut geenit voidaan tunnistaa vasta sitten, kun ApoE4-alleelin vaikutukset sisällytetään myöhempään analysiin.

Edellä olevat esimerkit kuvaavat keksintöä eikä niitä tule pitää sitä rajoittavina. Keksintöä määrittelevät seuraavat patenttivaatimukset niin, että patenttivaatimusten ekvivalentit sisältyvät tähän.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä potilaan Alzheimerin taudin diagnosoimiseksi, ennustamiseksi tai seulomiseksi potilaassa, jossa apolipoproteiini E tyyppi 4 -isomuodon (ApoE4) läsnäolo osoittaa, että mainittu potilas sairastaa Alzheimerin tautia tai hänellä on riski sairastua Alzheimerin tautiin, t u n n e t t u siitä, että mainitussa menetelmässä tunnistetaan ApoE4:n tai siitä koodaavan DNA:n läsnä- tai poissaolo mainitun potilaan biologisessa näytteessä kuten verinäytteessä.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainitun potilaan ei aiemmin ole diagnosoitu sairastavan Alzheimerin tautia.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu tunnistusvaihe sisältää tunnistuksen, onko mainittu potilas homotsygootti ApoE tyyppi 4 -isomuotoa koodittavan geenin suhteen.

4. Patenttivaatimuksen 1 - 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainitulla potilaalla on aiemmin määritelty olevan riski sairastua Alzheimerin tautiin.

5. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu potilas sairastaa dementiaa.

6. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu tunnistusvaihe suoritetaan amplifioimalla ApoE4-proteiinia koodittava DNA.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu amplifikaatiovaihe suoritetaan polymeraasiketjureaktiolla tai liqaasiketjureaktiolla.

8. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu tunnistusvaihe suoritetaan isoelektrisellä fokusoinnilla tai im-

munotestillä, mahdollisesti immunotestillä käyttäen vasta-ainetta, joka selektiivisesti sitoutuu ApoE4-isomuotoon.

9. Välineen käyttö apolipoproteiini E tyypin 4 -isomuodon tai sitä koodaavan DNA:n havaitsemiseksi määritettäessä sairastaako henkilö Alzheimerin tautia tai onko hänellä riski sairastua siihen.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että sitä sovelletaan potilaan Alzheimerin taudin diagnostisointiin tai prognoosin määritykseen.

11. Patenttivaatimuksen 9 tai 10 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että se toteutetaan tunnistamalla ApoE4:ää koodaava DNA.

12. Patenttivaatimuksen 9 tai 10 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että se toteutetaan tunnistamalla suoraan ApoE4.

13. Jonkin patenttivaatimusten 9 - 12 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että todetaan, onko tutkittava henkilö homotsygootti ApoE4:ää koodaavan geenin suhteen.

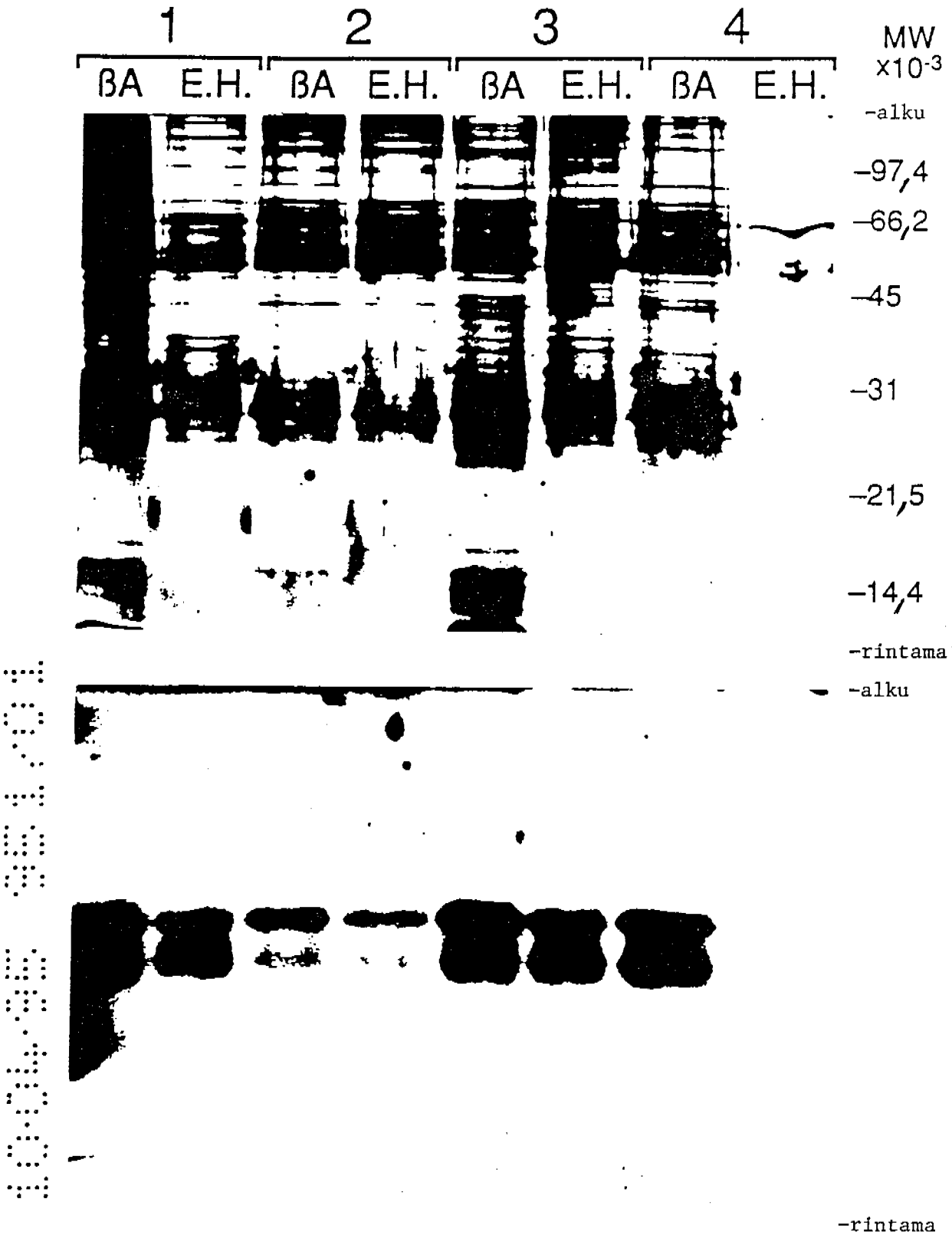
1
2
3
4
βA
E.H.
βA
E.H.
βA
E.H.
βA
E.H.
MW
x10-3
-alku
-97,4
-66,2
-45
-31
-21,5
-14,4
-rintama
-alku
-rintama

FIG. 1

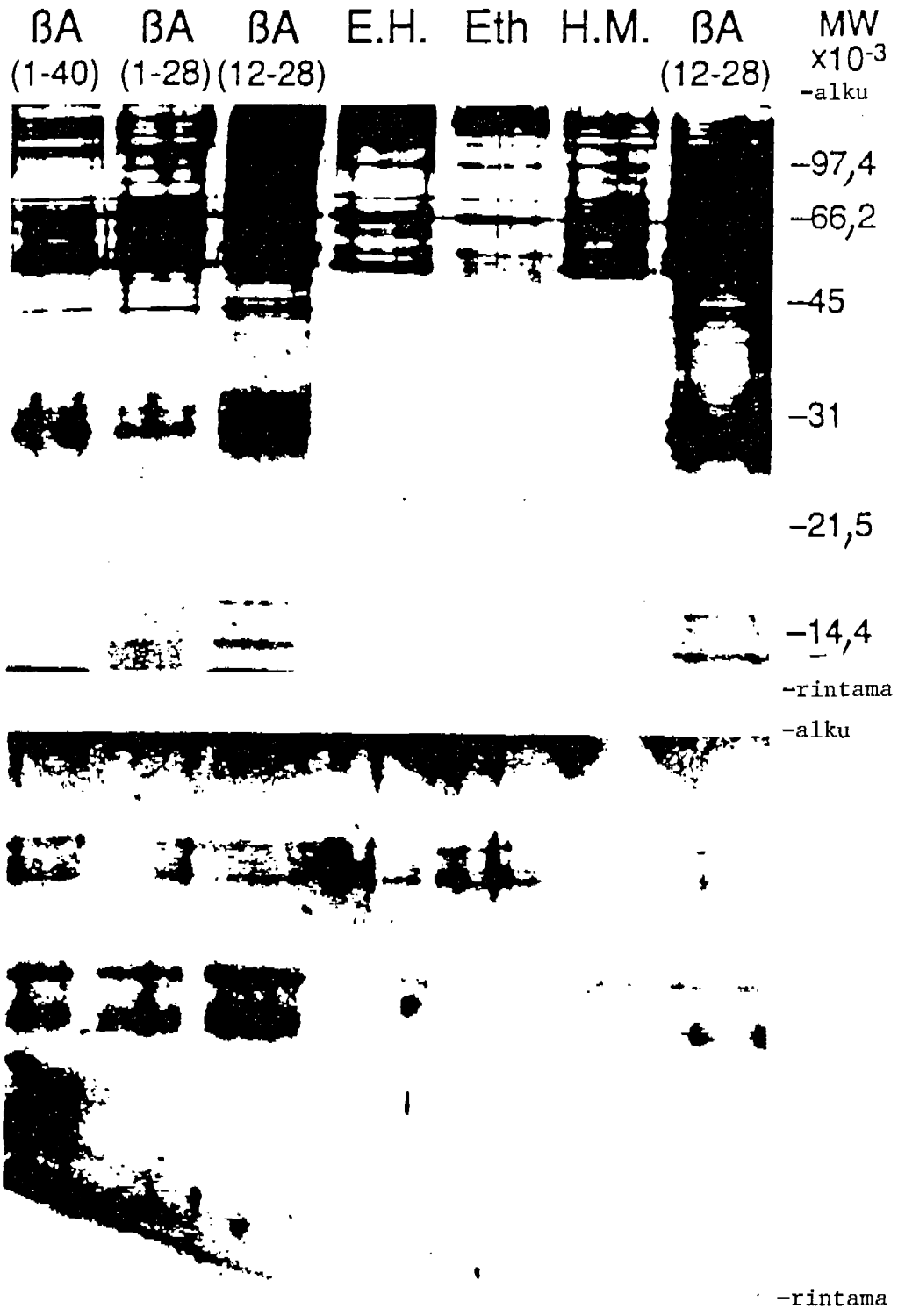
βA (1-40)
βA (1-28)
βA (12-28)
E.H.
Eth
H.M.
βA (12-28)
MW x10-3
-alku
-97,4
-66,2
-45
-31
-21,5
-14,4
-rintama
-alku
-rintama

FIG. 2

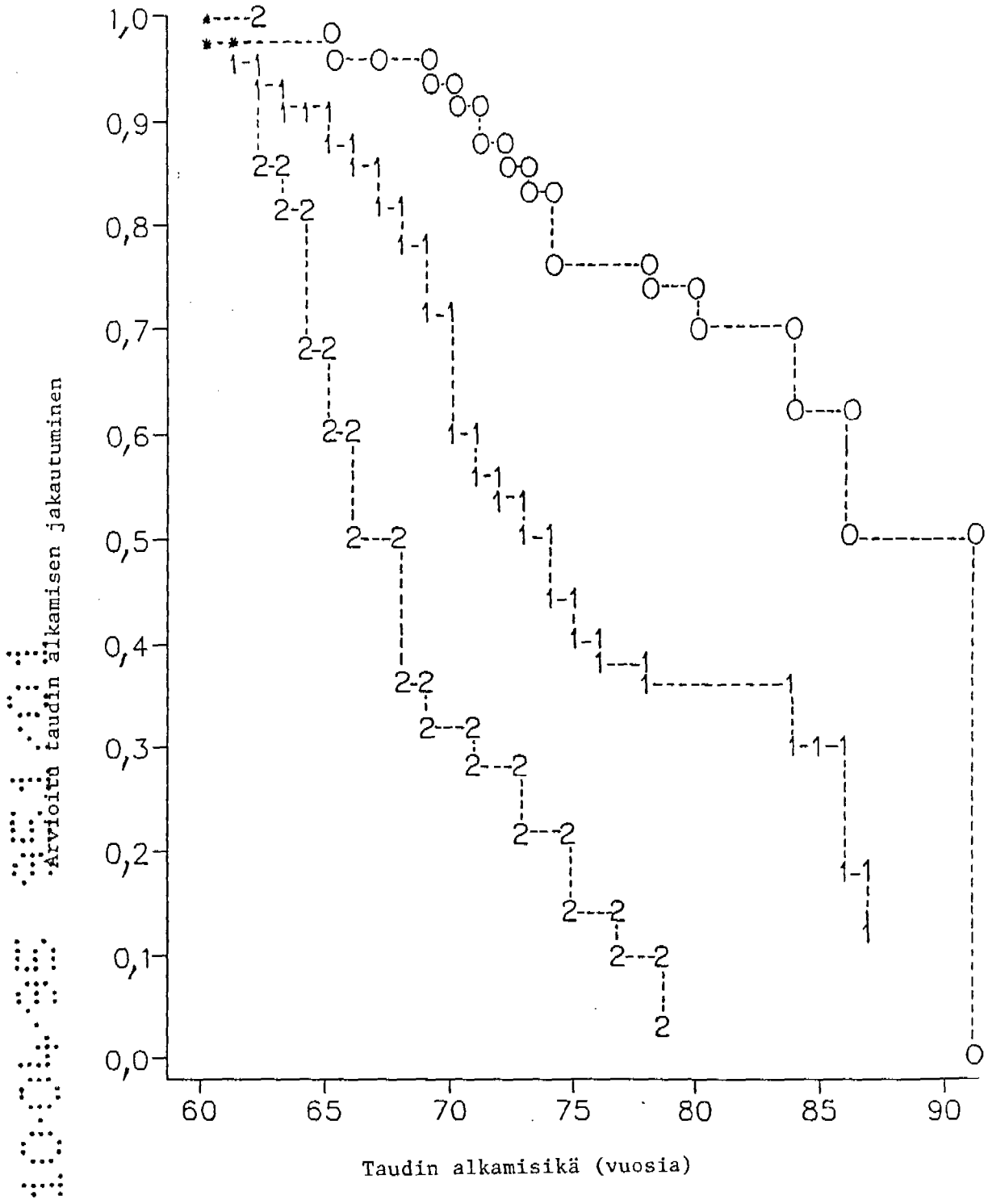
Arvioitu taudin alkamisen jakautuminen
1,0
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
60
65
70
75
80
85
90
Taudin alkamisikä (vuosia)

FIG. 3

951701

VIITEJULKAISUT

Burke J R, Roses A D, Genetics of Alzheimer's disease, International Journal of Neurology, Uruguay, IRN - ISSN 0020-7446, VOL. 25-26, 1991, s. 41-51: MEDLINE / NLM AN: NLM11980062.

Pericak-Vance M et al., Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage: MEDLINE / NLM AN: NLM2035524.

17.01.2005 PEK