

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Maria Risoleta Freire Marques

**MUTAÇÕES NO GENE DA PROTEÍNA PRECURSORA DA β -AMILÓIDE
EM FAMÍLIAS AFETADAS PELO MAL DE ALZHEIMER**

Tese apresentada ao Departamento de Genética e
Evolução do Instituto de Biologia para a obtenção
do título de Doutor em Ciências Biológicas na área
de Genética

Orientador: Prof. Dr. Benedito de Oliveira

Campinas, SP, 1994

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Química de Proteínas e Biologia Molecular do Departamento de Patologia no Centro Médico da Universidade de Nova York, NYU

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Benedito de Oliveira pela confiança e por proporcionar a oportunidade da realização deste trabalho. Pela leitura criteriosa da versão inicial do manuscrito e pelas sugestões pertinentes.

Ao Dr. Blas Frangione pela acolhida em seu laboratório e pelas discussões sempre proveitosas.

À Dra. Efrat Levy pela orientação segura na condução deste trabalho. Pelos ensinamentos e pela discussão constante ao longo da execução dos experimentos. Pelas críticas construtivas.

Ao Dr. Wanderley Dias da Silveira pela disposição demonstrada na leitura da tese. Pelas correções criteriosas e pela contribuição dada à discussão do trabalho.

Ao Dr. Luís Alberto Magna pelo entusiasmo na discussão do trabalho e por todas as sugestões apresentadas.

À Dra. Maricilda Palande de Mello pelo cuidado e atenção na revisão do trabalho. Pelas contribuições feitas durante a discussão.

Ao Dr. Gilberto Domont por aceitar com entusiasmo o convite e por enriquecer a discussão do trabalho.

Ao Serra pela execução dos desenhos e esquemas. Pela paciência e incentivo.

Ao amigo José Camillo Novello pela leitura do trabalho e pelo estímulo.

À Maristela pela ajuda fundamental nos encaminhamentos à distância.

Aos colegas do Departamento de Bioquímica, CCB, UFSC pelo apoio recebido.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. E, em especial, àqueles que compartilharam as dificuldades para a sua conclusão.

Agradecemos o apoio recebido tanto da CAPES como da SCPG-Genética durante todo o programa de pós-graduação.

ABREVIACÕES

BSA	soro albumina bovina
CAPS	cido 1,3-bis[tris(Hidroximetil)-metilamino] propano
DTT	ditiotreitol
EDTA	cido [etilenodinitrilo]tetra acético
PSA	persulfato de amônio
SDS	dodecil sulfato de sódio
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
Tris	Tris[hidroximetil]amino metano

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO

1.1	Doença de Alzheimer: aspectos gerais	01
1.2	Propriedades dos depósitos amilóides	06
1.3	O Mal de Alzheimer e os vários tipos de amiloidoses	08
1.4	A proteína precursora da β -amilóide (β APP)	12
1.5	Formação das fibrilas amilóides a partir da β APP	18
1.6	A Genética do Mal de Alzheimer	21
1.7	Objetivo	30

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1	Meios de Cultura	31
2.2	Soluções e Reagentes	
2.2.1	Soluções para Complementação de Meios de Cultura e/ou para plaqueamento	32
2.2.2	Soluções para Preparação de Células Bacterianas Competentes	33
2.2.3	Solução Tampão Tris-HCl com EDTA ($T_{10}E_1$)	34
2.2.4	Solução Tampão Tris-Acetato com EDTA (TEA)	34
2.2.5	Solução para visualização de DNA em U.V.	34
2.2.6	Soluções para Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	34
2.2.7	Soluções para Marcação Radioativa de Sonda Molecular	35
2.2.8	Soluções para Preparação de Filtros e Hibridização	36
2.2.9	Soluções para Sequenciamento	37
2.2.10	Soluções para SSCP	39
2.2.11	Soluções Tampão para Enzimas	39
2.2.12	Soluções para Eletroforese em Poliacrilamida (PAGE-SDS)	40
2.2.13	Soluções para Western-Blotting	41
2.3	Obtenção do Material	42
2.4	Extração do DNA	43

2.5	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	49
2.5.1	"Primers"	49
2.5.2	Reação	50
2.6	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	
2.6.1	Preparação do Gel	50
2.6.2	Preparação das Amostras para Eletroforese	51
2.6.3	Análise do Gel	51
2.7	Análise de Polimorfismo pela Conformação de Fita) Simples(SSCP	
2.7.1	"PCR"	53
2.7.2	Preparação das Amostras para Eletroforese	54
2.7.3	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	54
2.7.4	Preparação do Gel para Exposição a Filme de Raio-X	55
		53
2.8	Clonagem (Sistema 1)	
2.8.1	Preparação do Vetor	56
2.8.2	Reação de Fosforilação	56
2.8.3	Reação de Ligação	56
2.8.4	Preparação de Células Competentes	57
2.8.5	Transformação e Plaqueamento	57
2.9	Clonagem (Sistema 2)	
2.9.1	Reação de Ligação	58
2.9.2	Transformação e Plaqueamento	59
2.10	Hibridização	
2.10.1	Preparação dos Filtros	59
2.10.2	Pré-Hibridização	60
2.10.3	Preparação das Sondas	60
2.10.4	Hibridização e Lavagem dos Filtros	61
2.10.5	Exposição dos Filtros	62
2.11	Eletroforese em gel de Agarose	
2.11.1	Preparação do Gel e Eletroforese	63
2.11.2	Purificação dos fragmentos de DNA em Agarose	63
2.12	Sequenciamento	
2.12.1	Preparação do material para sequenciamento	64
2.12.2	Reações	65

	2.12.2.1	Reação de Pareamento	66
	2.12.2.2	Reação de Marcação	66
	2.12.2.3	Reação de Término	66
2.12.3		Eletroforese	
	2.12.3.1	Montagem do Gel	67
	2.12.3.2	Condições da Eletroforese	68
	2.12.3.3	Autoradiografia	68
2.13		Western blotting	
2.13.1		Preparação das amostras	68
2.13.2		Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida com SDS (PAGE SDS)	69
2.13.3		Transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose	70
2.13.4		Bloqueio da membrana e reação com o anticorpo primário	70
2.13.5		Reação Imunoenzimática	71
3.		RESULTADOS	
3.1		Isolamento do DNA	72
3.2		Amplificação dos exons da APP	73
3.3		Triagem de mutações pontuais	79
3.4		Sequenciamento dos exons 14, 15 e 16	81
3.5		Western blotting dos depósitos amilóides	85
4.		DISCUSSÃO	91
5.		RESUMO	101
6.		ABSTRACT	103
7.		REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

TABELA I - Principais tipos de amiloidoses humanas e suas proteínas precursoras correspondentes	09
TABELA II - Resumo dos dados clínicos dos casos de Mal de Alzheimer nas famílias afetadas (FAD)	44
TABELA III - Indivíduos analisados e origem do DNA utilizado na caracterização dos exons da APP	45
TABELA IV - "Primers" utilizados na amplificação dos exons da β APP	52
TABELA V - Condições da amplificação dos exons da β APP	74
FIGURA 1 - Esquema da proteína precursora da β -amilóide (APP)	14
FIGURA 2 - Esquema mostrando a correlação entre os domínios da proteína precursora da β -amilóide (APP) e os exons do gene que a codifica	16
FIGURA 3 - Heredograma da família Argentina (FAD 1)	48
FIGURA 4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 8.4% do exon 14 (APP695)	76
FIGURA 5 - Análise eletroforética em gel de poliacrilamida 8.4% dos produtos da reação de amplificação do exon 15 (APP695)	77
FIGURA 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida da amplificação do exon 16 (APP695)	78

FIGURA 7 - Autoradiografia da eletroforese do exon 14 da (APP695)	80
FIGURA 8 - Análise do padrão de migração eletroforética do do exon 16 da (APP695)	82
FIGURA 9 - Autoradiografia do gel de sequência do exon 14 do gene do precursor da β -amilóide (APP ₆₉₅)	84
FIGURA 10 - Autoradiografia do gel de sequência de parte do exon 15 do gene da proteína precursora da β -amilóide	87
FIGURA 11 - Sequência dde parte do exon 15, obtida de material isolado do paciente III-8	88
FIGURA 12 - Autoradiografia do gel de sequência de um dos clones do exon 16, obtido do paciente BRI (FAD 3)	89
FIGURA 13 - Esquema da reação de Western blotting da proteína extraída do tecido fixado do paciente IV-13 da família FAD 1	90

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Alzheimer: aspectos gerais

Observando ao microscópio cortes do tecido cerebral de um paciente que em vida apresentava sinais de demência, o psiquiatra Alois Alzheimer descreveu a deposição de uma "substância peculiar" em toda a região do córtex cerebral (ALZHEIMER, 1907).

Os depósitos, descritos por Alzheimer, constituem o evento central do distúrbio neurológico que hoje leva o seu nome, caracterizando as lesões cerebrais associadas a essa doença que afeta milhões de indivíduos de diferentes raças e grupos étnicos.

Estudos neuropatológicos mostraram que essas lesões constituem a base da perda de memória e de estabilidade emocional que ocorrem de maneira gradual, mas inexorável, nos indivíduos afetados. O conjunto dos sintomas inclui, ainda, declínio do desempenho das tarefas cotidianas, diminuição do senso crítico, desorientação têmporo-espacial e dificuldades de aprendizado. Os sintomas podem evoluir para um estado de debilidade grave e imobilidade, resultando em demência e morte em um intervalo de seis a vinte anos a partir do início da doença (HARDY & ALLSOP, 1991; CLARK & GOATE, 1993). A doença de Alzheimer é responsável por 50% de todas as demências, e, entre as irreversíveis (80 a 90 % das demências no geral), 70% são associadas a ela (SAYEG, 1991).

Ainda não existe tratamento efetivo para a doença e o diagnóstico definitivo requer confirmação histopatológica por biópsia cerebral ou, após a morte, necropsia (SAYEG, 1991; CLARK & GOATE, 1993).

Apesar da doença estar, geralmente, associada ao envelhecimento e de sua manifestação ser, na maioria dos casos, esporádica, estudos epidemiológicos mostraram um padrão de herança autossômica dominante em algumas famílias (PRICE, 1986; FITH *et al.*, 1988). A identificação de marcadores cromossômicos associados a vários casos de

doença de Alzheimer familiar deu origem a uma dicotomia com base na idade do início da manifestação, nas diferentes famílias. Algumas famílias apresentam manifestação precoce (abaixo de 65 anos), enquanto em outras a doença se manifesta mais tardiamente (LEVY & FRANGIONE, 1991).

Evidências acumuladas na última década indicaram que os depósitos cerebrais encontrados no Mal de Alzheimer são constituídos pelo acúmulo de uma proteína na forma fibrilar, a proteína β -amilóide de 4.500 daltons (GLENNER & WONG, 1984), também denominada de β/A_4 (MASTERS *et al.*, 1985) ou ainda β AP. Esta proteína é, na verdade, o produto da clivagem enzimática ou processamento de uma proteína precursora muito maior, a APP (proteína precursora da β -amilóide), ~~codificada por um gene localizado no cromossomo 21~~ (St. GEORGE-HYSLOP *et al.*, 1987; TANZI *et al.*, 1987).

Para muitos, o mapeamento do gene da APP no cromossomo 21 veio ao encontro do fato de que indivíduos afetados pela síndrome de Down que chegam à idade adulta apresentam, geralmente por volta da quarta ou quinta década de vida, degeneração e lesões cerebrais semelhantes àsquelas encontradas em pacientes com doença de Alzheimer (WISNIEWSKI *et al.*, 1985). As habilidades mentais nestes pacientes parecem então, diminuir ainda mais, tornando possível uma correlação clínico-patológica entre a síndrome de Down e a doença de Alzheimer.

O estudo da proteína β -amilóide e do seu precursor não só contribuiu para a caracterização patobioquímica da doença, como também ajudou a esclarecer a base genética do Mal de Alzheimer e a discutir alguns dos aspectos provavelmente ligados à etiologia da doença.

Como mencionado, os depósitos amilóides fibrilares associados ao Mal de Alzheimer, também presentes nos casos de adultos com síndrome de Down, constituem as lesões típicas dessa doença. Essas lesões se apresentam na forma dos chamados emaranhados neurofibrilares e placas senis. Os primeiros constituem os agregados encontrados intracelularmente no corpo celular dos neurônios. As placas senis são lesões

esféricas de 10-200 μ m de diâmetro formadas de depósitos extracelulares de filamentos protéicos de 6-10 nm . Muitas vezes a placa senil está cercada de terminais nervosos em degeneração. A análise do córtex cerebral, quanto ao número de placas e de neurônios que mostram esses emaranhados neurofibrilares no seu interior, indicou a correlação dessas variáveis com o aparecimento e a gravidade da demência (ROTH,1966 ;BRAAK & BRAAK,1991).

As paredes dos vasos sanguíneos do córtex cerebral ou das meninges podem também ser um sítio extracelular adicional da deposição amilóide (PANTELAKIS,1954;GLENNER,1992), embora essa amilóide cerebrovascular (angiopatia congofilica) ocorra com menor frequência em comparação aos emaranhados neurofibrilares e às placas senis. Não foi encontrada correlação significativa entre quantidade de amilóide vascular e gravidade clínica da demência na Doença de Alzheimer (MONTJOY *et al.*,1982).

A proteína β -amilóide encontrada nas placas senis e nas paredes dos vasos é essencialmente a mesma proteína, sendo constituída de 42 resíduos de aminoácidos no primeiro tipo de lesão e de 39 resíduos no segundo (GLENNER & WONG,1984;MASTERS *et al.*,1985;PRELLI *et al.*,1988).

Além do papel central da deposição de um fragmento decorrente da proteólise de uma proteína precursora, a APP, evidências acumuladas nos últimos anos mostram que várias substâncias podem ser relevantes para o processo de formação dos depósitos amilóides na doença de Alzheimer. A presença de algumas delas foi inclusive detectada nessas lesões. Entre essas substâncias estão o componente amilóide P, inibidor da elastase *in vitro*, e outros inibidores de proteases (PRELLI *et al.*,1985;CORIA *et al.*,1988;ABRAHAM *et al.*,1988), glicosaminoglicanas (SNOW *et al.*,1987), sílicatos de alumínio e outros componentes inorgânicos (MASTERS *et al.*,1985;CANDY *et al.*,1986), além de proteínas diversas, como a proteína tau, a principal proteína encontrada nos emaranhados neurofibrilares (KOSIK,1992;GOEDERT *et al.*, 1988). Possivelmente, outros fatores ainda não identificados devem completar este conjunto (MULLER-HILL & BEYREUTER,1988). Além de um conjunto possivelmente incompleto, dois aspectos precisam ser ainda melhor explorados: o mecanismo pelo qual estes fatores relacionados aos depósitos amilóides propriamente ditos exercem sua ação e o seu real papel ou contribuição

na etiologia da amiloidogênese. De qualquer modo, estudos mais recentes abordando a proteína tau, por exemplo, mostraram que as seis isoformas humanas conhecidas, originadas por processamentos distintos a partir de um único gene no cromossomo 17, estão todas igualmente presentes nos emaranhados neurofibrilares intraneurônios e, apresentam um estado de fosforilação anormal (BRION, 1991; DREWES *et al.*, 1992). Esta situação poderia alterar as funções normalmente exercidas por esta proteína (MANDELKOW & MANDELKOW, 1993), como por exemplo sua participação na montagem e estabilização dos microtúbulos (BAAS *et al.*, 1991; DRECHSEL *et al.*, 1992). A desestabilização dos microtúbulos poderia gerar a completa dissolução do citoesqueleto nos neurônios afetados pelos emaranhados neurofibrilares (KOSIK, 1992), contribuindo para a perda neuronal observada nos estágios mais avançados da doença (HOLTZMAN & MOBLEY, 1991).

A compreensão da etiologia do Mal de Alzheimer parece ser extremamente difícil, refletindo, portanto, a complexidade do processo. Esta complexidade parece ficar ainda mais evidente quando outros aspectos, excluídos os sinais neuropatológicos no cérebro, ou seja, as lesões típicas da doença, são considerados. Além da clara relevância dos fatores genéticos, abordada adiante, outros fatores parecem contribuir significativamente para o quadro patológico.

Nos indivíduos afetados pela doença de Alzheimer, tem sido observado um aumento da permeabilidade das membranas celulares, muitas vezes associado a um aumento da mortalidade celular. Essas características são consistentes com a ação de radicais livres, implicando-os, conseqüentemente, na etiologia da doença.

Estudos recentes (RICHARDSON, 1992) mostraram que células do tecido nervoso central e da pele de indivíduos acometidos pela doença de Alzheimer apresentam uma maior sensibilidade aos efeitos causados por radicais livres, utilizando-se como referência, entre outros, os níveis de formação de produtos de peroxidação e o nível da enzima superóxido-dismutase (SOD). A avaliação deste último foi também realizada em eritrócitos obtidos de indivíduos afetados (FERNANDES *et al.* 1993), podendo ser a diminuição observada no nível da enzima interpretada como um possível indicativo de uma maior sensibilidade a radicais livres nesses pacientes. Em ambos os casos, a origem desta maior sensibilidade não foi determinada, podendo estar relacionada tanto com uma

diminuição das defesas antioxidantes quanto com um aumento da formação de radicais livres ou ainda, ambos. A consequência disto para os pacientes não foi estabelecida, mas seguramente não deve ser minimizada dentro do quadro patológico.

O envolvimento de radicais livres na etiologia da doença de Alzheimer parece ter ganho ainda maior relevância com a hipótese proposta recentemente por HENSLEY *et al.* (1994), na qual a agregação e a neurotoxicidade da β -amilóide são explicadas com base na geração de espécies ativas de oxigênio por peptídeos originados da sua própria fragmentação *in vitro*. Trabalhando com β -amilóide sintética ($\beta_{1 \rightarrow 40}$), os autores, além de acompanharem a geração de radicais livres em solução aquosa pela fragmentação da proteína, também reuniram evidências de que os peptídeos resultantes podem inativar as enzimas glutamina sintetase (GS) e creatina quinase (CK) *in vitro*. Entre estes, aquele englobando a seqüência do resíduo 25 ao 35 ($\beta_{25 \rightarrow 35}$) parece ser o inativador mais potente. Estes dados parecem complementar os resultados de PIKE *et al.* (1993) que mostraram o comportamento neurotóxico deste mesmo peptídeo em células em cultura, imediatamente após sua solubilização. Por outro lado, o efeito observado sobre a GS e a CK, sensíveis às lesões oxidativas (LEVINE, 1983), encontra contrapartida no fato de que a atividade das duas enzimas está alterada em indivíduos afetados pela Doença de Alzheimer (OLIVER *et al.*, 1990).

Outro fator de risco apontado recentemente implica mudanças observadas no ácido desoxirribonucleico mitocondrial (mtDNA). Foi detectado um aumento significativo de "deleções" no mtDNA em várias regiões do cérebro de indivíduos idosos. Este aumento parece ocorrer significativamente em indivíduos com mais de 80 anos de idade e, justamente nas áreas cerebrais afetadas pela Doença de Alzheimer (CORRAL-DEBRINSKI *et al.*, 1992). Esses dados sugerem que essas "deleções" poderiam contribuir para as alterações neurológicas associadas freqüentemente com o envelhecimento. Na doença de Alzheimer, elas poderiam estar relacionadas com a manifestação tardia e com a gravidade, por exemplo.

O gene da subunidade 2 da NADH desidrogenase mitocondrial (ND2) parece particularmente importante na implicação do mtDNA como um fator relevante para a doença. EIN *et al.* (1992) detectaram uma mutação de ponto no codon 331

deste gene em DNA mitocondrial isolado do cérebro, em um número significativo de pacientes com o Mal de Alzheimer. Esta mutação não foi encontrada em cérebros normais. Apesar de nem o efeito, nem o significado patológico desta mutação terem sido diretamente demonstrados, os autores sugerem que esta alteração poderia estar relacionada com um possível papel desacoplador na fosforilação oxidativa, o que traria grande impacto nas funções cerebrais dos indivíduos afetados pela doença.

Além das alterações detectadas ao nível do mtDNA, 5.2% dos pacientes de origem caucasiana incluídos no estudo de SHOFFNER *et al.*(1993), com doença de Alzheimer de manifestação tardia, apresentaram alterações na seqüência de nucleotídeos do gene do ácido ribonucleico transportador (tRNA) da glutamina (GLN); alteração esta detectada em apenas 0.7% dos indivíduos normais analisados. Além disso, em um desses pacientes foi encontrada ainda uma inserção de cinco nucleotídeos no ácido ribonucleico ribossômico (rRNA) 12S, enquanto em um outro, foi detectada uma alteração na seqüência de nucleotídeos neste mesmo tipo de ácido nucleico. Estudos adicionais devem contribuir para que se determine o verdadeiro significado dessas mutações.

1.2 Propriedades dos depósitos amilóides

Os depósitos protéicos intra e extracelulares que ocorrem nesta doença exibem propriedades tintoriais características que são largamente utilizadas na localização e identificação específica dos mesmos, possuindo, conseqüentemente, valor diagnóstico. A mais importante delas, usada como procedimento padrão na identificação histológica, é a birrefringência verde-maçã sob luz polarizada, após coloração com vermelho-congo (PUCHTLER *et al.*,1962). Um outro exemplo é a fluorescência verde-amarela típica, associada à coloração por tioflavina S e T (VASSAR & CULLING,,1959;HOLTZMAN & MOBLEY,1991).

Estas propriedades tintoriais incluem os depósitos encontrados no cérebro de pacientes acometidos pelo Mal de Alzheimer dentro do grupo de depósitos patológicos

denominados, genericamente, de amilóides (GLENNER *et al.*,1986). O termo amilóide foi introduzido pelo patologista Rudolph Virchow, sugerindo uma composição polissacarídica dos mesmos a partir da observação da coloração desses depósitos com iodo (VIRCHOW,1855a;1855b).

A natureza protéica dos depósitos amilóides foi sugerida logo a seguir com base na análise química do material depositado (FRIEDRICH & KEKULÉ, 1859). Entretanto, a demonstração definitiva da natureza protéica do material amilóide fibrilar só foi realizada por GLENNER *et al.* em 1971, a partir da análise de material amilóide associado a um caso de mieloma múltiplo.

No entanto, o termo amilóide é ainda usado hoje e define, de maneira geral, agregados de filamentos de natureza protéica de 6-10 nm que, além da congofilia e birrefringência verde-maçã sob a luz polarizada, apresentam outras propriedades comuns. Uma das mais importantes é a estrutura secundária β em folha pregueada, com um padrão de difração de raio X característico. Esta conformação acarreta uma resistência relativa à proteólise e solubilização. Conseqüentemente, todos os depósitos amilóides são altamente insolúveis em condições fisiológicas (GLENNER *et al.*,1978).

Os depósitos amilóides estão relacionados com proteínas que podem formar agregados na forma de fibras e que são chamadas de amiloidogênicas. Em geral, o material amilóide depositado é um fragmento de uma proteína precursora. O material amilóide pode se depositar em vários órgãos, em diferentes graus de infiltração e resultando em diferentes síndromes (BENSON & WALLACE,1990).

A disfunção e a morte celular que eventualmente resultam desses depósitos são conseqüências comuns das doenças denominadas pelo termo genérico de amiloidoses.

A Doença ou Mal de Alzheimer é um membro deste grupo de doenças, cujo denominador comum é a deposição do material amilóide nos tecidos (HARDY & ALLSOP,1991). Na verdade, as amiloidoses estão associadas a uma variedade de processos patológicos bem mais ampla do que a observada em qualquer outra doença,

sendo as manifestações clínicas heterogêneas e consideravelmente miméticas (GLENNER *et al.*,1978).

1.3 O Mal de Alzheimer e os vários tipos de Amiloidoses

A heterogeneidade observada nas amiloidoses vai além dos aspectos relacionados às manifestações clínicas . A própria distribuição dos depósitos amilóides se mostra variada, podendo ser sistêmica ou restrita a diferentes órgãos (CASTAÑO & FRANGIONE,1988). Além disso, esta heterogeneidade está particularmente refletida na diversidade bioquímica das proteínas amiloidogênicas ou proteínas precursoras que dão origem a esses depósitos amilóides. Diferentes proteínas estão associadas aos depósitos encontrados nas amiloidoses. Essa deposição é consequência de uma concentração local aumentada tanto de formas variantes como de fragmentos proteolíticos (GLENNER & WONG,1984;CASTAÑO & FRANGIONE,1988;WESTERNAK *et al.*,1987). Isto refletiria o envolvimento de uma proteína precursora com uma seqüência potencialmente amiloidogênica cuja concentração elevada seria resultado não só de uma superprodução ou remoção defeituosa, mas eventualmente de um processamento anormal . Este último seria possivelmente o aspecto mais relevante na amiloidogênese (HARDY & ALLSOP,1991;KYLE,1992a).

Enquanto no Mal de Alzheimer e nos casos adultos da Síndrome de Down, a proteína β -amilóide ou β A4 (GLENNER *et al.*,1984;MASTERS *et al.*,1985) é a subunidade amilóide, a origem dos depósitos nos demais tipos de amiloidose é distinta e variada (TABELA I).

A deposição de proteína amilóide ocorre na chamada amiloidose primária ou idiopática, associada a alguns casos de mieloma múltiplo e tem origem na cadeia leve da imunoglobulina monoclonal que ocorre nesta doença linfoproliferativa

TABELA I

AMILOIDOSES E SUAS PROTEÍNAS PRECURSORAS CORRESPONDENTES

DOENÇAS	AMILÓIDES	PROTEÍNA PRECURSORA
Sistêmicas:		
Primária ou idiopática	AL	Cadeia leve de imunoglobulina
Amiloidose secundária	AA	Apolipoproteína SAA
Febre mediterrânea familiar	AA	Apolipoproteína SAA
Hemodiálise a longo prazo	A β 2m	β 2 - microglobulina
Amiloidose senil sistêmica	ATTR	Pré-albumina (transtirritina)
Polineuropatia amilóide familiar* (FAP I,II)	ATTR	Var. Pré-albumina(transtirritina)
Polineuropatia amilóide familiar * (FAP III)	AApoAI	Var. Apolipoproteína A-I
Amiloidose familiar (tipo finlandês)* (FAF)*	AGel	Var. da gelsolina
Endócrinas:		
Carcinoma medular da tireóide	ACalc	Pré-calcitonina
Diabetes mellitus - tipo II (pancreática)	AIAPP	Polipeptídeo amilóide da ilhota
Amiloidose atrial	AANP	Peptídeo natriurético atrial
Cerebrais:		
Doença de Alzheimer	β A4	Proteína precursora β -amilóide (APP)
Doença de Alzheimer familiar (FAD)	β A4	Var. Prot. precursora β -amilóide(APP)
Síndrome de Down	β A4	Proteína precursora β -amilóide(APP)
Amilóide relatada em idade normal	β A4	Proteína precursora β -amilóide(APP)
Angiopatia amilóide cerebral esporádica	β A4	Proteína precursora β -amilóide(APP)
HCHWA-D (tipo holandês)**	β A4	Proteína precursora β -amilóide(APP)
HCHWA-I (tipo islandês)**	ACys	Var. Cistatina C
Encefalopatia espongiforme transmissível †	APrP	Proteína Prion (PrP ^{Sc})

Principais tipos de amiloidoses humanas, agrupadas de acordo com a distribuição anatômica dos depósitos amilóides com base em CASTAÑO & FRANGIONE (1988); KYLE (1992) e BENSON (1992). Tanto as amiloidoses sistêmicas quanto as localizadas (endócrinas e cerebrais) incluem formas hereditárias e não hereditárias. A proteína precursora correspondente está indicada em cada caso. Estes precursores, suas variantes ou seus fragmentos proteolíticos, dão origem ao depósito amilóide típico de cada patologia, indicado aqui pela abreviação mais comum utilizada na sua identificação.

* Hereditário; *Recentemente descrita também em famílias americanas e japonesas

** Hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (HCHWA)

† Inclui a doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), a síndrome de Gerstmann-Sträussler (GSS) e o kuru humano, as chamadas "doenças de vírus lentos", formas infecciosas e hereditárias, associadas ao prion (de *proteinaceous infectious particle*) (PRUSINER, 1982); PrP e suas variantes (GOLDFARB *et al.*, 1991; PRUSINER, 1992)

Var.= variante

(GLENNER *et al.*,1971;GLENNER *et al.*,1978). As fibrilas são compostas pelo domínio ou região variável (VL) da cadeia (KYLE,1992). O isotipo λ é mais freqüentemente associado aos depósitos amilóides que o κ , numa proporção inversa (2:1) àquela encontrada normalmente na associação das cadeias leves com as cadeias pesadas para a formação das moléculas de imunoglobulinas circulantes normais (KYLE,1992). O subgrupo $V\lambda VI$ é o preferencialmente associado aos depósitos patológicos neste caso (SLETTEN *et al.*,1974;FRANGIONE *et al.*,1983).

A amiloidose secundária ou reativa é composta de uma proteína, a amilóide A, que aumenta de modo marcante com o estímulo inflamatório. A proteína sérica AS, uma apoproteína da lipoproteína de alta densidade (HDL)(complexo 3) é o precursor da proteína amilóide A (BENDITT & ERIKSEN,1977; MEECK *et al.*,1986). Muitas doenças parecem predispor o indivíduo para este tipo de amiloidose, principalmente a artrite reumatóide, a tuberculose e a lepra. Além das condições inflamatórias crônicas, a amilóide A é também detectada na Febre Mediterrânea Familiar (FMF), doença autossômica recessiva de etiologia desconhecida, caracterizada por episódios recorrentes de febre e prostração.

Variantes da pré-albumina ou transtirritina (ATTR) constituem as fibrilas amilóides das polineuropatias amilóides familiares (hereditárias) (FAP) (COSTA *et al.*,1978;CASTAÑO & FRANGIONE,1988) e um tipo de amiloidose cardíaca senil (BENSON,1992). Mais de 25 variantes, envolvendo a substituição de um único resíduo de aminoácido, foram descritas (SARAIVA *et al.*,1986;BENSON, 1992). Por outro lado, outros tipos de FAP não estão associados a variantes da ATTR, mas a uma mutação na apolipoproteína A-1 (AApoA1) (FAP III) ou a uma variante da gelsolina plasmática (AGel)(FAP IV) (BENSON,1992).

A amiloidose associada à hemodiálise de longa duração é constituída do monômero, dímero e formas poliméricas da β_2 -microglobulina, encontrada em níveis altos

na maioria desses pacientes (GEJYO *et al.*,1985). Os depósitos são sistêmicos, sendo encontrados preferencialmente no tecido ósseo (BARDIN *et al.*,1985).

A pré-calcitonina é a subunidade amilóide associada ao carcinoma medular da tireóide (SLETTEN *et al.*,1976), enquanto uma variante da cistatina C, um inibidor das proteases de cisteína, está associada aos depósitos amilóides encontrados em uma forma autossômica dominante de hemorragia cerebral hereditária com amiloidose, descrita em famílias da Islândia (tipo islandês) (HCHWA-I) (GHISO *et al.*,1986;LEVY *et al.*,1989). Esta foi a primeira proteína amilóide cerebral caracterizada. Apesar de ser tentador atribuir à substituição de aminoácido encontrada, a propriedade amiloidogênica exibida pela variante anormal da proteína, a possibilidade de que esta substituição não seja de fato a única causa deste efeito não pode ser excluída. Esta cautela deve ser observada não só neste caso, como também no caso de outras variantes protéicas encontradas nos diferentes casos de amiloidoses hereditárias (CASTAÑO & FRANGIONE,1988).

Um outro tipo de amiloidose, onde ocorrem depósitos cerebrovasculares característicos, é a chamada hemorragia cerebral hereditária com amiloidose do tipo holandês, abreviada como HCHWA-D, uma forma de amiloidose autossômica dominante, caracterizada por hemorragias cerebrais recorrentes e morte prematura, geralmente por volta dos cinquenta anos. A subunidade amilóide neste caso é semelhante à β -amilóide, encontrada no Mal de Alzheimer e Síndrome de Down (vanDUINE *et al.*,1987;PRELLI *et al.*,1988).

Entretanto, a proteína amilóide da HCHWA-D é três resíduos menor, apresentando 38 a 39 aminoácidos em vez dos 42 resíduos da β /A4 encontrada nas outras duas. Além da ausência dos três resíduos da região C-terminal, foi constatada heterogeneidade na região N-terminal. Essas diferenças podem ser responsáveis por alterações das propriedades das fibrilas e refletir diferentes processos proteolíticos da proteína precursora, a APP.

Uma mutação no gene desta proteína precursora da β -amilóide (β APP), associada a uma substituição de aminoácido na β -amilóide cerebrovascular encontrada neste tipo de amiloidose, foi a primeira mutação descrita no gene da APP (LEVY *et al.*, 1990) (TABELA I).

Apesar de não haver homologia clara entre as proteínas amiloidogênicas conhecidas, parece evidente que princípios comuns governam os mecanismos de formação de depósitos amilóides. A obtenção de fibrilas amilóides *in vitro* foi possível a partir da amilóide AL por proteólise e da β_2 -microglobulina por concentração (GLENNER *et al.*, 1971; CONNORS *et al.*, 1985). Isto sugere que as fibrilas amilóides formadas são homopolímeros da proteína característica. Além disso, estruturas amiloidogênicas primárias que podem adotar uma estrutura em folha pregueada β e, agregar em fibrilas, podem ser geradas *in vitro* a partir dos precursores por dois mecanismos básicos: aumento da concentração, se a molécula precursora por si só forma fibrilas amilóides, ou proteólise, se somente um fragmento proteolítico do precursor é capaz de originar uma estrutura fibrilar. Este último mecanismo é particularmente relevante para a doença de Alzheimer, como mencionado anteriormente.

1.4 A Proteína Precursora da β /A4(APP)

A disponibilidade da seqüência N-terminal da β -amilóide (GLENNER & WONG, 1984; MASTERS *et al.*, 1985) tornou possível a utilização de oligonucleotídeos baseados nesta parte da seqüência da proteína, com o objetivo de isolar clones de cDNA contendo a seqüência nucleotídica correspondente. Isto foi obtido de modo independente por quatro grupos: KANG *et al.* (1987), ROBAKIS *et al.* (1987), GOLDGABER *et al.* (1987) e TANZI *et al.* (1987). Um dos grupos (KANG *et al.*, 1987), utilizando uma "biblioteca" genômica construída a partir de RNA mensageiro (mRNA) de cérebro de feto

humano, obteve um clone contendo uma seqüência codificadora completa de 695 codons a partir de um codon iniciador AUG.

A utilização deste cDNA com o objetivo de detectar a presença ou ausência do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) correspondente em diferentes tecidos, mostrou que a proteína parece ser expressa em vários tecidos, além do cérebro, como músculo, fígado, pulmão, intestino delgado, coração, pâncreas, timo e adrenal (TANZI *et al.*, 1987).

A clonagem e o seqüenciamento deste ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) indicaram ainda que a proteína $\beta/A4$ é codificada como parte de um produto gênico muito maior: uma proteína precursora glicosilada, constituída por um longo domínio N-terminal extracelular, seguido de um domínio que atravessa a membrana celular e, finalmente, de um pequeno domínio C-terminal citoplasmático (KANG *et al.*, 1987; TANZI *et al.*, 1987)(FIGURA 1).

Na verdade, a $\beta/A4$ representa uma pequena porção, 39 a 43 resíduos de aminoácidos, dessa proteína precursora. Esta proteína precursora da β -amilóide, a APP, é derivada de um único gene localizado no braço longo do cromossomo 21, na banda q21. Este gene tem um comprimento de 300 a 400 kilobases e sua região codificadora é formada de pelo menos 19 exons (YOSHIKAI *et al.*, 1990). Processamentos diferentes dão origem a pelo menos cinco produtos distintos, denominados de acordo com o número de aminoácidos que apresentam: APP₇₇₀, APP₇₅₁, APP₇₁₄, APP₆₉₅ e APP₅₆₃ (PONTE *et al.*, 1988; KITAGUCHI *et al.*, 1988; TANZI *et al.*, 1988; de SAUVAGE *et al.*, 1989; GOLDE *et al.*, 1992). As isoformas predominantes são a APP₇₇₀, APP₇₅₁ e APP₆₉₅. O mRNA da APP₇₅₁ difere daquele correspondente a APP₆₉₅ pela inclusão do exon 7 que codifica um domínio de 56 resíduos de aminoácidos, homólogo aos inibidores de proteases do tipo Kunitz (KPI) (PONTE *et al.*, 1988; KITAGUCHI *et al.*, 1988). O mRNA da isoforma APP₇₇₀ inclui, além do exon 7, o exon 8 que codifica 19 resíduos de aminoácidos que apresentam homologia com o antígeno de superfície MRC- $\text{OX}2$, encontrado em neurônios e timócitos (KITAGUCHI *et al.*, 1988; WEIDMAN *et al.*, 1989).

A β -amilóide é codificada por parte dos exons 16 e 17 (numeração de acordo com a APP₇₇₀) (YOSHIKAI *et al.*,1990), incluindo, portanto, uma parte da região extracelular, próxima à membrana e, uma região menor, inserida na membrana plasmática (FIGURA 2).

A isoforma APP₇₇₀ é a mais abundante na maioria dos tecidos, mas no sistema nervoso central, a APP₆₉₅ (onde o domínio KPI não é expresso) é a forma predominante, sendo a expressão maior nos neurônios do que nas células da glia (TANZI *et al.*,1988; WEIDMANN *et al.*,1989).

Os níveis de mRNA das isoformas APP₇₅₁ e APP₇₁₄ apresentam-se iguais tanto no cérebro como em outros tecidos. Ainda não se sabe se a formação da β /A4 está associada ou não a uma das isoformas da APP em particular. Parece haver, no entanto, uma correlação entre envelhecimento e aumento da transcrição da isoforma APP₇₅₁ em relação a APP₆₉₅, o que poderia estar refletindo uma alteração do processamento dos exons 7 e 8 com a idade e possivelmente na D

doença de Alzheimer (KÖNIG *et al.*,1992;CLARK & GOATE,1993).

Além da APP₅₆₃, uma forma rara não amiloidogênica, e da APP₃₆₅ que também não contem a seqüência correspondente à β /A4 (JACOBSEN *et al.*,1991), uma nova isoforma, produto de um processamento alternativo do mRNA da APP que exclui o exon 15, foi recentemente descrita em células da glia e leucócitos (linfócitos T e macrófagos) (KÖNIG *et al.*,1992). Estes resultados confirmam a complexidade do padrão de expressão da APP.

O acúmulo de evidências sobre a estrutura da APP e suas relações de homologia, a demonstração de que ela é expressa em níveis altos em diferentes tecidos no organismo e a ocorrência de várias isoformas, correspondentes a processamentos alternativos, tornaram relevante a investigação do possível papel fisiológico da APP e os mecanismos envolvidos na sua conversão em um fragmento amilóide.

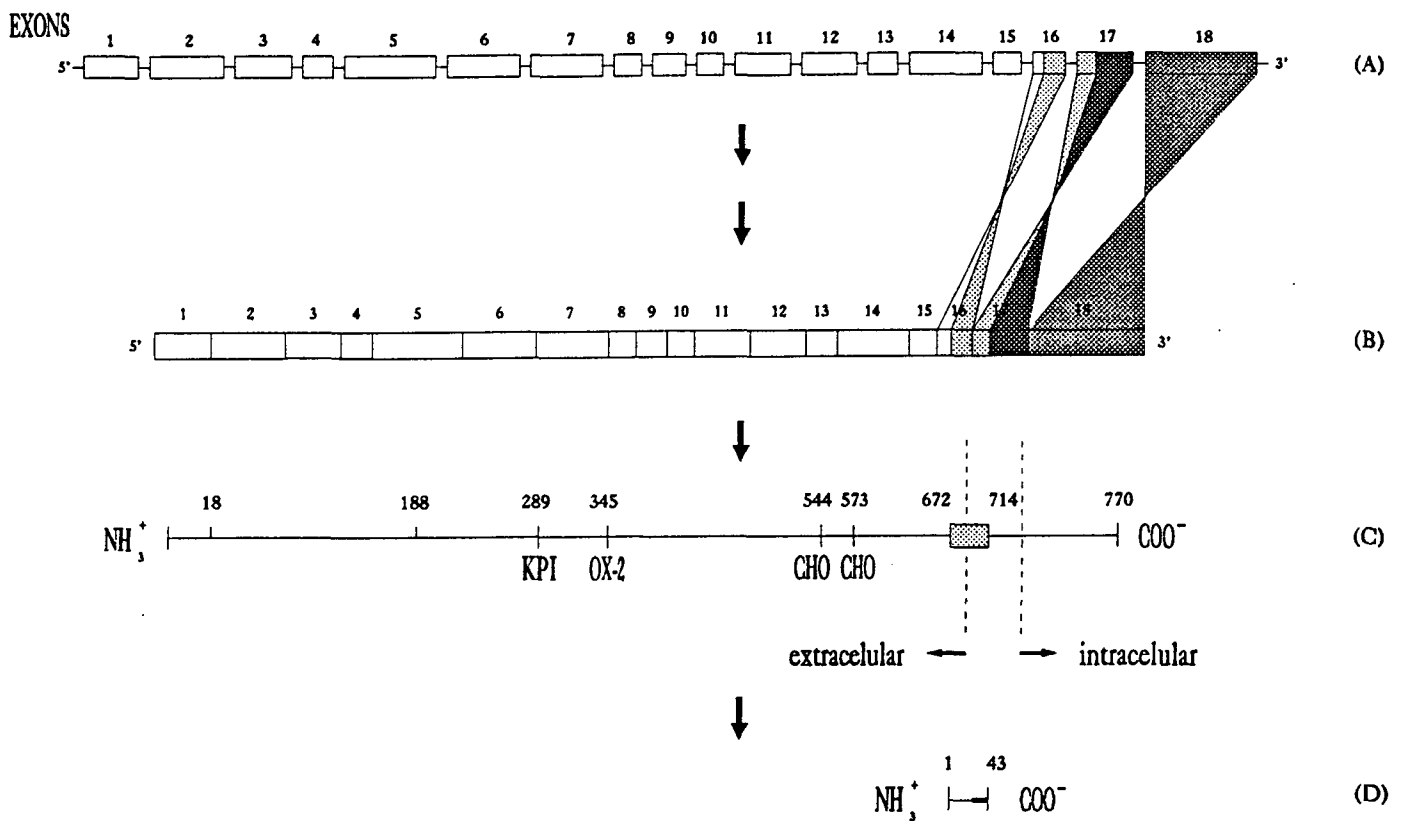


FIGURA 2: Esquema mostrando a correlação entre os domínios da proteína precursora da β -amilóide (APP) e os exons do gene que a codifica. Os 18 exons representados em (A) estão separados entre si pelas sequências nucleotídicas intervenientes ou não codificadoras (Introns). A distância entre os exons não guarda relação de proporção com o tamanho da sequência de nucleotídeos de cada intron. Esta representação não inclui o exon 13a. Os exons são mostrados a nível do RNA mensageiro (mRNA) em (B). A tradução deste mRNA maduro é mostrado em (C), como o precursor de 770 resíduos de aminoácidos da β -amilóide (APP₇₇₀): exons que codificam a região extracelular (N-terminal) da APP₇₇₀; ████████ parte do exon 16 que codifica a porção terminal do domínio extracelular da APP₇₇₀, próxima à membrana celular; ████████ exon 17 que codifica o domínio transmembrana e parte do domínio intracelular; ████████ exon 18 que codifica parte do domínio intracelular (C-terminal) da APP. Os exons 7 e 8 são expressos nesta isoforma e correspondem a uma inserção de 75 resíduos de aminoácidos em relação a APP₆₉₅. O exon 7 codifica a sequência de 56 resíduos que apresenta homologia com inibidores de protease do tipo Kunitz (KPI) e a inserção associada ao exon 8 é composta de 19 resíduos de aminoácidos, homóloga ao antígeno MRCOX-2 (OX-2) (C). As posições de glicosilação da APP (CHO), correlacionadas aos exons 13 e 14, estão indicadas. A região da APP que corresponde à β -amilóide está destacada em (C). A sua codificação está associada à parte do exon 16 e parte do exon 17 (A) (B). Na β -amilóide, mostrada em (D) com 43 aminoácidos, os 28 primeiros resíduos codificados pelo exon 16 correspondem a porção terminal do domínio extracelular da APP (C). Os 15 últimos, destacados em preto, correspondem à parte do domínio transmembrana da APP, sendo codificados por parte do exon 17. As mutações descritas para a APP até a presente data (FIGURA 1) envolvem códons encontrados nos exons 16 e 17.

Foi sugerido que ao nível neural, a APP poderia exercer, por exemplo, um papel no contato sináptico (SCHUBERT *et al.*, 1991; HARDY, 1992).

De estudos com células em cultura vieram as evidências de que as funções fisiológicas da APP poderiam incluir a inibição de proteases e a participação na adesão e na regulação do crescimento celular (HARDY & ALLSOP, 1991).

A inibição de proteases encontra respaldo não só na presença no domínio KPI que apresenta 50% de homologia com os inibidores do tipo Kunitz, como já mencionado anteriormente, mas também no longo fragmento N-terminal originado da clivagem da APP₇₅₁ ou APP₇₇₀ que é idêntico a um outro inibidor de protease já descrito, denominado nexina-II. Este inibidor forma complexos estáveis com várias proteases do tipo serina (OLTERSDORF *et al.*, 1989) e é inibidor de tripsina (van NOSTRAND *et al.*, 1991).

Além disso, uma forma truncada da APP que contém este domínio é um inibidor do fator de coagulação XIa (SMITH *et al.*, 1990). Portanto, a liberação de uma forma truncada da APP por plaquetas poderia sugerir um papel da APP na coagulação sangüínea.

Estes e outros estudos parecem mostrar que esta proteína apresenta vários domínios funcionalmente importantes, o que, aliado à existência de várias isoformas, poderia indicar que a APP deve exercer mais de uma função, como sugerido por CLARK et GOATE (1993).

Assim, a β -amilóide poderia ser vista simplesmente como um produto patológico, originado do metabolismo da APP. Uma hipótese para a liberação da β -amilóide nos casos de Mal de Alzheimer poderia estar relacionada ou envolver uma via proteolítica alternativa e/ou anormal do seu precursor, a APP (SISODIA, 1993; TAGAWA *et al.*, 1993).

1.5 Formação das fibrilas amilóides a partir da β APP

A β -amilóide corresponde a um peptídeo interno da β APP, com início a 99 resíduos da extremidade C-terminal do precursor e estendendo-se da região intramembrana (~28 resíduos de aminoácidos) até a região extracelular (~11-15 aminoácidos) do mesmo (KANG *et al.*,1987). Conseqüentemente é necessária uma clivagem proteolítica da β APP, do lado amino e do lado carboxi-terminal da β -amilóide para que este fragmento encontrado nos depósitos amilóides possa ser liberado.

O processamento intracelular da β APP e as vias pelas quais a β -amilóide poderia ou ser gerada ou degradada têm sido intensamente investigados nos últimos dois anos.

Duas vias metabólicas foram descritas para a APP. A primeira delas, denominada de via da secretase, ocorre aparentemente ao nível da membrana celular e envolve a clivagem enzimática no codon 687 (lisina) (numeração da APP770). Esta clivagem ocorre dentro da região correspondente a β -amilóide (codons 672→714), no resíduo 16 da sequência deste fragmento (FIGURA 1). Conseqüentemente, há a liberação do longo domínio extracelular N-terminal da APP, com a região correspondente à sequência N-terminal da β /A4 incluída (ESCH *et al.*,1990) e, um pequeno fragmento C-terminal, associado a membrana. O resíduo da extremidade C-terminal do longo domínio secretado corresponde à glicina da posição 15 da sequência da β /A4 (GLY 15), enquanto a extremidade N-terminal do pequeno fragmento ligado a membrana apresenta leucina como o primeiro resíduo da sequência, a leucina 17 da β /A4 (LEU 17) (FIGURA 1). Esta clivagem no interior da sequência correspondente à β /A4 efetivamente evita sua deposição, ou seja, a formação dos depósitos amilóides. Este seria o caminho observado em pessoas não acometidas pela doença, constituindo este evento, um processo proteolítico normal, não amiloidogênico (SISODIA,1991;HARDY,1992). Tal protease, denominada de secretase α (SELKOE,1993) ainda não foi identificada de maneira definitiva, mas,

recentemente, a catepsina B, uma enzima lisossômica encontrada inclusive nas placas senis, foi apontada como uma forte candidata a esta função (TAGAWA *et al.*, 1992).

Apesar de se acreditar que a clivagem da APP por esta via ocorra praticamente em todas as células, a proporção de moléculas de APP secretada parece variar bastante entre elas. Neurônios e astrócitos, em cultura, apresentam baixos níveis de clivagem operada pela secretase α e, parecem realizar o processamento da APP através de um mecanismo intracelular, não secretor (HAAS *et al.*, 1992). Esta observação, associada ao fato de que o fragmento $\beta/A4$ é depositado não só na doença de Alzheimer, mas em cérebros de indivíduos normais com o envelhecimento, reforçaram a idéia da existência de uma outra via de processamento da APP que deixasse a região da $\beta/A4$ intacta.

Esta segunda via parece envolver endossomas ou lisossomas, como sugerido pela detecção imunocitoquímica de epitopos da β APP nessas organelas e pelo acúmulo de vários fragmentos potencialmente amiloidogênicos em células tratadas com compostos que inibem a função lisossômica (BENOWITZ *et al.*, 1989; GOLDE *et al.*, 1992). Nesta segunda via, a via lisossômica, a clivagem ocorreria em outro ponto da sequência da APP, provavelmente na lisina 670 (LYS670), próximo à região N-terminal da $\beta/A4$, ou na metionina 671 (MET671), criando a extremidade N-terminal da β AP (aspártico, ASP672) (FIGURA 1). Este caminho levaria à liberação de um fragmento solúvel e do fragmento amiloidogênico intacto (ESCH *et al.*, 1992; ESTUS *et al.*, 1992; HAAS *et al.*, 1992). Evidências favoráveis ao processamento nestas organelas vieram ainda com o trabalho de HAAS *et al.* (1992) que demonstraram que a β APP na superfície celular, marcada com anticorpo ou com biotina, pode ser reinternalizada ou transportada para o interior dessas organelas, onde vários fragmentos contendo a sequência correspondente à β AP podem ser detectados.

A idéia de que a liberação proteolítica da $\beta/A4$, a partir da região transmembrana da proteína precursora, levando à conseqüente geração e deposição das fibrilas amilóides, reflita um processamento anormal ou alternativo da APP parece abalada

com o fato da primeira ser constantemente secretada por uma grande variedade de tipos celulares, incluindo linhagens primárias e linhagens transfectadas de células neurais e não neurais em condições normais de cultura (HAAS *et al.*,1992;SEUBERT *et al.*,1992;SHOJI *et al.*,1992), na ausência de qualquer alteração ou injúria da membrana celular, como mencionado acima. Apesar disto, esta idéia pode ainda ser associada à ocorrência de mutações na APP que poderiam, por sua vez, ser a origem desse processamento anormal, uma outra via para tornar esta proteína amiloidogênica ou então, aumentar seu potencial amiloidogênico.

Esta interferência das mutações no processamento normal da APP na doença de Alzheimer poderia ser relacionada à mutação no codon 693 da APP (APP₇₇₀), descrita na angiopatia do tipo holandês (HCHWA-D) que se localiza a seis resíduos do sítio de clivagem proteolítica normal da APP pela secretase α (LEVY *et al.*,1990;LEVY & FRANGIONE,1991).

Assim, um modelo hipotético de formação da β -amilóide a partir da β APP por proteases tem sua proposição favorecida, podendo englobar ainda outras possibilidades relacionadas, como a possível inativação da enzima necessária. Se esta enzima estiver inativada, como pode ser o caso no Mal de Alzheimer, outras enzimas clivariam o domínio extracelular do precursor na lisina 2 e na lisina 28, por exemplo, liberando assim o domínio correspondente à β /A4 e permitindo a formação dos depósitos amilóides (GLENNER,1992).

Esta hipótese sugere que a identificação destas enzimas proteolíticas pode ser um passo importante na abertura de novas perspectivas não só para o entendimento da doença, mas para um possível tratamento. A partir da identificação dessas enzimas poder-se-iam desenvolver inibidores que pudessem vir a prevenir a formação dos depósitos amilóides e, provavelmente, do próprio Mal de Alzheimer.

A presença da β -amilóide foi também detectada no sangue e no líquido cefalorraquidiano de indivíduos normais (SEUBERT *et al.*,1992;SHOJI *et al.*,1992).

Estes resultados parecem corroborar as evidências de que a subunidade β -amilóide é um produto solúvel, constantemente produzido e secretado durante o metabolismo celular normal.

As razões e o(s) mecanismo(s) associados com a sua deposição nos moldes patológicos devem ser mais intensamente investigados. As novas perspectivas trazidas por estes dados são bastante importantes para o melhor entendimento do processamento da β APP e podem, definitivamente, estimular estudos relacionados a formação e metabolização da β -amilóide em indivíduos saudáveis e portadores do Mal de Alzheimer. Estes estudos seriam o tão esperado e preconizado esforço sugerido há tempo e, recentemente reforçado por SELKOE (1993), na direção de se obter formas de inibir a formação dos depósitos amilóides.

1.6 A Genética do Mal de Alzheimer

A maioria dos casos do Mal de Alzheimer ocorrem em indivíduos idosos, geralmente a partir da metade da sexta ou a partir da oitava década de vida. No entanto, como já mencionado, a manifestação da doença pode se dar precocemente, por volta dos 45 anos de idade.

Vários estudos epidemiológicos têm sido realizados com o objetivo de identificar os fatores de risco relacionados ao desenvolvimento da doença. Entretanto, a única variável que mostrou um efeito consistente foi a presença de um histórico familiar positivo (HUFF *et al.*, 1988). Além disso, foram feitos vários relatos de famílias nas quais a doença é herdada como uma doença autossômica dominante (HARDY & ALLSOP, 1991).

Apesar das fortes evidências sugerindo a importância de fatores genéticos na etiologia da doença, particularmente nas famílias onde se caracteriza uma herança autossômica dominante, a maior parte dos casos não parece ter origem genética. Assim

sendo, o quadro que parece emergir é aquele que associa à doença uma etiologia heterogênea: alguns casos claramente associados a fatores genéticos e outros devido a fatores não genéticos, não podendo ser excluída ainda a possibilidade de uma combinação das duas classes de fatores (CLARK & GOATE,1993;SMITH & ANDERTON,1994).

Como mencionado anteriormente, a observação da neuropatologia característica da doença de Alzheimer em indivíduos afetados pela síndrome de Down, com mais de trinta anos, estimulou a procura de uma possível correlação entre a doença de Alzheimer e marcadores no cromossomo 21. Estudos em quatro famílias afetadas pelo Mal de Alzheimer de manifestação precoce, mostraram uma correlação positiva entre a doença e vários marcadores presentes na região proximal do braço longo do cromossomo 21 (St. GEORGE HYSLOP *et al.*,1987). O resultado positivo destes estudos foi complementado com a subsequente localização do gene que codifica a proteína precursora da β amilóide (β APP) na mesma região cromossômica. Com o mapeamento do gene que codifica a proteína precursora da β -amilóide (β APP) nesse cromossomo, foi sugerido que os depósitos amilóides presentes na síndrome de Down poderiam refletir uma maior expressão do gene da APP nesses indivíduos, como consequência da trissomia do cromossomo 21. Isto estimulou a clonagem do gene da APP que foi realizada logo a seguir, independentemente, por diferentes grupos (KANG *et al.*,1987;TANZI *et al.*,1987;GOLDGABER *et al.*,1987;ROBAKIS *et al.*,1987).

Por outro lado, dados obtidos de estudos com outras famílias afetadas, sugeriam a possibilidade de que o Mal de Alzheimer seja uma doença geneticamente heterogênea, mesmo dentro do grupo associado à manifestação precoce, uma vez que somente uma pequena proporção das famílias apresentava ligação com marcadores presentes no cromossomo 21 (Van BROECKHOVEN *et al.*,1987).

Esta observação levou à investigação de diferentes casos com recorrência familiar e ao seqüenciamento do gene da APP nestas famílias, com a consequente identificação de uma mutação de ponto em uma delas (GOATE *et al.*,1991). Esta mutação

está associada ao codon 717 da APP₇₇₀ (resíduo 642 da APP₆₉₅) e causa a substituição de valina (VAL) por isoleucina (ILE), na posição correspondente ao terceiro resíduo após a região C-terminal da β -amilóide (resíduo 714) (FIGURA 1). Esta mutação foi também detectada em pacientes de origem japonesa (NARUSE *et al.* 1991; YOSHIOKA *et al.*, 1991). Estudos subsequentes revelaram, ainda, a presença da mesma mutação em outras famílias afetadas pelo Mal de Alzheimer, todas apresentando manifestação precoce, mas de origem étnica distinta (LUCOTTE *et al.*, 1991; KARLINSKY *et al.*, 1992; FIDANI *et al.*, 1992; SORBI *et al.*, 1993).

Estes resultados fortaleceram a interpretação inicial de GOATE *et al.* (1991) que conferia a esta mutação um papel patogênico, em um raciocínio análogo ao de LEVY *et al.* (1990) que descreveram a primeira mutação de ponto encontrada no gene da APP que poderia causar a deposição da β -amilóide. Esta mutação foi detectada em pacientes portadores de hemorragia cerebral hereditária com amiloidose, do tipo holandês (HCHWA-D), no codon 693 (APP₇₇₀) (correspondente ao codon 618 da isoforma 695), e, neste caso, um possível papel patogênico foi associado à conseqüente substituição de um resíduo de ácido glutâmico (GLU) por uma glutamina (GLN) dentro da sequência da β /A4 (posição 22) (FIGURA 1).

A presença de uma mutação na proteína β /A4 numa condição patológica relacionada ao Mal de Alzheimer, através do mesmo precursor do material amilóide, e da presença de duas das três lesões típicas associadas à doença, aliada aos resultados de GOATE *et al.* (1991), desencadearam uma intensa investigação de alterações na sequência do gene da APP em várias famílias, onde a doença se manifesta precocemente, por volta dos quarenta e cinco anos. Como decorrência deste esforço, outras mutações foram descritas nos exons 16 e 17 (numeração da APP₇₇₀) que codificam a β -amilóide (FIGURA 1 e FIGURA 2).

Uma nova mutação foi descrita no domínio transmembrana da APP, no exon 17, associada a uma alteração na estrutura primária da proteína: a substituição da valina

(VAL) da posição 717 (na APP₇₇₀) por fenilalanina (PHE) (MURRELL *et al.*, 1991), levando os autores a sugerirem que esta poderia ser o fator hereditário causador não só da formação das fibras amilóides, mas também da demência observada nos indivíduos estudados. Quase simultaneamente, o seqüenciamento do exon 17 em indivíduos afetados de uma outra família, revelou uma única mudança de base no mesmo codon, refletida na substituição da mesma valina (VAL). Só que neste caso, a glicina (GLY) aparecia como o aminoácido substituinte (CHARTIER-HARLIN *et al.*, 1991).

A ocorrência de três substituições distintas na mesma posição da APP, próxima ao término da seqüência C-terminal do fragmento $\beta/A4$ e associadas a doença de Alzheimer, reforçou a idéia de mutações patogênicas e, a existência de um "hot spot"¹ que poderia explicar a manifestação precoce nessas famílias como decorrência de uma possível alteração da estrutura do domínio associado à membrana plasmática. Como conseqüência, as vias normais de processamento da APP poderiam ser afetadas, produzindo, por exemplo, fragmentos potencialmente mais sujeitos à deposição. Uma outra interpretação é conseqüência do fato de que uma das características que poderia converter uma proteína não amiloidogênica em amiloidogênica seria a substituição de um aminoácido crucial na seqüência devido a uma mutação gênica. E, neste caso, esta mutação mostrou-se associada à herança genética em indivíduos de pelo menos algumas famílias afetadas, onde a doença se manifestava de maneira precoce.

Estas mutações não foram detectadas na população em geral, sugerindo um papel fundamental das mesmas na etiologia da doença, pelo menos em alguns casos familiares de manifestação precoce (GLENNER, 1992). Com o objetivo de ampliar este conceito, vários grupos se lançaram à análise do gene da APP em casos familiares de manifestação precoce. Como conseqüência deste esforço, novas mutações foram encontradas não só no mesmo exon 17, como também no exon 16.

¹ "hot spot": sítio ou local no qual a freqüência de mutações (ou recombinações) é maior do que aquela observada normalmente (LEWIN, 1990)

Uma nova mutação foi descrita no mesmo exon 17 em uma família que apresentava tanto indivíduos afetados com demência pré-senil quanto indivíduos com hemorragia cerebral devido à presença de angiopatia amilóide cerebral. O sequenciamento do exon 17 nesses indivíduos revelou uma mudança de base (C em lugar de G) no codon 692 da APP (HENDRIKS *et al.*,1992) que causa a substituição de alanina (ALA) por glicina (GLY). Esta substituição corresponde a uma alteração no resíduo 21 da β -amilóide, na porção da sequência correspondente à região extracelular da APP (FIGURA 1). Os resultados apresentados pelos autores indicam que nesta família a demência pré-senil e a hemorragia cerebral, associadas aos depósitos da β /A4 no parênquima cerebral e nas paredes dos vasos sanguíneos, segregam com a nova mutação descrita, em todos os indivíduos estudados. Entretanto, uma exceção foi verificada. Neste último caso, a idade de manifestação da doença era consideravelmente mais tardia do que a aquela observada nos demais membros da família. Isto talvez indicasse que a mutação apesar de suficiente, pudesse não ser necessária para a manifestação da doença e tivesse, na verdade, um efeito de epistasia na manifestação, duração e gravidade da doença, não podendo ser descartada ainda a possibilidade de que a mesma não tivesse efeito patogênico. Ainda neste caso, é interessante notar que esta mutação é vizinha àquela detectada em casos de HCHWA-D (substituição de GLU por GLN na posição 22), onde hemorragias cerebrais estão associadas a grandes depósitos amilóides nos vasos sanguíneos.

Uma nova mutação foi encontrada em dois pacientes com Alzheimer de manifestação precoce e histórico familiar positivo. Esta mudança no gene da APP se refere ao codon 708 (codon 633 da APP₆₉₅) e, envolve uma mudança de nucleotídeos que resulta na alteração da sequência do codon GGC para GGT (BALBIN *et al.*,1992). No entanto, como tanto o codon normal como o mutante especifica um resíduo de glicina, a mutação é silenciosa ao nível da estrutura primária da proteína (FIGURA 1).

A sugestão de uma região na APP suscetível a mutações que poderiam levar ao desenvolvimento da doença já a partir da metade da quinta década de vida, encontrou

novo suporte experimental com a descrição de uma mutação silenciosa no codon vizinho ao 717. No codon 716, no exon 17, foi detectada uma única substituição de base (C por A) (ZUBENKO *et al.*,1992) que não implica em alteração da sequência do produto deste gene.

Por outro lado, uma mutação dupla foi observada no exon 16 (isoforma APP₇₇₀) que co-segrega com a doença em duas famílias suecas, nas quais a doença tem manifestação precoce (MULLAN *et al.*,1992). A alteração de dois pares de base na sequência do gene da APP (G→T e A→C) em comparação à sequência normal, leva à modificação dos codons 670 e 671 da APP₇₇₀ (595 e 596 na isoforma 695), acarretando duas substituições de aminoácidos na proteína: asparagina (ASN) em lugar de lisina (LYS) da sequência normal e leucina (LEU) em lugar de metionina (MET), respectivamente. É importante salientar que estas mutações ocorrem imediatamente antes do início da região que corresponde à β-amilóide, mais precisamente, estas mutações são vizinhas ao resíduo N-terminal (aspártico, ASP) da β/A4. Esta localização amino-terminal à β/A4 poderia dar a esta mutação dupla um caráter patogênico, uma vez que ela ocorre exatamente ou próximo do local onde o precursor APP deve sofrer clivagem pela via lisossômica envolvida no processamento alternativo da molécula (GOLDE *et al.*,1992), gerando fragmentos amiloidogênicos.

Na mesma época, JONES *et al.* (1992) investigaram a sequência do exon 17 do gene que codifica a proteína precursora da β-amilóide em vários pacientes com demência pré-senil. Alguns casos foram diagnosticados como doença de Alzheimer, outros constituíam um grupo atípico e outros, ainda, foram classificados como esquizofrenia crônica. Apesar de não ter sido identificada qualquer alteração nos dois primeiros grupos, os autores detectaram uma mutação de ponto no codon 713 da APP (isoforma 770), que produz uma mudança de alanina (ALA) para valina (VAL) na proteína. Esta substituição de aminoácido ocorre dentro da sequência correspondente ao fragmento β-amilóide, um resíduo antes do aminoácido C-terminal, considerando o peptídeo de 43 resíduos de aminoácidos (FIGURA 1). Entretanto, esta mutação não pôde ser analisada em outros

membros da família e nem foi encontrada em outros 100 casos de esquizofrenia crônica analisados pelos autores. Mesmo assim, o fato dela ocorrer em uma região aparentemente crítica do gene da APP, poderia indicar um eventual papel patogênico desta mutação de modo similar ao sugerido para as demais mutações.

Apesar das investigações da sequência do gene da APP estarem centradas nos exons relacionados com a expressão do fragmento $\beta/A4$, exons 16 e 17, uma mutação foi descrita também no nucleotídeo 459 do codon 153 (valina, VAL) no exon 4 em um membro afetado pelo Mal de Alzheimer de recorrência familiar. Nenhuma substituição de aminoácido está associada a esta alteração nucleotídica, sendo a mutação considerada não patogênica pelos autores (VAULA *et al.*, 1992).

Mesmo que a existência de mutações nos exons 16 e 17 (envolvidos na codificação da β -amilóide) possa fornecer subsídios para a hipótese de que essas mutações sejam patogênicas, e que, indivíduos que apresentam as mutações descritas nos códons 717 e 670/671, exibam a evolução clássica da doença de Alzheimer de manifestação precoce, o entendimento do real papel dessas mutações se mostrou mais complexo. Não só porque essas mutações pareçam estar associadas à somente alguns casos de manifestação precoce, mas também porque o gene da APP no cromossomo 21 foi excluído como o *locus* envolvido na doença em muitas famílias com este padrão de manifestação.

A procura por outros *loci* que pudessem ser ligados com a predisposição à doença culminou com os resultados de SCHELLENBERG *et al.* (1992) que mostraram a ligação entre a manifestação precoce da doença e marcadores presentes no braço longo do cromossomo 14 (marcador denominado D14S43). O gene ou genes envolvidos ainda não foram identificados de maneira inequívoca, mas foi sugerido que a proteína codificada por este gene no cromossomo 14 talvez pudesse estar conectada com a síntese da APP ou com o seu processamento. Os genes candidatos para este *locus* incluem o gene da HSPA2, uma

proteína "heat-shock"² de 70 kD, e o gene c-Fos (St.GEORGE-HYSLOP *et al.*,1992;Van BROECKHOVEN *et al.*,1992). O produto do último é um fator de transcrição que poderia aumentar a atividade do gene da APP, com o conseqüente aumento na produção da mesma. A HSPA2 poderia estar envolvida nas vias de processamento de proteínas na célula, e, conseqüentemente, ligada ao processamento da APP. De qualquer modo, não se deve excluir a hipótese de que talvez o produto deste novo gene não esteja diretamente ligado à APP.

Pelo menos mais um outro *locus* ligado à doença de Alzheimer de manifestação precoce, deve existir, uma vez que ela parece não estar ligada nem ao cromossomo 21 e nem ao 14 em um grupo de famílias americanas, descendentes de alemães da região do Rio Volga (SCHELLENBERG *et al.*,1994).

O quadro genético dos casos de doença de Alzheimer associados à manifestação tardia parece menos definido, talvez pelas dificuldades decorrentes do seu próprio padrão de manifestação. A maior parte dos casos parece estar associada a uma origem multifatorial, com contribuições tanto de fatores genéticos como ambientais. Apesar destas observações, a ligação desta forma da doença com marcadores presentes na região proximal do braço longo do cromossomo 19 foi demonstrada em algumas famílias (PERICAK-VANCE *et al.*,1991). Esta evidência foi confirmada recentemente com os resultados de STRITTMATTER *et al.*(1993), mostrando a associação entre a doença de Alzheimer e o *locus* da apolipoproteína E (APO E). A freqüência do alelo APOE do tipo 4 (APOE-ε4) estava significativamente aumentada nesses pacientes (de 13% para 48%, em relação aos indivíduos normais), nas diferentes famílias analisadas, implicando este alelo, herdado como um traço autossômico codominante., como um importante fator na etiologia da doença com padrão familiar de manifestação tardia. O papel da apoE4 como um possível

² proteína "heat shock": proteínas codificadas por um conjunto de genes aos quais se atribui um papel na proteção da célula contra o estresse ambiental. Eles são ativados por um ou mais agentes físicos ou químicos, como por exemplo: calor, etanol, metais pesados, falta de glicose ou estimulação mitogênica (FERRIS *et al.*,1988)

fator de risco para o desenvolvimento da doença parece não se restringir somente a este padrão de manifestação. Recentemente, os resultados de UEKI *et al.*(1993) indicam que, em pacientes japoneses, a presença da isoforma E4 está associada também à doença de Alzheimer de manifestação tardia, sem antecedentes familiares (casos esporádicos).

Apesar de não estar claro, pelo menos no momento, como variações no genótipo de apolipoproteínas podem levar às lesões patológicas encontradas no Mal de Alzheimer, um maior risco, uma diminuição da idade de manifestação da doença e o aumento da deposição da β -amilóide no cérebro (nas placas senis e nos vasos) estão associados com o número de alelos APOE- ϵ 4 presentes no indivíduos afetados (CORDER *et al.*,1993;SCHEMECHEL *et al.*,1993).

Estes resultados vão ao encontro da hipótese da possível existência de proteínas funcionando como "chaperones"³ na doença de Alzheimer. Tais proteínas, ao interagir com a β /A4, influenciariam o processo da sua deposição (FRANGIONE, comunicação pessoal). Esta hipótese parece fortalecida com os resultados acima e com a demonstração *in vitro* de que a isoforma apoE4 se liga mais avidamente à β /A4 do que as demais isoformas de apolipoproteínas (WISNIEWSKI *et al.*,1993).

A afinidade da apolipoproteína E (apoE) de se ligar à β /A4 poderia ser reflexo das propriedades especiais da primeira. Entre as várias apolipoproteínas, a apoE é única frente à sua relevância para o sistema nervoso. Diferentemente das demais lipoproteínas, produzidas exclusivamente no fígado, a apoE é produzida também nas células de Schwann no sistema nervoso periférico e no astrócitos (PITAS *et al.*,1987a). Ela aparece como a principal apolipoproteína presente no líquido cefalorraquidiano (PITAS *et al.*,1987b), estando ainda implicada na mobilização e redistribuição de lipídeos durante o crescimento do axônio e no reparo das membranas dos mesmos (MAHLEY,1988).

³ "chaperones": classe de proteínas, amplamente distribuídas e estruturalmente não relacionadas, que interagem com conformações não nativas de outras proteínas. Elas influenciariam diretamente o enovelamento dos polipeptídeos na sua conformação nativa (HARTL *et al.*,1994)

1.7 OBJETIVO

O crescente interesse sobre mutações no gene da APP e a possível relação das mesmas com a etiologia da Doença de Alzheimer conduziram a formulação da hipótese de que outras mutações neste gene deveriam ocorrer em outros indivíduos com histórico familiar de manifestação precoce e herança do tipo autossômica dominante (HARDY & ALLSOP, 1991; GLENNER, 1992).

O presente trabalho nos foi proposto dentro deste contexto, como parte de uma intensa investigação sobre o papel patológico da $\beta/A4$ e seu precursor na Doença de Alzheimer e na hemorragia cerebral hereditária com amiloidose do tipo holandês (HCHWA-D), em andamento no Departamento de Patologia do Centro Médico da NYU.

Nosso objetivo foi investigar a presença de mutações no gene da β APP, caracterizando sua frequência e distribuição nos diferentes exons, no sentido de explorar a relação dessas mutações com a doença.

A análise do gene da β APP foi realizada em famílias afetadas pelo Mal de Alzheimer, todos os casos apresentando manifestação precoce. Foram estudados indivíduos de seis famílias diferentes, sendo quatro americanas, uma inglesa e uma argentina.

Os diferentes exons que codificam a APP foram inicialmente amplificados e, em seguida, possíveis alterações conformacionais, induzidas pela presença de mutações de ponto, foram investigadas através de alterações do padrão de migração eletroforética das fitas simples correspondentes, tomando-se com referência a migração observada para os exons de indivíduos normais, não afetados.

Os dados obtidos a partir desta análise indireta foram corroborados com a clonagem e o seqüenciamento dos exons correspondentes a $\beta/A4$: exon 16 e 17 (numeração tomada da APP₇₇₀). O exon 18, correspondente à região intracelular da proteína APP também foi clonado e seqüenciado nas diferentes famílias.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MEIOS DE CULTURA

Na preparação dos meios de cultura foram utilizados reagentes da Difco (Difco Laboratories, Detroit, MI).

Os meios de cultura foram autoclavados a 121°C por 20 minutos e, em seguida, mantidos à temperatura ambiente para resfriamento. Tendo em vista o experimento a ser realizado, o meio foi acrescido do antimicrobiano necessário. No caso de crescimento em meio sólido, o meio de cultura foi distribuído em placas de Petri esterilizadas que foram mantidas à temperatura ambiente até total gelificação .

2.1.1 Meio LB (Luria-Bertani Medium) (Miller,1972)

Bactotripton	10,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
NaCl	10,0 g
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	1,0 l pH final 7.2

2.1.2 Meio LA (Luria-Bertani ágar) (Miller,1972)

Ágar bacteriológico	15,0 g
Meio LB pH 7.2	1,0 l

2.1.3 Meio YT 2x (BRENT,1992)

Extrato de levedura	10,0 g
---------------------	--------

Bactotripton	16,0 g
NaCl	5,0 g
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	1,0 l

2.1.4 Meio SOC (BRENT,1992)

Extrato de levedura	5,0 g
Bactotripton	20,0 g
NaCl	0,58 g
KCl	186 mg
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	1,0 l

A solução foi autoclavada por 20 minutos . Ao meio resfriado, foram adicionados MgCl₂ e MgSO₄ na concentração final de 10mM , além de glicose na concentração final de 20 mM.

2.2 SOLUÇÕES E REAGENTES

2.2.1 Soluções para Complementação de Meios de Cultura e/ou para Plaqueamento

1. H-Top Ágar (BRENT,1992)

Bactotripton	1,0 g
NaCl	0,8 g
Agarose	0,8 g
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	0,1 l

A solução foi autoclavada a 121°C por 20 minutos.

2. IPTG (isopropil-1-tio-β-D- galactosídeo)

IPTG	2,0 g
H ₂ O destilada q.s.p.	10,0 ml

A solução foi esterilizada por filtração (filtro de 0,22 micron), distribuída em alíquotas de 1.0 ml e estocada a -20°C .

3. BCIG (5-bromo-4-cloro-3indolil- β -D -galactosídio (X-Gal)

BCIG	2,0 mg
N,N Dimetilformamida	1,0 ml

A solução, protegida da luz, foi mantida a -20°C .

4. Soluções de antimicrobianos

Soluções estoque de kanamicina (50 mg/ml) ou ampicilina (50 mg/ml) foram preparadas em H_2O Milli-Q, esterilizadas por filtração em membrana de 0,22 micron e mantidas a 4°C .

5. Soluções de sais e solução de glicose

Foram preparadas soluções estoque de sais (MgCl_2 e MgSO_4) em H_2O Milli-Q na concentração de 1M . As soluções foram esterilizadas por filtração em membrana de 0.22 micron. A solução estoque de glicose foi preparada a 2M ,esterilizada nas mesmas condições e mantida a -20°C .

2.2.2 Soluções para Preparação de Células Bacterianas Competentes

1. Solução de CaCl_2 2.5 M

$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	13,5 g
H_2O destilada q.s.p.	20,0 ml

A solução foi esterilizada por passagem em filtro de 0,22 micron e armazenada em alíquotas de 1.0 ml a -20°C .

2. Solução de CaCl_2 50 mM

$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,7 g
H_2O destilada q.s.p.	200,0 ml

A solução foi esterilizada como a solução anterior e estocada a -4°C .

2.2.3 Solução Tampão Tris com EDTA (T₁₀E₁)

Tris pH 8.0	1,21 g
EDTA 0.5 M pH 8.0	2,00 ml
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	1,00 l

2.2.4 Solução Tampão Tris - Acetato de Sódio/EDTA (TEA)

Tris pH 7.5	40 mM
Acetato de Sódio	20 mM
EDTA	1 mM

2.2.5 Soluções para visualização de DNA sob luz U.V.

1. Solução estoque de Brometo de Etídio 1%

Brometo de Etídio	1,0 g
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	100,0 ml

2. Solução corante de Brometo de Etídio (0.5µg/ml)

Solução estoque de brometo de etídio 1%	50 µl
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	100 ml

2.2.6 Soluções para Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

1. Solução tampão Tris- Borato (estoque) (TBE 20 x)

Tris	121,10 g
Ácido Bórico	51,30 g
EDTA	3,72 g
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	1,00 l pH 8.0

2. Solução tampão de amostra

Sacarose	20,0 g
Azul de Bromofenol	0,1 g
TBE 10x pH 8.0	10,0 ml

H ₂ O Milli-Q q.s.p.	100,0 ml
---------------------------------	----------

3. Solução estoque de acrilamida

Acrilamida	29,2 g
Bis-acrilamida	0,8 g
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	100,0 ml

4. Solução de Persulfato de Amônia 20% (PSA)

Persulfato de Amônia	2,0 g
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	10,0 ml

2.2.7 Soluções para Marcação de Sonda Molecular

1. Tampão de "nick translation" (10x)

Trizma base	500 mM
MgCl ₂	50 mM
2-β-mercaptoetanol	100 mM
BSA	0,5 ng/ml pH 8.0

2. Tampão para a diluição da DNA polimerase I

NaCl	100 mM
Tris	10 mM
MgCl ₂	7 mM
DTT	1 mM pH 7.4

3. Tampão de resuspensão de nucleotídeos

Trizma	5 mM
EDTA	1 mM
2-β-mercaptoetanol	2 mM
Etanol P.A.	50 % pH 7.5

4. Solução de EDTA 0.5 M pH 8.0

Na ₂ EDTA	186,1 g
NaOH (~ 20 g)	para pH 8.0
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	1,0 l

A solução foi separada em alíquotas e autoclavada.

5. Solução de DNA carreador

DNA de esperma de salmão em tampão TE 1x na concentração final de 10ng/ml. Para a fragmentação do DNA carreador (redução a fragmentos de aproximadamente 10⁵ daltons), a solução foi submetida inicialmente a passagens sucessivas (5 vezes) por uma agulha de 38mm x 12 mm e, a seguir, a mais 5 passagens por uma agulha de 25 mm x 7 mm.

Após este tratamento, a solução foi separada em alíquotas e mantida a -20°C.

6. Solução para diluição da DNase I

NaCl	0,876 g
Glicerol	50 %

2.2.8 Soluções para Preparação de Filtros e Hibridização

1. Solução salina padrão com citrato (estoque) (SSC 20x)

NaCl	3.0M
Citrato de Sódio	0.3M

2. Solução de Denhart (50x)

Ficoll 400 000	5,0 g
Polivinil pirrolidona	5,0 g

Soroalbumina bovina	5,0 g
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	500,0 ml

3. Solução para desnaturação

NaOH	4,00 g
NaCl	87,66 g
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	1,00 l

4. Solução salina SSCP (estoque) (5x)

NaCl	35,00 g
Citrato de Sódio	22,00 g
KH ₂ PO ₄	88,50 g
EDTA	1,69 g
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	1,00 l

5. Solução para neutralização

Tris 1M pH 7.5	200,0 ml
SSCP 5x	400,0 ml
NaCl	45,5 g
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	1,0 l

6. Solução para lavagem

NaCl	29,25 g
Tris 1M pH 7.2	25,00 ml
EDTA 0.5M pH 8.0	1,00 ml
SDS 10%	5,00 ml
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	0,50 l

2.2.9 Soluções para Sequenciamento

1. Solução de acrilamida 40% (estoque)

Acrilamida	380,0 g
Bis acrilamida	20,0 g
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	1,0 l

A dissolução foi realizada a 37°C. Após o ajuste final do volume, a solução foi filtrada (poro de 0,45 micron) e mantida em frasco âmbar na geladeira.

2. Mistura A (TBE 0.5x)

Acrilamida 40%	150,0 ml
Uréia	460,0 g
TBE 10x	50,0 ml
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	1,0 l

3. Mistura B (TBE 2.5x)

Acrilamida 40%	150,0 ml
TBE 10x	250,0 ml
Uréia	460,0 g
Sacarose	50,0 g
Azul de bromofenol	50,0 mg
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	1,0 l

4. Tampão para pareamento com o primer (5x)

Tris - HCl pH 7.5	200 mM
MgCl ₂	100 mM
NaCl	250 mM

5. Tampão para diluição da enzima (sequenase)

Tris- HCl pH 7.5	10 mM
DTT	5 mM
BSA	0,5 mg/ml

6. Mistura de nucleotídeos para reação de marcação (para uso com dATP radioativo)

1.5 µM dGTP; 1.5 µM dCTP; 1.5 µM dTTP

7. Misturas de nucleotídeos para reação de término

Foram preparadas quatro misturas distintas, uma para cada dideoxynucleotídeo. Cada mistura contém: 80 μ M dATP, 80 μ M dTTP, 80 μ M dCTP, 80 μ M de dGTP e 50 mM NaCl. A cada uma das misturas de dNTP, foram acrescentados 8 μ M do dideoxynucleotídeo (ddNTP) correspondente: ddATP, ddTTP, ddCTP e ddGTP.

8. Solução bloqueadora

Formamida	95,00 %
EDTA	20 mM
Azul de Bromofenol	0,05 %
Xileno Cianol FF	0,05 %

2.2.10 Soluções para análise de polimorfismo pela conformação de fita simples(SSCP)

1. Solução para gel de poliacrilamida

Acrilamida 40%	6,3 ml
TBE 10x	4,2 ml
Glicerol	4,2 ml
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	42,0 ml

2. Solução para aplicação de amostra

Formamida	94,00%
Azul de Bromofenol	0,05%
Xileno Cianol FF	0,05 %
EDTA	20 mM

2.2.11 Soluções Tampão para Enzimas

1. Tampão quinase (10x)

Tris-HCl pH 7.6	0,7 M
MgCl ₂	0,1 M
DTT	50,0 mM

2. Tampão ligase (5x)

Tris-HCl pH7.6	250 mM
MgCl ₂	50 mM
ATP	5 mM
DTT	5 mM
PEG 8000	25%

3. Tampão *Sma* I (1x)

Acetato de Potássio	50 mM
Tris pH 7.9	20 mM
Acetato de Magnésio	10 mM
DTT	1 mM

4. Tampão *Taq* polimerase (10x)

Tris pH 8.0	10 mM
KCl	50 mM
MgCl ₂	10 mM
Gelatina	0.01 %

2.2.12 Soluções para eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS)

1. Solução de bis-acrilamida (estoque)

Acrilamida	29,2 g
Bis-acrilamida	0,8 g
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	100,0 ml

Após dissolução, a solução foi filtrada em papel Whatman 1 MM e mantida a 4°C em frasco âmbar.

2. Solução tampão Tris-HCl 1M pH 8.8

Tris	12,114 g
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	100 ml pH 8.8

3. Solução tampão Tris-HCl pH 6.8

Tris	12,114 g
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	100 ml pH 6.8

4. SDS 20%

SDS	20,0 g
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	100 ml

5. PSA 10%

PSA	100 mg
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	1,0 ml

6. Tampão de corrida 10x (estoque)

Tris	30,3 g
Glicina	144,2 g
SDS	10,0 g
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	1,0 l

7. Tampão de amostra 2x

SDS 10%	4,0 ml
Glicerol	2,0 ml
Tris 1 M pH 6.8	1,2 ml
Azul de Bromofenol 0.1%	0,6 ml
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	3,0 ml

2.2.13 Soluções para Western-Blotting

1. Tampão de Transferência 10x (estoque)

CAPS	22,13 g
NaOH 2N q.s.p.	pH 11
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	1,0 l

2. Solução bloqueadora (JOHNSON *et al.*, 1984)

Leite em pó desnatado	5 g
TBS q.s.p.	100 ml
Tween 20	50µl

3. Solução salina tamponada com Tris (Tris 25 mM)(TBS)

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Tris	3,0 g
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	1,0 l pH 8.0

2.3 OBTENÇÃO DO MATERIAL

O material utilizado no presente estudo foi obtido de indivíduos que ou apresentavam ou manifestaram, em vida, um quadro clínico compatível com Mal de Alzheimer.

Todos os casos estavam associados à manifestação precoce e apresentavam histórico familiar.

Estes casos foram encaminhados ao laboratório por diferentes neurologistas ou clínicos por intermédio do Dr. B. Frangione ou diretamente pelo Dr. E. Castaño e pelo Dr. T. Wisniewski. O grupo incluía um total de oito famílias diferentes: duas argentinas (FAD 1) (FAD 7), cinco americanas (FAD 2) (FAD 4) (FAD 5) (FAD 6) (FAD 8) e, uma inglesa (FAD 3). As informações disponíveis sobre estas famílias estão resumidas na TABELA II.

O diagnóstico dos indivíduos que apresentaram em vida um quadro clínico compatível com a doença foi confirmado imunohistoquimicamente após autópsia. Nos demais casos foi realizada inicialmente uma avaliação de saúde e dependência, seguida de teste psicológico. Os casos que apresentaram suspeita clínica foram, então, extensamente

investigados através dos parâmetros normalmente utilizados como referência na clínica médica e que incluem exames neurológicos, testes neuropsicológicos, eletroencefalograma e tomografia computadorizada, entre outros (Castaño & Wisniewski, comunicação pessoal, de acordo com FOLSTEIN *et al.*,1975 e MCKHANN *et al.*,1984). Com base nesses critérios, os casos foram, então, classificados (**TABELA II**).

Sempre que possível as informações clínicas disponíveis foram complementadas com depoimentos de membros da família e com a revisão e análise do arquivo médico, resultados de biópsias e autópsias e com dados disponíveis sobre os demais membros da família (Castaño, comunicação pessoal). No caso da família argentina, os dados disponíveis permitiram estabelecer o heredograma esquematizado na **FIGURA 3**.

2.4 Extração de DNA

O DNA foi extraído ou de tecido cerebral congelado (lobo temporal) ou de linfócitos de sangue periférico, conforme protocolo descrito por BLIN & STAFFORD,1976.

Em função da disponibilidade de material, a extração foi também realizada a partir de material fixado embebido em parafina, após modificação do método de GOELZ *et al.*,1985. Como alternativa para algumas amostras foi também utilizado o procedimento descrito por ROGERS *et al.*,1990.

Com exceção das amostras IV-13 (FAD 1), 382 (FAD 4), P (FAD 7) e 260-III (FAD 8) (**TABELA II**) (**TABELA III**) que foram obtidas a partir de material fixado embebido em parafina e das demais amostras dos casos da família FAD 1 (III-8; IV-31) que foram obtidas de linfócitos, as demais amostras (IV-2, FAD 1; NS, FAD2; BRI, FAD 3; 422, FAD 5 e CD, FAD 6) foram preparadas a partir de tecido cerebral.

TABELA II

Resumo dos dados clínicos dos casos de doença de Alzheimer nas famílias estudadas

Família/Indivíduo	Sexo	Idade: Doença	Idade: Morte	Duração (anos)	Diagnóstico Classificação	Fonte de Informação
FAD 1:						
II-1	F	40	47	7	PAD	IR
III-1	F	41	48	7	DAD	IR;MR
III-2	F	46	55	9	PAD	IR
III-3	F	40	49	9	DAD	IR;MR
III-5	F	43	51	8	PAD	IR;MR
III-8	M	40	47*	--	PAD	IR;EX.CL
IV-2	F	38	44	6	PAD	IR;MR
IV-13	F	35	41	7	DAD	IR;MR
IV-30	M	34	37*	--	PAD	EX.CL;MR
IV-31	F	33	35*	--	PAD	EX.CL;MR
FAD 2:						
NS	F	46	55	9	DAD	IR;MR
FAD 3:						
BRI	M	48	56	8	PAD	IR
FAD 4:						
382	M	45	54	9	DAD	IR;MR
FAD 5:						
422	F	50	57	7	DAD	IR;MR
FAD 6:						
CD	M	43	50	7	DAD	IR;MR
FAD 7:						
P	M	--	56	--	DAD	IR
FAD 8:						
260-III	F	46	53	7	DAD	IR;MR

Cada uma das famílias (FAD) está identificada com um número. A idade da doença corresponde à idade de manifestação da patologia. O símbolo (*) indica a idade atual do indivíduo. A classificação dos casos, com base nos parâmetros e critérios para diagnóstico clínico do National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (NINCDS) e Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (ADRDA) (McKHANN *et al.*,1984), está indicada como PAD: provável e, DAD: definitivo. As informações disponíveis em cada caso foram obtidas de IR: relato familiar; MR: relato médico e EX.CL: exame clínico.

TABELA III

Indivíduos analisados e origem do DNA utilizado para a caracterização dos exons da APP nas diferentes famílias afetadas pela doença de Alzheimer de manifestação precoce

FAD 1:

IV-13	tecido cerebral fixado, embebido em parafina
III-8	linfócitos
IV-31	linfócitos
IV-2	tecido cerebral congelado

FAD 2:

NS	tecido cerebral congelado
----	---------------------------

FAD 3:

BRI	tecido cerebral congelado
-----	---------------------------

FAD 4:

382	tecido cerebral fixado, embebido em parafina
-----	--

FAD 5:

422	tecido cerebral congelado
-----	---------------------------

FAD 6:

CD	tecido cerebral congelado
----	---------------------------

FAD 7:

P	tecido cerebral fixado, embebido em parafina
---	--

FAD 8:

260-III	tecido cerebral fixado, embebido em parafina
---------	--

Entre estas, foram também incluídas amostras obtidas de tecido cerebral de dois indivíduos normais e de um paciente afetado por hemorragia cerebral hereditária com amiloidose-tipo holandês (HCHWA-D) (LEVY *et al.*, 1990).

O sangue foi coletado em heparina e centrifugado a 200 x g por 10 minutos à temperatura ambiente. A interface, contendo os linfócitos, foi cuidadosamente transferida para um tubo limpo e a este, foram adicionados 3-5 ml de uma solução de EDTA 50 mM pH 8.5, contendo SDS 0.5%.

O cérebro congelado foi mantido em gelo seco durante o manuseio e, com o auxílio de uma lâmina de aço e um pequeno martelo, foram retirados pequenos fragmentos de tecido. Estes foram imediatamente macerados em um gral, sob atmosfera de nitrogênio líquido. De modo análogo ao tratamento descrito acima, este material foi, em seguida, transferido para um tubo de ensaio limpo, contendo a mesma solução.

Aos tubos foi adicionada proteinase K (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) na concentração final de 100 µg/ml e a digestão ocorreu a 37°C por 4 horas, sendo os tubos cuidadosamente invertidos algumas vezes durante este período. Após duas extrações seguidas com fenol-clorofórmio e uma extração com clorofórmio, o DNA presente na fase aquosa foi precipitado com etanol a frio na presença de NaCl 0.2 M. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur vedada, o DNA foi cuidadosamente retirado e transferido para um tubo contendo 3.0 ml de T₁₀E₁ e mantido sob lenta agitação a 4°C por 16 horas. Ao material dissolvido foi adicionada ribonuclease pancreática A (Sigma, Chemical, St.Louis, MO) na concentração final de 5 µg/ml e a reação ocorreu a 37°C durante 1 hora. Esta etapa foi seguida de uma nova adição de proteinase K (10 µg/ml) e incubação a 37°C por duas horas.

Após a extração final com fenol (2x) e clorofórmio (1x), a fase aquosa coletada foi transferida para um tubo limpo e, após adição de NaCl na concentração final de 0.2 M, o DNA foi finalmente precipitado a frio com etanol (P.A.) (2.5x V/V). Tris 10mM.

O DNA obtido foi dissolvido em 100µl de T₁₀E₁. Diluições de 100 e, se necessário, 500 vezes foram preparadas em H₂O e o material analisado espectrofotometricamente a 260 e 280 nm para dosagem e avaliação quanto a pureza, como descrito em SAMBROOK *et al.*(1988). As amostras foram mantidas a 4°C.

Para a obtenção de DNA a partir do material fixado e embebido em parafina, fragmentos pequenos e finos foram retirados com o auxílio de uma lâmina esterilizada, tomando--se o cuidado de minimizar ao máximo a inclusão de parafina. As amostras foram pesadas (50-500 mg), dissolvidas em 4-8 ml de TE₉ (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 9), respectivamente e, em seguida, mantidas a 48 °C por 24 horas, antes da digestão com proteinase K na presença de SDS.

Após 20 horas de digestão, uma segunda alíquota da enzima foi adicionada às amostras e, a digestão se prolongou por mais um período de 20 horas. O material foi submetido à extração nas condições descritas acima e precipitado com etanol a frio na presença de acetato de amônio 0.3 M e, em seguida, dissolvido em T₁₀E₁ e analisado como descrito acima.

No segundo procedimento utilizado para obtenção de DNA dos tecidos fixados e embebidos em parafina, as amostras foram imersas em 400µl de xileno por 5 minutos à temperatura ambiente para a eliminação da parafina. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos e o precipitado lavado com etanol 100%. Depois de nova centrifugação, o precipitado foi lavado com etanol 35% e, após evaporação do mesmo, dissolvido em TE₉ com SDS 1% para a digestão com proteinase K (500 µg/ml).

As condições de extração e precipitação foram as mesmas especificadas acima. Como alternativa, algumas amostras foram submetidas a um pré-tratamento com Triton X-100 a 1% a 48°C por 16 horas antes da digestão enzimática.

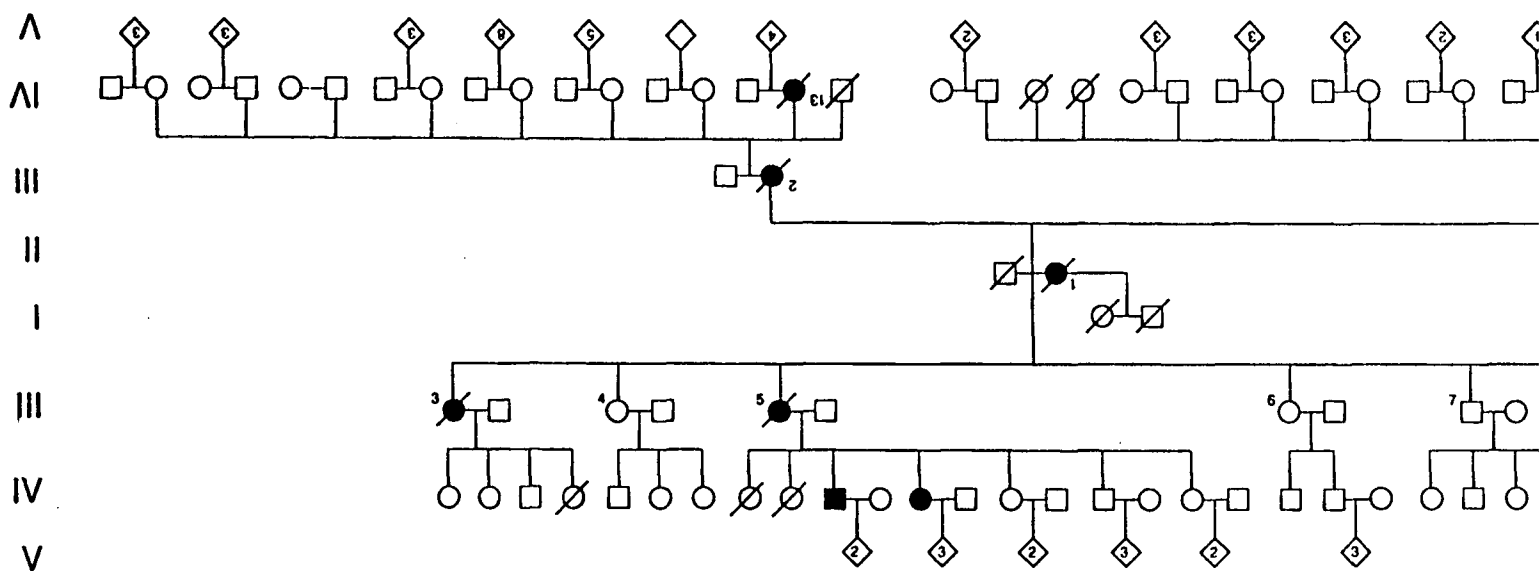


FIGURA 3: Heredograma da família argentina (FAD 1). Os pacientes III-1, III-3 e IV-13 tiveram confirmados. Símbolos: O = ♀ ; □ = ♂ ; ∅, ∅ = falecido; ■ ; ● = afetado; ◇ = criança

2.5 Reação em cadeia da polimerase ("PCR")

As reações foram realizadas a partir do protocolo original descrito por SAIKI *et al.*, 1988.

2.5.1 "Primers"

Os "primers", utilizados para a amplificação dos diferentes exons do gene que codifica a proteína precursora da β -amilóide (β APP), foram esquematizados com base na sequência dos introns contíguos a cada um dos exons, usando-se como referência os trabalhos de LEMAIRE *et al.* (1989) e YOSHIKAI *et al.* (1990).

A sequência nucleotídica de cada "primer" (TABELA IV), foi então, sintetizada automaticamente em um sintetizador de DNA PCR-MATE 391 (Applied Biosystems, Foster City, CA) pelo Dr. A. Goldsmith do Departamento de Farmacologia-MSB da NYU ou sob encomenda pela Operon Technologies, Inc., Alameda, CA.

De cada "primer" recebido foi retirada uma alíquota de 10 μ l e o volume completado para 200 μ l com H₂O.

O material foi submetido a extração com fenol (2x), seguida de extração com clorofórmio. A fase aquosa, obtida deste último tratamento, foi transferida para um eppendorf limpo e o DNA precipitado com NaCl na concentração final de 0.2M e etanol P.A. a frio (1:2.5 v/v) em gelo seco.

O material foi centrifugado por 5 minutos a 12 000 rpm, o sobrenadante descartado e o precipitado seco a vácuo. Em seguida, o DNA precipitado foi dissolvido em 200 μ l de H₂O e uma alíquota diluída 1:500 em H₂O para estimativa da concentração pela absorbância a 260 nm (SAMBROOK *et al.*, 1988).

2.5.2 Reação

Uma quantidade de 1µg de DNA de cada amostra foi amplificada em um volume final de 100µl, na presença dos respectivos "primers", na concentração final de 25 a 40 pmoles, e dos demais reagentes: cada um dos quatro dNTP (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, NJ) na concentração final de 200 µM, 2.5 unidades da *Taq* DNA polimerase I da bactéria termófila *Thermus aquaticus* (*Taq*) (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN) e tampão *Taq* 1x .

A mistura foi coberta com óleo mineral e submetida a um ciclo de reações, repetido automaticamente 20 a 30 vezes em uma máquina programável da Perkin-Elmer Cetus(Norwalk,CT): desnaturação a 94°C por 1 minuto, renaturação com pareamento dos "primers" a temperatura e tempo variável, dependendo do exon em questão e, finalmente, extensão a 72°C por 2 minutos. Esta programação foi seguida de uma extensão final por 10 minutos a 72°C .

2.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A análise dos fragmentos amplificados nas condições descritas no item anterior foi realizada em gel de poliacrilamida a 5 ou 8.4% , de acordo com o tamanho do fragmento esperado, utilizando-se o sistema Mini-Protean II (Bio-Rad Laboratories, Hercules,CA)

2.6.1 Preparação do gel

O gel foi preparado a partir de uma solução estoque de acrilamida (acrilamida-bis, 30:0.8; item 2.2.6, nº 3) dissolvida em TBE 1x (item 2.2.6, nº 1) ,

utilizando-se PSA a 0.14% como iniciador e TEMED a 0.005% como catalisador da reação de polimerização.

Com o auxílio de uma pipeta, a solução (12.5 ml/gel) foi cuidadosamente colocada entre duas placas de vidro (102x72 e 102x82 mm), separadas por espaçadores plásticos de 1.0 mm e, posicionadas verticalmente no suporte acrílico apropriado do sistema. Os poços foram obtidos colocando-se com um pente plástico de mesma espessura (10 dentes) entre as duas placas.

Após a polimerização, o pente foi retirado e o conjunto placas de vidro-gel transferido para o suporte plástico conectado aos eletrodos. Este foi então, colocado na cuba para eletroforese, contendo TBE 1x como tampão de corrida.

2.6.2 Preparação das amostras e eletroforese

Alíquotas da reação de amplificação (10 μ l), cuidadosamente retiradas de modo a se evitar a presença do óleo mineral, foram misturadas a 5 μ l de tampão da amostra (item 2.2.6; n° 2) e o material submetido à eletroforese a 150 V até que o azul de bromofenol atingisse a extremidade inferior do gel.

Como marcadores de peso molecular, foram incluídos fragmentos de DNA dupla fita de tamanho conhecido, obtidos comercialmente (Bio Marker Low, BioVentures, Inc, Murfreesboro, TN).

2.6.3 Análise do gel

Após a corrida eletroforética, a eficiência da reação de amplificação foi avaliada pela visualização do fragmento de DNA, por coloração com brometo de etídio.

O gel foi mergulhado em uma solução de brometo de etídio (0.5 μ g/ml) e mantido sob movimentação lenta por 5 minutos ao abrigo de luz. Em seguida, a solução

TABELA IV

"Primers" utilizados na amplificação dos exons do gene da β APP

Exons (APP ₆₉₅)	Pares de " Primers "	Tamanho (em bp)
1	5' AGCAAGGACGCGCGGATCC 3' 5' GTATCGCGTCCCCACCGTGC 3'	190
2	5' TGCCTTGGAGCTATGGATACT 3' 5' AACAAATGCATGTGATCCAAC 3'	213
3	5' ACAGTGGAGGTTGTTAGAT 3' 5' CTTCCCTCAAGACCAGGCC 3'	171
4	5' CGGTAAGAACACTGTGATACAG 3' 5' GGAAATCTTCACTTTGCAATAAGA 3'	200
5	5' ACACATCTACTCTAGCCAC 3' 5' ACTCCATACAAGATGTTTCAGC 3'	255
6	5' ATTCCATATGGACGACTTTC 3' 5' TCCAACCTCTGGTATTACGCT 3'	300
7	5' TCTCTGTTCTGAGAAATACG 3' 5' GCTCAGGTTTCCAATATCG 3'	290
8	5' AACATAATCATCCATCCTAT 3' 5' GCAGACATATTAATGGATG 3'	150
9	5' GCTGCTTCATCCTACTTATTC 3' 5' CTTACTGTCTGTGCTGTGAC 3'	320
10	5' TCTAACCATCGCCAATGGAA 3' 5' GTCAAAGCTGCAGAAGATGA 3'	169
11	5' GCGACAAGAAGTTGAGACTCCGT 3' 5' TGTCGTATAACTCCTATTCCTCA 3'	142
12	5' GTTACTCACCAAAGAGATGGT 3' 5' CCCTGCTGGCTCAGGGACTC 3'	300
13	5' GCCACGACTTACCGATCTTG 3' 5' AAGGAGACAACGTCTGCTCG 3'	138
14	5' AGAGTCATTTATCTATTTTCTTCTAA 3' 5' GAAAGAGGGTAAATTATTTTACGTAC 3'	242
15	5' CCTCATCCAAATGTCCCCTGCATT 3' 5' CCACTTGGAAACATGCAGTCAAGTT 3'	319
16	5' ACTGCTTCTCCATGTTTACC 3' 5' ATGGACTCCGATGGGTAGTG 3'	304

A seqüência dos "primers" foi baseada na seqüência dos introns contíguos a cada um dos exons, conforme LEMAIRE *et al.* (1989) e YOSHIKAI *et al.* (1990). Na coluna à direita é indicado o tamanho do fragmento a ser amplificado (bp = pares de base). Para a amplificação dos exons correspondentes às inserções encontradas na isoforma β APP₇₇₀ (KPI e MRC-OX2) foram empregados os seguintes pares de "primers", respectivamente: 5'ATGCTAAATGTGGTTCCCA3' ; 5'CAGAGTCATGGCGAGAGAGA3' e 5'GAGCGCGCTTGGTTTTGTTGGAGGGACC3' ; 5'GCCGATCGCTGGAGTTATGTGAACCCAA3' .

foi descartada, o gel lavado em água destilada (duas trocas) e mantido submerso até ser observado em um transiluminador sob radiação UV e fotografado.

O tamanho do fragmento obtido foi estimado por comparação com os marcadores comerciais incluídos na eletroforese.

2.7 Análise de polimorfismo pela conformação da fita simples (SSCP)

A ocorrência de mutações na região codificadora do gene da β APP foi investigada pela técnica descrita por ORITA *et al.*, 1989.

Além do material dos indivíduos afetados pela Doença de Alzheimer, foi incluído DNA de indivíduos normais como controle, além de DNA obtido de dois indivíduos de uma família holandesa, ambos acometidos em vida de hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (HCHWA-D) (vide Introdução) e cuja sequência do gene da β APP foi determinada e parcialmente publicada (LEVY *et al.*, 1990). O DNA de indivíduos normais e dos indivíduos com HCHWA-D foi obtido a partir de tecido cerebral congelado e, no último caso, também a partir das leptomeninges, nas condições descritas acima (item 2.4).

2.7.1 "PCR"

A amplificação de cada um dos exons do gene da β APP foi realizada nas condições padronizadas previamente, conforme descrição no item 2.5. Entretanto, como o produto da reação seria analisado, em seguida, através da técnica de SSCP, a reação de amplificação, neste caso, foi realizada na presença de [α - 32 P]CTP (Du Pont NEN Products, Boston, MA).

A amplificação foi realizada em 10µl de tampão de reação, contendo 10 ng de DNA, 10µM da mistura de dNTP, 1µCi de [³²P] dCTP e 0.25 unidades de Taq DNA polimerase(Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN).

2.7.2 Preparação das amostras para eletroforese

Ao término da reação de amplificação, a mistura foi separada em duas alíquotas de 4µl. A uma delas foram acrescentados 6µl de T₁₀E₁ e 4µl de tampão da amostra e, em seguida, a mistura foi imediatamente congelada em gelo seco. A segunda alíquota foi submetida a desnaturação pela adição de 4µl de NaOH 0.08M a 2µl de T₁₀E₁ e 4µl de tampão da amostra. As amostras tratadas com NaOH foram então colocadas a 95°C por 10 minutos na máquina de PCR e, a seguir, imediatamente transferidas para gelo seco. As amostras foram mantidas congeladas nestas condições até serem submetidas à eletroforese a seguir.

2.7.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

As amostras desnaturadas foram submetidas à eletroforese para separação das fitas simples em um gel de poliacrilamida a 6% em TBE 1x com glicerol a 10%, em condições não desnaturantes. No mesmo gel foram também incluídas as amostras sem tratamento (não desnaturadas) e os controles (DNA de indivíduos normais).

A mistura para o gel descrita acima foi preparada em um béquer, sob agitação, a partir de uma solução estoque de acrilamida 40%, TBE estoque 10x e glicerol (item 2.2.10) em um volume final de 42ml. À mistura foram acrescentados 72µl de PSA 20% e 72µl de TEMED para a reação de polimerização. Imediatamente, todo o conteúdo do béquer foi vertido entre duas placas de vidro de 400x200 e 430x200mm, separadas por espaçadores acrílicos de 0.5mm e previamente vedadas com fita crepe. As placas foram colocadas sobre a bancada, em posição horizontal e um pente de mesma espessura (10

dentes) foi colocado no intervalo entre elas para a obtenção dos poços de aplicação das amostras .

Após a polimerização, a vedação inferior e o pente foram retirados e as placas com o gel foram colocadas em uma cuba para eletroforese vertical. A cuba foi completada com TBE 1x e a placa de vidro frontal coberta com uma placa de alumínio , contendo uma fita para controle da temperatura (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA) durante a corrida.

A eletroforese foi realizada a 8-10 Watts e o tempo de corrida (12-18 horas) para cada exon foi determinado a partir do tamanho do fragmento esperado, usando-se como referência o PCR padronizado no item 2.5. O controle de temperatura durante a corrida eletroforética foi realizado de modo a manter o gel em temperaturas inferiores a 20°C .

2.7.4 Preparação do gel para exposição ao filme de raio-X

Ao término da eletroforese, o gel foi retirado das placas de vidro por transferência para papel Whatman 3 MM, recoberto com filme plástico e colocado em um sistema automático de secagem (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA) a 80°C sob vácuo.

O gel seco foi exposto a uma chapa autoradiográfica com tela intensificadora a -70°C por 12 horas . O filme de raio X (X-Omat-R, Eastman Kodak, Rochester, NY) foi então revelado automaticamente nas condições especificadas pelo fabricante e o padrão de impressão da chapa foi analisado e comparado ao obtido para indivíduos normais, incluídos como controle.

2.8 Clonagem (sistema 1)

2.8.1 Preparação do Vetor

Como vetor foi utilizado o fago M 13 (M13 mp 18), preparado segundo o protocolo de SAMBROOK *et al.*(1988)

A digestão de 2 µg do vetor foi realizada com Sma I (10 unidades) (New England BioLabs, Beverly, MA) em um volume final de 200µl, tamponado nas condições adequadas para a enzima (item 2.2.11). A reação foi mantida a temperatura ambiente por 1 hora.

O produto da digestão foi tratado a seguir com fosfatase alcalina (1:10 000) (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis,IN) a 37°C por 1 hora. A enzima foi então inativada mantendo-se a mistura a 65°C por 10 minutos.

O material foi mantido à 4°C e a eficiência da preparação avaliada submetendo-se uma alíquota a eletroforese em gel de agarose nas condições descritas anteriormente (item 2.7).

2.8.2 Reação de Fosforilação

Alíquotas (1 a 5 µl) das reações de amplificação foram diluídas em um volume final de 12µl (ajustado com T₁₀E₁), contendo tampão quinase (1x) e ATP 5mM. Às amostras foi adicionada quinase (New England BioLabs, Beverly, MA)(1:10) e a reação ocorreu a 37°C por 1 hora. O material foi em seguida precipitado com etanol (2.5x V/V) a frio após adição de NaCl na concentração final de 0.2M, mantendo-se os tubos em gelo seco.

2.8.3 Reação de Ligação

O material precipitado foi inicialmente dissolvido em 6µl de T₁₀E₁ e o volume final ajustado com H₂O de modo a diluir o tampão ligase estoque para 1x (item

2.2.11), considerando a adição de 1 µl do vetor e 0.5µl da ligase (T4 DNA ligase)(New England BioLabs, Beverly, MA). Após centrifugação, a mistura foi incubada durante a noite, de modo que a reação iniciada a 4°C atingisse 16°C até o fim deste período. O produto da reação foi mantido em geladeira até ser usado para a transformação de células competentes de *E.coli*.

2.8.4 Preparação de Células Competentes

Células competentes de *E.coli* (linhagem JM 101), foram preparadas conforme protocolo detalhado em SAMBROOK *et al.*,1988.

Colônias foram inicialmente transferidas para um tubo plástico estéril (Falcon 2054, Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ) contendo meio líquido YT (2x) (aproximadamente 3ml/reação de ligação), utilizando-se uma alça plástica de inoculação. Os tubos foram tampados e o conteúdo gentilmente homogeneizado. O crescimento foi realizado a 37°C sob agitação (250 rpm) e monitorado espectrofotometricamente a 550 nm a intervalos de aproximadamente 40 minutos ($A_{550} = 0.3$).

As células foram então submetidas à centrifugação a 2.600 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células resuspendidas em CaCl_2 50 mM a 4°C e mantidas em gelo por 20 minutos. Ao fim deste intervalo, as células foram submetidas a nova centrifugação nas mesmas condições, resuspendidas na mesma solução (0.2 ml /reação de ligação) e incubadas em gelo por no mínimo 1 hora.

2.8.5 Transformação e Plaqueamento

A suspensão de células competentes foi distribuída em alíquotas de 200µl, em tubos mantidos em gelo. A cada uma delas foi adicionado o conteúdo de uma reação de ligação. Esta mistura foi, em seguida, incubada em gelo por 40 minutos.

Ao término deste período de incubação, cada preparação foi submetida a choque térmico por 2 minutos a 42°C.

Os tubos foram imediatamente retirados do bloco de aquecimento e, a cada um deles foram adicionados 35µl de BCIG (X-Gal), 35µl de IPTG para visualização dos recombinantes e mais 3 ml de H-Top Ágar (previamente fundido em forno de microondas) para plaqueamento. O conteúdo resultante, obtido para cada uma das preparações, foi rapidamente vertido sobre placas de Petri individuais, contendo meio YT 2x . Após solidificação desta camada superior, as placas foram transferidas para estufa e mantidas a 37° por 16 horas.

2.9 Clonagem (sistema 2)

Como alternativa para a clonagem dos exons correspondentes à $\beta/A4$ (exons 14 e 15) e do exon 16 (numeração relativa a APP 695), o vetor utilizado foi o plasmídeo pCR™ 1000 do Sistema TA Cloning™ (versão 1.1)(Invitrogen, San Diego, California).

2.9.1 Reação de ligação

As reações de ligação foram estabelecidas na relação molar (vetor: produto de PCR) de 1:1 ou 1:3 , usando-se 50 ng do vetor resuspenso em T₁₀E₁ em cada reação, na presença de T4 ligase (1µl/reação)(New England Biolabs, Beverly, MA). A incubação foi realizada a 12°C durante a noite .

2.9.2 Transformação e Plaqueamento

Células competentes (*E.coli*, INV α F') (LacI^q) foram transformadas nas condições descritas pelo fabricante (Invitrogen, San Diego, California). Foram utilizados 50 μ l da suspensão de células para cada reação de ligação/transformação.

Após choque térmico de 1 minuto a 42°C, as células foram mantidas em meio SOC (volume de 450 μ l/ligação) por exatamente 1 hora a 37°C com agitação (225 rpm).

Findo este intervalo, as células foram transferidas para gelo e, em seguida, plaqueadas (25 e 100 μ l) em meio LB-ágar, contendo kanamicina (50 μ g/ml) e X-gal (40 μ g/ml). As placas foram mantidas em estufa a 37°C por 16 a 40 horas.

2.10 Hibridização

2.10.1 Preparação dos filtros

Réplicas das placas foram obtidas por contato, cobrindo-se o meio com filtros de nitrocelulose (Schleicher & Schuell, Keene, NH). O material adsorvido ao filtro foi desnaturado mergulhando-se os filtros em solução desnaturante por 5 minutos (item 2.2.8.; n°3) e neutralizado a seguir por imersão dos filtros em solução neutralizante por 5 minutos (item 2.2.8.; n°5). Os filtros, colocados sob papel absorvente com a superfície de contato direto com o meio voltada para cima, foram mantidos à temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos para eliminação do excesso de líquido.

Os filtros foram então intercalados com papel de filtro Whatman 1 MM (Whatman Laboratory Products, Clifton, NJ), embrulhados em papel alumínio e mantidos em forno a 80°C por 3 horas a vácuo para a completa adsorção do material.

2.10.2 Pré-hibridização

Os filtros foram inicialmente mergulhados na solução de lavagem (item 2.2.8. ; nº4) que foi previamente aquecida a 68°C e lavados a 42°C em agitação durante 30 minutos. A solução foi então, descartada e, aos filtros, adicionados 10-12 ml de solução de hibridização. Este tratamento (pré-hibridização) foi realizado a 42°C sob agitação durante 3 horas.

2.10.3 Preparação das sondas

Os oligonucleotídeos (~ 20 pmoles) utilizados como sondas foram marcados diretamente por incorporação de [γ -³²P]ATP (Du Pont NEN Products, Boston, MA) (~34 pmoles/oligonucleotídeo) em um volume inicial de 11 μ l, contendo tampão quinase 1x.

A mistura foi aquecida a 70°C por 2 minutos e imediatamente transferida para gelo. Em seguida, após a adição de 0.5 μ l de quinase, a reação foi mantida a 37°C por 30 minutos. A mistura foi então, mais uma vez, aquecida a 70°C por 2 minutos e transferida para gelo. Foram adicionados 0.5 μ l de uma diluição a fresco de β -mercaptoetanol (1:100), mais 0.5 μ l de quinase e a mistura foi incubada novamente a 37°C por 30 minutos. Ao fim deste período, foram adicionados 2 μ l de EDTA 0.5 M pH 8.0 e o volume final completado para 100 μ l com H₂O.

Para separar o DNA radioativamente marcado do dATP precursor não incorporado, foi montada uma coluna de Sephadex G-25 (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, NJ) em H₂O dentro de uma seringa plástica de 1.0 ml, vedada com lã de vidro silicizada. A coluna foi primeiramente lavada com 200 μ l de H₂O (2 vezes) por centrifugação a 2 000 rpm a 4°C por 4 minutos. O material da reação foi então aplicado ao topo da coluna e esta submetida a uma nova centrifugação, nas mesmas condições. O DNA marcado foi coletado em um tubo eppendorf mantido sob a coluna durante a centrifugação.

No caso de plasmídeo (pA751, contendo a sequência nucleotídica APP751 em pGem) a marcação radioativa foi realizada por "nick translation", segundo SAMBROOK *et al.*, 1988.

Inicialmente foi realizada uma digestão de 10µg com EcoRI (50 unidades) (New England Biolabs, Beverly, MA) em um volume de 200µl a 37°C por 3 horas. Os produtos desta reação, submetidos em seguida à precipitação a frio, com etanol, foram redissolvidos em 15µl de H₂O, misturados a 10µl de tampão da amostra e separados por eletroforese a 80 V em gel de agarose 0.75% (Seaplaque, FMC Bioproducts, Rockland, ME) em TBE (1x), contendo brometo de etídeo (item 2.7). A eficiência da digestão foi avaliada pela detecção do fragmento de interesse por comparação com fragmentos de tamanho conhecido, produtos da digestão do DNA do fago λ por Hind III (New England BioLabs, Beverly, MA). A respectiva banda foi então recortada do gel sob exposição à luz UV, a agarose fundida como descrito acima (item 2.7.2) e o DNA extraído sucessivamente com fenol, fenol-clorofórmio e clorofórmio, de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, o material foi dissolvido em 12 µl de T₁₀E₁.

Para a marcação por "nick translation", uma alíquota contendo ~150 ng foi dissolvida em um volume final de 40µl, contendo tampão da reação (1x), dNTPs, DNA polimerase I (New England BioLabs, Beverly, MA), DNase (New England BioLabs, Beverly, MA) (item 2.2.7), 5µl de [α -³²P]dCTP (DuPont NEN Products, Boston, MA) e a mistura mantida a 12°C por 1 hora. Ao fim deste intervalo, o volume foi ajustado para 100µl com T₁₀E₁ e o excesso de material radioativo, não incorporado, eliminado por passagem em uma coluna de Sephadex G-50 sob centrifugação, utilizando-se o mesmo procedimento descrito no caso da marcação de oligonucleotídeos.

2.10.4 Hibridização e lavagem dos filtros

Para a hibridização, 50-100µl da sonda apropriada, marcada radioativamente, foram adicionados à solução de hibridização e a reação foi realizada em

média por 15 horas a 42°C sob agitação. No caso das sondas preparadas por "nick translation", após dissolução na solução de hibridização adequada, o DNA foi desnaturado em água em ebulição por 8 minutos, imediatamente transferido para um recipiente com gelo e, então, adicionado aos filtros.

Ao término da reação, a solução de hibridização foi retirada e os filtros lavados duas vezes com SSC 2x SDS 0.1% por cinco minutos à temperatura ambiente. Na segunda etapa de lavagem foi utilizada a mesma solução a 42°C por vinte minutos, sendo este procedimento repetido por duas vezes.

A radioatividade foi avaliada com um contador Geiger manual e, quando necessário, foi realizada uma terceira etapa de lavagem com SSC 0.5x, SDS 0.1% a 42°C durante 20-30 minutos.

2.10.5 Exposição dos filtros

Os filtros foram colocados em contato com uma chapa autoradiográfica (X-Omat-R, Eastman Kodak, Rochester, NY) com tela intensificadora e mantidos a -70°C por um período inicial de 6-8 horas. O filme de raio-X foi então revelado automaticamente nas condições especificadas pelo fabricante e, quando necessário, a exposição foi repetida por um período mais longo.

2.11 Eletroforese em gel de agarose

As eletroforeses em gel de agarose foram utilizadas com diferentes objetivos: clonagem, acompanhamento da digestão do vetor, avaliação da eficiência da reação de ligação, análise preliminar dos clones recombinantes e, no caso de algumas amostras de material fixado embebido em parafina, para purificação do fragmento de interesse obtido a partir da reação de amplificação.

2.11.1 Preparação do gel e eletroforese

As eletroforeses foram realizadas em agarose de baixo ponto de fusão (Nu Sieve, FMC Bioproducts, Rockland, ME) a 1% em TEA ou em TBE. A agarose misturada inicialmente ao tampão foi fundida em forno de microondas em potência média e resfriada até aproximadamente 60°C. Após adição de duas gotas da solução de brometo de etídio, a agarose foi cuidadosamente vertida em uma placa de acrílico devidamente vedada com fita crepe e mantida na posição horizontal. Em uma das extremidades, a uma distância de aproximadamente 2.0 cm da borda da placa foi colocado um pente acrílico (com doze dentes) de 2.5 mm de espessura a uma altura de 1.5 mm acima da base acrílica.

Após a polimerização do gel, o pente foi removido e o conjunto placa-gel colocado em uma cuba para eletroforese horizontal submersa.

As amostras, dissolvidas no tampão da amostra (item 2.2.6.; nº 2), foram aplicadas nos poços e submetidas inicialmente a uma corrente de 15 mA para entrada no gel. Em seguida, o gel foi totalmente recoberto com tampão (TEA ou TBE) e a corrida foi realizada a 80 V por aproximadamente 4 horas.

No caso a purificação de fragmentos amplificados, o gel foi tratado com uma solução de brometo de etídio (item 2.2.5.; nº 2) somente após a eletroforese. A imersão na solução foi realizada por 5 minutos, sendo o gel lavado em seguida duas vezes com água destilada.

2.11.2 Purificação dos fragmentos de DNA em agarose

A banda de interesse foi recortada do gel sob radiação UV e transferidas para um tubo eppendorf limpo.

A fusão da agarose foi realizada mantendo-se o tubo a 67°C por 10 minutos em um bloco de temperatura regulável. O volume foi estimado visualmente e aumentado em 5x com T₁₀E₁ previamente aquecido à mesma temperatura. A mistura foi

homogeneizada e a amostra foi extraída da agarose inicialmente com fenol, seguido de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1 V/V) e, finalmente, com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 V/V), conforme instruções do fabricante. O DNA na fase aquosa foi precipitado a frio com etanol, na presença de 0.25 volumes de acetato de amônio 10M, mantendo-se o tubo em gelo seco. O material foi então, submetido a centrifugação a 12000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta Pasteur. O precipitado foi seco a vácuo e, em seguida, resuspendido em 6µl de T₁₀E₁

2.12 Sequenciamento

2.12.1 Preparação do material para sequenciamento

Os clones positivos obtidos pelo método de clonagem 1 (item 2.9), foram coletados diretamente das placas com o auxílio de palitos esterilizados, usando-se como referência para a localização, além da cor, o padrão radioativo da autoradiografia e, então, transferidos individualmente para tubos contendo meio YT 2x (1.5 ml/tubo) com células de *E.coli* da linhagem JM101. O crescimento foi realizado sob agitação (250 rpm) a 37°C por 5 horas ou durante a noite.

Este material foi transferido para tubos eppendorf e preparado para sequenciamento de acordo com o protocolo descrito por SAMBROOK *et al.*(1988).

Após centrifugação a 9.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi transferido para tubos eppendorf limpos contendo 200µl de uma solução PEG 20% NaCl 2.5M. O material foi misturado e mantido à temperatura ambiente por 15 minutos. Uma nova centrifugação foi realizada a 12 000 rpm por 5 minutos e o precipitado dissolvido em 100µl de T₁₀E_{0.1}(Tris-HCl pH 7.5 com EDTA 0.1M pH 8.0) . O material foi submetido à extração com fenol e a fase aquosa precipitada em gelo seco com etanol a frio (1:2.5 V/V), na presença de acetato de sódio pH 5.5 na concentração final de 0.3M. O material precipitado foi recuperado por centrifugação e dissolvido em 30 ou 50µl de T₁₀E_{0.1}.

dependendo do período de crescimento utilizado: 5 horas ou durante a noite (15-16 horas), respectivamente.

Os clones recombinantes obtidos conforme a metodologia descrita no item 2.10 foram coletados nas condições especificadas acima . O crescimento foi realizado em meio líquido LB (2ml/tubo), contendo kanamicina (50µg/ml) durante a noite a 37°C . O conteúdo de cada tubo foi transferido para tubos eppendorf e submetidos a centrifugação a 12000 rpm por 5 minutos a 4°C. Após remoção do sobrenadante, o precipitado obtido de cada amostra foi resuspenso em 100µl de uma solução fria de glicose 50 mM EDTA 10mM pH 8.0 em Tris 75 mM pH 8.0, contendo lisozima 1mg/ml . As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por dois minutos e cada uma delas desnaturada pela adição de 200µl de uma solução de NaOH 0.2N SDS 1% , sendo então mantidas à temperatura ambiente por outros 2 minutos. Em seguida, após a adição de 150µl da seguinte solução: 60 ml de acetato de potássio 5M, 11.5 ml de ácido acético glacial, as amostras foram mantidas em gelo por 5 minutos e centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos limpos e submetidos à extração por fenol-clorofórmio. O DNA da fase aquosa, precipitado à temperatura ambiente com isopropanol (1:1, v/v) e coletado por centrifugação a 12 000 rpm durante 5 minutos, foi lavado com uma gota de etanol 70% e seco a vácuo. A seguir, este material foi dissolvido em 32µl de T₁₀E₁ e submetido à digestão enzimática com RNase (Sigma Chemical, St.Louis, MO) (concentração final de 20µg/ml) por 1 hora a 37°C, seguida de nova extração por fenol,(2x), clorofórmio e precipitação por etanol a frio nas condições de SAMBROOK *et al.*(1988) .

2.12.2 Reações

O método de sequenciamento utilizado foi o de SANGER *et al.*(1977), utilizando-se Sequenase TM (derivada da DNA polimerase do bacteriófago T7) (USB Corp., Cleveland OH) (TABOR & RICHARDSON,1987), versão 2.0 .

2.12.2.1 Reação de pareamento

O pareamento entre o DNA (DNA fita simples ou DNA fita dupla desnaturado) e o "primer" (M13 universal ou M13 reverso, USB, Cleveland, OH) foi realizado individualmente (uma reação para cada amostra a ser sequenciada) na relação de 0.5-1.0 pmol da amostra para 0.5 pmol do "primer", na presença do tampão de pareamento 1x (item 2.2.9, nº 4) em um volume final de 10µl .

Os tubos foram mantidos a 65°C por 2 minutos, resfriados à temperatura ambiente por no mínimo 30 minutos e transferidos, em seguida, para gelo.

2.12.2.2 Reação de marcação

Após a reação anterior, a cada uma das amostras foram adicionados os seguintes reagentes: 1µl de DTT 0.1 M, 2µl da mistura de nucleotídeos (item 2.2.9: nº 6), 0.5µl (aproximadamente 5µCi) de [α -³⁵S] dATP (DuPont NEN Products, Boston, MA) e 2µl (correspondente a 3 unidades) de uma diluição 1:8 da enzima sequenase no tampão apropriado (item 2.2.9; nº 5). As novas misturas foram incubadas por 2 minutos a 20°C .

2.12.2.3 Reação de término

Para cada uma das amostras submetidas à reação acima foram preparados 4 tubos eppendorf, sem tampa, contendo respectivamente 2.5µl de cada mistura de término com o dideoxinucleotídeo apropriado (item 2.2.9; nº 6): "T", "C", "G" e "A". Estes tubos foram, em seguida, pré-incubados a 37°C .

Ao término do tempo de incubação da reação de marcação descrita acima, uma alíquota de 3.5µl da mistura de reação foi transferida imediatamente para o tubo "T" pré-aquecido a 37°C . O mesmo procedimento foi repetido para cada um dos outros 3 tubos ("C", "G" e "A"). Após 2 minutos de incubação a 37°C, os tubos foram imediatamente centrifugados por 30 segundos a 10 000 rpm e, após adição a cada um

deles de 4µl da solução bloqueadora da reação (item 2.2.9; nº 5), os tubos foram submetidos imediatamente a uma nova centrifugação e, então, mantidos em gelo.

2.12.3 Eletroforese

As quatro reações de término, relativas a cada uma das amostras, foram submetidas a eletroforese em gradiente de poliacrilamida com uréia, de acordo com SAMBROOK *et al.*, 1988.

2.12.3.1 Montagem do gel

O gel foi montado entre duas placas de vidro (400x200 e 430x200 mm), separadas por espaçadores de plástico flexível de 0.5 mm de espessura. A face interna da placa recortada para o encaixe do pente (36 poços) foi impermeabilizada com uma solução siliconizada antes da vedação do conjunto com fita crepe.

Em dois béquers diferentes, mantidos sob agitação, foram colocados 35 ml da mistura A (0.5x TBE) e 7.0 ml da mistura B (2.5x TBE), respectivamente. Ao primeiro foram adicionados 60µl de uma solução de PSA a 20% e ao segundo 12µl da mesma solução. Em seguida, após a adição do mesmo volume de TEMED a cada uma das misturas (60 e 12µl, respectivamente), e, utilizando-se uma pipeta de 15 ml, 4.0 ml da mistura A foram rapidamente transferidos para o béquer com a solução B. Todo o conteúdo deste béquer foi imediatamente colocado entre as placas de vidro. Este procedimento foi a seguir repetido cuidadosamente com o conteúdo do outro béquer (solução A).

As placas de vidro foram posicionadas horizontalmente sobre a bancada e o pente colocado no espaço entre as placas, na fenda recortada na parte superior da menor delas.

2.12.3.2 Condições da eletroforese

Após a polimerização, as placas foram colocadas verticalmente na cuba de eletroforese e cobertas com uma placa de alumínio. O recipiente superior da cuba foi preenchido com TBE 0.5x e o inferior com TBE 1.0x. O pente foi então, cuidadosamente retirado e os poços lavados com o tampão da cuba.

As amostras foram aquecidas a 80-85°C por 5 minutos e volumes de 2-3µl aplicados em cada poço.

As corridas foram realizadas a 24 mA até que o corante da solução bloqueadora adicionada à amostra atingisse a extremidade inferior do gel.

Ao fim da corrida, as placas de vidro foram separadas com o auxílio de dois bisturis e o gel aderido à uma das placas foi transferido por contato para papel Whatman 3MM (Whatman Laboratory Products, Clifton, NJ), recoberto com filme transparente de PVC e seco à temperatura de 80°C sob vácuo como descrito anteriormente (2.8.4).

2.12.3.4 Autoradiografia

O gel seco foi colocado em contato com uma chapa autoradiográfica (X-Omat-R, Eastman Kodak, Rochester, NJ) sem tela intensificadora e mantido à temperatura ambiente por aproximadamente 16 horas antes da revelação. A revelação foi realizada em máquina automática, nas condições especificadas pelo fabricante do filme de raio-X.

2.13 Western blotting

2.13.1 Preparação das amostras

Foi utilizado material do paciente IV-13 (FAD 1), obtido a partir de cortes de tecido cerebral (lobo frontal e temporal) fixado em formalina e embebido em parafina. Estas amostras foram encaminhadas para a análise por Western blotting após terem sido submetidas a tratamento para a remoção da parafina (CASTAÑO, comunicação pessoal).

As amostras recebidas após este tratamento prévio, foram dissolvidas em ácido fórmico 98% e, submetidas à sonicação (4x 30 seg) e centrifugação a 10 000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi seco sob atmosfera de nitrogênio e dissolvido diretamente no tampão de amostra para eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (item 2.2.12; nº 7).

2.13.2 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS)

As eletroforeses em gel de poliacrilamida foram realizadas de acordo com o método descontínuo de LAEMMLI (1970) em condições desnaturantes, na presença de SDS, utilizando-se o sistema Mini-Protean II da Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA).

A mistura para o gel de separação foi preparada a 17% em Tris-HCl 0.375M pH 8.8 SDS 0.1% em um volume final de 11.25 ml/gel. Após a adição de 37.5µl de uma solução de PSA 10% e 7.5µl de TEMED, a mistura foi colocada entre duas placas de vidro (102x72 e 102x82 mm), separadas por espaçadores de 0.75 mm, de modo a se obter um mini-gel de aproximadamente 70mm de altura. A superfície foi cuidadosamente coberta com uma camada de aproximadamente 1 cm de butanol saturado com H₂O. Após a polimerização, a camada de butanol-H₂O foi descartada por inversão, as superfícies do gel lavada com H₂O desionizada e o gel de separação coberto pela mistura do gel de concentração, preparada a 5% em Tris-HCl 0.125M pH 6.8 SDS 0.1% em um volume final de 7.5 ml/gel, após adição de 38µl de PSA 10% e 3.8µl de TEMED. O pente para a obtenção dos poços foi inserido na solução do gel de concentração.

Após a polimerização do gel de concentração, o conjunto placas-gel foi colocado na cuba eletroforética, contendo tampão de corrida 1x (item 2.2.12.1; nº 6).

A eletroforese foi realizada inicialmente a 80V até que as amostras atingissem o limite de separação entre os dois géis. Em seguida, a corrida prosseguiu a 100V até que o azul de bromofenol do tampão da amostra atingisse a extremidade inferior do gel de separação.

2.13.3 Transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose

As proteínas separadas por eletroforese foram transferidas e imobilizadas em membrana de nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), de acordo com TOWBIN *et al.*, 1979.

A membrana foi inicialmente umedecida por capilaridade pelo contato com a superfície de água desionizada, tendo sido a seguir, mantida submersa por 5 minutos. Após este tratamento prévio, a membrana foi mergulhada no tampão de transferência (1x)(item 2.2.12.2) por 5 minutos.

Imediatamente após a eletroforese, o gel foi colocado sobre um pedaço de papel de filtro Whatman 3MM (Whatman Laboratory Products, Clifton, NJ) recortado exatamente do mesmo tamanho do gel e umedecido anteriormente com o tampão de transferência (1x). O gel foi então, recoberto com a membrana de nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) recortada no mesmo tamanho e preparada como descrito acima. Esta, por sua vez, foi coberta com outro pedaço de papel de filtro.

Este conjunto foi transferido para o interior do suporte plástico apropriado do equipamento utilizado e, em seguida, colocado em uma cuba acrílica, contendo tampão CAPS 1x pH 11 com metanol 10%. A transferência foi realizada por 1 hora a 400 mA, sob agitação.

2.13.4 Bloqueio da membrana e reação com o anticorpo primário

Ao término da transferência, as membranas foram lavadas com TBS e, então, mergulhadas em uma solução bloqueadora de leite em pó desnatado a 5% em TBS, contendo Tween 20 a 0.05%, de modo a evitar a adsorção inespecífica na etapa seguinte. A reação de bloqueio foi realizada sob agitação lenta por 3 horas à temperatura ambiente. Em seguida, a solução bloqueadora foi descartada e as membranas lavadas três vezes em TBS/Tween 20 0.05%, sob agitação, por cerca de 10 minutos cada vez.

Após as lavagens, cada membrana foi incubada durante a noite a 4°C com o anticorpo diluído 1:500 em TBS Tween 20 0.05%. Uma delas foi incubada com anti-SP 28, anticorpo policlonal contra um peptídeo sintético homólogo aos primeiros 28 aminoácidos da β -amilóide (CASTAÑO et al, 1986). A incubação da outra membrana foi realizada com anti-PrP, anticorpo policlonal contra a proteína componente dos prions (PRUSINER, 1992) (anticorpo gentilmente cedido pelo Dr. P. Brown). Ao fim do período de incubação, as membranas foram lavadas nas mesmas condições acima.

2.13.5 Reação imunoenzimática

Anticorpos de cabra contra imunoglobulinas de coelho (Tago, Burlingame, CA) e anticorpos de cavalo contra imunoglobulinas de camundongo, conjugados com fosfatase alcalina (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA) foram utilizados como segundo anticorpo para a detecção da eventual interação antígeno-anticorpo descrita acima. Estes anticorpos foram utilizados na diluição de 1:3000 em uma incubação por 2 horas à temperatura ambiente com agitação. As membranas foram a seguir, lavadas 3x com TBS por 10 minutos a cada troca.

Para a visualização do novo complexo imune, a reação enzimática foi realizada com 33 μ l de 5-bromo-4 cloro-3-indolil fosfato (BCIP) e 16.5 μ l de tetrazolio nitroblue (NBT)(Promega, Madison, WI.) em 5 ml de tampão Tris-HCl 0.1M NaCl 0.1M MgCl₂ 5 mM pH 9.5.

O desenvolvimento de cor foi observado cuidadosamente e, a reação interrompida com TBS/EDTA 20mM. A membrana foi em seguida lavada em água desionizada.

3. RESULTADOS

3.1 Isolamento do DNA

Foi obtido DNA a partir de tecido cerebral congelado, de amostras provenientes de indivíduos normais e de material patológico, seja de casos de doença de Alzheimer ou de casos de hemorragia cerebral hereditária com amiloidose do tipo holandês (HCHWA-D). Nos casos de doença de Alzheimer (TABELA II), as amostras obtidas a partir deste tipo de tecido estão relacionadas na TABELA III.

A dosagem da concentração de DNA das diferentes preparações com base nos valores de absorvância a 260 nm (A_{260}), onde 1 unidade de absorvância é equivalente a 50 μ g/ml de DNA de fita dupla, indicou um rendimento médio superior a 100 μ g/ml. A relação $A_{260/280}$ em todas essas preparações apresentou valores entre 1.8 - 2.0 . O mesmo padrão foi observado para o material isolado a partir de linfócitos, no caso de alguns dos indivíduos analisados na família FAD 1 (TABELA III)(FIGURA 3).

No entanto, essas observações não se repetiram uniformemente para todas as preparações obtidas a partir de tecido cerebral fixado embebido em parafina (TABELA III).

Resultados semelhantes aos acima só foram observados no caso da amostra 382 (FAD4). As dosagens das preparações originadas das amostras P (FAD7) e 260-III (FAD8) apresentaram valores iguais ou em torno de 50 μ g/ml. No caso das preparações obtidas da amostra 260-III, a relação de absorvância 260/280nm mostrou valores abaixo de 1.8 .

Estes últimos resultados foram repetitivos, apesar da utilização de dois métodos diferentes para a extração do DNA dessas amostras (vide Material e Métodos) e de cada procedimento ter sido repetido pelo menos três vezes para cada amostra, em preparações independentes.

3.2 Amplificação dos exons da APP

A amplificação dos diferentes exons da APP pela reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada, utilizando-se os "primers" ou iniciadores específicos, conforme descrito em Material e Métodos e apresentado na TABELA IV.

Com exceção do exon 15 (numeração da APP₆₉₅, correspondente ao exon 17 da APP₇₇₀), cuja reação de pareamento foi realizada nas mesmas condições descritas por LEVY *et al.* (1990), as condições ideais para a reação de pareamento para os demais exons foram determinadas experimentalmente.

As condições finais de temperatura e duração desta reação do ciclo de amplificação para cada um dos exons são mostradas na TABELA V. Variações no intervalo de tempo utilizado na reação de extensão também estão mostrados na mesma tabela.

Alíquotas das reações de amplificação de cada um dos exons do gene da APP foram preparadas, conforme descrito (item 2.6.2) e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida.

O material amplificado por PCR nas condições descritas para o exon 14 (numeração tomada da APP₆₉₅, correspondente ao exon 16 da APP₇₇₀), submetido à eletroforese, foi analisado após tratamento do gel com brometo de etídio.

TABELA V

Condições utilizadas na amplificação dos diferentes exons da β APP

EXON (APP ₆₉₅)	Condições da desnaturação	Reação de pareamento	Amplificação extensão	Número de Ciclos
1	94°C ; 1 min.	70°C ; 2 min.	72°C ; 2 min.	25
2	94°C ; 1 min.	70°C ; 2 min.	72°C , 2 min.	25
3	94°C ; 1 min.	65°C ; 1 min.	72°C ; 2 min.	25
4	94°C ; 1 min.	70°C ; 2 min.	72°C ; 2 min.	25
5	94°C ; 1 min.	56°C ; 2 min.	72°C ; 5 min.	25
6	94°C ; 1 min.	55°C ; 1 min.	72°C ; 2 min.	20
7	94°C ; 1 min.	56°C , 1 min.	72°C ; 2 min.	25
8	94°C ; 1 min.	42°C ; 2 min.	72°C ; 3 min.	25
9	94°C ; 1 min.	70°C ; 2 min.	72°C ; 3 min.	25
10	94°C ; 1 min.	55°C ; 1 min.	72°C ; 2 min.	20
11	94°C ; 1 min.	55°C ; 1 min.	72°C ; 2 min.	25
12	94°C ; 1 min.	56°C ; 2 min.	72°C ; 3 min.	25
13	94°C ; 1 min.	55°C ; 1 min.	72°C ; 2 min.	20
14	94°C ; 1 min.	62°C ; 1 min.	72°C ; 2 min.	25
15	94°C ; 1 min.	55°C ; 1 min.	72°C ; 2 min.	30
16	94°C ; 1 min.	55°C ; 1 min.	72°C ; 2 min.	25

As condições para a amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) dos diferentes exons foram determinadas experimentalmente. A numeração dos exons foi tomada da APP₆₉₅ de acordo com KANG *et al.*, 1987 e LEMAIRE *et al.*, 1989. A temperatura e o tempo utilizados para cada uma das três reações de um ciclo completo de amplificação (desnaturação, pareamento e extensão) estão indicados. Na coluna à direita está indicado o número de repetições do ciclo de amplificação utilizado para cada exon, respectivamente. Os dois exons que são expressos na isoforma APP₇₇₀ e identificados como as inserções ou domínios KPI e MRC-OX2 foram amplificados nas seguintes condições: desnaturação a 94°C ; 1 min.; pareamento a 56°C; 2 minutos e extensão a 72°C ; 2 minutos.

A inspeção do gel por transiluminação em luz UV, revelou a presença de uma única banda, correspondente a um único fragmento de 220 pares de base (FIGURA 4), conforme esperado (TABELA IV).

A análise da amplificação do exon 15 (APP₆₉₅) por eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada nas mesmas condições e é mostrada na FIGURA 5. Um único fragmento de 330 pares de base foi detectado para as diferentes amostras analisadas, conforme esperado com base nos "primers" utilizados (TABELA IV).

A amplificação dos demais exons, realizada nas condições descritas na TABELA V, a partir do DNA isolado de tecido cerebral ou de células sangüíneas do indivíduos afetados (TABELA III) e dos indivíduos normais, permitiu a obtenção de um único fragmento em cada caso, ou seja, para cada um dos exons, conforme a análise eletroforética do produto da reação (resultados não mostrados).

O material obtido a partir das amostras de tecido cerebral fixado (TABELA III), quando submetido a PCR para a amplificação dos exons 15 e 16 (APP₆₉₅), o primeiro comprometido com a codificação de parte da sequência da β -amilóide (região N-terminal) e o segundo com o domínio da APP inserido na membrana (englobando a região C-terminal da β -amilóide (exons 17 e 18 na numeração da APP₇₇₀), apresentou resultados variados.

Com exceção da amostra 382, cujos resultados de amplificação desses exons foram positivos e comparáveis aos das amostras de DNA não fixado, como pode ser observado na FIGURAS 5, por exemplo, a análise eletroforética da mistura de amplificação das demais amostras de material fixado e embebido em parafina, revelou que as reações ou não apresentaram resultados positivos ou não apresentaram a mesma eficiência. Como parâmetro de comparação foi utilizado o resultado de amplificação dos mesmos exons para a amostra 382 e para as demais amostras de DNA extraído de tecido cerebral ou de células sangüíneas (TABELA III).

Esta observação é ilustrada na FIGURA 6 para a reação de amplificação do exon 16. Além da ausência de produto de amplificação nas condições padronizadas para esta reação (TABELA IV), a presença de fragmentos de tamanho variável pode ser

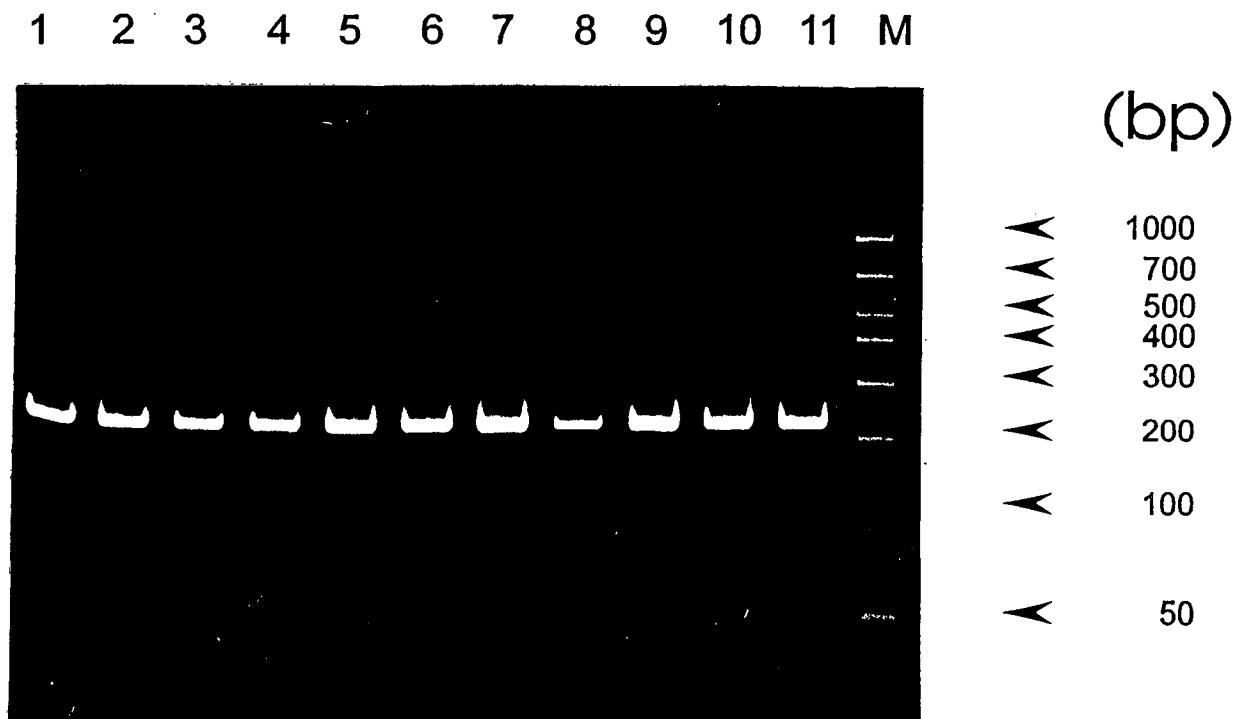


FIGURA 4: Eletroforese em gel de poliacrilamida (8.4%) do exon 14 (APP₆₉₅), amplificado nas condições mostradas na TABELA V. De cada uma das amostras de DNA foi obtido um único fragmento, como evidenciado após tratamento do gel com brometo de etídio (solução contendo 0.5µg/ml). Como controle foi incluído material de indivíduos não afetados (10 e 11 = controles normais). Fragmentos (fita dupla) de tamanho conhecido foram incluídos como marcadores (M) (Bio Marker Low, Bioventures, Inc.) e estão indicados à direita. Os fragmentos amplificados do DNA obtido de casos familiares de doença de Alzheimer (FAD) de manifestação precoce correspondem aos números de 1 a 8. Em (1) e (2), material amplificado a partir do DNA de dois membros (III-8 e IV-31) da família argentina, FAD 1; em (3) N.S. (FAD 2); em (4) 422 (FAD 5); em (5) CD, pertencente à família FAD 6; em (6) e (7), indivíduo 382 e, em (8) BRI., representantes das famílias FAD 4 e FAD 3, respectivamente. Em (9), Paciente (D), cuja patologia foi diagnosticada como hemorragia cerebral hereditária com amiloidose, tipo holandês (HCHWA-D).

(bp) = pares de base

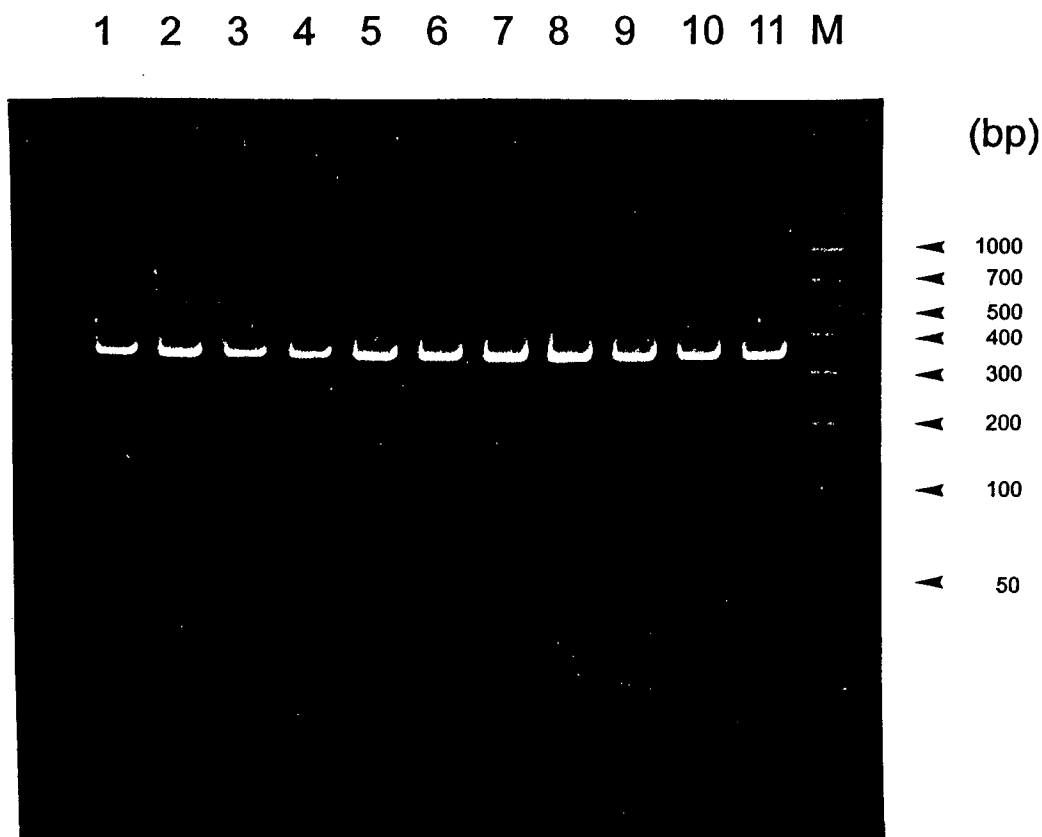


FIGURA 5: Análise eletroforética em gel de poliacrilamida (8.4%) dos produtos da reação de amplificação (PCR) do exon 15 (APP₆₉₅). Os fragmentos, detectados em UV por intercalação de brometo de etídio, foram obtidos após repetição por 30 vezes do ciclo de reações: desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento com os primers específicos (TABELA IV) a 55°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 2 minutos. Como marcadores (M), foram incluídos fragmentos de fita dupla de tamanho conhecido (em pares de base, bp) (Bio Marker Low, Bioventures, Inc.). Em (10) e (11), indivíduos não afetados (normais) e em (9) caso diagnosticado de amiloidose associada com hemorragia cerebral hereditária do tipo holandês (HCHWA-D), incluídos como controle . Em (1) e (3), material amplificado a partir do DNA extraído do paciente III-8 da família argentina, identificada como FAD 1. Em (2) e (4), amostras BRI e 422, respectivamente. Os fragmentos obtidos a partir dos casos de FAD 2 e FAD 6 estão mostrados em (5) e (6), correspondendo às amostras NS e CD. Em (7) e (8) material de duas preparações diferentes da amostra (382) de tecido cerebral fixado.

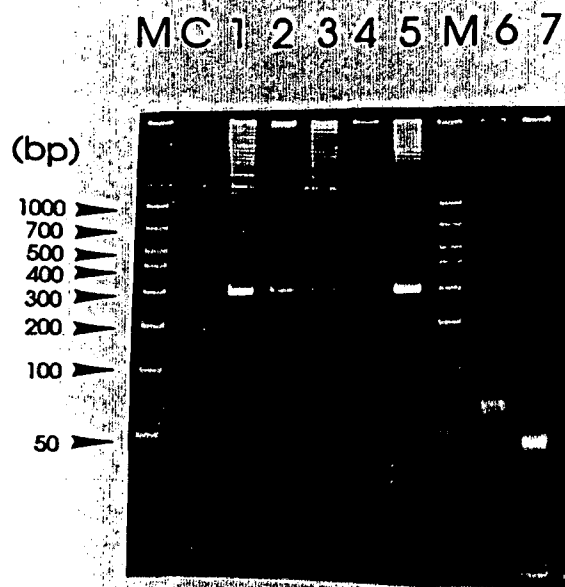


FIGURA 6 : Eletroforese em gel de poliacrilamida (8.4%) dos produtos da reação de ampliação do exon 16 (APP₆₉₅). Os fragmentos obtidos a partir de DNA genômico (1µg/reação) de sangue periférico ou cérebro congelado estão identificados como (1) 382; (2) III-8; (3) 422; (4) BRI e (5) controle (indivíduo normal não afetado). Os números (6) e (7) identificam duas amostras isoladas de tecido cerebral fixado, embebido em parafina: 260-III e P, respectivamente. A seta indica, no caso desta última amostra, a presença da banda correspondente ao fragmento esperado. Fragmentos de tamanho conhecido foram incluídos como marcadores (M) (Bio Marker Bioventura, Inc.) e estão indicados em pares de base (bp). A letra C identifica o controle da reação de amplificação, com DNA ausente da mistura da reação.

observada.

Esses fragmentos não correspondem àquele esperado, apresentando tamanho menor, não correspondente ao tamanho do exon em questão, tomando-se como referência o desenho dos primers utilizados e a sequência determinada por KANG *et al.*, 1987.

3.3 Triagem de mutações pontuais pela migração eletroforética das fitas simples

A presença de mutações de ponto em cada um dos exons da APP foi investigada, inicialmente, em função de alterações do padrão de mobilidade eletroforética das fitas simples, obtidas por desnaturação do fragmento correspondente, amplificado por PCR, nas condições descritas no item 2.7.

O padrão de migração eletroforética obtido para cada um dos exons, foi comparado àquele observado para os indivíduos normais, utilizados como controle.

Variações neste padrão de migração em relação àquele observado para os controles são interpretadas como sendo um reflexo de diferenças na sequência de nucleotídeos nos exons analisados. Estas diferenças na sequência, quando presentes, induzem uma mudança na conformação das fitas simples destes fragmentos. Esta mudança, por sua vez, é detectada pela alteração da mobilidade eletroforética dessas fitas, em condições não desnaturantes (ORITA *et al.*, 1989).

A FIGURA 7 mostra os resultados da análise desta possível alteração na sequência refletido na conformação das fitas simples (SSCP) para o exon 14, realizada para as diferentes amostras dos casos familiares e, para os controles nas condições descritas em Material e Métodos.

O produto da reação de amplificação do exon em questão foi desnaturado (2.7.2) e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% em condições não desnaturantes (2.7.3).

Na chapa autoradiográfica, além das bandas que correspondem às fitas simples (FS), resultantes do processo de desnaturação, também podem ser observadas as



FIGURA 7 : Autoradiografia da eletroforese em gel de poliacrilamida (6%) (16h; 60W) do exon 14 da APP (numeração correspondente a APP₆₉₅). O padrão de migração eletroforética no filme de raio X foi obtido pela amplificação do fragmento na presença de [α -³²P]dCTP. As setas indicam as amostras não desnaturadas (fita dupla, FD) e as amostras desnaturadas (fita simples, FS). Em (1) e (4), material amplificado a partir de DNA de indivíduo não afetado (N = controle normal). Em (2) e (3), indivíduo III-8, da família FAD1. O padrão de migração observado em (5), (6), (7) e (8), corresponde as outras famílias analisadas, representadas aqui pelos indivíduos, 422; NS; BRI e 382, respectivamente.

bandas que correspondem às fitas duplas (FD) (fragmento amplificado, não desnaturado), indicando que a desnaturação das amostras não foi completa.

A mobilidade eletroforética das fitas simples do fragmento correspondente ao exon 14 nos casos de Mal de Alzheimer de manifestação precoce pode ser comparada àquela apresentada pelas fitas simples do DNA controle, incluído no mesmo gel.

Esta comparação não mostra nenhuma diferença entre o perfil eletroforético dos indivíduos doentes e aquele dos indivíduos normais.

Os resultados da análise do padrão de migração eletroforética para o exon 16 podem ser vistos na **FIGURA 8**.

O padrão de mobilidade das fitas simples (FS) das diferentes amostras analisadas não apresentou alteração quando comparado àquela das fitas simples do material amplificado a partir de DNA de indivíduos normais. A mobilidade das fitas duplas (FD) de amostras não submetidas a desnaturação também pode ser observada para as amostras analisadas. Na análise foram também incluídos DNA normal, de um indivíduo não doente, como controle (vide figura).

A análise dos demais exons do gene responsável pela codificação do precursor da β -amilóide, realizada por SSCP a partir do DNA isolado de indivíduos afetados pelo Mal de Alzheimer, não revelou nenhuma variação na migração eletroforética das fitas simples em relação ao padrão obtido para as amostras de DNA isolado de indivíduos normais (resultados não mostrados).

3.4 Sequenciamento dos exons 14, 15 e 16 do gene da APP

Os clones positivos, obtidos a partir da amplificação do exon 14 do gene da APP, realizada como descrito em Material e Métodos (2.5) e, detectados por hibridização, foram preparados nas condições descritas (2.12.1) e submetidos a sequenciamento (SANGER *et al.* 1977).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

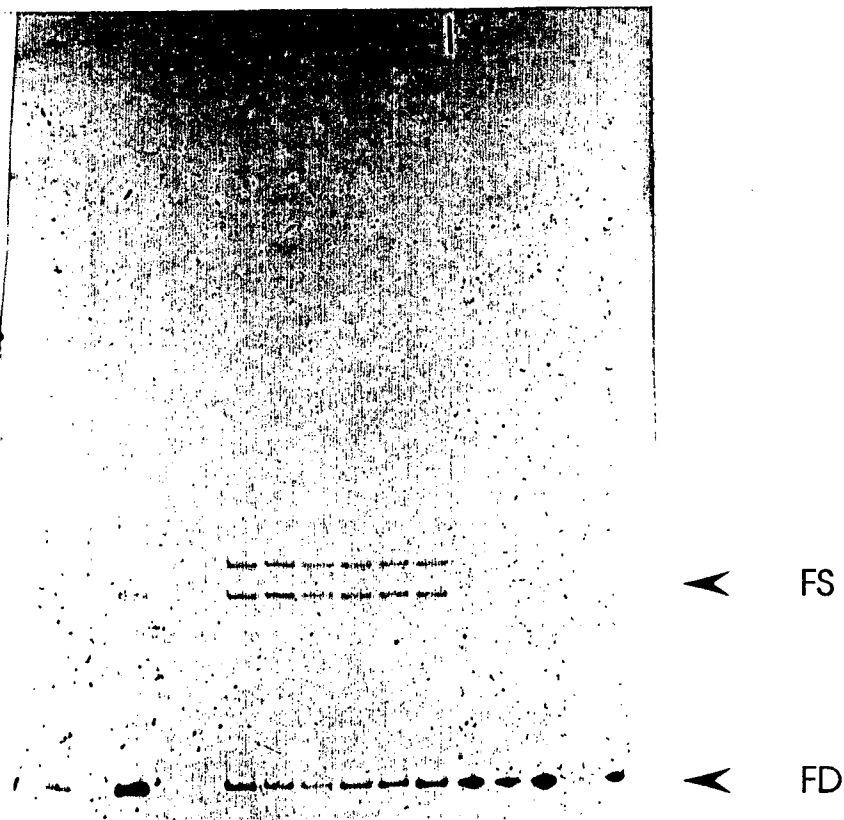


FIGURA 8 Análise do padrão de migração do exon (16) (APP_{695}). Os fragmentos obtidos da reação de amplificação na presença de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ foram submetidos diretamente a eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e são indicados como FD (fita dupla) em 1; 2 e de 9 \rightarrow 12. As fitas simples (FS) foram obtidas pela desnaturação das amostras antes da eletroforese. Em (1) e (5), DNA de indivíduo não afetado, incluído como referência para comparação. Em (2) e (3), material amplificado do indivíduo identificado como III-8. Em (4) e (10) paciente IV-31. Ambos da família identificada como FAD 1. Em (6) e (9), material correspondente ao indivíduo BRI (FAD 5); em (7) e (11), amostra N.S. (FAD2) e, em (8) e (12) paciente identificado como 422 (FAD5).

A autoradiografia do gel de sequenciamento do exon 14 pode ser vista na **FIGURA 9** para dois clones obtidos a partir do DNA isolado do paciente III-8 da família argentina, identificada como FAD 1.

Os dois clones, cujas seqüências são mostradas, representam uma amostragem do total de clones obtidos para este indivíduo (N=30) que tiveram suas seqüências determinadas. Esse total de clones analisados foram obtidos de três reações de amplificação (PCR) distintas.

A análise dos clones com a seqüência do exon 14 não revelou qualquer alteração de bases em relação à seqüência do mesmo exon em indivíduos normais, usada como controle. Nesta comparação com indivíduos normais foram utilizadas tanto seqüências determinadas por nós (cinco clones) como aquelas descritas na literatura (KANG *et al.*, 1987; GOATE *et al.*, 1991).

Este mesmo exon foi analisado nos demais indivíduos das famílias estudadas. Para cada um deles foi obtido o mesmo número de clones recombinantes a partir de três reações de amplificação independentes. As seqüências determinadas para estes clones não revelaram qualquer alteração de bases nesta região do gene da β APP nos indivíduos incluídos na presente investigação.

Para completar a caracterização da região codificadora da β -amilóide, o segundo exon envolvido na sua expressão, exon 15 (numeração tomado da APP₆₉₅) teve sua seqüência determinada a partir do material clonado como descrito em 2.8 e 2.9.

A seqüência de um dos clones obtidos do material do paciente III-8 (família argentina, FAD 1) pode ser vista na foto da autoradiografia mostrada na **FIGURA 10**.

A análise da seqüência correspondente ao códon 642 (códon 717 APP₇₇₀) neste paciente foi idêntica àquela observada em clones originados de DNA de indivíduos normais, usados como referência para comparação. Esta observação se repetiu em todos os demais clones obtidos para este indivíduo.

A análise deste mesmo codon para os demais indivíduos estudados revelou a seqüência GTC, encontrada nos indivíduos não afetados pela doença.

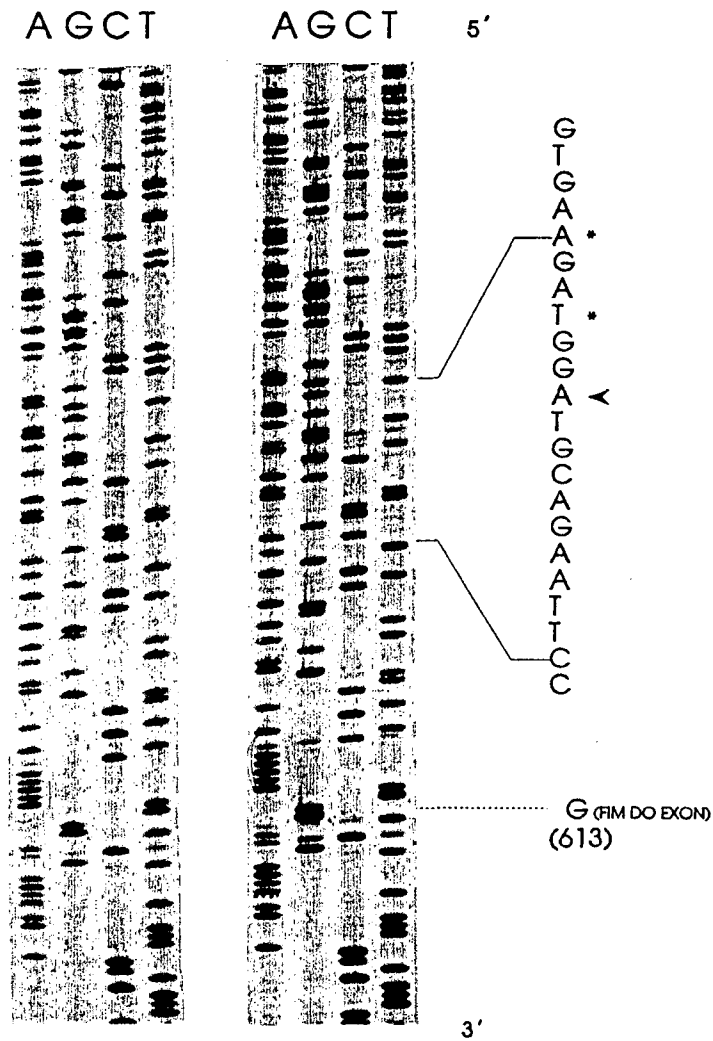


FIGURA 9 Autoradiografia do gel de seqüência do exon 14 do gene do precursor da β - amilóide (APP₆₉₅). São mostradas parte das seqüências de dois dos clones obtidos para o paciente III-8 da família FAD1. A seta à direita (\blacktriangleleft) indica o início da seqüência codificadora da β - amilóide. Os dois códons que o precedem estão assinalados (*). As letras A, G, T e C indicam os didesoxinucleotídeos utilizados em cada uma das reações. As substituições de base descritas neste exon em casos de doença de Alzheimer de manifestação precoce, envolvem os dois códons assinalados: AGA e TGG que codificam os aminoácidos lisina (LYS), e metionina (MET), respectivamente.

De modo semelhante, a análise do restante da sequência deste exon nos pacientes acometidos por Mal de Alzheimer com antecedente familiar de manifestação precoce, não revelou qualquer alteração em relação a sequência presente nos indivíduos normais em nenhum dos clones (N=30 por amostra), obtidos de diferentes reações de amplificação (N=3).

Isto inclui a posição relacionada à mutação observada nos pacientes com hemorragia hereditária com amiloidose do tipo holandês (HCHWA-D) (LEVY *et al.*, 1990). A ausência da substituição de C por G, associada a esta patologia, pode ser observada na sequência parcial do exon 15, mostrada na FIGURA 11.

A localização intracelular da região codificada pelo exon 16 na APP₆₉₅ e sua proximidade com a região transmembrana, parte da β -amilóide, nos levou a realizar o sequenciamento desta região do gene nos indivíduos estudados, completando a análise inicial por SSCP.

O sequenciamento do exon 16 nas seis famílias, representadas pelos indivíduos na III-8 e IV-31 na FAD 1; NS na FAD 2; BRI na FAD 3; 382 na FAD 4; 422 na FAD 5; e CD na FAD 6 não mostrou qualquer alteração na sequência nucleotídica em relação àquela determinada para indivíduos normais. Também neste caso, os clones analisados para cada paciente foram obtidos da repetição da reação de amplificação por três vezes, a partir de preparações diferentes para cada uma das amostras. Parte da sequência obtida para um desses clones está mostrada na FIGURA 12.

3.5 Western blotting

A análise do "immunoblotting" das proteínas dos depósitos amilóides do tecido cerebral do paciente IV-13, extraídas com ácido fórmico, mostrou a presença de uma banda imunoreativa com o anticorpo anti-SP28.

Com base nas proteínas utilizadas como marcadores de peso molecular, incluídas na separação por eletroforese e transferência, esta banda evidente apresenta

uma massa molecular de 16 kD. Este resultado é consistente com o padrão de polimerização da β /A4 observado em outros casos de Doença de Alzheimer (CASTAÑO *et al.*, 1986).

Não foi detectada reação positiva com o anti-PrP, conforme esquema apresentado na **FIGURA 13**. A ausência de reação da amostra com soro de coelho pré-imune, incluído como controle da reação imune, indica a especificidade do anticorpo utilizado no reconhecimento deste epitopo da β -amilóide.

A baixa recuperação dessa proteína, observada inclusive após transferência para membrana de PVDF, pode ser atribuída ao processo de fixação do tecido. Como consequência, não foi possível o microsequenciamento da região amino-terminal desta proteína dos depósitos amilóides de um dos casos de Alzheimer familiar de manifestação precoce investigados no presente estudo.

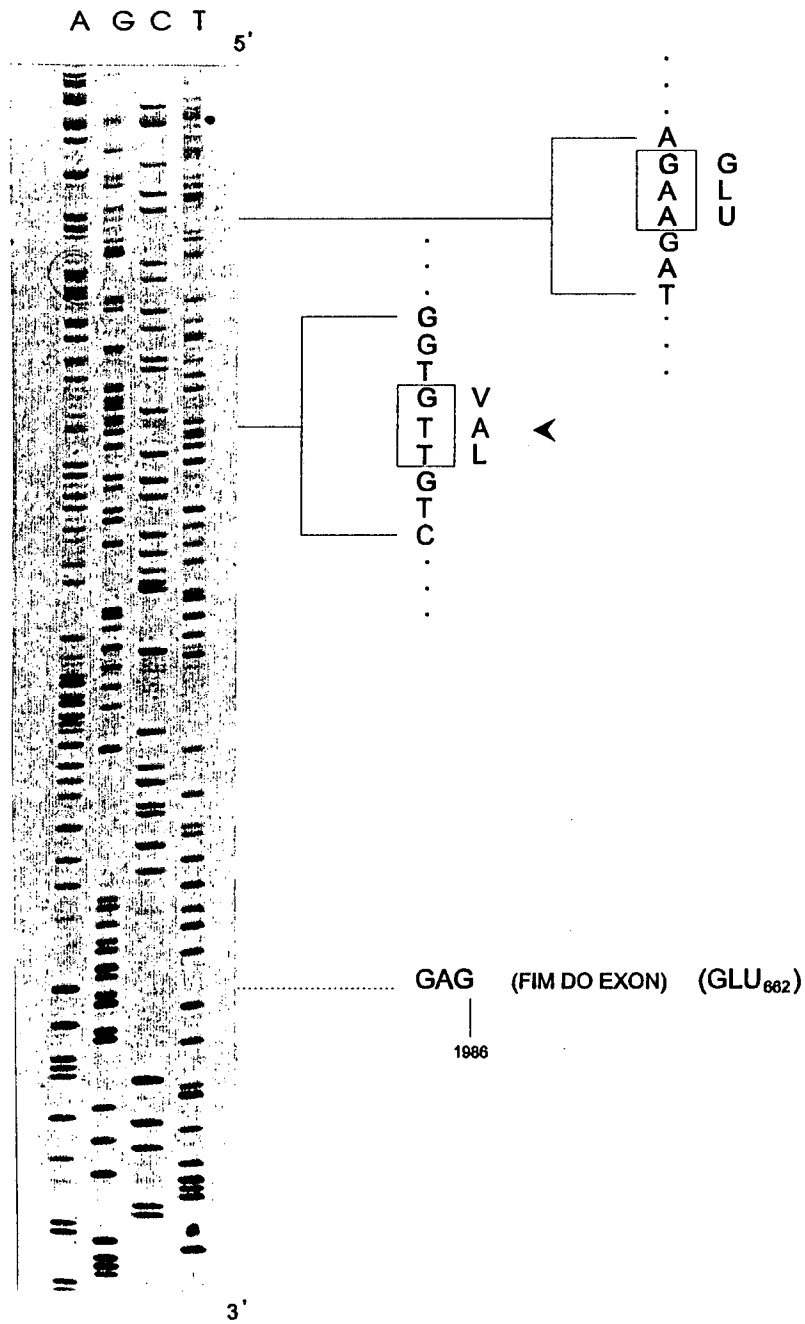


FIGURA 11 Sequência de parte do exon 15 da APP₆₉₅, obtida de material isolado do paciente III-8, um dos indivíduos analisados da família FAD1. Na sequência está incluída a posição da mutação descrita neste exon em pacientes com hemorragia cerebral hereditária com amiloidose do tipo holandês (HCHWA-D) (LEVY *et al.*, 1990). Nestes pacientes o códon GAA (GLU) está alterado para CAA (GLN). Esta mutação está localizada dentro da região codificadora da β -amilóide, cujo término está assinalado pela seta e, corresponde, neste caso, ao resíduo de valina (VAL) na posição 39 (resíduo 635 na APP₆₉₅; resíduo 710 na APP₇₇₀). A sequência deste clone é idêntica àquela de indivíduos normais.

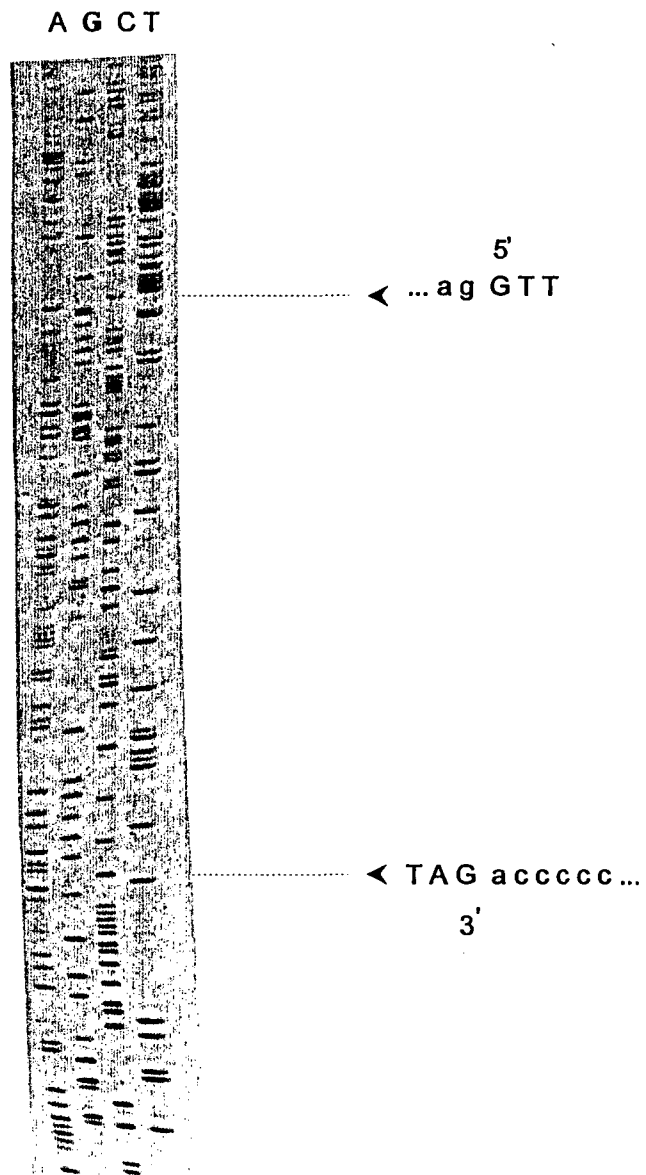


FIGURA 12 Autoradiografia do gel de sequência de um dos clones do exon 16 (APP_{695}), obtido do DNA isolado do paciente BRI (família FAD3). Parte da sequência destacada representa a região C-terminal do domínio intracelular do precursor da β -amilóide. Esta sequência é idêntica àquelas obtidas nos indivíduos normais, utilizados como controle. As letras minúsculas representam regiões dos introns.

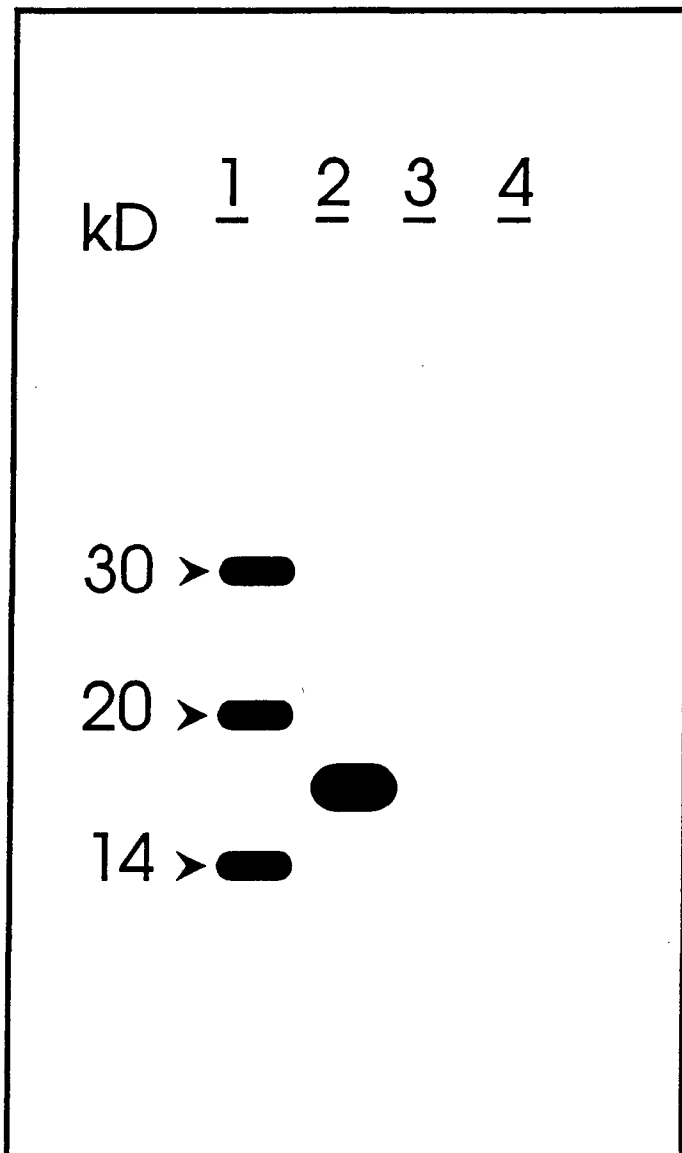


FIGURA 13: Esquema da reação imunoenzimática do Western blotting da proteína extraída dos depósitos encontrados no tecido fixado do paciente IV-13 da família FAD 1. Em (1): bandas correspondentes a proteínas utilizadas como marcadores de peso molecular (peso molecular aparente em kD). Em (2): uma banda de 16 kD, detectada pela reação com anti-SP28, utilizado como anticorpo primário. Em (3): ausência de imunoreação com soro pré-imune de coelho. Em (4): ausência de reação com anti-PrP, utilizado como anticorpo primário.

4. DISCUSSÃO

Um grupo de doenças neurodegenerativas que engloba a Doença de Alzheimer, esporádica e familiar, a hemorragia cerebral hereditária do tipo holandês (HCHWA-D), a angiopatia amilóide cerebral esporádica e a síndrome de Down, está relacionado com a deposição crônica no parênquima cerebral e/ou paredes vasculares de uma proteína de 39-42 resíduos de aminoácidos, a β -amilóide (GLENNER *et al.*, 1984; van DUINEN *et al.*, 1987; CORIA *et al.*, 1987; PRELLI *et al.*, 1988). Essa subunidade proteica, associada aos depósitos amilóides detectados nessas patologias, é o produto da degradação de uma glicoproteína de membrana, a β APP, amplamente distribuída nos diferentes tecidos (KANG *et al.*, 1987; WEIDMAN *et al.*, 1989).

Nos últimos 3-4 anos, o estudo, ao nível genético, da HCHWA-D e da doença de Alzheimer familiar de manifestação precoce, não só forneceu evidências irrefutáveis do papel patogênico da β APP nessas patologias, como sugeriu um possível papel patogênico para mutações presentes no gene desse precursor (LEVY *et al.*, 1991; HARDY *et al.*, 1992; CLARK & GOATE, 1993).

Das famílias estudadas no presente trabalho, uma delas, argentina, denominada FAD 1 (TABELA II e FIGURA 3), representa o "pedigree" melhor caracterizado, incluindo 5 gerações e mais de 110 indivíduos. Os dados clínicos disponíveis fornecem evidências para um diagnóstico de Alzheimer familiar de manifestação precoce (CASTAÑO, comunicação pessoal). A idade média de manifestação da doença é aos 38.9 anos de idade (N=10), incluindo 3 confirmações patológicas (idade média de morte= 48.5 anos de idade; N=7). A duração média da doença é de 7.6 ± 1.1 anos. Nos membros da quarta geração, a idade média de manifestação da doença ocorre aos 35 ± 2.2 anos, enquanto que nos membros da terceira, a média é igual a 41.5 ± 2.1 .

O padrão de transmissão sugere herança autossômica dominante. A maior parte dos membros da quarta geração não atingiu ainda a idade média de manifestação da doença, o que poderia explicar menos de 50% da incidência esperada. Por outro lado, outros fatores que não a idade podem estar afetando a penetrância neste "pedigree" (NEE *et al.*,1987).

Entre as famílias estudadas, a FAD 1 foi a única cuja origem foi bem analisada, sendo sua identidade étnica associada a índios sul-americanos nativos. Esta particularidade representa uma característica importante para a investigação de mutações no gene da β APP (GOATE *et al.*,1991). No entanto, a ocorrência de casamentos dentro de outros grupos étnicos ou raciais em tempos mais remotos não pode ser excluída. Esta observação se baseia no sobrenome e, também, na extensa colonização espanhola daquele país, em particular, na região noroeste, lugar de nascimento das três primeiras gerações (CASTAÑO, comunicação pessoal).

As demais famílias incluídas nesta investigação estão representadas por um único indivíduo e, apesar dos dados clínicos disponíveis e os antecedentes familiares permitirem associar estes casos à forma hereditária da doença com manifestação precoce, não foi possível estabelecer um "pedigree" confiável. Nenhuma particularidade em relação à ascendência desses indivíduos foi anotada entre os dados desses pacientes (WISNIEWSKI, comunicação pessoal).

No caso de duas famílias americanas, identificadas como FAD 4 e FAD 8 (indivíduo 382 e 260-III, respectivamente) e, da família argentina, identificada como FAD 7 (indivíduo P) (TABELA II), o material disponível para a obtenção de DNA era constituído exclusivamente por blocos com cortes de tecido cerebral fixado e embebido em parafina (TABELA III). Apesar disto não ter implicado dificuldades para as preparações realizadas com o material proveniente do indivíduo 382 (FAD 4), o mesmo não ocorreu no caso das preparações realizadas a partir dos blocos 260-III e P. A utilização de dois métodos diferentes (GOELZ *et al.*,1985;ROGERS *et al.*,1990), incluindo nos procedimentos, entre outras modificações, tratamento prévio com solvente orgânico, maior tempo de incubação com proteinase K, e, extração com fenol-clorofórmio, não acarretou alteração dos resultados negativos obtidos para essas duas amostras.

Este tipo de dificuldade pode ocorrer com material fixado, onde as condições da reação de fixação, particularmente o tempo entre a remoção cirúrgica do tecido e sua fixação, o tipo de fixador utilizado, o uso ou não de formalina tamponada e o tempo da reação, parecem ser críticas para a extração posterior e obtenção de boas preparações de DNA (GOELZ *et al.*,1985;DUBEAU *et al.*,1986;ROGERS *et al.*1990). A integridade do DNA ou, em outras palavras, a extensão de modificações ou "crosslinking" que a molécula pode sofrer parece estreitamente associada a esses fatores.

A degradação da molécula de DNA tem sido frequentemente observada em amostras armazenadas por longos períodos na forma de blocos de parafina ou em condições desfavoráveis ou, ainda, fixadas de modo não apropriado (WRIGHT & MANOS,1990). Apesar desta observação não ser relevante no caso da utilização do material extraído para PCR, onde, diferentemente da análise por Southern blot, DNA de alto peso molecular não é necessário, o procedimento usado na fixação dos tecidos pode reduzir a eficiência da amplificação (WRIGHT & MANOS,1990) ou, ainda, causar a inibição da reação (NUOVO *et al.*,1990).

A tentativa de superar esses possíveis efeitos inibitórios, incluindo pré-tratamento da amostra (vide Material e Métodos), extração com fenol-clorofórmio e precipitação com etanol, após a digestão com protease K, não se mostrou eficiente no caso das amostras mencionadas.

Dado que a quantidade de DNA (concentração ótima) para uma reação de amplificação é determinada por diferentes fatores e pode ser específica para cada amostra e, que, no caso de amostras fixadas, a quantidade deste no sobrenadante pode ser afetada por traços residuais do fixador, excesso de fragmentos de tecido, etc., várias concentrações da amostra foram testadas em diferentes reações de amplificação. No entanto, isso foi feito sem que qualquer diferença fosse detectada. Como já observado por outros autores, com diferentes materiais, a amplificação de preparações de tecido fixado e embebido em parafina é menos eficiente que amplificações realizada a partir de outros tipos de moldes, como DNA purificado ou extraído de material fresco ou tecido congelado, algumas modificações na mistura da reação foram realizadas, com o objetivo de compensar a eficiência reduzida da amplificação: concentração dos "primers" concentração da polimerase. Apesar desses

fatores não terem mostrado nenhum efeito na amplificação das amostras mencionadas, isto nem sempre é o caso, particularmente para seqüências de DNA que apresentam quantidade considerável de estrutura secundária, por exemplo (ROGERS *et al.*, 1990). Parâmetros, do ciclo também foram alterados: aumento do número de ciclos (40 ciclos) e aumento do tempo de cada uma das suas etapas (aumentos de 30 seg. a 1 min.). O aumento no número de ciclos de amplificação e o aumento dos intervalos de pareamento e extensão no caso dessas amostras, não resultou em reação positiva, mas, em alguns casos, foi detectada a presença de produtos não específicos, além daquele esperado (FIGURA 6).. Tais produtos, eram visíveis com brometo de etídio e se mostraram freqüentemente, menores que o produto específico. Resultados semelhantes com o uso de DNA molde proveniente de material fixado e embebido em parafina foram observados por outros autores (WRIGHT & MANOS, 1990). Essas observações levaram a exclusão das famílias FAD 7 e FAD 8 da presente investigação, uma vez que mesmo em caso de reação positiva, a presença de outros fragmentos não específicos e variabilidade nos resultados obtidos a partir de diferentes preparações dessas amostras prejudicariam, particularmente, a análise por SSCP.

As condições padronizadas para a amplificação dos diferentes exons da APP a partir do material isolado das demais famílias (TABELA III) mostraram-se eficientes, uma vez que somente um único fragmento do tamanho teoricamente esperado (TABELA IV) foi detectado pela análise eletroforética do material submetido à amplificação.

O material obtido da amostra 382 (FAD 4), de tecido fixado, apresentou um comportamento tão eficiente quanto as demais amostras obtidas de linfócitos ou de cérebro congelado e constitui uma exceção entre as amostras disponíveis em bloco de parafina. Esta observação corrobora a heterogeneidade exibida por preparações provenientes de tecido fixado, conforme observado por diferentes autores e discutido acima. No caso do exon 14, a detecção de outras bandas, além de esperada na reação de amplificação na presença de material radiativo, foi a única exceção observada para essa amostra e, este problema foi contornado com a purificação do fragmento desejado por eletroforese em agarose, antes da clonagem.

Do ponto de vista clínico, na FAD 1, a associação do caráter hereditário da patologia, os sinais de envolvimento do cerebelo (CASTAÑO, comunicação pessoal) e a

manifestação precoce da demência, levantou a possibilidade de um diagnóstico diferencial de Síndrome de Gerstmann-Straussler (GSS). Além disso, uma variante deste tipo de demência já foi erroneamente diagnosticada como Doença de Alzheimer, com base em dados clínicos e patológicos (NOCHLIN *et al.*, 1989).

A reação imune específica, detectada por Western blotting, do material extraído dos depósitos amilóides do paciente IV-13 com anticorpo policlonal contra a β -amilóide (resíduos 1→28; anti-SP28) e, a ausência de reatividade com anticorpo policlonal anti-PrP, corroboram o diagnóstico de Alzheimer Familiar neste caso.

Este resultado poderia ser ainda complementado com a utilização de outro anticorpo primário, como o 4G8, anticorpo monoclonal contra um peptídeo sintético, homólogo a seqüência dos resíduos 17→24 da β -amilóide (WISNIEWSKI *et al.*, 1990). Outra possibilidade inclui, ainda, a realização de uma eletroforese em gel de poliácridamida - tricina-SDS (SCHÄGGER & von JAGOW) a 16 % , sistema que permite uma boa resolução de proteínas pequenas, especialmente na faixa entre 5 e 20 kD. Deste modo, a detecção por immunoblotting de reação positiva com o mesmo anticorpo anti-SP-28 , poderia revelar a presença de outras bandas. Estas bandas seriam conseqüência de outras formas de agregação, normalmente encontradas entre os polímeros da β /A4, como uma banda de 8 kD, por exemplo (CASTAÑO *et al.*, 1986).

A seqüência da β /A4 das placas senis não pode ser obtida, devido à baixa recuperação das proteínas extraídas dos blocos do paciente IV-13. Este dado, seria relevante, uma vez que a seqüência da β /A4 de casos de doença de Alzheimer familiar não foi determinada. A seqüência da β /A4 de casos esporádicos de doença de Alzheimer mostrou heterogeneidade amino e carboxi-terminal. Enquanto a vascular apresenta 39/40 resíduos, a presente na placa senil apresenta, predominantemente, uma seqüência de 42/43 resíduos de aminoácidos (WISNIEWSKI & FRANGIONE, 1992). A determinação da seqüência a partir de material de casos de manifestação precoce com antecedente familiar, seria importante não só para comparação com aquela determinada em casos esporádicos, mas também com outros casos com o mesmo diagnóstico. A razão deste interesse é que poder-se-ia comparar seqüências originadas de genes com e sem mutações, uma vez que um papel patogênico foi sugerido para mutações encontradas em alguns casos de doença de

Alzheimer familiar, como a descrita no códon 717 da APP₇₇₀, valina é substituída por isoleucina, fenilalanina ou glicina (HARDY *et al.*, 1992).

Apesar de não ser conhecido um possível mecanismo através do qual essas mutações causem o fenótipo patológico da deposição precoce e acelerada da $\beta/A4$ nos casos familiares de manifestação precoce, foi demonstrado que células humanas em cultura, transfectadas com DNA que codifica a βAPP_{695} com a mutação dupla descrita em uma família sueca (MULLAN *et al.*, 1992) e, que afeta dois aminoácidos vizinhos à região amino terminal da $\beta/A4$ (posições 595 e 596 da βAPP_{695} , ou 670 e 671 na βAPP_{770}), produzem 6 a 8 vezes mais $\beta/A4$ que células que expressam a βAPP normal (CITRON *et al.*, 1992). Mutações também poderiam eventualmente estar associadas a algumas manifestações clínicas observadas em casos de Alzheimer familiar de manifestação precoce. Apesar de não se distinguir, do ponto de vista fenotípico, esses casos daqueles considerados esporádicos, distúrbios de linguagem e envolvimento do cerebelo podem ser características proeminentes no primeiro grupo (HESTON *et al.*, 1981). Além disso, a mutação da βAPP associada à variante holandesa da HCHWA que ocorre no resíduo 22 da $\beta/A4$ (LEVY *et al.*, 1990), aumenta o potencial amiloidogênico do fragmento, o que se revela em uma tendência maior de formar fibrilas (WISNIEWSKI & FRANGIONE, 1992).

A procura de alterações no gene do precursor da β -amilóide, na forma de mutações de ponto, foi conduzida, inicialmente, pela análise de mudanças no padrão de migração de fitas simples (SSCP; ORITA *et al.*, 1989), obtidas a partir da desnaturação dos diferentes exons amplificados. Esta técnica tem sido empregada também para a detecção de mutações de ponto em diferentes patologias (LABRUNE *et al.*, 1991; SAEKI *et al.*, 1991; BAUER-HOFMAN *et al.*, 1992; CALABRÒ *et al.*, 1993).

O padrão observado na migração eletroforética das fitas simples foi comparado com aquele obtido para indivíduos normais e com hemorragia cerebral hereditária com amiloidose, do tipo holandês (HCHWA-D). Além do controle normal, a inclusão dos exons amplificados a partir de DNA isolado de paciente com HCHWA-D é uma boa referência, uma vez que os 18 exons que codificam a isoforma APP₇₇₀ foram

sequenciados, e, com exceção da mutação encontrada no exon 17 (LEVY *et al.*,1990), nenhuma outra alteração foi detectada (VIDAL *et al.*,1991).

Um outro controle que poderia ter sido incluído na análise seria material amplificado a partir de DNA de macacos. Esta sugestão se baseia no fato de que representantes desse grupo de animais, particularmente no gênero *Macaca* sp., foi demonstrada uma correlação entre idade ou envelhecimento e a presença de depósitos amilóides na forma de placas senis no parênquima cerebral e nas paredes de alguns vasos (MARTIN *et al.*,1991). Esses depósitos são reconhecidos por anticorpos contra parte da seqüência da β -amilóide humana. Esta homologia, refletida em identidade antigênica, foi corroborada pela clonagem e sequenciamento de um cDNA que codifica a β APP de *M.fascicularis* (PODLISNY *et al.*,1991). Apesar da total homologia com a isoforma APP₆₉₅, a detecção de quatro substituições na isoforma 770 torna este material um bom controle para a padronização da técnica no caso do exon 7 e 8, em investigações futuras. Neste caso, a adequação dos "primers" deveria ser investigada.

Apesar de não ter sido detectada a presença de mutações de ponto nos diferentes exons do gene da β APP nas famílias analisadas, conforme indicado pelos resultados de SSCP, essa investigação foi, no caso dos exons 16, 17 e 18, ampliada através de clonagem e sequenciamento.

A escolha dos exons 16 e 17 se baseia no fato de que são eles os responsáveis pela codificação da subunidade β -amilóide encontrada nas placas senis e nos vasos cerebrais dos indivíduos afetados pela patologia. Além disso, a importância de se confirmar a ausência de alterações na seqüência desses fragmentos encontra respaldo na observação de que, até o momento, as mutações encontradas neste gene foram descritas nesses dois exons. Parte dessas mutações de ponto no gene da β APP tem como consequência substituições de aminoácidos localizadas próximas à extremidade N e C-terminal da seqüência da β /A4 ou no interior da mesma (vide FIGURA 1). A localização de tais alterações na seqüência da proteína pode ser crucial para o processo de clivagem proteolítica do precursor. Modificações nesse processamento poderiam ser consequência de alterações em posições críticas para o sítio de ação das enzimas proteolíticas, levando à formação da subunidade amilóide (SISODIA,1992). Essas mutações poderiam, por outro lado, conferir um potencial

amiloidogênico maior ao produto desta clivagem (LEVY & FRANGIONE,1991;JARRET *et al.*,1992). Isto pode levar à idéia de um papel amiloidogênico para estas mutações; hipótese elaborada por GOATE *et al.*,1991 a partir da descrição da primeira mutação associada a doença de Alzheimer familiar de manifestação precoce e demonstração de que não se tratava de um polimorfismo presente na população.

Frente a essas considerações, a clonagem e o sequenciamento do exon 18 foi também realizada, em função deste exon codificar o domínio citoplasmático da β APP. Além de alterações na estrutura do domínio transmembrana da APP, alterações na seqüência desta porção intracelular da molécula, próxima da posição 717 (posição 642 na APP₆₉₅), poderiam contribuir também para a formação do fragmento amilóide. Além do mais, a seqüência deste exon não tem sido incluída nas análises do gene da β APP, realizadas em casos familiares da doença.

A ausência de mutações de ponto nesses exons foi confirmada pelos dados de seqüência, através da comparação com seqüências obtidas de indivíduos normais.

Recentemente, vários trabalhos mostraram que mutações no gene que codifica a β APP, localizado no cromossomo 21, parecem ser a causa ou podem estar associadas à patologia em pelo menos um pequeno grupo de casos de doença de Alzheimer familiar de manifestação precoce, independentemente do grupo étnico (HARDY *et al.*,1992;CLARK & GOATE,1993).

Apesar disso, mutações no gene da β APP parecem ser responsáveis por somente uma pequena proporção dos casos de Alzheimer familiar de manifestação precoce, conforme sugerido por SCHELLENBERG *et al.*(1991); CRAWFORD *et al.*(1991) e, mais recentemente por LANNFELT *et al.*,1993.

De qualquer modo, os trabalhos realizados até o momento, têm tido como alvo de investigação somente os exons 16 e 17. Isto, restringe, a nosso ver, uma análise mais ampla da ocorrência e freqüência de alterações neste gene, bem como a avaliação de uma efetiva contribuição das mesmas para a manifestação da patologia. Um dos raros trabalhos que envolveu uma análise completa, mostrou a presença de uma mutação no exon 4, considerada, no entanto, não patogênica (VARELA *et al.*,1992).

Além dos exons propriamente ditos, a análise do restante da estrutura do gene, incluído aqui os introns e a região promotora poderia ser considerada para completar este quadro. Raciocínio análogo foi feito no caso de pacientes com HCHWA-D, onde foi descrita a primeira mutação no gene da APP, no exon 17. A seqüência completa deste gene nesses pacientes, no entanto, indicam que a alteração de guanina por citosina parece ser a única alteração presente, uma vez que as poucas alterações detectadas na seqüência dos introns 6, 9 e 13 (APP₆₉₅) foram também encontradas no DNA genômico de indivíduos normais e de indivíduos afetados pelo Mal de Alzheimer (VIDAL *et al.*, 1993).

O papel patogênico das mutações nesse tipo de manifestação familiar da doença se contrapõe a possíveis interações com outros fatores de risco, como fatores ambientais, por exemplo.

Além do mais, deve ser lembrado que a doença de Alzheimer familiar se mostra geneticamente heterogênea, podendo envolver *loci* adicionais no próprio cromossomo 21, bem como outros autossomos (van BROECKOVEN *et al.*, 1987; ST GEORGE-HYSLOP *et al.*, 1990; SCHELLENBERG *et al.*, 1992; HARDY & DUFF, 1993; CLARK & GOATE, 1993).

Estas observações são refletidas, por exemplo, no conceito da importância da participação dos "chaperones" no processo amiloidogênico (WISNIEWSKI & FRANGIONE, 1992), respaldado, recentemente, nos resultados de estudos em casos de recorrência familiar de manifestação tardia (SCHMECHEL *et al.*, 1993).

Além dos fatores discutidos acima, evidências recentes têm indicado que instabilidades ou uma variedade de anormalidades cromossômicas parecem estar associadas à doença de Alzheimer, podendo comprometer a integridade do DNA nos neurônios e células relacionadas. Um indicativo de uma maior fragilidade no cromossomo X, em casos familiares de doença de Alzheimer, foi obtido, por exemplo, nos estudos de ETTINGER *et al.* (1994) em células em cultura.

A caracterização de defeitos genéticos em outras famílias com demência de manifestação precoce e neuropatologia clássica da doença de Alzheimer, em particular como a FAD 1 apresentada no presente trabalho, pode contribuir para estabelecer

inequivocamente a frequência das mutações já descritas, bem como a identificação de outras proteínas que poderiam participar no processamento amiloidogênico da β APP

O conjunto de evidências resultante deste esforço poderia eventualmente contribuir para o entendimento dos eventos moleculares envolvidos na etiologia da doença de Alzheimer, abrindo novas perspectivas para tratamento e diagnóstico precoce.

5. RESUMO

A Doença ou Mal de Alzheimer, uma doença fortemente associada com o envelhecimento, tem como característica a diminuição das habilidades linguísticas e motoras, a perda da memória e a alteração de comportamento. Esses sintomas são, frequentemente, acompanhados por um quadro de demência.

A principal característica neuropatológica da doença é a deposição anormal, no cérebro, de uma proteína denominada β -amilóide. Esta proteína é produto da degradação de uma proteína precursora, muito maior, denominada de proteína precursora da beta-amilóide, β APP.

O gene responsável pela codificação da proteína precursora da β -amilóide, localizado no cromossomo 21, foi estudado em indivíduos afetados pelo Mal de Alzheimer que apresentavam antecedente familiar de manifestação precoce, com o objetivo de detectar possíveis mutações e confirmar uma possível correlação de mutações com esta forma de manifestação da doença.

Além dos membros de seis famílias afetadas, indivíduos normais e indivíduos portadores de hemorragia cerebral hereditária com amiloidose do tipo holandês (HCHWA-D) foram incluídos no presente estudo.

Os exons do gene da β APP foram amplificados pela reação em cadeia de polimerase (PCR) a partir de DNA extraído ou de tecido cerebral congelado, ou de linfócitos de sangue periférico, ou ainda de tecido fixado embebido em parafina. Os "primers" utilizados na reação foram sintetizados com base na sequência dos introns que delimitam cada um dos exons do gene da β APP. As condições de amplificação foram determinadas de modo a se obter uma única banda em gel de poliacrilamida.

Como indicador da ocorrência ou não de possíveis mutações de ponto nos 18 exons do gene que codifica a β APP (numeração tomada da isoforma APP₇₇₀), o padrão de migração eletroforética das fitas simples, obtidas da desnaturação dos segmentos amplificados na presença de [α^{32} -P]dCTP, foi analisado. O padrão da migração eletroforética destes exons, obtido para as diferentes amostras estudadas, quando

comparado àquele observado para indivíduos normais não indicou a presença de alterações que pudessem ser interpretadas como variações na sequência de bases dos diferentes exons do gene da β -APP .

Como a expressão dos exons 16 e 17 (numeração da APP₇₇₀) está relacionada aos depósitos amilóides cerebrais característicos da doença, estes exons foram clonados e seqüenciados. Os resultados do sequenciamento corroboraram a análise comparativa do padrão de migração eletroforética, uma vez que não revelaram qualquer alteração na sequência de nucleotídeos em comparação com os indivíduos normais. O mesmo foi observado em relação a sequência do exon 18 que codifica a região transmembrana da APP.

Os resultados apresentados indicam que as famílias estudadas pertencem ao grupo de famílias que não apresentam alterações no gene da β -APP .

Estes resultados dão suporte ao conceito de que mutações são responsáveis por somente uma pequena parcela dos casos hereditários do Mal de Alzheimer de manifestação precoce. Conseqüentemente, a hipótese de que outros fatores contribuam para a manifestação desta forma da doença e de que esses casos possam apresentar uma etiologia heterogênea deve ser considerada.

6. ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD), a disease strongly associated with aging, is characterised by impairments in language, memory and behaviour and can be associated with progressive dementia.

Typical neuropathology of AD comprises the abnormal deposition of β -amyloid peptide ($A\beta$) in the brain. $A\beta$ is a degradation product of a large precursor protein, β APP.

The gene located on chromosome 21 encoding the β -amyloid precursor protein was studied in patients whose available clinical data supported the diagnosis of early onset Familial Alzheimer's Disease (FAD).

The exons of the β APP gene were amplified by the polymerase chain reaction (PCR) from DNA extracted from frozen brain, blood cells or fixed paraffin-embedded tissue using oligonucleotide primers designed according to the intron sequences flanking each exon. The amplification conditions for each pair of primers were established in order to obtain a single band in polyacrylamide gels.

Search for abnormality in the β APP gene was conducted using single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP) of the different exons. The electrophoretic separation of denatured DNA amplified fragments was compared to DNA from normal controls as well as to DNA isolated from patients with Hereditary Cerebral Hemorrhage with Amyloidosis, Dutch type (HCHWA-D), the latter displaying a single mutation in exon 17 (numbering from the precursor protein isoform β APP₇₇₀).

No abnormalities were observed in any of the 18 exons of the β APP gene from the FAD patients studied as indicated by SSCP analysis.

Since point mutations in the β APP gene reported so far have been located within exons 16 and 17 that encode the β -amyloid subunit seen in Alzheimer's Disease, cloning and sequencing of these two exons were performed to confirm the absence of

mutations in these fragments. No differences were observed when these sequences were compared to normal controls.

Moreover, no abnormalities were detected after sequencing exon 18 in the FAD patients included in the present study.

The results presented here indicate that these kindreds belong to the group of FAD families without abnormality in the β APP gene.

These findings strengthen both the concept that mutations account for only a small proportion of early-onset FAD and the existence of other factors related to the manifestation of this form of the disease.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM,C.R.; SELKOE,D.J. & POTTER,H. Immunochemical identification of the serine protease inhibitor α_1 -antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease *Cell*,**52**:487-501,1988

AKAMATSU,Y. & BARTON,B.P. Neoplasms and amyloidosis in strains of mice treated with 3-methylcholantrene. *J.Natl.Cancer Inst.*,**52**:377-385,1974

ALZHEIMER,A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde *Allg.Z.Psychiatr.Psych.Gerichtl.Med.*,**64**:146-8,1907. Apud: UNTERBECK,A.; TRAPP,B.D.; SCANGOS,G & WIRAK,D. Amyloid β -protein gene in transgenic mice. In: Regulation and genetic control of brain amyloid. *Brain Res.Rev.*,**16**:94-5,1991

BAAS,P.W.; PIENKOWISKI,T.P. & KOSIK,K.S. Processes induced by tau expression in Sf9 cells have an axon-like microtubule organization. *J.Cell Biol.*,**115**:1333-1344,1991

BALBIN,M.; ABRAHAMSON,M.; GUSTAFSON,L.; NILSSON,K.;BRUN,A. & GRUBB,A A novel mutation in the β -protein coding region of the amyloid beta protein precursor (APP) gene. *Hum.Gen.*,**89**:580-2,1992

BARDIN,T.; KUNITZ,D.; ZINGRAFF,J.; VOISIN,M.; ZELMAR,A. & LANSAMAN,J. Synovial amyloidosis in patients undergoing long-term hemodialysis. *Arthritis Rheum.*,**28**:1052-6,1985

BAUER-HOFMAN,R.; KRESS,S. & SCHWARZS,S. Identification of point mutations at codon 61 of the c-Ha-ras gene by single-strand conformation polymorphism analysis. *Biotechniques*,**13**:192-3,1992

BENDITT,E.P. & ERIKSEN,N. Amyloid protein SAA is associated with high density lipoproteins from human serum. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*,**74**:4025-9,1977

BENOWITZ,L.I.; RODRIGUEZ,W.; PASKEVICH,P.; MUFSON,E.J.; SCHENK,D. & NEVE,E.L. The amyloid precursor protein is concentrated in neuronal lysosomes in normal and Alzheimer disease subjects. *Exp.Neurol.*,**106**:237-250, 1989

BENSON,M.D. Familial amyloidosis. *J.Int.Med.*,**232**:525-7,1992

BENSON,M.D. & WALLACE,M.R. Amyloidosis. In: *The metabolic basis of inherited disease*. SCRIVER,C.R.; BEAUDET,A.L.; SLY,W.S.& VALE,D. eds. McGraw-Hill, New York 6th ed. C.97 p.2439-2460, 1989

BLIN,N. & STAFFORD,D.W. A general method for the isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes.*Nucleic Acids Res.*,**31**:2303-8,1976

BLESSED,G.; TOMLINSON,B.E. & ROTH,M. The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Br.J.Psychiatry*,**114**:797-811,1968

BRENT,R. *Escherichia coli* - Media preparation and bacteriological tools. In: AUSUBEL,F.M.; BRENT,R.; KINGSTON,R.E.; MOORE,D.D.; SEIDMAN,J.G.; SMITH,J.A. & STRUHL,K. eds. *Short protocols in molecular biology*. 2nd.ed. Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons. New York, NY 1992

BRION,J-P.; HANGER,D.P.; BRUCE,M.T.; LOREK,A-M.; FLAMENT-DURAND,J. & ANDERSON,B.H. Tau in Alzheimer neurofibrillary tangles. *Biochem.J.*,**273**:127-133,1991

BRAAK,H. & BRAAK,E. Neuropathology staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropath.*,**82**: 239-259,1991

CALABRÒ,V; MASON,P.J.; FILOSA,S.; CIVITELLI,D.; CITTADELLA,R.; TAGARELLI,A.; MARTINI,G.; BRANCATI,C. & LUZZATTO,L. Genetic heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency revealed by single-strand conformation and sequence analysis. *Am.J.Hum.Genet.*,**52**:527-536,1993

CANDY, J.M.; OAKLEY, A.E.; KLINOWSKI, J.; PERRY, R.H.; ATACK, J.R.; PERRY, E.K.; FAIRBAIN, A. & EDWARDSON, J.A. Aluminosilicates contribute to senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Lancet*, **1**:354-6, 1986

CASTAÑO, E.M.; GHISO, J.; PRELLI, F.; GOREVIC, P.D.; MIGHELI, A. & FRANGIONE, B. *In vitro* formation of amyloid fibrils from two synthetic peptides of different lengths homologous to Alzheimer's Disease β -protein *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **141**:782-9, 1986

CASTAÑO, E.M. & FRANGIONE, B. Biology of disease: human amyloidosis, Alzheimer's disease and related disorders. *Lab. Invest.*, **58**:122-132, 1988

CHARTIER-HARLIN, M.-C.; CRAWFORD, F.; HOULDEN, H.; WARREN, A.; HUGHES, D.; FIDANI, L.; GOATE, A.; ROSSOR, M.; ROQUES, P.; HARDY, J. & MULLAN, M. Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the β -amyloid precursor protein gene. *Nature*, **353**:844-6, 1991

CITRON, M.; OLTERS DORF, T.; HAAS, C.; McCOLOGUE, L.; HUNG, A.-Y.; SEUBERT, P.; VIGO-PELFREY, C.; LIEBERBURG, I. & SELKOE, D.J. Mutation of the β -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases β -protein production. *Nature*, **360**:672-4, 1992

CLARK, R.F. & GOATE, A.M. Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.*, **50**:1164-1172, 1993

CONNORS, L.H.; SHIRAHANA, T.; SKINNER, M.; FENVES, A. & COHEN, A.S. *In vitro* formation of amyloid fibrils from intact β_2 -microglobulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **131**:1063-8, 1985

CORDER, E.H.; SAUNDERS, A.M.; STRITTMATTER, W.J.; SCHMECHEL, D.E.; GASKELL, P.C.; SMALL, G.W.; ROSES, A.D.; HANES, J.L. & PERCAK-VANCE, M.A. Gene dosage of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late-onset families. *Science*, **261**:921-3, 1993

CORIA, F.; CASTAÑO, E.M.; PRELLI, F.; LARRONDO-LILLO, M.; van DUINEN, S.; SHELANSKI, M.L. & FRANGIONE, B. Isolation and characterization of amyloid P

component from Alzheimer's disease and other types of cerebral amyloidosis. *Lab. Invest.*, **58**:454-7, 1988

CORRAL-DEBRINSKI, M.; HORTON, T.; LOTT, M.; SHAFFNER, J.; BEAL, F. & WALLACE, D.C. Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increased with advanced age. *Nature genetics*, **2**:324-9, 1992

CORRAL-DEBRINSKI, M.; HORTON, T. & WALLACE, D.C. Marked changes in mitochondrial DNA deletion levels in Alzheimer brain. *Genomics*, **23**:471-3, 1994

COSTA, P.P.; FIGUERA, A.S. & BRAVO, F.R. Amyloid fibril protein related to prealbumin in familial amyloidotic polyneuropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**:4499-4503, 1978

CRAWFORD, F.; HARDY, J.; MULLAN, M.; GOATE, A.; HUGHES, D.; FIDANI, L.; ROQUES, P.; ROSSOR, M. & CHARTIER-HARLIN, M-C. Sequencing of exons 16 and 17 of the β -amyloid precursor protein gene in 14 families with early onset Alzheimer's disease fails to reveal mutations in the β -amyloid sequence. *Neurosci. Letters*, **133**:1-2, 1991

DRECHSEL, D.N. et al. *Mol. Bio. Cell*, **3**:1141-1154, 1992 Apud: MANDELKOW, E-M & MANDELKOW, E. Tau as a marker for Alzheimer's disease. *Trends Biochem. Sci.*, **18**:480-3, 1992

DREWES, G.; LICHTENBURG-KRAG, B.; DÖRING, F.; MANDELKOW, E-M; BIERNAT, J.; GORIS, J.; DORÉE, M. & MANDELKOW, E. Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *EMBO J.*, **11**:2131-6, 1992

DUBEAU, L.; CHANDLER, L.A.; GRALOW, J.R.; NICHOLS, P.W. & JONES, P.A. Southern blot analysis of DNA extracted from formalin-fixed pathology specimens. *Cancer Res.*, **46**:2964-9, 1986

ESCH, F.S.; KEIM, P.S.; BEATHE, E.C.; BLACHER, R.W.; CULWELL, A.R.; OLTERS DORF, T.; McCLURE, D. & WARD, P.J. Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science*, **248**:1122-4, 1990

ESTUS,S; GOLDE,T.E. & YOUNKIN,S.G. Normal processing of the Alzheimer's Disease amyloid β protein precursor generates potentially amyloidogenic carboxyl-terminal derivatives. In: BANNER,C.D.B. & NIXON,R.A. eds. Protease and Protease Inhibitors in Alzheimer's Disease. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*,674:138-148, 1992

ETTINGER,S.; WEKSLER,M.E.; ZHOU,X.; BLASS,J. & SZABO,P. Chromosomal fragility associated with familial Alzheimer's disease. *Ann.Neurol.*,36:190-9,1994

FERNANDES, M.A.S.; SANTANA,I.; JANUÁRIO,C.; CUNHA,L. & OLIVEIRA,C.R. Decreased superoxide dismutase activity in erythrocytes from patients with Alzheimer's Disease. *Med.Sci.Res.*,21:679-682, 1993

FERRIS,D.K.; HAREL-BELLAN,A.; MORIMOTO,R.I.; WELCH,W.J. & FARRAR,W.L. Mitogen and lymphokine stimulation of heat-shock proteins in T-lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,85:3850-4,1988

FIDANI,L.; ROOKE,K.; CHARTIE-HARLIN,M-C.; CRAWFORD,F.; HUGHES,D.;GOATE,A.; HARDY,J. & MULLAN,M. Screening for mutations in the open reading frame and promoter of the β -amyloid precursor protein gene in familial Alzheimer's disease: identification of a further family with APP717 Val \rightarrow Ile. *Hum.Mol.Genet.*,1:165-8,1992

FITH,N.; BECKER,R. & HELLER,A. The inheritance of Alzheimer's disease: a new interpretation. *Ann.Neurol.*,37:359-363,1988

FOSTEIN,M.F.; FOLSTEIN,S.E.& McHUGH,P.R. Mini Mental State: a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J.Psychiatr.Res.*,12:189-198,1975

FRANGIONE,B.; MOLOSHOK,T. & SOLOMON,A. Primary structure of the variable region of a human λ VI light chain: Bence Jones protein SUT. *J.Immunol.*,131:2490.5,1983

FRIEDRICH,N. & KEKULÉ,A. Zur Amyloid frage. *Arch.Pathol.Anat.Physiol.Klin.Med.*,16:50-65,1859. Apud
GLENNER,G.G.;IGNACZAC,T.F. & PAGE,D.L. The hereditary amyloidosis. In:

STANBURY, J.B.; WYNGEARDEN, J.B. & FREDRICKSON, D.S. eds. **The metabolic basis of inherited disease**. 4th ed. New York, McGraw-Hill p.1308, 1978

GEJYO, F., YAMADA, T.; ODANI, S.; NAKAGAWA, Y.; ARAKAWA, M.; KUNITOMO, T.; KATAOKA, H.; SUSUKI, M.; SHIRAHAMA, T.; COHEN, A.S. & SCHIMID, K. A new form of amyloid protein associated with chronic hemodialysis was identified as β_2 -microglobulin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **129**:414-9, 1986

GHISO, J.; JENSSON, O. & FRANGIONE, B. Amyloid fibrils in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis of Icelandic type is a variant of gamma-trace basic protein (Cystatin C). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **83**:2974-8, 1986

GLENNER, G.G.; TERRY, W.; HARADA, M. & CUATRECASAS, P. Amyloid fibril proteins. Proof of homology with immunoglobulin light chains by sequence analysis. **Science**, **172**:1150-1, 1971

GLENNER, G.G., IGNACZAC, T.F. & PAGE, D.L. The hereditary amyloidosis. In: STANBURY, J.B.; WYNGEARDEN, J.B. & FREDRICKSON, D.S. eds. **The metabolic basis of inherited disease**. 4th ed. New York, McGraw-Hill 1978

GLENNER, G.G. & WONG, C.W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **120**:885-890, 1984

GLENNER, G.G. Alzheimer's disease. **J. Int. Med.**, **232**:533-4, 1992

GOATE, A.; CHARTIER-HARLIN, M.-C.; MULLAN, M.; BROWN, J.; CRAWFORD, F.; FIDANI, L.; GIUFFRÀ, L.; HAYNES, A.; IRVING, N.; JAMES, L.; MANT, R.; NEWTON, P.; ROOKE, K.; ROQUES, P.; TALBOT, C.; PERICAK-VANCE, M.; ROSES, A.; WILLIAMSON, R.; ROSSOR, M.; OWEN, M. & HARDY, J. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. **Nature**, **349**:704-6, 1991

GOEDERT, M.; WISCHIK, C.M.; CROWTHER, R.A.; WALKER, J.E. & KLUG, A.P. Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical

filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **85**:4051-5, 1985

GOELZ,S.E.; HAMILTON,S.R. & VOGELSTEIN,B. Purification of DNA from formaldehyde fixed tissue and paraffin embedded human tissue. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **30**:118-126, 1985

GOLDE,T.E.; CAIX D.; SHOIL,M. & YOUNKIN,S.G. Production of amyloid β -protein from normal amyloid β protein precursor (β APP) and the mutated β APPs linked to familial Alzheimer's disease. In: BANNER,C.D.B. & NIXON,R.A. eds. Protease and Protease Inhibitors in Alzheimer's Disease *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **674**:103-8, 1992

GOLDFARB,L.G.; BROWN,P. & CAJDUSEK,D.C. Multiple mutations in Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome. In: Regulation and genetic control of brain amyloid. *Brain Res.Rev.*, **16**:96-8, 1991

GOLDGABER,D.; LERMAN,M.I.; McBRIDE,O.W.; SAFFIOTTI,U. & GAJDUSEK,D.C. Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science*, **235**:877-880, 1987

HAAS,C.; SCHLOSSMACHER,M.G.; HUNG,A.Y.; VIGO-PELFREY,C.; MELLON,A.; OSTASZEWSKI,B.L.; LIEBERBURG,I.; KOO,E.H.; SCHENK,D.; TEPLow,D.B. & SELKOE,D.J. Amyloid β -peptide is produced by cultured cell during normal metabolism. *Nature*, **359**:322.5, 1992

HARDY,J. & ALLSOP,D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Biochem.Sci.*, **12**:383-8, 1991

HARDY,J. Framing β -amyloid. *Nature genetics*, **1**:233-4, 1992

HARTL,F-U; HLODAN,R. & LANGER,T. Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations. *Trends Biochem.Sci.*, **19**:20-5, 1994

HENDRIKS,L.; vanDUJN,C.M.; CRAS,P.; CRUTS,M.; vanHUL,W.; vanHARSKAMP,F.; WARREN,A.; McINNIS,M.G.; ANTONARAKIS,S.E.; MATIN,J.J.; HOFMAN,A. & VanBROECKHOVEN,C. Presenile dementia and

cerebral haemorrhage linked to a mutation at conon 692 of the β -amyloid precursor protein gene. *Nature Genetics*,1:218,1992

HENSLEY,K.; CARNEY,J.M.; MATTSON,M.P.; AKSENOVA,M.; HARRIS,M.; WU,J.F.; FLOYD,R.A. & BUTTERFIELD,D.A: A model for β -amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: Relevance to Alzheimer's disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,91:3270-4,1994

HESTON,L.L.; MASTR,A.R.; ANDERSON,V.E.; WHITE,J. Dementia of the Alzheimer type: clinical genetics, natural history and associated conditions. *Arch.Gen.Psych.*,38:1085-1090,1981

HOLTZMANN,D.M. & MOBLEY,W.C. Molecular studies in Alzheimer's disease. *Trends Biochem.Sci.*,16:140-4,1991.

HUFF,J.; AUERBACH,J.; CHAKRAVARTI,A & BOLLER,F. Risk of dementia in relatives of patients with Alzheimer's disease. *Neurology*,38:786-790,1988

ISERSKY,C.; EIN,D.; PAGE,D.L.; HARADA,M. & GLENNER,G.G. Immunochemical cross-reactions of human amyloid proteins with immunoglobulin light polypeptide chains. *J.Immunol.*,108:486-492,1972

ISOBE,T. & OSSERMAN,E.F. Patterns of amyloidosis and their association with plasma cell dyscrasis, monoclonal immunoglobulin and Bence Jones proteins. *N.Engl.J.Med.*,290:473-7,1984

IVANY,B. Frequency of light chain deposition nephrology in a necropsy study of patients with myeloma. *Arch.Pathol.Lab.Med.*,114:986,1990

JACOBSEN,J.S.; MUERKEL,H.A.; BLUME,A:J: & VITEK,M.P. A novel species specific mRNA related to alternatively spliced amyloid precursor protein mRNAs. *Neurobiol.Aging*,12:575-583,1991

JARRET,J.T.; BERGER,E.P. & LANSBURY,Jr., P.T. The C terminus of the β -protein is critical in amyloidogenesis. In: BARNNER,C.D.B. & NIXON,R.A. eds. *Protease and Protease Inhibitors in Alzheimer's Disease*. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*,674:144-8,1992

- JOHNSON,D.A.; GAUTSCH,J.W.; SPORTSMAN,J.R. & ELDER,J.H. Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. *Gene Anal. Tech.*,1:3-8,1984
- JONES,C.T.; MORRIS,S.; YATES,C.M.; MOFFOOT,A.; SHARPEC,C.; BROCK,D.J.H. & St.CLAIR,D. Mutation in codon 713 of β -amyloid precursor protein gene presenting with schizophrenia. *Nature Genetics*,1:306-9,1992
- KANG,J.; LEMAIRE,H-G.; UNTERBECK,A.; SALBAUM,J.M.; MASTERS,C.L.; GRZESCHIK,K-H.; MULTHAUP,G.; BEYREUTHER,K. & MÜLLER-HILL,B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*,325:733-6,1987
- KARLINSKY,H.; VAULA,G.; HAINES,J.L.; RIDGLEY,J.; MOTTILLA,M.; TUPLER,R.G.; PERCY,M.E.; ROBITAILLE,Y.; NOLDY,N.E.; YIP,T.C.K.; TANZI,R.E.; GUSELLA,J.F.; BECKER,R.; BERG,J.M.; CRAPPER McLAHLAN,D.R. & ST GEORGE-HYSLOP,P.H. Molecular and prospective phenotypic characterization of a pedigree with familial Alzheimer's disease and a missense mutation in codon 717 of the β amyloid precursor protein gene . *Neurology*,42:1445 1453,1992
- KITAGUCHI,N.; TAKAHASHI,Y.; TOKUSHIMA,Y.; SHIOJIRI,S. & ITO,H. Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature*,331:530-2,1988
- KÖNIG,G.; MÖNNING,U.; CZECK,C.; PRIOR,R.; BANATI,R.; SCHREITER_GASSER,U.; BAUER,J.; MASTERS,C.L. & BEYREUTHER,K. Identification and differential expression of a novel alternative splice isoform of the β A4 amyloid precursor protein (APP) mRNA in leukocytes and brain microglial cells. *J.Biol.Chem.*,267:10804-9,1992
- KOSIK,K.S Alzheimer's Disease: a cell biological perspective. *Science*,256:780-2,1992
- KYLE,R.A. & GERTZ,M.A. Amyloidosis. In: Wiernik,P.H.; Carnellos,G.P.; Kyle,R.A.; Schiffer, C.A. eds. *Neoplastic diseases of the blood*. New York, Churchill Livingstone. 1991: 525-70 .
- KYLE,R.A. Amyloidosis. *J.Int.Med.*,232:507-8,1992a.

KYLE,R.A. Primary systemic amyloidosis. *J.Int.Medicine*,**232**:523-4,1992b.

LABRUNE,P.; MELLE,D.; REY,F.; BERTHELON,M.; CAILLAUD,C.; REY,J.; MUNNICH,A. & LYONNET,S. Single-strand conformation polymorphism for detection of mutations and base substitutions in phenylketonuria. *Am.J.Hum.Genet.*,**48**:1115-1120,1991

LAEMMLI,U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*,**227**:680-1970

LANNFELT,L.; VIITANEN,M.; JOHANSSON,K.; AXELMAN,K.; LILIUS,L.; ALMQVIST,E. & WINBLAD,B. Low frequency of the APP 670/671 mutation in familial Alzheimer's disease in Sweden. *Neurosci.Lett.*,**153**:85-7,1993

LEMAIRE,H.G.; SALBAUM,J.M.; MULTHAUP,G.; KANG,J.; BAYNEY,R.M.; UNTERBECK,A.; BEYREUTHER,K. & MULLER-HILL,B. The preA4695 precursor protein of Alzheimer's disease A4 amyloid is encoded by 16 exons *Nucl.Acid Res.*,**17**:517-522,1989

LEVINE,R.L. Oxidative modification of glutamine synthetase. I . Inactivation is due to loss of one histidine residue. *J.Biol.Chem.*,**258**:11823-7,1983

LEVY,E.; LOPEZ-OTIN,C.; GHISO,J.; GELTNER,D. & FRANGIONE,B. Stroke in iceland patients with hereditary amyloid angiopathy is related to a mutation in the cystatin C gene, an inhibitor of cysteine proteases. *J.Exp.Med.*,**169**: 1771-8,1989

LEVY,E.; CARMAN,M.D.; FERNANDEZ-MADRID,I.J.; POWER,M.D.; LIEBERBURG,I.; vanDUINEN,S.G.; BOTS,G.T.A.M.; LUYENDIJK,W & FRANGIONE,B. Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science*,**248**:1124-6,1990

LEVY,E. & FRANGIONE,B. Familial Alzheimer's disease. *Curr.Op.Biol.*,**1**:312-4,1991

LEWIN,B. *Genes IV*. Oxford University Press. Oxford 4th ed. p.71 1990

- LIEPNIEKS,J.J.; GHETTI,B.; FARLOW,M.; ROSES,A.D. & BENSON,M.D. Characterization of amyloid fibril β peptide in familial Alzheimer's disease with APP717 mutations *Biochem.Biophys.Res.Comm.*,**197**:386-392,1993
- LIN,F-H.; LIN,R.; WISNIEWSKI,H.M.; HWANG,Y-W.; GRUNDKE-IQBAL,I.; HEALY-LOVIE,G. & IQBAL,K. Detect of point mutations in codon 331 of mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 2 in Alzheimer's brains. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*,**182**:238-246,1992
- LUCOTTE,G.; BERRICHE,S. & DAVID,F. Alzheimer's mutations. *Nature*,**351**:530-2,1991
- MAHLEY,K.W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in biology. *Science*,**240**:622-630,1988
- MANDELKOW,E-M. & MANDELKOW,E. Tau as a marker for Alzheimer's disease. *Trends Biochem.Sci.*,**18**:489-4,1993
- MASTERS,C.L.; SIMMS,G.; WEINMAN,N.A.; MULTHAUP,G.; McDONALD,B.L.; BEYREUTHER,K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,**82**:4245-9,1985
- MARTIN,L.J.; SISODIA,S.; KOO,E.H.; CORK,L.C.; DELLOVADE,T.L.; WEIDMANN,A.; BEYREUTHER,K.; MASTERS,C. & PRICE,D.L. Amyloid precursor protein in aged nonhuman primates. *ProcNatl.Acad.Sci.*,**88**:1461-5,1991
- MCKHANN,G.; DRACHMAN,D.; FOLSTEIN,M. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of the Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology*,**34**:939-944,1984
- MEEK,R.L.; HOFFMAN,I.S.; BENDITT,E.P. Amyloidogenesis: one serum amyloid A isotype is selectively removed from circulation. *J.Exp.Med.*,**163**:499-510,1986
- MILLER,J.H. *Experiments in molecular biology*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press,1972

MOUNTJOY,C.Q.; TOMLINSON,B.E. & GIBSON,P.H. Amyloid and senile plaques and cerebral blood vessels. A semi-quantitative investigation of a possible relationship. *J.Neurol.Sci.*,57:89-103,1982

MULLAN,M.; CRAWFORD,F.; AXELMAN,K.; HOULDEN,H.; LILIUS,L.; WINBLAD,B. & LANFELT,L. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of β -amyloid. *Nature Genetics*,1:345-7,1992

MÜLLER-HILL,B. & BREYREUTH,K. Molecular biology of Alzheimer's disease. *Annu.Rev.Biochem.*,58:287-307,1989

MURREL,J.; FARLOW,M.; GHETTI,B.; BENSON,M.D. A mutation in the amyloid precursor protein Associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science*,254:97-9,1991

NARUSE,S.; IGARASHI,S.; KOBAYASHI,H.; AOKI,K.; INUZUKA,T.; KANEKO,K.; SHIMIZU,T.; IIHARA,K.; KOJIMA,T.; MIYATAKE,T. & TSUJI,S. Missense mutation Val→Ile in exon 17 of amyloid precursor protein gene in Japanese familial Alzheimer's disease. *Lancet*,337:978-9,1991

NEE,L.; ELDRIDGE,R. & SUNDERLAND,D.T. Dementia of the Alzheimer type: clinical and family study of 22 twin pairs. *Neurology*,37:359-363,1987

NICHOLS,W.C.; GREGG,R.E.; BREWER,H.B. & BENSON,M.D. A mutation in apolipoprotein A-1 in the Iowa type of familial amyloidotic polyneuropathy. *Genomics*,8:318-323,1990

NOCHLIN,D.; SUMI,S.M. & BIRD,T.D. Familial dementia with PrP positive amyloid plaques: a variant of Gerstmann-Straussler Syndrome. *Neurology*,39: 910-8, 1989

NUOVO,G.J. Human papillomavirus DNA in genital tract lesions histologically negative for condylomata. *Am.J.Surg.Pathol.*,14:643-651,1990

ORITA,M.; SUSUKI,Y.; SEKIYA,T. & HAYASHI,K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction *Genomics*,5:874,1989

OLIVER,N.; STARKE-REED,P.E.; STADTMAN,E.R.; LIU,G.J.; CAREY,J.M. & FLOYD,R.A. Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*,**87**:5144-7,1990

PANTELAKIS,S. *Monatsschr.Psychiatr.Neurol.*,**128**:219-256,1954. Apud: MÜLLER-HILL,B. & BEYREUTHER,K. Molecular biology of Alzheimer Disease. *Annu.Rev.Biochem.*,**58**:287-307,1989

PERICAK-VANCE,M.A.; BEBOUT,J.L.; GASKELL,P.C. Linkage studies in familial Alzheimer's disease: evidence for chromosome 19 linkage. *Am.J.Hum.Genet.*,**48**:1034-1050,1991

PIKE,C.J.; BURDICK,D.; WALENCEWICZ,A.J.; GLABEC,G. & COTMAN,C.W. Neurodegeneration induced by β -amyloid peptides *in vitro*: the role of peptide assembly state. *J.Neurosci.*,**13**:1676-7,1993

PITAS,R.E.; BOYLES,J.K.; LEE,S.H.; FOSS,D. & MAHLEY,R.W. Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim.Biophys.Acta*,**917**:148-161,1987a.

PITAS,R.E.; BOYLE,J.K.; LEE,S.H.; HUI,D. & WEISGRABER,K.H. Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. *J.biol.Chem.*,**262**:14352-14360,1987b.

PODLISNY,M.B.; TOLAN,D.R. & SELKOE,D.J. Homology of the amyloid beta protein precursor in monkey and human supports a primate model for beta amyloidosis in Alzheimer's Disease. *Am.J.Pathol.*,**138**,1423-1435,1991

PONTE,P.; GONZALES-DeWHITT,P.; SCHILLING,J.; MILLER,J.; HSU,D.; GREENBERG,B.; DAVIS,K.; WALLACE,W.; LEIBERBURG,I.; FULLER,F.; & CORDELL,B. A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine protease inhibitors. *Nature*,**331**:525-7,1988

PRELLI,F.; PRAS,M. & FRANGIONE,B. The primary structure of human tissue amyloid P component from a patient with primary idiopathic amyloidosis. *J.biol.Chem.*,**260**:12895-8,1985

PRELLI,F.; CASTAÑO,E.M.; van DUINEN,S.G.; BOTS,G.T.A.B.; LUYENDIJK,W. & FRANGIONE,B. Different processing of Alzheimer's β -protein precursor in the vessel wall of patients with hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis-Dutch type. **Biochem.Biophys.Res.Commun.**,151:1150-5,1988

PRICE,D.L. New perspectives on Alzheimer's disease. **Annu.Rev.Neurosci.**,9:489-512,1986

PRUSINER,S.B. Novel proteinaceous infectious particles. **Science**,216:136-144,1982

PRUSINER,S.B. Chemistry and biology of prions. **Biochemistry.**,31:12277-12288,1992

PUCHTLER,H.; SWEAT,F. & LEVINE,M. On the binding of Congo red by amyloid. **J.Histochem.Cytochem.**,10:355-8,1962

RICHARDSON,J.S. Free radicals in the genesis of Alzheimer's disease. In: BARNNER,C.D.B. & NIXON,R.A. eds Proteases and protease inhibitors in Alzheimer's disease . **Ann.N.Y.Acad.Sci.**,674:73-6,1992

ROBAKIS,N.K.; RAMAKRISHNA,N.; WOLFE,G. & WISNIESKI,H.M. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**,84:4190-4,1987

ROGERS,B.B.; ALPERT,L.C.; HINE,E.A.S. & BUFFONE,G.J. Analysis of DNA in fresh and fixed tissue by the polymerase chain reaction. **Am.J.Pathol.**,136:541-8,1990

ROTH,M.; TOMLINSON,B.E. & BLESSED,G. Correlation between scores for dementia and counts of "senile plaques" in cerebral grey matter of elderly subjects. **Nature**,209.109-110,1966

SAEKI,Y.; UENO,S.; YORIFUJI,S.; SUGIYAMA,Y.; IDE,Y. & MATSUZAWA,Y. New mutant gene (transthyretin Arg 48) in cases with hereditary polyneuropathy detected by non-isotope method of single-strand conformation polymorphism analysis. **Biochem.Biophys.Res. Commun.**,180:380-5,1991

SAIKI,R.K.; GELFAND,D.H.; STOFELL,S.; SCARFF,S.J.; HIGUCHI,R.; HOM,G.T.; MULLIS,K.B. & ERLICH,H. Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase *Science*,**239**:487-491,1988

SAMBROOK,J.; FRITSCH,E.F. & MANIATIS,T. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. vol.1-3.

SANGER,F.; NICHLEN,S. & COULSON,A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*,**74**:5463-7,1977

SARAIVA,M.J.M.; COSTA,P.P. & GOODMAN,D.S.Genetic expression of a transthyretin mutation in typical and late-onset Portuguese families with familial amyloidotic polyneuropathy. *Neurology*,**36**:1413-9,1986

SAUNDERS,A.M.; STRITTMATTER,W.J.; SCHMECHEL,D.; St.GEORGE-HYSLOP,P.H.; PERICAK-VANCE,M.A.; JOO,S.H.; ROSI,B.L.; GUSELLA,J.F.; CRAPPER-McLACHLAN,D.R.; ALBERTS,M.J.; HULETTE,C.; CRAIN,B.; GOLDGABER,D. & ROSES,A.D. *Neurology*,**43**:1467-1472,1993

SAYEG,N. *Doença de Alzheimer: Guia do Cuidador*. Associação Brasileira de Alzheimer, Doenças Similares e Idosos de Alta Dependência (ABRA). São Paulo, SP. 1991.308p.

SCHÄGGER,H & von JAGOW,G. Tricine-sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analyt.Biochem.*,**166**:368-379,1987

SCHELLENBERG,G.D.BIRD,T.D.; WIJSMAN,E.M.; ORR,H.T.; ANDERSON,L.; NEMENS,E.; WHITE,J.A.; BONNYCASTLE,L.; WEBER,J.L.; ALONSO,M.L.; POTTER,H.; HESTON,L.L. & MARTIN,G.M. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science*,**258**:668-671,1992

SCHMECHEL,D.E.; SAUNDERS,A.M.; STRITTMATTER,W.J.; CRAIN,B.J.; HULETTE,C.M.; JOO,S.H.; PERICAK-VANCE; M.A.; GOLDGABER,D.& ROSES,A.D. Increased amyloid β -peptide deposition in cerebral cortex as a consequence

of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer's disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*,**90**:9649-9653,1993

SELKOE,D.J. Amyloid β -protein precursor and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Cell*,**58**:611-2,1989

SELKOE,D.J. Physiological production of the β amyloid protein and the mechanism of the Alzheimer's disease. *Trends Neurol.Sci.*,**16**:403 9,1993

SEUBERT,P.; VIGO-PELFREY,C.; ESCH,F.; LEE,M.; DOVEY,H.; DAVIS,D.; SINHA,S.; SCHLOSSMACHER,M.; WHALEY,J.; SWINDLEHURST,C.; McCORMACK,R.; WOLFERT,R.; SELKOE,D.; LIEBERBURG,I. & SCHENK,D. Isolation and quantification of soluble Alzheimer's β -peptide from biological fluids. *Nature*,**359**:325.7,1992

SHIRAHAMA,T.; BENSON,M.D.; COHEN,A.S. & TANAKA,A. Fibrillar assemblage of variable segments of immunoglobulin light chains: an electron microscope study. *J.Immunol.*,**110**:21-30,1973

SHOFFNER,J.M.; BROWN,M.D.; TORRONI,A.; LOTT,M.T.; CABELL,M.F.; MIRRA,S.S.; BEAL,M.F.; YANG,C.C.; GEARING,M.; SALVO,R. Mitochondrial DNA variants observed in Alzheimer's disease and Parkinson disease patients. *Genomics*,**17**:171-184,1993

SISODIA,S.S. Secretion of the β -amyloid precursor protein. In: BANNER,C.D.B. & NIXON,R.A.eds. *Proteases and Protease Inhibitors in Alzheimer's Disease Pathogenesis*. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*,**674**:53-5,1992

SLETTEN,K.;HUSEY,G. & NATIVIG,J.B. N-terminal amino acid sequence of amyloid fibril protein AR, prototype of a new λ variable subgroup V λ V. *Scand.J.Immunol.*,**3**:833-6,1974

SLETTEN,K.; WESTERMARK,P.; NATIVIG,J.B. Characterization of amyloid fibrils proteins from medullary carcinoma of the thyroid. *J.Exp.Med.*,**143**:993-8,1976

SMITH,C. & ANDERTON,B.H. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuropath.Appl.Neurobiol.*,20:322-6,1994

SNOW,A.D.; WILLMER,J.; KISILEVSKY,R. *Hum.Pathol.*,18:506-510,1987. Apud HOLTZMANN,D.M. & MOBLEY,W.C. Molecular studies in Alzheimer's Disease. *Trends Biochem. Sci.*,16:140-4,1991

SORBI,S.; NACMIAS,B.; FORLEO,P.; PIACENTINI,S. & AMADUCI,L. APP717 and Alzheimer's disease in Italy. *Nature Genetics*,4:10,1993

St.GEORGE-HYSLOP,P.H.; TANZI,R.E.; POLINSKY,R.J.; HARNES,J.L.; NEE,L.; WATKINS,P.C.; MYERS,R.H.; FELDMAN,R.G.; POLLEN,D.; DRACHMAN,D.; GROWDON,J.; BRUNE,A.; FONCIN,J-F.; SALMON,D.; FROMMELT,P.; AMADUCCI,L.; SORBI,S.; PIACENTINI,S.; STEWART,G.D.; HOBBS,W.J.; CONNEALLY,F.M. & GUSELLA,J.F.The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science*,235:885-890,1987

St GEORGE-HYSLOP,P.H. et al., *Neurobiol.Aging*,10:417-425,1989. Apud CLARK,R.F. & GOATE,A.M. Molecular Genetics of Alzheimer's Disease. *Arch.Neurol.*,50:1164-1172,1993

STRITTMATTER,W.J.; SAUNDERS,A.M.; SCHMECHEL,D.,PERICAK-VANCE,M.; ENGHILD,J.; SALVESEN,G.S. & ROSES,A.D. Apolipoprotein E: high avidity binding to β -amyloid and increased frequency of type-4 allele in familial Alzheimer's disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*,90:1977-1981,1993

TABOR,S. & RICHARDSON,C.C. DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*,84:4776-4772,1987

TAGAWA,K.; MARUYAMA,K. & ISHIURA,S. Amyloid β /A4 precursor protein(APP) processing in lysosomos. In: BARNER,C.D.B & NIXON,R.A. Proteases and Protease Inhibitors in Alzheimer's Disease. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*,674:129-137,1992

TANZI,R.E.; GUSELLA,J.F.; WATKIN,P.C.; BRUAS,G.A.P.; St. GEORGE-HYSLOP,P.; van KEUREN,M.L.; PATTERSON,D.; PAGAN,S.; KURMIT,D.N. & NEVE,R.I. Amyloid β -protein gene: cDNA, mRNA distribution and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science*,235:880-4,1987

- TANZI,R.E.; McCLATCHEY,A.L.; LAMPERTI,E.D.; VILLA-KOMAROFF,L.; GUSELLA,J.F.; NEVE,R.L. Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature*,331:528-530,1988
- TOWBIN,H.; STAEBELIN,T. & GORDON,J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,76:4350-3,1979
- UEKI,A.; KAWANO,M.; NAMBA,Y.; KAWAKAMI,M. & IKEDA,K. A high frequency of apolipoprotein E4 isoprotein in Japanese patients with late-onset nonfamilial Alzheimer's disease. *Neurosci.Lett.*,163:166-8,1993
- vanBROECKHOVEN,C.; GENTHE,A.M.; VANDENBERGHE,A. Failure of familial Alzheimer's disease to segregate with the A4-amyloid gene in several European families. *Nature*,329:153-5,1987
- van DUINEN,S.G.; CASTAÑO,E.M.; PRELLI,F.; BOTS,G.T.A.B.; LUYENDRIJK,W. & FRANGIONE,B. Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis in patients of Dutch origin. *Proc.Natl.Acad.Sci.,USA*,84:5991-4,1987
- VASSAR,R.P.S. & CULLING,C.F.A. Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues. *Arch.Pathol.*,68:487-498,1959
- VIDAL,R.G.; FERNANDEZ-MADRID,I.; FRANGIONE,B. & LEVY,E. Sequencing of the Alzheimer's APP gene Dutch variant. *Hum.Mut.*,2:435,1993
- VIRCHOW,R. Zur Cellulose-Frage.*Arch.Pathol.Anat.Physiol.Klin.Med.*,8:140-4,1855a. Apud: GLENNER,G.G.; IGNACZAC,T.F. & PAGE,D.L. The hereditary amyloidosis. In: STANBURY,J.B.; WYNGEARDEN,J.B. & FREDRICKSON,D.S. eds. *The metabolic basis of inherited disease*. 4th ed. New York, McGraw-Hill. 1978
- VIRCHOW,R. Ueber den Gang der amyloiden Degeneration. *Arch.Pathol.Anat.Physiol.Klin.Med.*,8:364-8,1855b. Apud: GLENNER,G.G.; IGNAZAC,T.F. & PAGE,D.L. The hereditary amyloidosis. In: STANBURY,J.B.; WYNGEARDEN,J.B. & FREDRICKSON,J.L. eds. *The metabolic basis of inherited disease*. 4th. ed. New York, McGraw-Hill . 1978

WALLACE,M.R.; NAYLOR,S.L. & KLUVE-BECKERMAN,B. Localization of the human prealbumin gene to chromosome 18. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*,**129**:753-8,1985

WEIDMAN,A.G.; KONIG,G.; BUNKE,D.; FISCHER,P.; SABAUM,J.M.; MASTERS, C.L. & BEYREUTHER,K. Identification, biogenesis and localization of precursors of Alzheimer's A4 amyloid protein. *Cell*,**57**:115-126,1989

WESTERNAK ,P.; WERNSTEDT,C.; O'BRIEN,T.D.; HAYDEN,D.W.& JOHNSON,K.H. Islet amyloid in type 2 human diabetes mellitus and adult diabetic cats contains a novel putative polypeptide hormone. *Am.J.Pathol.*,**127**:414-7,1987

WISNIEWSKI,K.E.; WISNIEWSKI,H.M. & WEN,G.Y. *Ann.Rev.Neurol.*,**17**:278-282,1985 Apud MÜLLER-HILL,B. & BREYREUTH,K. Molecular biology of Alzheimer's Disease. *Annu.Rev. Biochem.*,**58**:287-307,1989

WISNIEWSKI,T.; GOLABEK,A.; MATSUBARA,E.; GHISO,J. & FRANGIONE,B. Apolipoprotein E: binding to soluble Alzheimer's β -amyloid. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*,**192**:359-365,1993

WISNIEWSKI,T. & FRANGIONE,B. Molecular Biology of Alzheimer amyloid-Dutch variant. *Mol.Neurobiol.*,**1**:75-6,1992

WRIGHT,D.K. & MANOS,M.M. Sample preparation from paraffin-embedded tissues. In: *PCR protocols: a guide to methods and applications*. New York. Academic Press. 1990 C.19

YOSHIKAI,S.I.; SASAKI,H.; DOHURA,K.; FURUYA,H. & SAKAKI,Y. Genomic organization of the human amyloid beta protein precursor gene. *Gene*,**87**: 257-263,1990

YOSHIOKA,K.; MIKI,T.; OGIHARA,T.& SAKAKI,Y. The 717 Val→Ile substitution in amyloid precursor protein is associated with familial Alzheimer's disease regardless of ethnic groups.*Biochem.Biophys.Res.Comm.*,**178**:1141-6,1991

ZUBENKO,G.S.; FARR,J.; SCOTT STIFFLER,J.; HUGHES,H.B. & KAPLAN,B.B.
Clinically-silent mutation in the putative iron-responsive element in exon 17 of the β -
amyloid precursor protein gene. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.*,51:459-463,1992