

Artikelen

Polymorfisme van apolipoproteïne E, α_1 -antichymotrypsine en presenilin-1 genen en de ziekte van Alzheimer

J. van der WEIDE en L.S.W. STEIJNS

De diagnose dementie ten gevolge van de ziekte van Alzheimer (AD) wordt op grond van het klinisch beeld gesteld, hoewel postmortale neuropathologische studies uitwijzen dat dit beperkingen heeft. Gezocht wordt naar fysisch diagnostische tests of biologische markers waarmee AD eenvoudig, betrouwbaar en specifiek ante mortem gediagnostiseerd kan worden. De associatie tussen het $\epsilon 4$ allel van apolipoproteïne E (apoE) en de ontwikkeling van AD is al sinds 1993 bekend, de relatie tussen bepaalde presenilin-1 (PS-1) en α_1 -antichymotrypsine (ACT) allelen en het optreden van de ziekte is recentelijk beschreven.

In de onderhavige case-control studie zijn bij 38 neuropathologisch bevestigde AD patiënten en 26 controles apoE, PS-1 en ACT genotyperingen uitgevoerd. In de AD-positieve groep blijken zowel dragers van het apoE- $\epsilon 4$ als van het PS-1-2 allel vaker voor te komen dan in de controlegroep en aanwezigheid van deze allelen kan derhalve als genetische risico-indicator voor AD worden beschouwd. De ACT genotypering is in beide patiëntengroepen gelijk.

Wanneer, naast klinisch onderzoek, apoE en PS-1 genotyperingen zouden worden uitgevoerd, zal met name het aantal foutief negatief gediagnostiseerde patiënten afnemen.

Trefwoorden: apolipoproteïne E; presenilin-1; α_1 -antichymotrypsine; ziekte van Alzheimer

De ziekte van Alzheimer (AD) is de belangrijkste oorzaak van dementie bij ouderen. De prevalentie van de ziekte neemt toe met de leeftijd: van 0,5% onder 65 jarigen tot 10-20% onder 85 jarigen (1). Tot op heden kan de diagnose dementie ten gevolge van de ziekte van Alzheimer alleen post mortem aan de hand van neuropathologisch onderzoek van de hersenen met 100% zekerheid worden gesteld. Echter, het belang van vroege herkenning dan wel uitsluiting van de ziekte is, met het oog op psychosociale interventie, zowel voor de patiënt en zijn familieleden als voor het ziekenhuis groot.

Klinisch Chemisch Laboratorium, Psychiatrisch Ziekenhuis Veldwijk, Ermelo

Correspondentie : Dr. J. van der Weide, Psychiatrisch Ziekenhuis Veldwijk, Klinisch Chemisch Laboratorium, Postbus 1000, 3850 BA Ermelo.
Ingekomen: 26.09.97

De gangbare methode om AD bij leven te diagnosticeren is op grond van klinische criteria, waartoe neurologisch, psychologisch en geriatrisch onderzoek worden uitgevoerd. Retrospectieve en postmortale neuropathologische studies wijzen uit dat deze werkwijze veel beperkingen heeft (2). Door bij de klinische diagnose de NINCDS-ADRDA criteria (3) te hanteren, waarbij onder andere uitgebreide neuropsychologische screening tests zoals de Mini Mental State Examination (MMSE) (4) worden uitgevoerd, zijn de sensitiviteit en specificiteit van diagnostisering op klinisch beeld te verhogen. Werken volgens deze criteria is echter erg arbeidsintensief en het vraagt veel expertise, zodat lang niet elk psychiatrisch ziekenhuis uitgerust is om op deze manier te werken. Om de ziekte van Alzheimer toch eenvoudig en definitief ante mortem te kunnen diagnosticeren is gezocht naar aanvullende fysisch diagnostische tests of biologische markers.

Uit de literatuur is bekend dat er een verband bestaat tussen het optreden van de "late onset" variant van de ziekte van Alzheimer en het apolipoproteïne E (apoE) genotype (5). Het risico voor het ontwikkelen van de ziekte neemt toe en de gemiddelde leeftijd waarop de symptomen beginnen neemt af bij een toenemend aantal apoE- $\epsilon 4$ allelen (6). Het feit dat het $\epsilon 4$ allel geen biologische marker maar slechts een risico-indicator voor AD is, doet vermoeden dat er meer (genetische) factoren bestaan die, alleen of in combinatie met het apoE- $\epsilon 4$ allel, het risico op het ontwikkelen van AD beïnvloeden.

Associaties tussen de laat-optredende vorm van Alzheimer en mutaties op het α_1 -antichymotrypsine (ACT) gen en het presenilin-1 (PS-1) gen zijn recentelijk beschreven (7,8). Beide genen zijn, evenals het apoE gen, polymorf en bepaalde allelen lijken bij AD-patiënten in verhoogde frequentie voor te komen. In de onderhavige case-control studie hebben wij onderzocht in hoeverre apoE, ACT en PS-1 genotype tezamen van invloed zijn op (het risico op) het ontwikkelen van de laat-optredende vorm van Alzheimer. Voorts is bekeken of apoE, ACT en PS-1 genotypering in ons ziekenhuis bij zouden kunnen dragen aan de Alzheimerdiagnostiek.

MATERIALEN en METHODEN

Het onderzoek werd uitgevoerd bij een groep van 64 psychogeriatrische en gerontopsychiatrische patiënten

van 65 jaar en ouder (gemiddelde leeftijd 79,8 jaar) die in de periode van februari '93 tot januari '97 opeenvolgend zijn overleden in Psychiatrisch Ziekenhuis Veldwijk te Ermelo en bij wie toestemming was voor obductie. Een aantal van hen vertoonde bij leven kenmerken van een dementiesyndroom. Na neuropathologisch onderzoek van de hersenen kon onderscheid gemaakt worden tussen Alzheimer-positieve (AD+ ; n=38) en Alzheimer-negatieve (AD- ; n=26) patiënten.

Genotypering voor apoE, ACT en PS-1 polymorfismen werd uitgevoerd volgens elders beschreven methoden (8-10). Genomisch DNA werd geïsoleerd uit hersenweefsel uit de hippocampus. Met behulp van de polymerase chain reaction (PCR) werd het deel van het apoE, ACT of PS-1 gen dat de polymorfe sequentie omvat geamplificeerd, waarbij fragmenten met een lengte van respectievelijk 244 bp, 156 bp en 199 bp ontstonden. Dit geamplificeerde DNA werd vervolgens gedigesteerd met de restrictie-enzymen HhaI, BstNI of BamHI, waarna de ontstane fragmenten in een 5,5% agarose gel waarin ethidiumbromide gedetecteerd konden worden. Aan de hand van de verkregen restrictieprofielen konden apoE, ACT en PS-1 genotypen worden vastgesteld.

RESULTATEN

In tabel 1 is de genotypeverdeling van apoE, ACT en PS-1 in de AD-positieve en AD-negatieve patiëntengroepen weergegeven. Zoals op grond van de literatuur verwacht mocht worden is in de AD+ groep de prevalentie van het apoE-ε4 allel significant verhoogd ten opzichte van de AD- groep ($X^2=23$, $df=1$, $p<0,001$). Van de Alzheimerpatiënten heeft 68% één of twee ε4 allelen, in de AD-negatieve groep is dit bij 19% het geval.

De ACT allelfrequenties zijn in beide patiëntengroepen niet significant verschillend ($X^2=0,08$, $df=1$, $p>0,7$). Ook wanneer onderscheid wordt gemaakt tussen apoE-ε4 alleldragers en niet-ε4 alleldragers blijft de verdeling van ACT-genotypen in de AD+ en AD-patiëntengroepen gelijk.

Uit de PS-1 genotypeverdeling blijkt dat in de AD+ groep significant meer 2 alleldragers voorkomen dan in de AD- groep ($X^2=7,36$, $df=1$, $p<0,01$). De 22 genotypefrequentie is in beide groepen nagenoeg

gelijk, het 1/2 genotype komt bij Alzheimerpatiënten vaker voor ($X^2=4,52$, $df=1$, $p<0,05$). Wordt hierbij een verdeling gemaakt in ε4 alleldragers en niet-ε4 alleldragers dan neemt de associatie tussen de aanwezigheid van een PS-1-2 allel en de ziekte van Alzheimer bij ε4 alleldragers verder toe.

DISCUSSIE

Uit de resultaten blijkt dat in onze Alzheimer patiëntengroep dragers van het ε4 allel van apoE en van het 2 allel van PS-1 in verhoogde mate voorkomen in vergelijking met de groep niet-Alzheimerpatiënten. Mensen die drager zijn van een apoE-ε4 en/of een PS-1-2 allel hebben significant vaker de ziekte en aanwezigheid van deze allelen zouden in meer of mindere mate als biologische risico-indicator voor AD kunnen worden beschouwd. De associatie tussen genotype en AD is het grootst bij apoE. Dit blijft de belangrijkste genetische factor voor risico-inschatting voor het ontwikkelen van de ziekte.

De verdeling van de apoE genotypen in de AD+ en AD- patiëntengroepen komt overeen met de resultaten van vorige onderzoeken (5,6,11,12). Ook de PS-1 genotypefrequenties in onze AD-negatieve groep zijn vergelijkbaar met die van controlegroepen in eerdere studies (8,13). Opvallend is dat de verdeling van de PS-1 genotypen in de AD-positieve patiëntengroep verschilt van de in de literatuur beschreven waarden. Een aantal onderzoekers meldt, in tegenstelling tot onze bevindingen, bij Alzheimer patiënten een verhoogde prevalentie van het 1/1 genotype en het 1 allel (8,14), door anderen wordt tussen Alzheimer patiënten en controles géén verschil in frequentie van het polymorfisme gevonden (13,15,16). Deze verschillen in effect van PS-1 genotype op het ontwikkelen van AD zijn mogelijk toe te schrijven aan de verschillen in genetische achtergrond van de diverse onderzoekspopulaties (13), verschillen in grootte van de onderzochte groepen, of aan het feit dat bij het samenstellen van de onderzoekspopulaties een bepaalde selectie is opgetreden. Verder is het zo dat in genoemde studies (8, 13-16) de diagnose AD niet neuropathologisch is bevestigd, maar slechts gesteld is op grond van klinisch beeld. Misclassificatie van patiënten kan de associatie tussen genotype en AD beïnvloeden.

Tabel 1. ApoE, ACT en PS-1 genotypeverdeling en -frequenties in de AD-positieve en AD-negatieve patiëntengroepen

| Gen | Genotype | AD+ (n=38) | AD- (n=26) | OR (95% betrouwbaarheidsinterval) AD+ tov AD- |
|------|---------------------|---------------|---------------|--|
| ApoE | ε4/ε4 | 4 (10%) | 0 (0%) | ε4: OR = 9,1 (2,8-30,0) |
| | ε2/ε4, ε3/ε4 | 22 (58%) | 5 (19%) | |
| | ε2/ε2, ε2/ε3, ε3/ε3 | 12 (32%) | 21 (81%) | |
| ACT | A A | 6 (16%) | 4 (15%) | A: OR = 0,8 (0,3-2,3) |
| | A T | 17 (45%) | 13 (50%) | |
| | T T | 15 (39%) | 9 (35%) | |
| PS-1 | 1 1 | 7 (18%) | 9 (35%) | 2: OR = 2,3 (0,7-7,3) |
| | 1 2 | 23 (61%) | 12 (46%) | |
| | 2 2 | 8 (21%) | 5 (19%) | |

Het ACT-genotype blijkt niet van invloed te zijn op de ontwikkeling van AD of op het met apoE-ε4 geassocieerde risico op AD. Volgens onze resultaten heeft ACT genotypering voor de Alzheimer diagnose geen enkele waarde. Ook diverse andere research groepen zijn recentelijk tot deze conclusie gekomen (17-20), dit in tegenstelling tot de bevindingen van Kamboh en medewerkers in 1995 (7).

Wanneer het apoE en het PS-1 genotype tezamen worden beschouwd, dan blijkt de voorspellende waarde voor de ontwikkeling van AD verder toe te nemen. Bij apoE-ε4 alleldragers is het relatieve risico op AD 9,1 maal verhoogd ten opzichte van niet-ε4 alleldragers, zo blijkt uit onze studie. Personen met een ε4 allel én een PS-1-2 allel hebben 24,5 zoveel kans op de ziekte dan iemand zonder deze allelen. De combinatie van de allelen apoE-ε4 en PS-1-2 wijst in onze patiëntengroep in 88% van de gevallen op AD. In de AD+ groep dragen 21 van de 38 patiënten tenminste één ε4 en één 2 allel, terwijl de combinatie bij slechts 3 van de 26 patiënten uit de AD- groep voorkomt. Met andere woorden de sensitiviteit van apoE en PS-1 genotypering samen als risico-indicator voor de ontwikkeling van AD is 55%, de specificiteit is 88%. Ter vergelijking: bij diagnostisering op grond van klinisch beeld werden in deze patiëntengroep een sensitiviteit en specificiteit van respectievelijk 47% en 85% bereikt. De uitvoering van de relatief eenvoudige apoE en PS-1 genotyperingstests, waarvoor bij de patiënt eenmalig een buisje bloed moet worden afgenomen, is dus niet minder informatief dan wanneer de diagnose op basis van klinisch onderzoek, dat voor de patiënt toch aanzienlijk belastender is, wordt gesteld.

Door nu klinisch onderzoek en apoE en PS-1 genotyperingen naast elkaar uit te voeren, kan in bepaalde gevallen de risico-inschatting voor AD verbeterd worden. Zo heeft in onze studie 48% van de patiënten met een klinische diagnose AD-negatief toch de ziekte. Wanneer hierbij ook naar het apoE en PS-1 genotype gekeken wordt dan blijkt van de negatief gediagnostiseerde groep zonder apoE-ε4 en PS-1-2 allel slechts 14% AD te hebben, terwijl van degenen die wél een ε4 en een 2 allel hebben 80% AD heeft. Van de op grond van klinisch beeld AD-positief bevonden groep is 82% AD patiënt, van de ε4/2 alleldragers in deze groep heeft 93% de ziekte. ApoE en PS-1 genotyperingen kunnen dus, naast diagnostisering op grond van klinische criteria, als hulpmiddel bij het stellen van de diagnose Alzheimer van nut zijn. Met name het aantal foutief negatieven, dat bij diagnostisering op grond van klinisch beeld erg hoog is, zou door combinatie van klinisch onderzoek en genotypering verminderd kunnen worden. Ook wanneer klinisch onderzoek volgens de NINCDS-ADRDA criteria wordt uitgevoerd, dus inclusief MMSE etcetera, blijkt apoE genotypering van toegevoegde diagnostische waarde te zijn (21). Omdat onze studie erop wijst dat apoE genotypering in combinatie met PS-1 genotypering een betere risico-indicator is dan apoE genotypering alleen, zou door bij geriatrische patiënten naast uitgebreid klinisch onderzoek deze genotyperingen uit te voeren de risico-inschatting voor de ontwikkeling van de ziekte van Alzheimer

verder kunnen worden geoptimaliseerd. Een onderzoek naar de toepasbaarheid van deze werkwijze is binnen ons ziekenhuis in voorbereiding.

Overigens is aanwezigheid van de allelen apoE-ε4 en PS-1-2 als risicofactor voor AD alleen bruikbaar in een populatie van oudere patiënten, zoals die zich op de gerontopsychiatrische en psychogeriatrische afdelingen van ons ziekenhuis bevindt. Immers, omdat de prevalentie van de ziekte sterk toeneemt met de leeftijd, blijft leeftijd de grootste risico-indicator voor het ontwikkelen van AD.

Verder blijkt, zoals eerder aangegeven, de voorspellende waarde van PS-1 genotypering voor de ontwikkeling van AD een controversiële te zijn. De verdeling van de PS-1 genotypen in de AD-positieve groep verschilt per onderzoekspopulatie. Nader onderzoek omtrent de associatie tussen PS-1 polymorfisme en risico op AD is dan ook vereist.

Literatuur

1. Breteler MMB, Claus JJ, Duijn CM van, Launer LJ, Hofman A. Epidemiology of Alzheimer's disease. *Epidemiol Rev* 1992; 14: 59-82.
2. Saunders AM, Hulette C, Welsh-Bohmer KA, Schmechel DE, Crain B, Burke JR, Alberts MJ, et al. Specificity, sensitivity, and predictive value of apolipoprotein-E genotyping for sporadic Alzheimer's disease. *Lancet* 1996; 348: 90-93.
3. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of department of health and human services task force on Alzheimer's disease. *Neurology* 1984; 34: 939-944.
4. Folstein M, Folstein S, McHugh P. The Mini Mental State Examination. *J Psychiatr Res* 1975; 12: 189-198.
5. Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, et al. Association of apolipoprotein E allele 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 1993; 43: 1467-1472.
6. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993; 261: 921-923.
7. Kamboh MI, Sanghera DK, Ferrell RE, DeKosky ST. ApoE*4-associated Alzheimer's disease risk is modified by α₁-antichymotrypsin polymorphism. *Nat Genet* 1995; 10: 486-488.
8. Wragg M, Hutton M, Talbot C, and the Alzheimer's Disease Collaborative Group. Genetic association between intronic polymorphism in presenilin-1 gene and late-onset Alzheimer's disease. *Lancet* 1996; 347: 509-512.
9. Weide J van der, Steijns LSW, Teepeen JLJM, Noback WJ, Klaverwijden G. Apolipoproteïne E polymorfisme en de ziekte van Alzheimer. *Tijdschr Gerontol Geriatr* 1996; 27: 73-77.
10. Faber J-P, Poller W, Olek K, Baumann U, Carlson J, Lindmark B, Eriksson S. The molecular basis of α₁-antichymotrypsin deficiency in a heterozygote with liver and lung disease. *J Hepatol* 1993; 18: 313-321.
11. Lidell M, Williams J, Bayer A, Kaiser F, Owen M. Confirmation of association between the ε4 allele of apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *J Med Genet* 1994; 31: 197-200.
12. Nalbantoglu J, Gilfix BM, Bertrand P, Robitaille Y, Gauthier S, Rosenblatt DS, Poirier J. Predictive value of apolipoprotein E genotyping in Alzheimer's disease: results of an autopsy series and an analysis of several combined studies. *Ann Neurol* 1994; 36: 889-895.

13. Pérez-Tur J, Wavrant-De Vrièze F, Lambert JC, Chartier-Harlin M-C, and the Alzheimer's Study Group. Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 1996; 347: 1560-1561.
14. Kehoe P, Williams J, Lovestone S, Wilcock G, Owen MJ, and the UK Alzheimer's Disease Collaborative Group. Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 1996; 347: 1185.
15. Scott WK, Growdon JH, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 1996; 347: 1186-1187.
16. Scott WK, Yamaoka LH, Locke PA, Rosi BL, Gaskell PC, Saunders AM, Conneally PM, et al. No association or linkage between an intronic polymorphism of presenilin-1 and sporadic or late-onset familial Alzheimer disease. *Genet Epidemiol* 1997; 14: 307-315.
17. Talbot C, Houlden H, Craddock N, Crook R, Hutton M, Lendon C, Prihar G, et al. Polymorphism in AACT gene may lower age of onset of Alzheimer's disease. *Neuro-Report* 1996; 7: 534-536.
18. Nacmias B, Tedde A, Latorraca S, Piacentini S, Bracco L, Amaducci L, Guranieri BM, et al. Apolipoprotein E and α_1 -antichymotrypsin polymorphism in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1996; 40: 678-680.
19. Haines JL, Pritchard ML, Saunders AM, Schildkraut JM, Growdon JH, Gaskell PK, Farrer LA, et al. No genetic effect of α_1 -antichymotrypsin in Alzheimer Disease. *Genomics* 1996; 33: 53-56.
20. Didierjean O, Martinez M, Campion D, Hannequin D, Dubois B, Martin C, Puel M, et al. No effect of the α_1 -antichymotrypsin A allele in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997; 63: 103-105.
21. Frisoni GB, Geroldi C, Bianchetti A, Binetti G, Trabucchi M. The gain of apolipoprotein E genotyping to separate patients with Alzheimer's disease from normal individuals: relevance to community studies. *Dementia* 1996; 7: 336-342.

Summary

Polymorphism of apolipoprotein E, α_1 -antichymotrypsin and presenilin-1 genes and Alzheimer's disease. Weide J van der and Steijns LSW. Ned Tijdschr Klin Chem 1998; 23: 51-54.

Dementia caused by Alzheimer's disease (AD) is diagnosed ante mortem on a clinical examination. Postmortal neuropathological studies not always confirm the reliability of this method. Physical tests or biological markers for a simple, reliable and specific diagnose of AD are desirable. The association between the ϵ_4 allele of apolipoprotein E (apoE) and the risk of developing AD is known since 1993, the relation between certain presenilin-1 (PS-1) and α_1 -antichymotrypsin (ACT) alleles and AD is described recently.

In the present case-control study apoE, PS-1 and ACT genotypes were analysed in 38 autopsy confirmed AD patients and 26 AD-negative controls. Both apoE- ϵ_4 and PS-1-2 allele carriers are overrepresented in the AD patient group in comparison with the controls. Hence, these alleles may be considered as genetical risk factors for the development of AD. For ACT there is no significant difference in allele and genotype distribution between both patientgroups. When apoE and PS-1 genotyping would be used as adjuncts to the clinical tests for AD diagnosis, the amount of false-negatives in particular will decrease.

Keywords: apolipoprotein E; presenilin-1; α_1 -antichymotrypsin; Alzheimer's disease.