

# Apolipoproteína E e Doença de Alzheimer

*Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease*

*Denise Prado<sup>1</sup>, Inês Lopes Cardoso<sup>2</sup>*

## RESUMO

**Contexto.** A doença de Alzheimer (DA) é uma demência que afeta indivíduos tanto em idades avançadas como em idades precoces. Trata-se de uma doença resultante de perdas das funções neuronais cognitivas que envolve principalmente a memória. **Objetivo.** Neste artigo pretende-se fazer uma breve revisão bibliográfica sobre o papel da apolipoproteína E (apoE) como fator de risco genético para o desenvolvimento de DA. **Método.** Para tal foi realizada uma revisão sistemática da literatura existente sobre o tema, tendo sido revistos 72 artigos científicos entre 1972 e 2007. Foram efetuadas pesquisas nos motores de busca da PubMed, B-on, Google Acadêmico, Medline e Science Direct, utilizando os unitermos: “apolipoprotein E” e “Alzheimer's disease”. **Resultados.** Como resultados desta pesquisa verificou-se existir influência da apoE na acumulação do péptido  $\beta$ -amilóide e consequentemente na patogénese da DA. Foi ainda possível relacionar a presença dos diversos alelos codificantes da apoE (com localização 19q13.2) e suas combinações com um melhor ou pior prognóstico para o desenvolvimento de DA, sendo o alelo  $\epsilon 4$  o responsável pelo aumento do risco de desenvolvimento precoce de DA. **Conclusão.** No entanto, esta apolipoproteína não é em si suficiente para causar DA, mas promove o aumento do risco do indivíduo vir a desenvolver a doença.

**Unitermos.** Apolipoproteína E, Doença de Alzheimer, Demência, Fatores de Risco, Alelos da APOE.

**Citação.** Prado D, Cardoso IL. Apolipoproteína E e Doença de Alzheimer.

## ABSTRACT

**Background.** Alzheimer's disease (AD) is a dementia that occurs not only in elderly individuals but also at young ages. It is a disease caused by loss of neuronal functions that mainly involves cognitive memory. **Objective.** In this paper, we intend to present a brief review of the role of apolipoprotein E (apoE) as a genetic risk factor for the development of AD. **Method.** For that, a systematic literature review about this subject was performed, being read 72 scientific papers from 1972 to 2007. Searches were done in the websites PubMed, B-on, Academic Google, Medline and Science Direct, using the keywords: “apolipoprotein E” and “Alzheimer's disease”. **Results.** As results of this search, it was confirmed the influence of apoE in the accumulation of the  $\beta$ -amyloid peptide and consequently in the pathogenesis of AD. It was also possible to relate the presence of the various alleles coding for apoE (with location 19q13.2) and its combinations with a better or worse prognosis for AD development, being  $\epsilon 4$  allele the one responsible for an increased risk for early development of AD. **Conclusion.** However, this apolipoprotein alone is not sufficient to cause AD, but promotes an increased risk of AD development.

**Keywords.** Apolipoprotein E, Alzheimer's Disease, Dementia, Risk Factors, APOE Alleles.

**Citation.** Prado D, Cardoso IL. Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease.

### Trabalho realizado na Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal.

1. formação académica, Mestre em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal.
2. Bioquímico, Professor Associado, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal.

### Endereço para correspondência:

Inês Lopes Cardoso  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Universidade Fernando Pessoa  
Rua Carlos da Maia, 296  
4200-150 Porto, Portugal  
Tel.: 00 351 22 507 4630  
Fax: 00 351 22 507 4637  
E-mail: mic@ufp.edu.pt

Revisão

Recebido em: 27/02/12

Aceito em: 12/11/12

Conflito de interesses: não

## INTRODUÇÃO

Já há vários anos tem vindo a ser estudada a doença de Alzheimer (DA) e os fatores responsáveis por esta doença. O peso dos fatores genéticos tem vindo a ser considerado como preponderante na etiopatogenia da DA. Além dos fatores genéticos foram registados fatores etiológicos, toxicidade a agentes infecciosos, ao alumínio, a radicais livres de oxigénio, a aminoácidos neurotóxicos e a ocorrência de danos em microtúbulos e proteínas associadas<sup>1,2</sup>.

O fato de a doença apresentar uma grande incidência entre membros da mesma família, levou à aplicação da genética molecular no estudo da DA. Esta doença apresenta uma herança autossômica dominante na maioria dos grupos familiares já estudados. Estimativas da prevalência de DA familiar variam de 5-10% até 50% em diferentes estudos<sup>3</sup>.

O primeiro gene a ter sido identificado como envolvido no aparecimento de DA situa-se no cromossoma 21, havendo associação com a síndrome de Down. Indivíduos que apresentam esta síndrome manifestam um envelhecimento precoce e a maioria apresenta DA confirmada entre os 40 e 50 anos de idade, a nível clínico e neurológico<sup>4</sup>. Este gene codifica a proteína precursora da  $\beta$ -amilóide (APP) que se deposita nas placas senis do cérebro dos indivíduos afetados<sup>5-10</sup>.

Estudos realizados revelaram a ligação e associação da DA com marcadores genéticos moleculares. A análise da ligação genética permitiu a identificação da maioria dos genes envolvidos. Para além do gene codificante de APP anteriormente mencionado, genes codificantes das proteínas presenilina 1 (PSEN1), presenilina 2 (PSEN2), apolipoproteína E (apoE),  $\alpha$ -2-macroglobulina (A2M) e catepsina D foram também identificados<sup>5-10</sup>. Estes genes localizam-se em cromossomas distintos sendo que alguns deles participam numa via neuropatogénica comum, que ocasiona o desencadeamento da doença.

A contribuição de fatores genéticos e ambientais leva ao desenvolvimento da doença com diferentes graus de severidade. Isto levou à classificação da DA relativamente ao aspeto clínico em DA de início precoce (DAIP) e DA de início tardio (DAIT).

A DAIP tem manifestação por volta dos 40 anos de idade, rápido curso clínico, mostrando recorrência fa-

miliar<sup>11</sup>. Este tipo de DA está relacionado com mutações em genes que codificam para a APP, PSEN1 e PSEN2. Mutações nestes genes são responsáveis por 40% dos casos de DAIP<sup>12</sup>. De 30 a 40% dos casos de DA precoce, têm padrão de herança autossômico dominante<sup>12-14</sup>.

Em relação à DAIT, geralmente de ocorrência esporádica, os sintomas podem aparecer após os 60 anos de idade, podendo estes perdurar por mais de 10 anos<sup>15</sup>. Para este tipo de DA o espectro de mutações é distinto. Apesar de já terem sido referidos por vários investigadores mais de 30 prováveis marcadores genéticos para a DA de início tardio, somente o alelo  $\epsilon$ 4 do gene codificante da apoE demonstrou uma relação consistente com a DA<sup>16</sup>. Entretanto, outros genes têm sido estudados, tendo sido encontrada uma possível ligação com a DAIT para os genes codificantes da apolipoproteína CI (apoCI), da  $\alpha$ -1-antiquimiotripsina, do receptor sigma tipo 1, da enzima conversora de angiotensina, da  $\alpha$ -2-macroglobulina, da proteína relacionada ao receptor de LDL (LRP), da interleucina 1 $\alpha$  e  $\beta$ , da paraxonase, do transportador de serotonina e do receptor de serotonina<sup>17-21</sup>.

## MÉTODO

A compilação de artigos foi realizada por meio de uma revisão sistemática da literatura sobre o tema. Foram usados os motores de busca PubMed, B-on, Google Acadêmico, Medline e Science Direct, utilizando os unitermos: “apolipoprotein E” e “Alzheimer’s disease”, tendo sido revistos 72 artigos científicos entre 1972 e 2007.

### Apolipoproteína E

O gene codificante da apoE é constituído por quatro exons, distribuídos ao longo de 6740 nucleótidos, sendo transcrito num RNAm com 1156 bp.

Embora a maioria dos genes das apolipoproteínas se encontre em diferentes regiões do genoma, o locus da apoE constitui, juntamente com os *loci* das apoCI, apoCII e apoCIV e um pseudogene de apoCI (apoCI’), um grupo gênico que ocupa uma região de cerca de 44 Kb no cromossoma 19 (19q13.2)<sup>22</sup>.

Entre estas apolipoproteínas, a apoCIV foi a descrita mais recentemente, tendo a sua estrutura sido derivada a partir da identificação do seu gene codificante, por não terem sido encontrados sinais de proteína circulante,

sendo improvável que esta proteína tenha uma importância significativa no metabolismo lipídico<sup>23</sup>.

A apoCII liga-se aos quilomicra e às partículas lipoproteicas VLDL e atua como cofator da lipase das lipoproteínas (LPL) responsável pela hidrólise dos triglicéridos e consequente liberação dos ácidos gordos constituintes que são absorvidos pelos tecidos<sup>24</sup>.

A apoCI liga-se de preferência às partículas VLDL e HDL e é um cofator da acil-transferase de lecitina/colesterol (LCAT) que catalisa a esterificação do colesterol durante o seu transporte reverso dos tecidos periféricos para o fígado<sup>23,25</sup>.

A apoE é uma glicoproteína polimórfica com 317 aminoácidos, sendo uma das principais proteínas existentes no plasma humano, para onde é transportada após ser sintetizada no fígado, local onde ocorre a produção de cerca de  $\frac{3}{4}$  da apoE plasmática<sup>26</sup>. O cérebro humano é o segundo local de maior produção de apoE, sendo esta sintetizada pelos astrócitos<sup>27</sup>, pela microglia<sup>28</sup> e oligodendrócitos. Esta é a principal apolipoproteína presente no cérebro<sup>26</sup> e executa um papel importante no transporte de colesterol e fosfolípidos destes compartimentos gliais aos locais de regeneração da membrana neuronal e remielinação<sup>29-31</sup>, assim como na regulação imunológica e na modulação do crescimento e diferenciação celular<sup>32,33</sup>. No plasma, a apoE é o principal constituinte das lipoproteínas de alta densidade (HDL)<sup>34</sup>. Atua na absorção, transporte, e redistribuição de colesterol entre órgãos e tecidos, apresentando também a função de regulação do metabolismo das lipoproteínas. Apresenta ainda função na reparação de danos excessivos nos neurônios, mediante a redistribuição dos lípidos aos axônios e regeneração das células de Schwann, restabelecendo as conexões sináptico-dendríticas<sup>33</sup>.

A apoE faz parte, juntamente com outros nove tipos de apolipoproteínas, de um grupo de moléculas com semelhanças estruturais e cujos genes terão sido originados a partir de um ancestral comum com mais de 680 milhões de anos por meio de processos de duplicação e translocação<sup>35</sup>.

### **Variantes da Apolipoproteína E**

Durante a evolução ocorreram mutações no gene codificante da apoE, resultando em genes com peque-

nas diferenças ou alelos, que ocasionaram alterações na sequência da proteína. Em humanos, são três os alelos principais do gene apoE, resultantes de duas alterações ao nível do DNA, sendo denominados de  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  e  $\epsilon 4$ . As isoformas proteicas (E2, E3 e E4) produzidas por estes alelos distinguem-se nos aminoácidos presentes nas posições 112 e/ou 158<sup>36-38</sup>: o alelo  $\epsilon 2$  contém o aminoácido cisteína nestas duas posições da proteína; o  $\epsilon 3$  possui cisteína na posição 112 e arginina na posição 158; já o alelo  $\epsilon 4$  possui arginina nas duas posições.

Estes alelos descrevem as três isoformas mais habituais da proteína na população, no entanto a natureza polimórfica do gene apoE não é restrita aos polimorfismos mencionados havendo outras variantes raras da apoE denominadas de  $\epsilon 1$ ,  $\epsilon 5$  e  $\epsilon 7$ .

As diferentes combinações de dois dos três alelos principais podem originar seis prováveis genótipos:  $\epsilon 2/\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4/\epsilon 4$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 4$  e  $\epsilon 2/\epsilon 4$ . Estudos realizados mencionam que a frequência destes três alelos na população caucasiana é de aproximadamente 8%, 78% e 14% para o  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  e  $\epsilon 4$  respectivamente<sup>39,40</sup>. O alelo  $\epsilon 3$  é o mais frequente em diferentes populações humanas podendo variar de 48 a 89%<sup>41</sup>. Num estudo<sup>42</sup> a frequência do alelo  $\epsilon 4$  mostrou ser elevada variando de 24 a 40% em algumas populações (Lapónia, pigmeus, tribo de Papua-Nova Guiné, e alguns nativos americanos).

Diferentes critérios têm considerado alternativamente os alelos  $\epsilon 3$  e  $\epsilon 4$  como as formas ancestrais do polimorfismo do gene codificante da apoE. A frequência mais elevada do alelo  $\epsilon 3$  e a possibilidade de este originar as variantes  $\epsilon 2$  e  $\epsilon 4$  através de um único passo mutacional, constitui o principal argumento a favor da hipótese de este ser o alelo mais antigo<sup>33,38</sup> (Figura 1A). No entanto, a presença de resíduos de arginina nas posições 112 e 158 das proteínas homólogas de primatas não humanos sugere que, apesar de ocorrer em baixa frequência, o alelo  $\epsilon 4$  pode representar a forma alélica primitiva<sup>43,44</sup> (Figura 1B).

Um estudo<sup>45</sup> que menciona a hipótese da evolução dos alelos humanos  $\epsilon 2$  e  $\epsilon 3$  a partir do gene ancestral  $\epsilon 4$  (único encontrado em primatas não humanos), considera que isto pode ter contribuído para o crescimento dramático do cérebro humano, aumentando o tempo de vida médio.

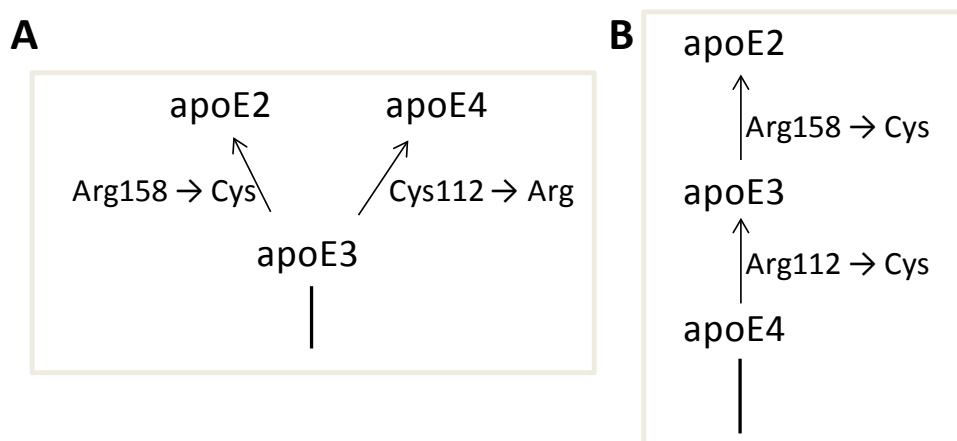


Figura 1. Hipóteses que têm considerado alternativamente os alelos  $\epsilon 3$  (A) e  $\epsilon 4$  (B) como as formas ancestrais do polimorfismo do gene codificante da apoE.

### Apolipoproteína E e Doença de Alzheimer

Além do envolvimento no metabolismo dos lipídios e patologias associadas, o polimorfismo do gene codificante da apoE é um dos principais fatores genéticos de suscetibilidade às formas comuns de manifestação tardia de DA<sup>3,46</sup>.

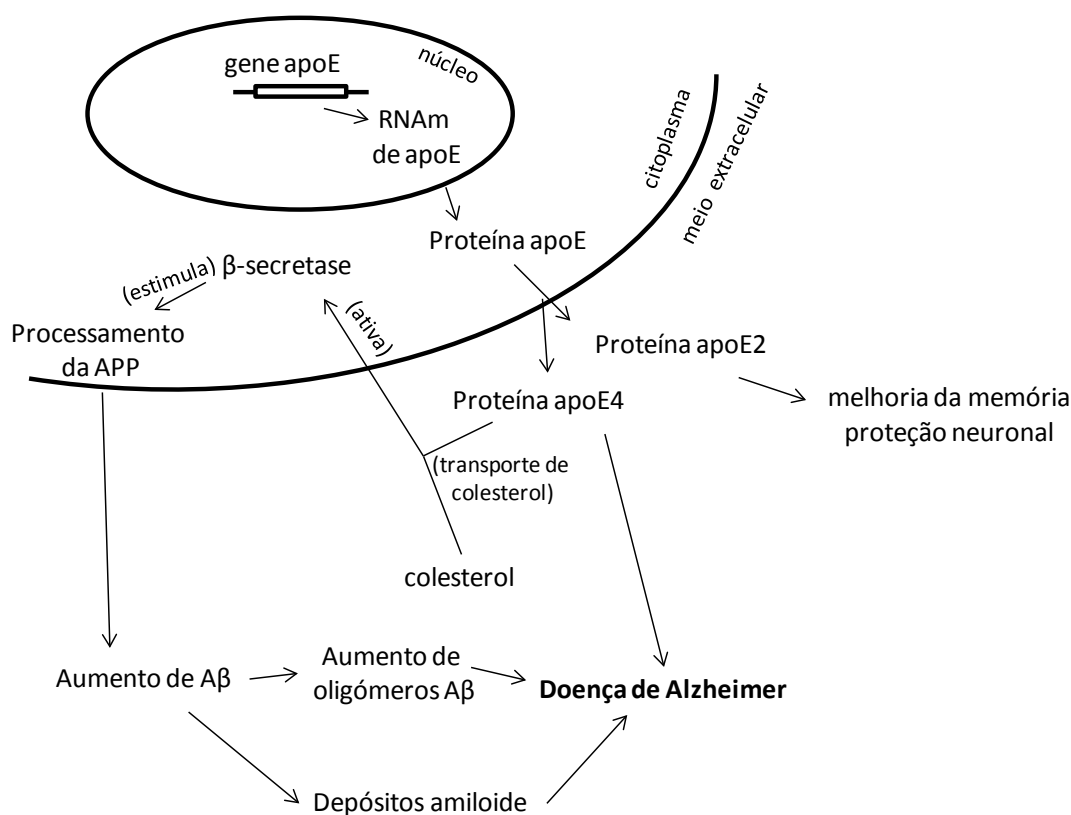
A identificação do alelo  $\epsilon 4$  como sendo um fator determinante de DA, sugere que o colesterol pode ter importância na patogênese da doença<sup>16,47</sup>. O alelo  $\epsilon 4$  está relacionado com um aumento do risco da doença e este efeito é mais pronunciado em indivíduos homozigóticos comparativamente aos heterozigóticos<sup>48,49</sup>. Um estudo<sup>50</sup> mostrou uma maior frequência do alelo  $\epsilon 4$  em pacientes classificados como possíveis portadores de DA, quando comparados com a frequência observada em indivíduos controle. Estudos com ratinhos transgênicos indicam que a proteína apoE contribui para a deposição da proteína  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ), sendo este efeito mais acentuado na presença da isoforma apoE4<sup>51</sup> (Figura 2). Ratinhos *knockout* para o gene codificante da apoE, demonstraram inibição da formação do depósito  $A\beta$ <sup>51</sup>. Nestes ratinhos a ausência de apoE afetou a acumulação extracelular de  $A\beta$  mas não a sua síntese<sup>51</sup>. Esta variante  $\epsilon 4$  é um fator de risco e não uma causa determinante de DA. Aparentemente, a isoforma E4 é ineficaz na mediação de processos de reparação celular<sup>33,52</sup>.

Há um estudo<sup>53</sup> em que a presença de dois alelos  $\epsilon 4$  é determinante no que diz respeito à redução da idade de início da doença de até uma década, enquanto somen-

te um alelo  $\epsilon 4$  determina uma redução menos acentuada.

Noutro estudo realizado<sup>54</sup> foi estimado o grau de risco determinado pelos diferentes genótipos do gene apoE entre indivíduos da mesma faixa etária. Os resultados deste estudo comprovaram que indivíduos com 80 anos de idade que apresentavam genótipo  $\epsilon 3/\epsilon 4$  possuem taxa de incidência de DA aumentada em 3-4x quando comparados a indivíduos com genótipo  $\epsilon 3/\epsilon 3$ . Já o genótipo  $\epsilon 4/\epsilon 4$  leva a um aumento de 4-9x na taxa de incidência, enquanto indivíduos que contêm a isoforma  $\epsilon 2$  apresentam decréscimo de 43% no risco demonstrado por indivíduos  $\epsilon 3/\epsilon 3$ , o que sugere uma função de proteção do alelo  $\epsilon 2$ . Esta hipótese de proteção do alelo  $\epsilon 2$  contra o desenvolvimento da patologia, tinha sido já levantada por outros autores<sup>55</sup>. Este aumento da probabilidade de desenvolvimento da doença em indivíduos portadores de uma ou duas cópias deste alelo foi confirmado por outros autores<sup>33</sup>.

A síntese de apoE pelos neurónios humanos em quantidades significativas<sup>56,57</sup> parece atuar como parte de um programa compensatório para reduzir a neurodegeneração do sistema nervoso<sup>58</sup>. Parece haver uma função específica da apoE na formação de placas amilóides e emaranhados neurofibrilares, componentes das placas amilóides cerebrais. A apoE4 desencadeia a fibrillogênese *in vivo* e *in vitro* do péptido  $\beta$ -amilóide, acelerando o desenvolvimento de DA, e a apoE3 liga-se à proteína Tau, reduzindo a sua taxa inicial de fosforilação e o consequente desenvolvimento de filamentos<sup>59,60</sup>.



*Figura 2.* Esquema da interação da apoE, Aβ e fatores de risco ambientais que levam à patogênese da DA. A proteína apoE atua como transportador de colesterol para o cérebro. O colesterol modula o processamento da APP, por aumento da atividade da enzima β-secretase, resultando num aumento da produção de Aβ. Este, por sua vez, causa neurodegeneração e o excesso de Aβ leva ao aumento dos depósitos de amiloide. Enquanto a apoE2 tem um efeito positivo na memória e é então protetor contra o desenvolvimento de DA, a apoE4 parece ter um papel neurotóxico que leva a neurodegeneração e acelera a deposição de Aβ. Portanto, a interação entre Aβ, apoE4, colesterol e APP forma uma cascata de eventos que culminam na patogenicidade da DA.

Na tentativa de explicar o papel da apoE na acumulação do depósito Aβ, dois modelos foram enumerados por vários autores<sup>61</sup>: no primeiro, a Aβ solúvel interage com a proteína apoE que se encontra associada a uma partícula lipídica, e em seguida ocorre a endocitose mediada por receptor. As lipoproteínas são digeridas por enzimas lisossomais, libertando o colesterol na célula. Nos lisossomas, uma fracção de apoE é degradada, enquanto a restante apoE permanece associada a Aβ, promovendo a agregação em fibrilas amilóides que são lançadas de novo para o meio extracelular (Figura 2). Uma vez que a apoE4 tem maior afinidade para Aβ do que as outras isoformas, espera-se uma aceleração neste processo na presença desta isoforma. No segundo modelo, além de a apoE4 facilitar diretamente a entrada de Aβ na célula e sua agregação, também pode aumentar a taxa de produção de Aβ, através do aumento do colesterol celular. Após a endocitose mediada por receptor e degradação enzimática das

lipoproteínas, o colesterol é libertado para as membranas celulares. As lipoproteínas com apoE4 contêm mais colesterol, e o aumento nos níveis de esterol nas membranas intracelulares promove um aumento da taxa de formação de Aβ, resultando numa maior libertação deste para o meio extracelular (Figura 2).

Mais ainda, com particular importância para o desenvolvimento de DA estão os seguintes fatores: (I) a apoE4 parece ser mais vulnerável do que as outras isoformas a degradação aberrante, limitando assim a mobilização de lípidos para reparação neuronal e neuroplasticidade<sup>62,63</sup>; (II) a síntese aumentada de fragmentos truncados no terminal C, que é frequente na isoforma E4, estimula a hiperfosforilação da proteína Tau e a consequente formação de emaranhados neurofibrilares<sup>64</sup>; (III) em pacientes portadores do alelo ε4, a eliminação de β-amiloide é menos eficiente, e a deposição do péptido neurotóxico é mais pronunciada<sup>65,66</sup>; (IV) danos isquêmicos cerebrais e

hipertensão resultante de lesões na massa branca, que são fatores que contribuem para a severidade da demência na DA, tendem a ser mais pronunciados em pacientes com  $\epsilon 4$ <sup>67,68</sup>.

É de ressaltar que estudos apontam que, apesar do alelo  $\epsilon 4$  ser um fator de risco reconhecido para DA de início tardio, foi demonstrado que este também possui influência na DA de início precoce, sendo que a frequência alélica em pacientes com DAIP foi maior do que a visualizada em controles (35,4% vs 15,6%)<sup>52</sup>.

## CONCLUSÃO

A doença de Alzheimer é uma das doenças desafiadoras do século, devido ao seu impacto social e público. Sabe-se que o desenvolvimento da DA resulta de uma acumulação de alterações em vários genes e não de alteração em apenas um único gene.

A forma mais comum de DA, a de início tardio tem uma componente genética importante, ainda em parte inexplicada. No entanto, o polimorfismo da apoE no que se refere à sua variante  $\epsilon 4$  foi uma das primeiras alterações moleculares associadas a DA. Assim sendo, o alelo  $\epsilon 4$  aumenta o risco enquanto o alelo  $\epsilon 2$  reduz o risco de desenvolver DAIT.

A associação da apoE com DA, faz com que a apoE seja uma das apolipoproteínas mais estudadas e o seu polimorfismo está descrito num grande número de populações. Na Europa, observa-se uma associação entre o aumento progressivo da frequência do alelo  $\epsilon 4$  com a latitude e um consequente aumento da prevalência de doenças cardiovasculares em países nórdicos<sup>69,70</sup>. Apesar desta relação, foi verificado que há uma grande variabilidade interindividual e interpopulacional nos riscos relacionados a cada genótipo e que a intensidade das associações pode variar de população para população<sup>70,72</sup>. Esta variação demonstra a interferência do polimorfismo da apoE que é dependente de múltiplos fatores ambientais e da composição genética de outros *loci* das populações<sup>70,71</sup>.

## REFERÊNCIAS

1. Mestel R. Putting priors to the test. *Science* 1996;273:184-9. <http://dx.doi.org/10.1126/science.273.5272.184>
2. Ying W. Deleterious network hypothesis of Alzheimer's disease. *Med Hypotheses* 1996;46:421-8. [http://dx.doi.org/10.1016/S0306-9877\(96\)90021-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0306-9877(96)90021-3)
3. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 2001;81:741-66.
4. Malamud D. Neuropathology of organic brain syndromes associated with aging. In: Gaitz CM. *Aging and the brain*, NY: Plenum Press; 1972; p.63-87. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4684-8503-5\\_6](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4684-8503-5_6)
5. Pericak-Vance MA, Bass MP, Yamaoka LH, Gaskell PC, Scott WK, Terwedow HA, et al. Complete genomic screen in late-onset familial Alzheimer disease. Evidence for a new locus on chromosome 12. *JAMA* 1997;278:1237-41. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.278.15.1237>
6. St George-Hyslop PH, Tanzi RE, Polinsky RJ, Haines JL, Nee L, Watkins PC, et al. The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science* 1987;235:885-90. <http://dx.doi.org/10.1126/science.2880399>
7. Schellenberg D, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, et al. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* 1992;258:668-71. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1411576>
8. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 1995;269:973-7. <http://dx.doi.org/10.1126/science.7638622>
9. Blacker D, Wilcox MA, Laird NM, Rodes L, Horvath SM, Go RC, et al. Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet* 1998; 19:357-60. <http://dx.doi.org/10.1038/1243>
10. Papassotiropoulos A, Bagli M, Feder O, Jessen F, Maier W, Rao ML, et al. Genetic polymorphism of cathepsin D is strongly associated with the risk for developing sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1999;262:171-4. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940\(99\)00071-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940(99)00071-3)
11. Harman D. A hypothesis on the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1996;786:152-68. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1996.tb39059.x>
12. Tanzi RE, Bertram L. New frontiers in Alzheimer's disease genetics. *Neuron* 2001;32:181-4. [http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00476-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00476-7)
13. Holmes C. Genotype and phenotype in Alzheimer's disease. *Br J Psychiatry* 2002;180:131-4. <http://dx.doi.org/10.1192/bjp.180.2.131>
14. Rogaeve E. The solved and unsolved mysteries of the genetics of early-onset Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* 2002; 2:1-10. <http://dx.doi.org/10.1385/NMM:2:1:01>
15. Cacabelos R. Diagnosis of Alzheimer's disease: defining genetic profiles (genotype vs phenotype). *Acta Neurol Scand Suppl* 1996; 165:72-84. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0404.1996.tb05875.x>
16. Laws SM, Hone E, Gandy S, Martins RN. Expanding the association between the APOE gene and the risk of Alzheimer's disease: possible roles for APOE promoter polymorphisms and alterations in APOE transcription. *J Neurochem* 2003; 84:1215-36. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01615.x>

17. Uchida N, Ujike H, Tanaka Y, Sakai A, Yamamoto M, Fujisawa Y, et al. A variant of the sigma receptor type-1 gene is a protective factor for Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry* 2005; 13:1062-6.  
<http://dx.doi.org/10.1176/appi.ajgp.13.12.1062>  
<http://dx.doi.org/10.1097/00019442-200512000-00005>
18. Monastero R, Caldarella R, Mannino M, Cefalù AB, Lopez G, Noto D, et al. Lack of association between angiotensin converting enzyme polymorphism and sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2002; 335:147-9.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)01182-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940(02)01182-5)
19. Kounnas MZ, Moir RD, Rebeck GW, Bush AI, Argraves WS, Tanzi RE, et al. LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation. *Cell* 1995; 82:331-40.  
[http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90320-8](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(95)90320-8)
20. Rogers J. An IL-1 alpha susceptibility polymorphism in Alzheimer's disease: new fuel for the inflammation hypothesis. *Neurology* 2000;55:464-5.  
<http://dx.doi.org/10.1212/WNL.55.4.464>
21. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 1991; 286:152-4.  
[http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80962-3](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(91)80962-3)
22. Paik YK, Chang DJ, Reardon CA, Davies GE, Mahley RW, Taylor JM. Nucleotide sequence and structure of the human apolipoprotein E gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:3445-9.  
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.82.10.3445>
23. Jong MC, Hofker MH, Havekes LM. Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2 and ApoC3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:472-84.  
<http://dx.doi.org/10.1161/01.ATV.19.3.472>
24. Bowman BH. Hepatic plasma proteins: mechanisms of function and regulation, San Diego: Academic Press Inc; 1993; p.159-67.
25. Smit M, van der Kooij-Meijis E, Frants RR, Havekes L, Klasen EC. Apolipoprotein gene cluster on chromosome 19: Definite localization of the APOC2 gene and the polymorphic HpaI site associated with type III hyperlipoproteinemia. *Hum Genet* 1988; 78:90-3.  
<http://dx.doi.org/10.1007/BF00291243>
26. Lin CT, Xu YF, Wu JY, Chan L. Immunoreactive apolipoprotein E is a widely distributed cellular protein. Immunohistochemical localization of apolipoprotein E in baboon tissues. *J Clin Invest* 1986; 78:947-58.  
<http://dx.doi.org/10.1172/JCI112685>
27. Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Foss D, Mahley RW. Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1987; 917:148-61.  
[http://dx.doi.org/10.1016/0005-2760\(87\)90295-5](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2760(87)90295-5)
28. Nakai M, Kawamata T, Taniguchi T, Maeda K, Tanaka C. Expression of apolipoprotein E mRNA in rat microglia. *Neurosci Lett* 1996; 211:41-4.  
[http://dx.doi.org/10.1016/0304-3940\(96\)12716-6](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3940(96)12716-6)
29. Beffert U, Poirier J. ApoE associated with lipid has a reduced capacity to inhibit beta-amyloid fibril formation. *Neuroreport* 1998; 9:3321-3.  
<http://dx.doi.org/10.1097/00001756-199810050-00031>
30. Lane RM, Farlow MR. Lipid homeostasis and apolipoprotein E in the development and progression of Alzheimer's disease. *J Lipid Res* 2005; 46:949-68.  
<http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M400486-JLR200>
31. Vaya J, Schipper HM. Oxysterols, cholesterol homeostasis, and Alzheimer disease. *J Neurochem* 2007; 102:1727-37.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04689.x>
32. Siest G, Pillot T, Régis-Bailly A, Leininger-Muller B, Steinmetz J, Galteau MM, et al. Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine. *Clin Chem* 1995; 41:1068-86.
33. Mahley RW, Rall SC Jr. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000;1:507-37.  
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.genom.1.1.507>
34. Mensenkamp AR, Jong MC, van Goor H, van Luyn MJ, Bloks V, Havinga R, et al. Apolipoprotein E participates in the regulation of very low density lipoprotein-triglyceride secretion by the liver. *J Biol Chem* 1999; 274:35711-8.  
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.50.35711>
35. Li WH, Tanimura M, Luo CC, Datta S, Chan L. The apolipoprotein multigene family: biosynthesis, structure, structure-function relationships, and evolution. *J Lipid Res* 1988; 29:245-71.
36. Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW. Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. *J Biol Chem* 1982; 257:2518-21.
37. Weisgraber KH, Rall SC Jr, Mahley RW. Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. *J Biol Chem* 1981; 256:9077-83.
38. Rall SC Jr, Weisgraber KH, Mahley RW. Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J Biol Chem* 1982; 257:4171-8.
39. Utermann G, Pruin N, Steinmetz A. Polymorphism of apolipoprotein E. III. Effect of a single polymorphic gene locus on plasma lipid levels in man. *Clin Genet* 1979; 15:63-72.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-0004.1979.tb02028.x>
40. Martins RN, Clarnette R, Fisher C, Broe GA, Brooks WS, Montgomery P, et al. ApoE genotypes in Australia: roles in early and late onset Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Neuroreport* 1995; 6:1513-6.  
<http://dx.doi.org/10.1097/00001756-199507310-00012>
41. Scacchi R, Gambina G, Ruggeri M, Martini MC, Ferrari G, Silvestri M, et al. Plasma levels of apolipoprotein E and genetic markers in elderly patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1999; 259:33-6.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940\(98\)00889-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940(98)00889-1)
42. Corbo RM, Scacchi R. Apolipoprotein E (apoE) allele distribution in the world: is a apoE4 a "thrifty" allele? *Ann Hum Genet* 1999; 63:301-10.  
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-1809.1999.6340301.x>
43. Hixson JE, Cox LA, Borenstein S. The baboon apolipoprotein E gene: structure, expression, and linkage with the gene for apolipoprotein C-1. *Genomics* 1988; 2:315-23.  
[http://dx.doi.org/10.1016/0888-7543\(88\)90020-1](http://dx.doi.org/10.1016/0888-7543(88)90020-1)
44. Hanlon CS, Rubinsztein DC. Arginine residues at codons 112 and 158 in the apolipoprotein E gene correspond to the ancestral state in humans. *Atherosclerosis* 1995;112:85-90.  
[http://dx.doi.org/10.1016/0021-9150\(94\)05402-5](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9150(94)05402-5)
45. Finch C. Toward a biology of middle age. In: Lachman ME. *Handbook of Midlife Development*, NY: John Wiley & Sons; 2001; p.77-108.
46. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol* 1999;56:303-8.  
<http://dx.doi.org/10.1001/archneur.56.3.303>
47. Davidson Y, Gibbons L, Pritchard A, Hardicre J, Wren J, Stopford C, et al. Apolipoprotein E epsilon4 allele frequency and age at onset of Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2007; 23:60-6.  
<http://dx.doi.org/10.1159/000097038>
48. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993;261:921-3.  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.8346443>
49. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, et al. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc*

- Natl Acad Sci USA 1993;90:1977-81.  
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.90.5.1977>
- 50.Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, et al. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 1993;43:1467-72.  
<http://dx.doi.org/10.1212/WNL.43.8.1467>
- 51.Bales KR, Verina T, Dodel RC, Altstiel L, Bender M, Hyslop P, et al. Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. *Nat Genet* 1997;17:263-4.  
<http://dx.doi.org/10.1038/ng1197-263>
- 52.Bertram L, McQueen MB, Mullin K, Blacker D, Tanzi RE. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the Alzgene database. *Nat Genet* 2007;39:17-23.  
<http://dx.doi.org/10.1038/ng1934>
- 53.Panza F, Solfrizzi V, D'Introno A, Capurso C, Colacicco AM, Torres F, et al. Genetics of late-onset Alzheimer's disease: vascular risk and beta-amyloid metabolism. *Recenti Prog Med* 2002;93:489-97.
- 54.Ewbank DC. A multistate model of the genetic risk of Alzheimer's disease. *Exp Aging Res* 2002;28:477-99.  
<http://dx.doi.org/10.1080/03610730290103096>
- 55.Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC Jr, et al. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet* 1994;7:180-4.  
<http://dx.doi.org/10.1038/ng0694-180>
- 56.Roses AD, Gilbert J, Xu PT, Sullivan P, Popko B, Burkhardt DS, et al. Cis-acting human ApoE tissue expression element is associated with human pattern of intraneuronal ApoE in transgenic mice. *Neurobiol Aging* 1998;9:S53-8.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0197-4580\(98\)00030-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0197-4580(98)00030-X)
- 57.Xu PT, Gilbert JR, Qiu HL, Ervin J, Rothrock-Christian TR, Hulette C, et al. Specific regional transcription of apolipoprotein E in human brain neurons. *Am J Pathol* 1999;154:601-11.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65305-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65305-9)
- 58.Boschert U, Merlo-Pich E, Higgins G, Roses AD, Catsicas S. Apolipoprotein E expression by neurons surviving excitotoxic stress. *Neurobiol Dis* 1999;6:508-14.  
<http://dx.doi.org/10.1006/nbdi.1999.0251>
- 59.Corder EH, Lannfelt L, Bogdanovic N, Fratiglioni L, Mori H. The role of APOE polymorphisms in late-onset dementias. *Cell Mol Life Sci* 1998;54:928-34.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s000180050223>
- 60.Czyzewski K, Pfeffer A, Barcikowska M. [Apolipoprotein E function in the nervous system]. *Neurol Neurochir Pol* 1998;32:125-32.
- 61.Puglielli L, Tanzi RE, Kovacs DM. Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat Neurosci* 2003;6:345-51.  
<http://dx.doi.org/10.1038/nn0403-345>
- 62.Acharya P, Segall ML, Zaiou M, Morrow J, Weisgraber KH, Phillips MC, et al. Comparison of the stabilities and unfolding pathways of human apolipoprotein E isoforms by differential scanning calorimetry and circular dichroism. *Biochim Biophys Acta* 2002;1584:9-19.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S1388-1981\(02\)00263-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1388-1981(02)00263-9)
- 63.Finch CE, Sapolsky RM. The evolution of Alzheimer disease, the reproductive schedule, and apoE isoforms. *Neurobiol Aging* 1999;20:407-8.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0197-4580\(99\)00053-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0197-4580(99)00053-6)
- 64.Harris FM, Brecht WJ, Xu Q, Tesseur I, Kekoni L, Wyss-Coray T, et al. Carboxyl-terminal-truncated apolipoprotein E4 causes Alzheimer's disease-like neurodegeneration and behavioral deficits in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:10966-71.  
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1434398100>
- 65.Bennett DA, Wilson RS, Schneider JA, Evans DA, Aggarwal NT, Arnold SE, et al. Apolipoprotein E epsilon4 allele, AD pathology, and the clinical expression of Alzheimer's disease. *Neurology* 2003;60:246-52.  
<http://dx.doi.org/10.1212/01.WNL.0000042478.08543.F7>
- 66.Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, et al. Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:9649-53.  
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.90.20.9649>
- 67.De Leeuw FE, Barkhof F, Scheltens P. White matter lesions and hippocampal atrophy in Alzheimer's disease. *Neurology* 2004;62:310-12.  
<http://dx.doi.org/10.1212/01.WNL.0000103289.03648.AD>
- 68.Laskowitz DT, Sheng H, Bart RD, Joyner KA, Roses AD, Warner DS. Apolipoprotein E-deficient mice have increased susceptibility to focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997;17:753-8.  
<http://dx.doi.org/10.1097/00004647-199707000-00005>
- 69.Lucotte G, Loirat F, Hazout S. Pattern of gradient of apolipoprotein E allele\*4 frequencies in western Europe. *Hum Biol* 1997;69:253-62.
- 70.Kardia SLR, Stengård J, Templeton A. An evolutionary perspective on the genetic architecture of susceptibility to cardiovascular disease. In: Stearns SC. *Evolution in Health and Disease*. Oxford: Oxford University Press; 1999; p.382-8.
- 71.Fullerton SM, Clark AG, Weiss KM, Nickerson DA, Taylor SL, Stengård JH, et al. Apolipoprotein E variation at the sequence haplotype level: implications for the origin and maintenance of a major human polymorphism. *Am J Hum Genet* 2000;67:881-900.  
<http://dx.doi.org/10.1086/303070>
- 72.Nickerson DA, Taylor SL, Fullerton SM, Weiss KM, Clark AG, Stengård JH, et al. Sequence diversity and large-scale typing of SNPs in the human apolipoprotein E gene. *Genome Res* 2000;10:1532-45.  
<http://dx.doi.org/10.1101/gr.146900>