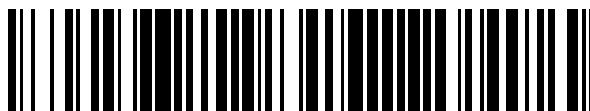


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 157**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07777651 .6**
96 Fecha de presentación: **26.01.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1987165**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.11.2008**

54 Título: **GENES QUE AFECTAN EL DESEMPEÑO DE LA MEMORIA HUMANA.**

30 Prioridad:
27.01.2006 US 762713 P
19.10.2006 US 862194 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.11.2011

73 Titular/es:
**TRANSLATIONAL GENOMICS RESEARCH
INSTITUTE
445 N. FIFTH STREET SUITE 600
PHOENIX AZ 85004, US y
UNIVERSITY OF ZÜRICH**

72 Inventor/es:
**PAPASSOTIROPOULOS, Andreas;
STEPHAN, Dietrich y
DE QUERVAIN, Dominique, J.-F.**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 369 157 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Genes que afectan el desempeño de la memoria humana

Campo de la invención

- 5 Esta invención se relaciona con secuencias de ADN asociadas con el desempeño de la memoria humana. Esta invención se relaciona adicionalmente con (i) métodos para la detección de enfermedades y afecciones patológicas que afectan la memoria humana, (ii) métodos para identificar agentes útiles para el tratamiento de enfermedades y afecciones patológicas que afectan la memoria humana, y (iii) agentes y composiciones útiles para el tratamiento de enfermedades y afecciones patológicas que afectan la memoria humana.

Antecedentes de la invención

- 10 La memoria humana es rasgo cognitivo poligénico. Los estimados hereditarios de aproximadamente cincuenta por ciento (50%) sugieren que la variabilidad genética que ocurre en la naturaleza tiene un impacto importante sobre estas funciones fundamentales del cerebro. (G. E. McClearn et al., Science 276, 1560 (1997)). Los recientes estudios de asociación de gen candidato han identificado exitosamente algunas variaciones genéticas con impacto significativo sobre la capacidad de la memoria humana y el desempeño de la memoria humana. (D. J. de Quervain et al., Nat. Neurosci. 6, 1141 (2003); A. Papassotiropoulos et al. Hum. Mo in the renal system I. Genet. 14, 2241 (2005)). Sin embargo, el éxito de esta hipótesis impulsada por los estudios depende en gran parte de la información preexistente, que limita su potencial para identificar genes novedosos y rutas moleculares. (N. J. Schork, Adv. Genet. 42, 299 (2001); J.R. Kelsoe, Int. Rev. Psychiatry 16, 294 (2004)). A la fecha, no se ha realizado una investigación libre de hipótesis no sesgada del genoma completo para los genes que controlan la memoria humana. La publicación de Edward D. Levin, Behaviour Genetics, Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers, volumen 35, número 4, páginas 447 - 453, proporciona un gen expresado diferencialmente con impacto sobre el desempeño de la memoria: aquí, una prueba del efecto de la sobreexpresión de EC-SOD sobre el período de vida de un grupo de ratones y sus controles tipo natural determina la escala de tiempo sobre la sobreexpresión del EC-SOD que atenúa el deterioro de la memoria inducido por el envejecimiento. Este hallazgo demuestra que el mejoramiento de la actividad EC-SOD parece mejorar el desempeño de la memoria específicamente en ratones viejos. El tratamiento imitador del EC-SOD durante el transcurso del envejecimiento sugiere una función en el deterioro cognitivo inducido por el envejecimiento. Por lo tanto, existe una clara e insatisfecha necesidad en la técnica de identificar los genes y las variaciones genéticas asociadas con la memoria humana.
- 25

Resumen de la invención

- 30 La presente invención surge de estudios de asociación genéticos de genoma completo realizados en dos poblaciones humanas particulares para detectar los polimorfismos de nucleótidos simples específicos dentro de las regiones genómicas implicadas en la función de la memoria humana.

- 35 Se describe que las regiones genómicas que codifican el KIBRA de proteína neuronal y las regiones genómicas que codifican la proteína sináptica Calsintena 2 (CLSTN2), así como también diversos polimorfismos de nucleótidos simples dentro de los genes KIBRA y CLSTN2 se utilizan para modular la función de la memoria humana.

En otro aspecto, se describen métodos para la detección de enfermedades y afecciones patológicas que afectan la memoria humana.

- 40 En un aspecto adicional, se describen métodos para identificar agentes útiles para el tratamiento de enfermedades y afecciones patológicas que afectan la memoria humana. Tales agentes se identifican con base en su capacidad para modular la función de la memoria humana.

Finalmente se describen los agentes y composiciones útiles para el tratamiento de enfermedades y afecciones patológicas que afectan la memoria humana. Tales agentes también son útiles como compuestos principales para diseñar o buscar fármacos adicionales y composiciones farmacéuticas para tratar enfermedades y afecciones patológicas relacionadas con la función de la memoria humana.

- 45 Breve descripción de los dibujos

La siguiente invención se llegará a entender mejor con referencia a la especificación, las reivindicaciones adjuntas, y los dibujos acompañantes, en donde:

Figura 1. Tabla que describe la influencia de los polimorfismos de nucleótidos simples (SPN) rs17070145 (KIBRA) y rs6439886 (CLSTN2) sobre la memoria episódica verbal en la población Suiza.

Figura 2. Tabla que describe la influencia de los SPN rs17070145 (KIBRA) y rs6439886 (CLSTN2) sobre la memoria episódica verbal en la población Estadounidense.

Figura 3. Significancia de los SPN y haplotipos. Se utilizan catorce SPN comunes para ajustar el mapa de la región que aloja KIBRA, RARS, y parte de ODZ2. Se detectan altos niveles de desequilibrio de acoplamiento ($P < 0.001$) entre los SPN 2 y 3, entre los SPN 4 y 12, y entre los SPN 13 y 14. El SPN 8 y el haplotipo correspondiente producen los mayores niveles de significancia ($P = 0.000004$ y $P = 0.000008$, respectivamente). Los puntos representan los SNP, las líneas horizontales continuas representan haplotipos, y la línea punteada representa el nivel de significancia de 0.05. 1: rs1363560, 2: rs7727920, 3: rs2279698, 4: rs11738934, 5: rs6862868, 6: rs2241368, 7: rs17551608, 8: rs17070145, 9: rs4976606, 10: rs3822660, 11: rs3822659, 12: rs3733980, 13: rs244903, 14: rs10516047.

Figura 4. Los niveles de expresión KIBRA en el homogenato de cerebro completo humano, hipocampo, lóbulo frontal y parietal evaluado por qRT-PCR y normalizado para los niveles de expresión GAPDH. Los niveles de expresión de KIBRA de longitud completa en el cerebro humano son bajos (Figura izquierda). En contraste, los niveles de expresión del KIBRA truncado son altos en todas las regiones de cerebro examinadas, con mayores niveles en el hipocampo (Figura derecha). Se utilizan tres combinaciones de cebador para la cuantificación de los niveles de expresión. La primera combinación reconoce solo los transcritos KIBRA de longitud completa; la segunda detecta el KIBRA de longitud completa y su versión truncada (K1AA0869). Se utiliza una tercera combinación de cebador para descartar la contaminación genómica.

Figura 5. Diferencias dependientes del alelo KIBRA en la activación del hipocampo. Se realiza fMRI en 30 sujetos humanos saludables (15 portadores de alelo T, 15 no portadores del alelo T de SPN rs17070145) durante la recuperación de la memoria episódica. Los grupos de genotipo se emparejan por edad, sexo, educación. Los grupos también se emparejan para el desempeño de recordación para estudiar las diferencias dependientes del genotipo en la actividad cerebral relacionada con la memoria independientemente del desempeño diferencial. En comparación con los no portadores del alelo T, los portadores de alelo T tienen incrementos relacionados con la memoria significativamente mayores en la actividad cerebral del hipocampo. Umbral: $P < 0.001$. Activación grande: hipocampo, activación pequeña: parahipocampo.

Descripción detallada de la invención

Definiciones.

De acuerdo con la presente invención y como se utiliza aquí, se definen los siguientes términos y abreviaturas con los siguientes significados, a menos que se indique explícitamente otra cosa. Estas explicaciones están destinadas a ser solo de ejemplo. Ellas no están destinadas a limitar los términos como se describen o se refieren a través de la especificación. Más bien, estas explicaciones significan que incluyen cualesquier aspectos adicionales y/o ejemplos de los términos como se describen y se reivindican aquí.

Como se utiliza aquí, "ácido nucleico" incluye referencia a un polímero de desoxirribonucleótido o ribonucleótido en la forma de cadena doble o sencilla, y a menos que se limite de otra forma, abarca análogos conocidos (por ejemplo, ácidos nucleicos de péptido) que tienen la naturaleza esencial de los nucleótidos naturales ya que ellos hibridan a los ácidos nucleicos de cadena sencilla en una forma similar a los nucleótidos que están presentes en forma natural.

Como se utiliza aquí, los términos "que codifican" o "codificados" cuando se utilizan en el contexto de un ácido nucleico especificado significa que el ácido nucleico comprende la información requerida para dirigir la traducción de la secuencia de nucleótido en una proteína especificada. La información mediante la cual se codifica una proteína se especifica por el uso de codones. Un ácido nucleico que codifica la proteína puede comprender las secuencias no traducidas (por ejemplo, intrones) en las regiones traducidas del ácido nucleico o puede carecer de tal intervención de las secuencias no traducidas (por ejemplo, como en cADN). Como se utiliza aquí, los términos "que codifican" o "codificados" cuando se refieren a una proteína o polipéptido de la secuencia definida incluyen todas las secuencias de ácido nucleico que codifican la proteína o polipéptido de la secuencia definida, que incluye las secuencias de ácido nucleico que difieren de la secuencia presente en forma natural mediante la degeneración del código genético, a menos que se excluyan tales secuencias. Es bien conocido en la técnica que se codifican muchos aminoácidos mediante múltiples codones, y que muchas secuencias de ácido nucleico por lo tanto pueden codificar la misma proteína o la secuencia de polipéptidos.

Como se utiliza aquí, "secuencia de longitud completa" en referencia a un polinucleótido especificado o su proteína codificada significa que tiene la secuencia de ácido nucleico completa o la secuencia de aminoácidos completa de una secuencia nativa. "Secuencia nativa" está destinada a una secuencia endógena, es decir, una secuencia no construida por ingeniería encontrada en el genoma de un organismo. Un polinucleótido de longitud completa codifica la forma catalíticamente activa de longitud completa de la proteína específica.

Como se utiliza aquí, el término "anticodificante" utilizado en el contexto de la orientación de una secuencia de nucleótido se refiere a una secuencia de polinucleótido dúplex que se liga en forma operativa a un promotor en una orientación en donde se transcribe la cepa anticodificante. La cepa anticodificante es suficientemente complementaria a un producto de transcripción endógeno de tal manera que se inhibe frecuentemente la traducción del producto de transcripción endógeno. Así, cuando se utiliza el término "anticodificante" en el contexto de una secuencia de nucleótidos particular, el término se refiere a la hebra complementaria del producto de transcripción de referencia.

Los términos "polipéptido," "péptido," y "proteína" se utilizan intercambiabilmente aquí para referirse a un polímero de los residuos de aminoácido. Los términos aplican a los polímeros de aminoácido en los que uno o más de los residuos de aminoácidos es un análogo químico artificial de un aminoácido que está presente en forma natural correspondiente, así como también polímeros de aminoácidos que están presentes en forma natural.

Los términos "residuo" o "residuo de aminoácido" o "aminoácido" se utilizan intercambiabilmente aquí para referirse a un aminoácido que se incorpora dentro de una proteína, polipéptido, o péptido (colectivamente "proteína"). El aminoácido puede ser un aminoácido que está presente en forma natural y, a menos que se limite de otra forma, puede abarcar los análogos conocidos de los aminoácidos naturales que pueden funcionar en una forma similar como los aminoácidos que están presentes en forma natural. El experto en la técnica conoce, en un péptido o proteína, las sustituciones conservadoras adecuadas de los aminoácidos y se pueden realizar de manera general sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Aquellos expertos en la técnica reconocen que, en general, las sustituciones de aminoácido individuales en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (ver, por ejemplo Watson et al. *Molecular Biology of the Gene*, 4ta Edición, 1987, Benjamin/Cummings, p. 224). En particular, tal una variante conservadora tiene una secuencia de aminoácidos modificada, de tal manera que los cambios no alteran sustancialmente la estructura de la proteína (la variante conservadora) y/o la actividad, por ejemplo, actividad de anticuerpo, actividad enzimática, o actividad del receptor. Estas incluyen variaciones conservadoramente modificadas de una secuencia de aminoácidos, es decir, las sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácido de aquellos residuos que no son críticos para la actividad de proteína, o la sustitución de aminoácidos con residuos que tienen propiedades similares (por ejemplo, ácidas, básicas, positivamente o negativamente cargadas, polar o no polar, etc.) de tal manera que las sustituciones de incluso los aminoácidos críticos no alteran sustancialmente la estructura y/o la actividad. Se conocen bien en la técnica las tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Por ejemplo, una directriz de ejemplo para seleccionar sustituciones conservadoras incluye (el residuo original seguido por la sustitución de ejemplo): Ala/Gly o Ser; Arg/Lys; Asn/Gln o His; Asp/Glu; Cys/Ser; Gln/Asn; Gly/Asp; Gly/Ala o Pro; His/Asn o Gln; Ile/Leu o Val; Leu/Ile o Val; Lys/Arg o Gln o Glu; Met/Leu o Tyr o Ile; Phe/Met o Leu o Tyr; Ser/Thr; Thr/Ser; Trp/Tyr; Tyr/Trp o Phe; Val/Ile o Leu. Una directriz alternativa de ejemplo utiliza los siguientes seis grupos, cada uno contiene aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí: (1) alanina (A o Ala), serina (S o Ser), treonina (T o Thr); (2) ácido aspártico (D o Asp), ácido glutámico (E o Glu); (3) asparagina (N o Asn), glutamina (Q o Gln); (4) arginina (R o Arg), lisina (K o Lys); (5) isoleucina (I o Ile), leucina (L o Leu), metionina (M o Met), valina (V o Val); y (6) fenilalanina (F o Phe), tirosina (Y o Tyr), triptofan (W o Trp); (ver también, por ejemplo, Creighton (1984) *Proteins*, W. H. Freeman and Company; Schulz and Schirmer (1979) *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag). Un experto en la técnica apreciará que las sustituciones identificadas anteriormente no solo son sustituciones conservadoras posibles. Por ejemplo, para algunos propósitos, uno puede considerar a todos los aminoácidos cargados como sustituciones conservadoras para cada uno si ellos son positivos o negativos. Adicionalmente, las sustituciones, eliminaciones o adiciones individuales que alteran, agregan o eliminan un aminoácido único o un porcentaje pequeño de aminoácidos en una secuencia modificada también se pueden considerar "variaciones conservadoramente modificadas" cuando la estructura tridimensional y la función de la proteína que se va a suministrar se conservan mediante tal variación.

Se pueden producir los polipéptidos de la invención a partir de un ácido nucleico descrito aquí, o mediante el uso de técnicas de biología molecular estándar. Por ejemplo, se puede producir una proteína truncada de la invención mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante de la invención en una célula anfitriona apropiada, o alternativamente mediante una combinación de procedimientos ex vivo, tales como digestión y purificación de proteasa.

Como se utiliza aquí para referirse a una proteína o molécula de ácido nucleico, los términos "aislado" y/o "purificado" se utilizan intercambiabilmente para referirse a un estado en el que la proteína o molécula de ácido nucleico de interés se encuentra típicamente en la naturaleza, y en el que la proteína o molécula de ácido nucleico de interés está sustancialmente libre de otras moléculas que interferirían con la actividad de la proteína o la molécula de ácido nucleico que se va a evaluar o emplear.

Por ejemplo, el término "purificado" se puede referir a una preparación en la que la proteína o molécula de ácido nucleico de interés es 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97.5%, 99%, 99.9%, o 99.99% pura, o uno de todavía mayor pureza. Son bien conocidos en la técnica los métodos para el aislamiento de la proteína y las moléculas de ácido nucleico.

Como se utiliza aquí el término "construido por ingeniería en forma recombinante" o "construido por ingeniería" connota la utilización de tecnología de ADN recombinante para introducir (por ejemplo, por ingeniería) un cambio en la estructura de la proteína con base en un entendimiento del mecanismo de acción de la proteína y una consideración de los aminoácidos que se introducen, eliminan, o sustituyen.

- 5 Como se utiliza aquí, los términos "polimorfismo de nucleótido simple" o "SNP" se utilizan intercambiamente para referirse a una variación en la secuencia de ADN que ocurre cuando se altera un nucleótido único (A, T, C, o G) en el genoma. Los SPN pueden ocurrir en las regiones codificante (gen) y no codificante del genoma.

Como se utiliza aquí, el término "haplotipo" se refiere a un conjunto de genes en más de un locus o una región genómica que contiene polimorfismos ligados que heredan un individuo de uno de sus progenitores.

- 10 Como se utiliza aquí, el término "desequilibrio de acoplamiento" se refiere a una condición en donde las frecuencias observadas de los haplotipos en una población no están de acuerdo con las frecuencias de haplotipo predichas al multiplicar la frecuencia de los marcadores genéticos individuales en cada haplotipo.

- 15 Como se utiliza aquí, el término "que comprende" significa que incluye, pero no se limita a, lo que sigue la palabra "comprende". Así, el uso del término "que comprende" indica que los elementos enumerados se requieren o son obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden o no pueden estar presentes.

- 20 Como se utiliza aquí, el término "que consiste de medios que incluyen, y se limitan a, lo que sigue a la frase "que consiste de". Así, la frase "que consiste de" indica que se requieren los elementos mencionados o son obligatorios, y que no pueden estar presentes otros elementos. "Consiste esencialmente de" significa que incluye cualesquier elementos enumerados después de la frase, y limitados a otros elementos que no interfieren con o contribuyen con la actividad o acción especificada en la descripción para los elementos enumerados. Así, la frase "consiste esencialmente de" indica que los elementos enumerados se requieren o son obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden o no pueden estar presentes dependiendo de si o no ellos afectan la actividad o acción de los elementos enumerados.

Se describe un método para evaluar el Desempeño de la memoria en un paciente que comprende las etapas de:

- 25 (a) detectar o determinar el nivel de expresión en el paciente de un gen seleccionado del grupo que consiste de KIBRA y CLSTN2; y

(b) correlacionar el nivel de expresión del gen en el paciente con el Desempeño de la memoria en el paciente.

- 30 Cabe notar que se conocen bien en la técnica los métodos para detectar o determinar el nivel de expresión en el paciente de uno o más genes de interés. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, Northern blot, que detecta los mRNA específicos mediante hibridación.

La presente invención es un método para evaluar la memoria episódica en un paciente que comprende las etapas de:

(a) detectar la presencia o ausencia del alelo CT/TT del SPN rs 17070145 en el gen KIBRA; y

(b) correlacionar la presencia o ausencia de la mutación con la memoria episódica en el paciente.

- 35 Cabe notar que se conocen bien en la técnica los métodos para detectar la presencia o ausencia de una mutación en uno o más genes de interés en un paciente. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, secuenciamiento de ADN y análisis de polimorfismo de longitud del fragmento de restricción (RFLP).

Se describe un método para evaluar el Desempeño de la memoria en un paciente que comprende las etapas de:

- 40 (a) detectar o determinar el nivel de actividad en el paciente de un producto génico de un gen seleccionado del grupo que consiste de KIBRA y CLSTN2; y

(b) correlacionar el nivel de actividad del producto génico en el paciente con Desempeño de la memoria.

- 45 Cabe notar que los métodos para detectar o determinar el nivel de actividad en un paciente de un producto génico de uno o más genes de interés son bien conocidos por un practicante medianamente experto en la técnica. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, Western blot para determinar la cantidad del producto génico expresado mediante inmunoensayo.

Se describe un método para mejorar el desempeño de la memoria en un sujeto que comprende administrar al sujeto un compuesto capaz de modular la plasticidad sináptica al estimular la síntesis o actividad de un producto génico de un gen seleccionado del grupo que consiste de KIBRA y CLSTN2.

- 5 Se describe un método para mejorar el Desempeño de la memoria en un sujeto que comprende administrar al sujeto un compuesto capaz de modular la plasticidad sináptica en donde el compuesto es una proteína KIBRA de longitud completa en donde la secuencia de ADN que codifica la proteína KIBRA de longitud completa es

ATGCCCCGGCCGGAGCTGCCCCTGCCGGAGGGCTGGGAGGAGGCGCGC¹ACTTCGA
 CGGCAAGGTCTACTACATAGACCACACGAACCGCACCACCAGCTGGATCGACCCGC
 GGGACAGGTACACCAAACCGCTCACCTTTGCTGACTGCATTAGTGATGAGTTGCCGC
 TAGGATGGGAAGAGGCATATGACCCACAGGTTGGAGATTACTTCATAGACCACAAC
 ACCAAAACCACTCAGATTGAGGATCCTCGAGTACAATGGCGGGCGGAGCAGGAACA
 TATGCTGAAGGATTACCTGGTGGTGGCCCAGGAGGCTCTGAGTGCACAAAAGGAGA
 TCTACCAGGTGAAGCAGCAGCGCCTGGAGCTTGACAGCAGGAGTACCAGCAACTG
 CATGCCGTCTGGGAGCATAAGCTGGGCTCCCAGGTCAGCTTGGTCTCTGGTTCATCA
 TCCAGCTCCAAGTATGACCCTGAGATCCTGAAAGCTGAAATTGCCACTGCAAAATCC
 CGGGTCAACAAGCTGAAGAGAGAGATGGTTACCTCCAGCACGAGCTGCAGTTCAA
 AGAGCGTGGCTTTTCAGACCCTGAAGAAAATCGATAAGAAAATGTCTGATGCTCAGG
 GCAGCTACAACTGGATGAAGCTCAGGCTGTCTTGAGAGAAACAAAAGCCATCAAA
 AAGGCTATTACCTGTGGGGAAAAGGAAAAGCAAGATCTCATTAAAGAGCCTTGCCAT
 GTTGAAGGACGGCTTCCGCACTGACAGGGGGTCTCACTCAGACCTGTGGTCCAGCA

GCAGCTCTCTGGAGAGTTTCGAGTTTCCCGCTACCGAAACAGTACCTGGATGTGAGCT
 CCCAGACAGACATCTCGGGAAGCTTCGGCATCAACAGCAACAATCAGTTGGCAGAG
 AAGGTCAGATTGCGCCTTCGATATGAAGAGGCTAAGAGAAGGATCGCCAACCTGAA
 GATCCAGCTGGCCAAGCTTGACAGTGAGGCCTGGCCTGGGGTGCTGGACTCAGAGA
 GGGACCGGCTGATCCTTATCAACGAGAAGGAGGAGCTGCTGAAGGAGATGCGCTTC
 ATCAGCCCCCGCAAGTGGACCCAGGGGAGGTGGAGCAGCTGGAGATGGCCCGGA
 AGCGGCTGGAAAAGGACCTGCAGGCAGCCCGGGACACCCAGAGCAAGGCGCTGAC
 GGAGAGGTTAAAGTTAAACAGTAAGAGGAACCAAGCTTGTGAGAGAACTGGAGGAA
 GCCACCCGGCAGGTGGCAACTCTGCACTCCAGCTGAAAAGTCTCTCAAGCAGCAT
 GCAGTCCCTGTCCTCAGGCAGCAGCCCCGGATCCCTCACGTCCAGCCGGGGCTCCCT
 GGTGTCATCCAGCCTGGACTCCTCCACTTCAGCCAGCTTCACTGACCTCTACTATGA
 CCCCTTTGAGCAGCTGGACTCAGAGCTGCAGAGCAAGGTGGAGTTCTCTGCTCCTGGA
 GGGGGCCACCGGCTTCCGGCCCTCAGGCTGCATCACCACCATCCACGAGGATGAGG
 TGGCCAAGACCCAGAAGGCAGAGGGAGGTGGCCGCCTGCAGGCTCTGCGTTCCTTG
 TCTGGCACCCCAAAGTCCATGACCTCCCTATCCCCACGTTCCCTCTCTCTCCTCCCCCT
 CCCCACCCTGTTCCCCCTCTCATGGCTGACCCCTCCTGGCTGGTGATGCCTTCCTCAA
 CTCCTTGGAGTTTGAAGACCCGGAGCTGAGTGCCACTCTTTGTGAACTGAGCCTTGG
 TAACAGCGCCCAAGAAAGATACCGGCTGGAGGAACCAGGAACGGAGGGCAAGCAG
 CTGGGCCAAGCTGTGAATACGGCCCAAGGGTGTGGCCTGAAAGTGGCCTGTGTCTC
 AGCCGCCGTATCGGACGAGTCAGTGGCTGGAGACAGTGGTGTGTACGAGGCTTCCG
 TGCAGAGACTGGGTGCTTCAGAAGCTGCTGCATTTGACAGTGACGAATCGGAAGCA
 GTGGGTGCGACCCGAATTCAGATTGCCCTGAAGTATGATGAGAAGAATAAGCAATT
 TGCAATATTAATCATCCAGCTGAGTAACCTTTCTGCTCTGTTGCAGCAACAAGACCA
 GAAAGTGAATATCCGCGTGGCTGTCCTTCCTTGCTCTGAAAGCACAACTGCCTGTT
 CCGGACCCGGCCTCTGGACGCCTCAGACACTCTAGTGTTCAATGAGGTGTTCTGGGT
 ATCCATGTCCTATCCAGCCCTTACCAGAAGACCTTAAGAGTCGATGTCGTGTACCAC
 CGACAGGAGCCATCTGGAAGAGTGCCCTGGGAGGCGCCCAAGATCAGCCTGGCGGAGG
 TCTGCCGGTCTGGGGAGAGGTGCGACTCGCTGGTACAACCTTCTCAGCTACAAATACT
 TGAAGAAACAGAGCAGGGAGCTCAAGCCAGTGGGAGTCATGGCCCCTGCCTCAGGG
 CCTGCCAGCACGGACGCTGTGTCTGCTCTGTTGGAACAGACAGCAGTGGAGCTGGA
 GAAGAGGCAGGAGGGCAGGAGCAGCACACAGACACTGGAAGACAGCTGGAGGTAT

GAGGAGACCAGTGAGAATGAGGCAGTAGCCGAGGAAGAGGAGGAGGAGGTGGAGG
 AGGAGGAGGGAGAAGAGGATGTTTTACCGAGAAAGCCTCACCTGATATGGATGGG
 TACCCAGCATTAAAGGTGGACAAAGAGACCAACACGGAGACCCCGGCCCATCCCC
 CACAGTGGTGCGACCTAAGGACCGGAGAGTGGGCACCCCGTCCCAGGGGCCATTTC
 TTCGAGGGAGCACCATCATCCGCTCTAAGACCTTCTCCCCAGGACCCAGAGCCAGT
 ACGTGTGCCGGCTGAATCGGAGTGATAGTGACAGCTCCACTCTGTCCAAAAAGCCA
 CCTTTTGTTCGAAACTCCCTGGAGCGACGCAGCGTCCGGATGAAGCGGCCTTCCTCG
 GTCAAGTCGCTGCGCTCCGAGCGTCTGATCCGTACCTCGCTGGACCTGGAGTTAGAC
 CTGCAGGCGACAAGAACCTGGCACAGCCAATTGACCCAGGAGATCTCGGTGCTGAA
 GGAGCTCAAGGAGCAGCTGGAACAAGCCAAGAGCCACGGGGAGAAGGAGCTGCCA
 CAGTGGTTGCGTGAGGACGAGCGTTTCCGCCTGCTGCTGAGGATGCTGGAGAAGCG
 GCAGATGGACCGAGCGGAGCACAAGGGTGAGCTTCAGACAGACAAGATGATGAGG
 GCAGCTGCCAAGGATGTGCACAGGCTCCGAGGCCAGAGCTGTAAGGAACCCCCAGA
 AGTTCAGTCTTTCAGGGAGAAGATGGCATTTTTACCCGGCCTCGGATGAATATCCC
 AGCTCTCTCTGCAGATGACGTCTAA

(SEQIDNO: 1).

Se describe un método para mejorar el Desempeño de la memoria en un sujeto que comprende administrar al sujeto un compuesto capaz de modular la plasticidad sináptica en donde el compuesto es una proteína KIBRA de longitud completa que comprende la siguiente secuencia de proteínas

MPRPELPLPEGWEEARDFDGKVYYIDHTNRRTTSWIDPRDRYTKPLTFAḌCISDELPLGW
 EEAYDPQVG DYFTDHNTKTTQIEDPRVQWRREQEHMLKDYL VVAQEALSAQKEIYQVK
 QQRLELAQQEYQQLHAVWEHKLGSQVSLVSGSSSSSKYDPETLKAEIATAKSRVNKLKR
 EMVHLQHELQFKERGFQTLKKIDKKMSDAQGSYKLDEAQAVLRETKAIKKAITCGEKE
 KQDLIKSLAMLDGFRTRDGRSHSDLWSSSSSLESSSFPLPKQYLDVSSQTDISGSFGINSN
 NQLAEKVRLRLRYEEAKRRIANLKIQLAKLDSEAWPGVLDSEDRDLILINEKEELLKEMR

FTSPRKWTQGEVEQLEMARKRLEKDLQAARDTQSICALTERLKLNSKRNQLVRELEEAT
RQVATLHSQLKSLSSSMQSLSSGSSPGSLTSSRGSVASSLDSSTSASFDTLYYDPFEQLD
SELQSKVEFLLLEGATGFRPSGCITTIHEDEVAKTQKAEGGGRLQALRSLSGTPKSMSTSL
SPRSSLSSPSPCSPLMADPLLAGDAFLNSLEFEDPELSATLCELSLGNQAQERYRLEEPGT
EGKQLGQAVNTAQGCGLKVACVSAAVSDES VAGDSGVYEASVQRLGASEAAAFDSDE
SEAVGATRIQIALKYDEKNKQFAILIIQLSNLSALLQQQDQKVNIRVAVLPCSESTTCLFR
TRPLDASDTLVFNEVFWVSMSPALHQKTLRVDVCTTDRSHLEECLGGAQISLAEVCRS
GERSTRWYNLLSYKYLKKQSRELKPVGVMAPASGPASTDAVSALLEQTAVELEKRQEG
RSSTQTLED SWRYEETSENEAVAE EEEEEVEEEEEGEEDVFTEKASPDMDGY PALKVDKE
TNTETPAPSPTVVRPKX)RRVGTPSQGPFLRGSTIIRSKTFSPGPQSQYVCRLNRSDDSSSTL
SKKPPFVRNSLERRSVRMKRPSSVKSLRSERLIRTSLDLLELDLQATRTWHSQLTQEISVLK
ELKEQLEQAKSHGEKELPQWLREDERFRLLLRLMLEKRQMDRAEHKGELQTDKMMRAA
AKDVHRLRGQSCKEPPEVQSFREKMAFFTRPRMNIPALSADDV

(SEQ ID NO: 3).

Se describe un método para mejorar el desempeño de la memoria en un sujeto que comprende administrar al sujeto un compuesto capaz de modular la plasticidad sináptica en donde el compuesto es una proteína KIBRA truncada en donde la secuencia de ADN que codifica la proteína KIBRA truncada es

AAAAAGGCTATTACCTGTGGGGAAAAGGAAAAGCAAGATCTCATTAAGAGCCTTGC
CATGTTGAAGGACGGCTTCCGCACTGACAGGGGGTCTCACTCAGACCTGTGGTCCAG
CAGCAGCTCTCTGGAGAGTTCGAGTTTCCCGCTACCGAAACAGTACCTGGATGTGAG
CTCCCAGACAGACATCTCGGGAAGCTTCGGCATCAACAGCAACAATCAGTTGGCAG
AGAAGGTCAGATTGCGCCTTCGATATGAAGAGGCTAAGAGAAGGATCGCCAACCTG
AAGATCCAGCTGGCCAAGCTTGACAGTGAGGCCTGGCCTGGGGTGCTGGACTCAGA

GAGGGACCGGCTGATCCTTATCAACGAGAAGGAGGAGCTGCTGAAGGAGATGCGCT
 TCATCAGCCCCCGCAAGTGGACCCAGGGGGAGGTGGAGCAGCTGGAGATGGCCCCG
 AAGCGGCTGGAAGAGGACCTGCAGGCAGCCCGGGACACCCAGAGCAAGGCGCTGA
 CGGAGAGGTTAAAGTTAAACAGTAAGAGGAACCAGCTTGTGAGAGAACTGGAGGA
 AGCCACCCGGCAGGTGGCAACTCTGCACTCCAGCTGAAAAGTCTCTCAAGCAGCA
 TGCAGTCCCTGTCCTCAGGCAGCAGCCCCGGATCCCTCACGTCCAGCCGGGGCTCCC
 TGGTTGCATCCAGCCTGGACTCCTCCACTTCAGCCAGCTTCACTGACCTCTACTATGA
 CCCCTTTGAGCAGCTGGACTCAGAGCTGCAGAGCAAGGTGGAGTTCCTGCTCCTGGA
 GGGGGCCACCGGCTTCCGGCCCTCAGGCTGCATCACCACCATCCACGAGGATGAGG
 TGGCCAAGACCCAGAAGGCAGAGGGAGGTGGCCGCCTGCAGGCTCTGCGTTCCTG
 TCTGGCACCCCAAAGTCCATGACCTCCCTATCCCCACGTTCCCTCTCTCTCCTCCCCCT
 CCCCACCCTGTTCCCCTCTCATGGCTGACCCCTCCTGGCTGGTGATGCCTTCCTCAA
 CTCCTTGAGTTTGAAGACCCGGAGCTGAGTGCCACTCTTTGTGAACTGAGCCTTGG
 TAACAGCGCCAGGAAAGATACCGGCTGGAGGAACCAGGAACGGAGGGCAAGCAG
 CTGGGCCAAGCTGTGAATACGGCCAGGGGTGTGGCCTGAAAGTGGCCTGTGTCTC
 AGCCGCCGTATCGGACGAGTCAGTGGCTGGAGACAGTGGTGTGTACGAGGCTTCCG
 TGCAGAGACTGGGTGCTTCAGAAGCTGCTGCATTTGACAGTGACGAATCGGAAGCA
 GTGGGTGCGACCCGAATTCAGATTGCCCTGAAGTATGATGAGAAGAATAAGCAATT
 TGCAATATTAATCATCCAGCTGAGTAACCTTTCTGCTCTGTTGCAGCAACAAGACCA
 GAAAGTGAATATCCGCGTGGCTGTCCTTCCTTGCTCTGAAAGCACAACTGCCTGTT
 CCGGACCCGGCCTCTGGACGCCTCAGACACTCTAGTGTTCAATGAGGTGTTCTGGGT
 ATCCATGTCTATCCAGCCCTTACCAGAAGACCTTAAGAGTCGATGTCTGTACCAC
 CGACAGGAGCCATCTGGAAGAGTGCCTGGGAGGCGCCAGATCAGCCTGGCGGAGG
 TCTGCCGGTCTGGGGAGAGGTCGACTCGCTGGTACAACCTTCTCAGCTACAAATACT
 TGAAGAAACAGAGCAGGGAGCTCAAGCCAGTGGGAGTCATGGCCCCTGCCTCAGGG
 CCGCCAGCACGGACGCTGTGTCTGCTCTGTTGGAACAGACAGCAGTGGAGCTGGA
 GAAGAGGCAGGAGGGCAGGAGCAGCACACAGACACTGGAAGACAGCTGGAGGTAT
 GAGGAGACCAGTGAGAATGAGGCAGTAGCCGAGGAAGAGGAGGAGGAGGTGGAGG
 AGGAGGAGGGAGAAGAGGATGTTTTCACCGAGAAAGCCTCACCTGATATGGATGGG
 TACCCAGCATTAAGGTGGACAAAGAGACCAACACGGAGACCCCGGCCCCATCCCC
 CACAGTGGTGCGACCTAAGGACCGGAGAGTGGGCACCCCGTCCCAGGGGCCATTC

TTCGAGGGAGCACCATCATCCGCTCTAAGACCTTCTCCCCAGGACCCAGAGCCAGT
 ACGTGTGCCGGCTGAATCGGAGTGATAGTGACAGCTCCACTCTGTCCAAAAAGCCA
 CCTTTTGTTCGAACTCCCTGGAGCGACGCAGCGTCCGGATGAAGCGGCCTTCCTCG
 GTCAAGTCGCTGCGCTCCGAGCGTCTGATCCGTACCTCGCTGGACCTGGAGTTAGAC
 CTGCAGGCGACAAGAACCTGGCACAGCCAATTGACCCAGGAGATCTCGGTGCTGAA
 GGAGCTCAAGGAGCAGCTGGAACAAGCCAAGAGCCACGGGGAGAAGGAGCTGCCA
 CAGTGGTTGCGTGAGGACGAGCGTTTCCGCCTGCTGCTGAGGATGCTGGAGAAGCG
 GCAGATGGACCGAGCGGAGCACAAGGGTGAGCTTCAGACAGACAAGATGATGAGG
 GCAGCTGCCAAGGATGTGCACAGGCTCCGAGGCCAGAGCTGTAAGGAACCCCCAGA
 AGTTCAGTCTTTCAGGGAGAAGATGGCATTTTTACCCGGCCTCGGATGAATATCCC
 AGCTCTCTCTGCAGATGACGTCTAA

(SEQ ID NO: 2).

Se describe un método para mejorar el Desempeño de la memoria en un sujeto que comprende administrar al sujeto un compuesto capaz de modular la plasticidad sináptica en donde el compuesto es una proteína KIBRA truncada que comprende la siguiente secuencia de proteínas

KKAITCGEKEKQDLIKSLAMKDGFRTRDGRSHSDLWSSSSSLESSSFPLPKQYLDVSSQT
DISGSFGINSNNQLAEKVRRLRYEEAKRRRIANLKIQLAKLDSEAWPGVLDSEDRDLILIN
EKEELLKEMRFTSPRKWTQGEVEQLEMARKRLEKDLQAARDTQSKALTERLKLNSKRN
QLVRELEEATRQVATLHSQLKSLSSSMQSLSSGSSPGSLTSSRGSVASSLDSSTSASFTD
LYYDPFEQLDSEEQSKVEFLLEGATGFRPSGCITTIHEDEVAKTQKAEGGRLQALRSL
SGTPKSMTSLSPRSSLSPSPCSPLMADPLLAGDAFLNSLEFEDPELSATLCELSLGNLSAQ
ERYRLEEPGTEGKQLGQAVNTAQGCGLKVACVSAVDESAGDSGVYEASVQRLGA
SEAAAFDSDESEAVGATRIQIALKYDEKNKQFAITLQSLNLSALLQQQDQKVNIRVAVLP
CSESTTCLFRTRPLDASDTLVFNEVFWVMSYPALHQTTLRVDTTDRSHLEECGGA
QISLAEVCRSGERSTRWYNLLSYKYLKKQRELKPVGVMAPASGPASTDAVSALLEQTA
VELEKRQEGRSSTQTLEDVSWRYEETSENEVAEEEEEEVEEEEGEEDVFTEKASPDMDG
YPALKVDKETNTETPAPSPTVVRPKDRRVGTPSQGPFLRGSTIIRSKTFSPGPQSQYVCR

NRSDSDSSTLSKPPFVRNSLERRSVRMKRPSSVKSLRSLRSLRTSLDLELDLQATRTWH
SQLTQEISVLKELKEQLEQAKSHGEKELPQWLREDFRLLLRMLEKRMEDRAEHKGEL
QTDKMMRAAAKDVRHLRGQSCKEPPEVQSFREKMAFFTRPRMNIPALSADDV

(SEQ ID NO: 4).

- 5 Se describe un método para evaluar la capacidad de un compuesto para afectar la expresión de una proteína KIBRA de longitud completa (SEQ ID NO: 3) en el hipocampo de un sujeto que comprende las etapas de:

- (a) administrar el compuesto al sujeto
- (b) medir la cantidad de expresión de la proteína KIBRA de longitud completa en el hipocampo del sujeto.

- 10 Se describe un método para evaluar la capacidad de un compuesto para afectar la expresión de una proteína KIBRA truncada (SEQ ID NO: 4), en donde la proteína KIBRA truncada carece de los aminoácidos 223 de terminal amino de la proteína KIBRA de longitud completa en el hipocampo de un sujeto que comprende las etapas de:

- (a) administrar el compuesto a un sujeto
- (b) medir la cantidad de expresión de proteína KIBRA truncada en el hipocampo del sujeto; y

- 15 (c) comparar la cantidad en la etapa (b) con la cantidad de expresión de proteína KIBRA truncada en el hipocampo del sujeto.

Se describe un método para tratar un sujeto con un defecto de pérdida de la memoria episódica debido a la existencia de una enfermedad o afección que afecta la memoria episódica, que comprende administrar al sujeto un compuesto capaz de mejorar la memoria episódica, el compuesto se selecciona del grupo seleccionado de:

- (a) proteína KIBPvA truncada (SEQ ID NO: 4);
- 20 (b) una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína KIBRA truncada (SEQ ID NO: 4); y
- (c) un compuesto que estimula la síntesis o actividad de la proteína KIBRA truncada; en una cantidad efectiva para mejorar la memoria episódica para tratar por lo tanto el defecto de la memoria episódica del sujeto.

Cabe notar que la cantidad efectiva o rango de cantidades efectivas de un compuesto capaz de mejorar la memoria episódica sería bien conocido por un practicante medianamente experto en la técnica.

5 Se describe una proteína aislada y purificada que es una proteína KIBRA truncada derivada de la secuencia de la proteína KIBRA de longitud completa (SEQ ID NO: 2), en donde la proteína se trunca mediante la eliminación de una porción de la región de terminal amino de la proteína de tal manera que un número de aminoácidos de aproximadamente 100 aminoácidos a aproximadamente 300 aminoácidos que empiezan en el terminal amino de la proteína se eliminan y en donde la proteína retiene el dominio similar a C2, una extensión rica en ácido glutámico y un dominio que interactúa con la proteína quinasa C (PKC) α de la proteína de longitud completa.

Se describe un método para mejorar o modular la función de la memoria en un sujeto que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad de una composición que contiene KIBRA rs 17070145 SPN efectiva para mejorar o modular la función de la memoria en el sujeto.

10 Se describe el método para mejorar o modular la función de la memoria en un sujeto que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad de una composición que contiene CLSTN2 rs 6439886 SPN efectiva para mejorar o modular la función de la memoria en el sujeto.

Proteína KIBRA

15 En la presente invención, se identifican las funciones novedosas relacionadas con la memoria del gen KIBRA. El KIBRA es una proteína citoplásmica que se expresa altamente en el cerebro y riñón humano y representa un nuevo miembro de la familia de las proteínas neuronales de transductor de señal. (J. Kremerskothen et al, Biochem. Biophys. Res. Commun. 300, 862 (2003)).

20 En la presente invención, los estudios han mostrado que los alelos KIBRA se asocian fuertemente con el Desempeño diferencial de la memoria en dos poblaciones saludables, distintas. Este hecho sugiere que los alelos KIBRA afectan el Desempeño de la memoria en los humanos independiente de la etnia, edad, idioma y tipo de tarea de memoria particular utilizada para evaluar el nivel del Desempeño de la memoria. Se sugiere adicionalmente que los alelos KIBRA afectan el Desempeño de la memoria en los humanos al modular la plasticidad sináptica. De manera importante, se considera que la adquisición y consolidación de la memoria que dependen de la plasticidad sináptica. (Y. Dudai, Curr. Opin. Neurobiol. 12, 211 (2002)).

25 El KIBRA de longitud completa comprende 1113 aminoácidos (aa). Una forma truncada, que se encuentra que se expresa en el hipocampo, carece de los primeros 223 aa y contiene un dominio similar a C2, una extensión rica en ácido glutámico y un dominio de interacción con la proteína quinasa C (PKC) α . (K. Buther, C. Plaas, A. Bamekow, J. Kremerskothen, Biochem. Biophys. Res. Commun. 317, 703 (2004)).

30 Se ha establecido previamente que el PKC α , está implicado en la formación de la memoria y en la consolidación de la potenciación a largo plazo. (E. A. Drier et al., Nat. Neurosci. 5, 316 (2002); T. C. Sacktor et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 90, 8342 (1993)). El dominio similar a C2 de KIBRA, que media probablemente la sensibilidad al Ca²⁺ (J. Rizo, T. C. Sudhof, J. Biol. Chem. 273, 15879 (1998)), es similar al dominio C2 de sinaptotagmina, que se considera que funciona como el sensor Ca²⁺ principal en la exocitosis de vesícula sináptica. (J. Kremerskothen et al, Biochem. Biophys. Res. Commun. 300, 862 (2003); J. Ubach, X. Zhang, X. Shao, T. C. Sudhof, J. Rizo, EMBO J. 17, 3921 (1998)). De forma importante, el bloque de haplotipo KIBRA asociado con la memoria y el SPN KIBRA asociado con la memoria describe adelante el mapa dentro del KIBRA truncado, que contiene los dominios que interactúan con PKC α y similares a C2.

Tomados juntos, la evidencia convergente de los experimentos independientes en el presente estudio indica una función principal del KIBRA en el desempeño normal de la memoria humana.

40 Por lo tanto, se describe un método para mejorar la función de la memoria en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un compuesto capaz de modular la plasticidad sináptica en un sujeto en una cantidad efectiva que mejora la función de la memoria del sujeto.

45 Se describe un método para mejorar la función de la memoria en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un compuesto que contiene la proteína KIBRA en una cantidad efectiva para mejorar la función de la memoria del sujeto.

SNP relacionados con la memoria KIBRA

50 La presente invención también describe los SPN relacionados con la memoria KIBRA tal como el polimorfismo de nucleótido simple rs17070145. El SPN rs17070145 KIBRA es una sustitución común T \rightarrow C dentro del noveno intrón del KIBRA (que codifica la proteína neuronal KIBRA). De acuerdo con los experimentos realizados en el curso de la presente invención, los portadores de los SPN rs17070145 KIBRA demuestran Desempeño superior de la memoria que los no portadores.

Se describe un método para utilizar el SPN rs17070145 KIBRA enseñado por la presente invención para modular la función de la memoria humana.

- 5 Se describe un método para mejorar la función de la memoria en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un compuesto que contiene SPN rs17070145 KIBRA en una cantidad efectiva para mejorar la función de la memoria del sujeto.

- 10 Estos métodos para mejorar o modular la función de la memoria se pueden llevar a cabo al administrar un ácido nucleico que codifica el SPN rs17070145 KIBRA o al administrar la proteína codificada por SPN rs17070145 KIBRA. Típicamente, la composición que incluye el ácido nucleico o la proteína para la administración se administra mediante una ruta seleccionada del grupo que consiste de suministro intralesional; inyección intramuscular; inyección intravenosa; infusión; suministro mediado por liposoma; infección vírica; bombardeo de genes; suministro tópico; suministro nasal; suministro oral; suministro anal; suministro ocular; suministro cerebroespinal; y suministro ótico. Se pueden utilizar métodos análogos con otros SPN como se describe aquí.

Se describe un método para utilizar el SPN rs11738934 KIBRA (Figura 3, SPN 4) enseñado por la presente invención para modular la función de la memoria humana.

- 15 Se describe un método para mejorar la función de la memoria en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un compuesto que contiene el SPN rs11738934 KIBRA en una cantidad efectiva para mejorar la función de la memoria de sujeto.

Se describe un método para utilizar el SPN rs6862868 KIBRA (Figura 3, SPN 5) para modular la función de la memoria humana.

- 20 Se describe un método para mejorar la función de la memoria en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un compuesto que contiene el SPN rs6862868 KIBRA en una cantidad efectiva para mejorar la función de la memoria de sujeto.

Se describe un método para utilizar el SPN rs2241368 KIBRA (Figura 3, SPN 6) para modular la función de la memoria humana.

- 25 Se describe un método para mejorar la función de la memoria en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un compuesto que contiene el SPN rs2241368 KIBRA en una cantidad efectiva para mejorar la función de la memoria de sujeto.

Se describe un método para utilizar el SPN rs17551608 K1BRA (Figura 3, SPN 7) para modular la función de la memoria humana.

- 30 Se describe un método para mejorar la función de la memoria en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un compuesto que contiene el rs17551608 KIBRA en una cantidad efectiva para modular la función de la memoria humana.

Se describe un método para utilizar el SPN rs4976606 KIBRA (Figura 3, SPN 9) para modular la función de la memoria humana.

- 35 Se describe un método para mejorar la función de la memoria en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un compuesto que contiene SPN rs4976606 KIBRA en una cantidad efectiva para modular la función de la memoria humana.

Se describe un método para utilizar el SPN rs3822660 KIBRA (Figura 3, SPN 10) para modular la función de la memoria humana.

- 40 Se describe un método para mejorar la función de la memoria en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un compuesto que contiene el SPN rs3822660 KIBRA en una cantidad efectiva para modular la función de la memoria humana.

Se describe un método para utilizar el SPN rs3822659 KIBRA (Figura 3, SPN 11) para modular la función de la memoria humana.

- 45 Se describe un método para mejorar la función de la memoria en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un compuesto que contiene el SPN rs3822659 KIBRA en una cantidad efectiva para modular la función de la memoria humana.

Se describe un método para utilizar el SPN rs3733980 KIBRA (Figura 3, SPN 12) enseñado por la presente invención para modular la función de la memoria humana.

5 Se describe un método para mejorar la función de la memoria en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un compuesto que contiene el SPN rs3733980 KIBRA en una cantidad efectiva para modular la función de la memoria humana.

Se describe un método para utilizar un haplotipo ubicado entre SPN 4 (rs11738934) y SPN 12 (rs3733980), de tal manera que la distancia genética entre estos SPN es 51032 pares base, enseñado por la presente invención, para modular la función de la memoria.

10 Se describe un método para mejorar la función de la memoria en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un compuesto que contiene un haplotipo ubicado entre SPN 4 (rs11738934) y SPN 12 (rs3733980), de tal manera que la distancia genética entre estos SPN es 51032 pares base en una cantidad efectiva para modular la función de la memoria humana.

15 Estos métodos para mejorar o modular la función de la memoria se pueden llevar a cabo al administrar un ácido nucleico que contiene el haplotipo ubicado entre SPN 4 (rs 11738934) y SPN 12 (rs 3733980). Típicamente, la composición que incluye el ácido nucleico para administración se administra mediante una ruta seleccionada del grupo que consiste de suministro intralesional; inyección intramuscular; inyección intravenosa; infusión; suministro mediado por liposoma; infección vírica; bombardeo de gen; suministro tópico; suministro nasal; suministro oral; suministro anal; suministro ocular; suministro cerebroespinal; y suministro ótico.

20 Con respecto a las realizaciones anteriores, se observa adicionalmente que una cantidad efectiva para modular la función de la memoria humana se conocerá por un practicante de experticia razonable en la técnica. De forma similar, una cantidad efectiva para mejorar la función de la memoria humana también será conocida por un practicante de experticia razonable en la técnica.

25 Los métodos para administrar los ácidos nucleicos, algunas veces denominados como "terapia de gen" se conocen de manera general en la técnica y se describen en T. Strachan & A.P. Read, "Human Molecular Genetics" (2d ed., Wiley-Liss, New York, 1999), pp. 515-543.

30 El gen KIBRA, transcriptos (de longitud completa y truncados), polipéptidos (de longitud completa y truncados), todos los alelos (que incluyen el alelo T y el alelo C definido por rs 17070145) y todos los SPN en el locus KIBRA (que incluye rs 17070145), que se asocian con la memoria, son diagnósticos útiles y aplicaciones farmacogenéticas. El KIBRA es un modificador de la severidad de la enfermedad para la pérdida de la memoria normal relacionada con la vejez y trastornos de amnesia. Los trastornos de amnesia incluyen pero no se limitan a enfermedad de Alzheimer; lesión traumática del cerebro; lesión cerebral originada por agentes terapéuticos, uso de fármacos, condiciones ambientales, cáncer u otras afecciones patológicas tales como enfermedad infecciosa; epilepsia; discapacidades de aprendizaje; retardo mental (por ejemplo, síndrome del cromosoma X frágil); síndrome de Down; esquizofrenia; depresión; deterioro cognitivo leve (MCI); enfermedad de Parkinson; pérdida de la función inducida por apoplejía; microangiopatía cerebral; y quimio-cerebro (dificultades con la memoria, atención y otras funciones cognitivas que los pacientes pueden sufrir durante y después de quimioterapia). Las aplicaciones diagnósticas por lo tanto incluyen la evaluación de susceptibilidad de la enfermedad, pronóstico, y supervisión de la enfermedad o proceso de tratamiento. Se puede utilizar el ácido nucleico KIBRA, proteína y los SPN para facilitar el diseño y desarrollo de diversas herramientas diagnósticas moleculares (por ejemplo, GeneChips™ que contiene conjuntos de sonda, sondas para diagnóstico in vivo, cebadores PCR, anticuerpos, equipos, etc.). Se puede utilizar formación de imagen in vivo para el diagnóstico, utilizando fMRI o agentes que detectan KIBRA. También se puede utilizar espectroscopía de masa para detectar los alelos y las proteínas KIBRA.

45 Las aplicaciones farmacogenéticas incluyen proporcionar medicina individualizada por medio de Sistemas predictivos de perfil de fármaco, por ejemplo, al correlacionar los motivos genómicos específicos con la respuesta clínica del paciente a fármacos individuales, por ejemplo, para la toma de decisiones terapéuticas y para la selección de pacientes para ensayos clínicos. En particular, la genotipificación y la estratificación basados en el haplotipo T y C de KIBRA (definido en el SPN rs17070145) es útil para terapia o ensayos clínicos con agentes designados para tratar trastornos normales amnésicos o relacionados con la vejez.

50 Adicionalmente, la presente descripción es útil para el SPN multiplex y el perfil de haplotipo, que incluye pero no se limita a la identificación de objetivos terapéutico, diagnóstico, y farmacogenéticos en el gen, mRNA, proteína, y el nivel de ruta. El perfil de las variantes de corte y empalme y las eliminaciones / truncaciones también es útil para aplicaciones terapéuticas y diagnósticas.

El gen KIBRA, los transcriptos, los SNP, alelos y polipéptidos, descritos aquí, también son útiles como objetivos de fármaco para el desarrollo de fármacos terapéuticos para el tratamiento de pérdida normal de la memoria

relacionada con la vejez y trastornos amnésicos, y para el mejoramiento de la memoria normal. Se puede utilizar una variedad de métodos conocidos para identificar tales compuestos. Los compuestos pueden ser moléculas pequeñas, péptidos, imitadores de péptido, moléculas anticodificantes, siARN, etc. Los compuestos que afectan la actividad, expresión, traducción, procesamiento, transporte, y degradación de KIBRA son útiles como terapéuticos.

- 5 Con respecto a la descripción anterior, se observa adicionalmente que una cantidad efectiva para modular la función de la memoria humana se conocerá por un practicante razonablemente experto en la técnica. De forma similar, también se conocerá por un practicante razonablemente experto en la técnica una cantidad efectiva para mejorar la función de la memoria humana.

Proteína Calsinténina 2

- 10 En el presente documento, se identifican las funciones novedosas relacionadas con la memoria del gen Calsinténina 2 ("CLSTN2"). El CLSTN2 es una proteína neuronal ubicada en la membrana post-sináptica de las sinapsis excitatorias. (G. Hintsch et al., Mol. y Cell. Neuro. 21, 403 (2002)).

- 15 En particular, el SPN CLSTN2 rs6439886, que representa una Sustitución común T-> C en el primer intrón de CLSTN2 (que codifica Calsinténina 2 de la proteína neuronal) se muestra que está fuertemente afiliada con el desempeño de la memoria en los humanos. Los portadores del SPN CLSTN2 rs6439886 demuestran desempeño superior de la memoria que los no portadores.

Se describe un método para utilizar el SPN CLSTN2 rs6439886 para modular la función de la memoria humana.

- 20 Se describe un método para mejorar la función de la memoria en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un compuesto que contiene SPN CLSTN2 rs6439886 en una cantidad efectiva para mejorar la función de la memoria de sujeto.

Con respecto a la descripción anterior, se observa adicionalmente que se conocerá una cantidad efectiva para modular la función de la memoria humana por un prácticamente razonablemente experto en la técnica. De forma similar, también se conocerá una cantidad efectiva para mejorar la función de la memoria humana por un practicante razonablemente experto en la técnica.

- 25 Formulaciones Farmacéuticas y Modos de Administración

- 30 El compuesto particular que afecta los trastornos o afecciones de interés se puede administrar a un paciente solo o en composiciones farmacéuticas en donde se mezcla con portadores o excipientes adecuados. En el tratamiento de un paciente que exhibe un trastorno de interés, se administra una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente o agentes tales como estos. Una dosis terapéuticamente efectiva se refiere a aquella cantidad del compuesto que resulta en el alivio de los síntomas o una prolongación de la supervivencia de un paciente.

- 35 Los compuestos también se pueden preparar como sales farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición ácida tales como aquellas que contienen clorhidrato, sulfato, fosfato, sulfamato, acetato, citrato, lactato, tartrato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato, ciclohexilsulfamato y quinato. Tales sales se pueden derivar utilizando ácidos tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido sulfámico, ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido malónico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido ciclohexilsulfámico, y ácido quínico.

- 40 Se pueden preparar sales farmacéuticamente aceptables mediante técnicas estándar. Por ejemplo, la forma de base libre del compuesto primero se disuelve en un solvente adecuado tal como una solución acuosa o de alcohol acuosa, que contiene el ácido apropiado. La sal luego se aísla al evaporar la solución. En otro ejemplo, la sal se prepara al hacer reaccionar la base libre y el ácido en un solvente orgánico.

- 45 Se pueden utilizar portadores o excipientes para facilitar la administración del compuesto, por ejemplo, para incrementar la solubilidad del compuesto. Ejemplos de portadores y excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares o tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales, polietilenglicoles y solventes fisiológicamente compatibles. Adicionalmente, se pueden utilizar las moléculas probadas para determinar las características estructurales que les permite actuar sobre la región de control del gen ob, y así seleccionar moléculas útiles en esta invención. Aquellos expertos en la técnica sabrán cómo diseñar fármacos a partir de moléculas principales, utilizando las técnicas bien conocidas en el arte.

- 50 Se puede determinar la toxicidad y la eficacia terapéutica de tales compuestos mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar el LD₅₀ (la

dosis letal al 50% de la población) y el ED₅₀ (la dosis terapéuticamente efectiva en 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación LD₅₀/FD₅₀. Se prefieren los compuestos que exhiben grandes índices terapéuticos. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos de cultivo celular y los estudios en animales se pueden utilizar en la formulación de un rango de dosificaciones para uso en humanos. La dosificación de tales compuestos se encuentra preferiblemente dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen el ED₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada.

Para cualquier compuesto utilizado en el método la dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente desde ensayos de cultivo celular. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos de animal para lograr un rango de concentración de plasma circulante que incluye el IC₅₀ como se determina en el cultivo celular (es decir, la concentración del compuesto de prueba que alcanza una interrupción media máxima del complejo de proteína, o una inhibición máxima media del nivel celular y/o la actividad de un componente complejo). Tal información se puede utilizar para determinar más exactamente las dosis útiles en los humanos. Se pueden medir los niveles en plasma, por ejemplo, mediante HPLC.

La formulación exacta, ruta de administración y dosificación se puede seleccionar por el médico individual en vista de la afección del paciente. (Ver por ejemplo Fingl et al., in *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 1975, Ch. 1 p. 1). Cabe notar que el médico que atiende sabría cómo y cuándo terminar, interrumpir, o ajustar la administración debido a la toxicidad, o a las disfunciones del órgano. Por el contrario, el médico que atiende también sabría cómo ajustar el tratamiento en niveles mayores si la respuesta clínica no es adecuada (excluyendo la toxicidad). La magnitud de una dosis administrada en el manejo del trastorno de interés variará con la severidad de la afección que se va a tratar y con la ruta de administración. La severidad de la afección, por ejemplo, se puede evaluar, en parte, mediante métodos de evaluación pronósticos estándar. Adicionalmente, la dosis y quizás la frecuencia de dosis también variará de acuerdo con la edad, peso corporal y respuesta del paciente individual.

Dependiendo de las afecciones específicas que se van a tratar, se pueden formular tales agentes y administrar sistemáticamente o localmente. Las técnicas para formulación y administración se pueden encontrar en Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990). Las rutas adecuadas pueden incluir administración oral, rectal, transdérmica, vaginal, transmucosal, o intestinal; suministro parenteral, que incluye inyecciones intramusculares, subcutáneas, intramedulares, así como también inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales, o intraoculares, solo por nombrar unas pocas.

Para inyección, los agentes descritos se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en reguladores fisiológicamente compatibles tales como solución de Hanks, solución de Ringer, o regulador de solución salina fisiológica. Para tal administración transmucosal, los penetrantes apropiados para la barrera que se va a permear se utilizan en la formulación. Tales penetrantes se conocen de manera general en la técnica.

El uso de portadores farmacéuticamente aceptables para formular los compuestos aquí descritos para la práctica en las dosificaciones adecuadas para la administración sistémica está dentro del alcance de la invención. Con la elección apropiada del portador y la práctica de fabricación adecuada, las composiciones, en particular, aquellas formuladas como soluciones, se pueden administrar parenteralmente, tal como mediante inyección intravenosa. Los compuestos se pueden formular utilizando fácilmente los portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica en dosificaciones adecuadas para la administración oral. Tales portadores permiten a los compuestos de la invención ser formulados como comprimidos, píldoras, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares, para ingestión oral por un paciente que se va a tratar.

Los agentes que se van a administrar intracelularmente se pueden administrar utilizando técnicas bien conocidas por aquellas personas medianamente expertas en la técnica. Por ejemplo, tales agentes se pueden encapsular en liposomas, y luego se administran como se describió anteriormente. Los liposomas son bicapas de lípido esféricas con interiores acuosos. Todas las moléculas presentes en una solución acuosa al momento de la formación de liposoma se incorporan en el interior acuoso. Los contenidos liposómicos se protegen del microambiente externo y, debido a que las liposomas se fusionan con las membranas celulares, se suministran de forma eficiente en el citoplasma celular. Adicionalmente, debido a su hidrofobicidad, se pueden administrar directamente intracelularmente moléculas orgánicas pequeñas.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso incluyen composiciones en donde los ingredientes activos están contenidos en una cantidad efectiva para lograr su propósito pretendido. La determinación de las cantidades afectivas está bien en la capacidad de aquellos expertos en la técnica, especialmente en claridad de la descripción detallada proporcionada aquí. Además de los ingredientes activos, estas composiciones farmacéuticas pueden contener portadores farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que se pueden utilizar farmacéuticamente. Las preparaciones formuladas para administración oral pueden estar en la forma de comprimidos, grageas,

cápsulas, o soluciones. Las composiciones farmacéuticas se pueden fabricar en una forma que se da a conocer, por ejemplo, por medio de procesos de mezcla convencional, disolución, granulación, elaboración de grageas, levitación, emulsificación, encapsulación, oclusión o liofilización.

5 Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos se pueden preparar como suspensiones de inyección aceitosas apropiadas. Los solventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácido graso sintético, tales como oleato de etilo o triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol, o dextrano. Opcionalmente, la
10 suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que incrementan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

Se pueden obtener las preparaciones farmacéuticas para uso oral al combinar los compuestos activos con excipientes sólidos, moliendo opcionalmente una mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de agregar auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes
15 adecuados son, en particular, rellenos tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de papa, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carboximetilcelulosa de sodio, y/o povidona (PVP). Si se desea, se pueden agregar agentes desintegrantes, tal como povidona entrecruzada, agar, o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato de sodio.

20 Se proporcionan núcleos de grageas con recubrimientos adecuados. Para este propósito, se pueden utilizar soluciones de azúcar concentradas, que pueden contener opcionalmente goma arábica, talco, povidona, gel carbopol, polietilenglicol, y/o dióxido de titanio, soluciones de laca, y solventes o mezclas de solventes orgánicos adecuados. Se pueden agregar colorantes o pigmentos a los recubrimientos de los comprimidos o las grageas para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis del compuesto activo.

25 Las preparaciones farmacéuticas que se pueden utilizar oralmente incluyen cápsulas de ajuste a presión hechas de gelatina, así como también cápsulas selladas, blandas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste a presión pueden contener los ingredientes activos en mezcla con relleno tal como lactosa, ligadores tales como almidones, y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, se pueden disolver los compuestos activos o suspender en líquidos
30 adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Adicionalmente, se pueden agregar estabilizantes.

Algunos métodos de suministro que se pueden utilizar incluyen:

- a. encapsulación en liposomas,
- b. transducción de vectores retrovíricos,
- 35 c. localización en el compartimiento nuclear utilizando el sitio objetivo nuclear encontrado en la mayor parte de las proteínas nucleares,
- d. transfección de células ex vivo con reimplantación posterior o administración de las células transfectadas,
- e. un sistema transportador de ADN.

EJEMPLOS

40 Ejemplo 1.

Exploración de genoma completo en la muestra Suiza.

Se reclutaron 351 adultos jóvenes (22.9 ± 4.1 años de edad) de Suiza. Los estudios de asociación genéticos en poblaciones consanguíneas tales como los presentes pueden ser propensos a falsa positividad debido a la heterogeneidad genética no aleatoria en la muestra de estudio (es decir la estructura de la población) puede
45 conducir a asociaciones falsas entre un marcador genético y un fenotipo (9). Por lo tanto desarrollamos un análisis de asociación estructurado (10) y encontramos que la divergencia de frecuencia del alelo en esta población es moderada y que los antecedentes genéticos de los participantes forman un grupo distribuido normalmente ($P=0.6$, ver métodos). Solo se identifican diez sujetos como valores atípicos (es decir la probabilidad de la asignación del grupo menor de 25%) y por lo tanto se excluyen de los estudios de asociación genéticos. La población restante

(n=341) se estratifica en 4 grupos de acuerdo con su desempeño en una prueba de memoria verbal. Estos cuartiles se genotificaron en 502,627 SNP. Se recorta el pobre desempeño de los SNP, y se emplean métodos estadísticos de único punto y de ventana deslizante (multi-punto) para seleccionar los SNP asociados con el desempeño en alta confianza estadística. Dos SNP son significativos con ambas estrategias de análisis: rs17070145 y rs6439886. De forma interesante, ambos mapas SNP dentro de los genes expresados en el cerebro humano: rs 17070145 es una sustitución T → C común en el noveno intrón de KIBRA (que codifica la proteína neuronal KIBRA), rs6439886 es una sustitución T → C común dentro del primer intrón de CLSTN2 (que codifica la proteína sináptica cal sintenina 2).

Materiales y Métodos.

Se realizan prueba de memoria y genotipo en 351 sujetos Suizos jóvenes saludables (240 mujeres, 111 hombres; edad media 22.8 ± 0.2 [error estándar] años). Después de la descripción completa de los sujetos de estudio, se obtiene consentimiento informado por escrito. El comité ético del Cantón de Zúrich, Suiza aprueba el protocolo del estudio. Se prueba la capacidad de la memoria durante dos días consecutivos. En el primer día, los sujetos ven 6 series de 5 nombres semánticamente no relacionados presentados en un índice de 1 palabra por s con la instrucción de aprender las palabras de memoria libre inmediata después de cada serie. Adicionalmente, los sujetos se sometieron a una prueba de memoria libre retrasada inesperada de las palabras aprendidas después de 5 min y de nuevo después de 24 h. Ambas pruebas de memoria retrasada reflejan la memoria episódica (11). En contraste la memoria de 5-min, la memoria de 24-h requiere adicionalmente cambios sinápticos a largo plazo (29).

Análisis de asociación estructurado

Se realiza análisis de asociación estructurado mediante genotipificación individual de todos los 351 sujetos Suizos 318 SNP no vinculados. El cálculo de la estructura de la población se hace mediante el programa de STRUCTURE siguiendo las instrucciones de los desarrolladores (10). Estimamos la descendencia de los sujetos de estudio bajo la suposición a priori de las subpoblaciones discretas $K = 2$. El análisis de asociación estructurado revela divergencia de frecuencia de alelo moderada entre las poblaciones. Se obtienen resultados idénticos bajo una suposición a priori de las subpoblaciones discretas $3 = K = 6$.

Genotipificación SNP GeneChip Affymetrix 500K en cohorte de formación

Se determinan concentraciones de ADN genómico individuales de los 351 sujetos utilizando el Equipo de Ensayo dsADN Quant-iT™ PicoGreen® (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se designan individuos a cada grupo con base en su clasificación de cuartiles en el desempeño en la tarea de memoria episódica verbal. La formación de grupos se basa en el desempeño de la memoria libre de 5-min (es decir realizadores de fondo 25%, fondo 50%, superior 50%, y superior 25%). Cada individuo contribuye a un total de 120 ng de ADN al grupo y cada grupo se crea de novo un total de tres veces. Estos tres grupos luego se genotifican por duplicado en ambas disposiciones Mendel de Acceso Temprano 500K Nsp I y Sty I de Affymetrix (Santa Clara, CA). Los grupos se componen como sigue, fondo 25% (90 individuos, concentración media de ADN genómico de 100.6 ng/μl), fondo 50% (171 individuos, concentración media de 97.1 ng/μl), superior 50% (180 individuos, concentración media de 95.1 ng/μl), superior 25% (136 individuos, concentración media de 95.4 ng/μl). Una vez creado, cada grupo se diluye a 50 ng/μl con regulador TE reducido en preparación para genotipificación.

Genotipificación SNP con base en disposición

Se procesan muestras como se describe en la versión de Acceso Temprana 2.0 del protocolo de Disposición de Mendel (Affymetrix). En resumen, las concentraciones relativas y de calidad de los grupos y sus replicas se ensayan en 2% de gen de agarosa TAE. Se digieren 250 ng (5 μl) de ADN de cada grupo y las replicas en paralelo con 10 unidades de las enzimas de restricción Nsp I y Sty I (New England Biolabs, Beverly, MA) durante 2 horas a 37°C. Los oligonucleótidos de adaptador específicos de enzima luego se ligan en los extremos digeridos con Ligasa de ADN T4 durante tres horas a 16°C. Después de dilución con agua, se someten a PCR 5μl de las reacciones de ligación diluidas. Se realiza PCR utilizando Polimerasa de ADN Taq Titanio (BD Biosciences, San Jose, CA) en la presencia de 25 μM de cebador PCR 002 (Affymetrix), 350 μM de cada dNTP, 1M de Betaina (USB, Cleveland, OH), y 1X de Regulador PCR Taq Titanio (BD Biosciences). Los parámetros cíclicos son como sigue, desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos, amplificación a 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y extensión a 68°C durante 15 segundos se repite un total de 30 veces, extensión final a 68°C durante 7 minutos. Los productos PCR de las tres reacciones se combinan y se purifican utilizando las placas de purificación de pCR UF de 96 pozos MinElute (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las directrices del fabricante. Las muestras se recolectan en tubos de microcentrifuga y se centrifugan a 16,000 x g durante 10 minutos. El producto purificado se recupera del tubo teniendo especial cuidado de no interrumpir la sedimentación similar a gel blanco de fosfato de magnesio. Los productos PCR luego se verifican para migrar en un tamaño promedio entre 200-800 bps utilizando electroforesis en 2% de gel TAE. Sesenta microgramos de PCR purificado. Los productos luego se fragmentan utilizando 0.25 unidades de ADNsa I a 37°C durante 35 minutos. Se verifica la fragmentación completa de los productos en un tamaño promedio de menos de 180 bps utilizando electroforesis en 2% de gel TAE. Luego de la fragmentación, el

ADN se marca finalmente utilizando 105 unidades de desoxinucleotidil transferasa terminal a 37°C durante 2 horas. El ADN marcado luego se hibrida en la disposición Mendel respectiva a 49°C durante 18 horas a 60 rpm. La disposición hibridada se lava, se tiñe, y se explora de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Affymetrix).

Análisis Estadístico

- 5 El cálculo de una frecuencia alélica de SPN se basa en la clasificación de Señal de Alelo Relativa correspondiente (RAS), que proporciona un índice cuantitativo de las frecuencias de alelo en el ADN agrupado (30). De manera general, $RAS = A/(A+B)$, por lo que A se refiere a la mediana de las diferencias de emparejamiento/emparejamiento incorrecto del alelo principal y B para el alelo menor (Affymetrix Technical Manual). Debido a que las direcciones codificante y anticodificante se sondean, existen dos valores RAS, RAS1 (codificante) y RAS2 (anticodificante).
- 10 Debido a que el RAS1 y RAS2 son predicciones independientes de la frecuencia alélica con variabilidad distinta tratamos ambos valores como experimentos independientes. Para generar los valores RAS a partir del software Affymetrix para las disposiciones de Mapeo Humano 500K GeneChip® desarrollamos una secuencia de comandos PERL que está disponible libremente en el siguiente sitio web del Instituto de Investigación Genómica Traduccional, Phoenix, Arizona: (<http://bioinformatics.tgen.org/software/tgen-array/>).
- 15 Se combinan dos métodos estadísticos diferentes y exigentes para seleccionar los SPN de alta confianza estadística. Solo aquellos SPN que cumplen con los criterios de ambos métodos se seleccionan para genotipificación individual posterior. Con el fin de seleccionar los grupos contiguos físicamente significativos de los SNP, se emplea un método genómico de formación de ventanas amplias. Se generan clasificaciones RAS mediante la secuencia de comandos Perl descrito anteriormente seguido por la prueba t de student que compara RAS 1 y
- 20 RAS2 separadamente a través de todos los ~500,000 SNP para los realizadores superiores 25% vs. de fondo 25% y los realizadores superiores 50% vs. de fondo 50% en la población Suiza. Luego se calcula y se grafica una clasificación de mediana de la prueba t en los tamaños de ventana deslizante de 3, 5, 10, 20, y 40 SPN para el RAS 1 y el RAS2 a través del genoma completo para identificar los grupos significativos de SPN en diversos tamaños de ventana.
- 25 El segundo método estadístico se enfoca en identificar los SPN individuales estadísticamente significativos a diferencia de los grupos de SPN. Se utilizan frecuencias alélicas derivadas de RAS para calcular los valores χ^2 específicos de SPN para las siguientes comparaciones: realizadores superior 50% vs. de fondo 50% (muestra completa) y realizadores superior 25% vs. de fondo 25% (extremos de distribución). Debido a que se tratan los valores RAS 1 y RAS2 independientemente, se calculan las estadísticas para cada SPN un total de 4 veces. Los
- 30 SPN que cumplen los siguientes criterios en por lo menos una de las cuatro comparaciones se consideran significativos con este método: $\chi^2 = 28$, df=1 (que corresponde a $P = 0.05$ Bonferroni corregido para 500,000 comparaciones), coeficiente de variación de las frecuencias alélicas derivadas de RAS = 0.2.

Ejemplo 2.

Exploración de genoma completo en las muestras de los Estados Unidos

- 35 Los SPN KIBRA rs17070145 y CLSTN2 rs6439886 se evalúan adicionalmente en una segunda población independiente de 256 participantes mayores cognitivamente normales (54.1 ± 12.0 años de edad) de los Estados Unidos. El SPN KIBRA muestra asociación significativa con la memoria episódica con la misma dirección de efecto: los portadores de alelo T tienen clasificaciones de memoria significativamente mejores que los no portadores en la Prueba de Aprendizaje Auditiva-Verbal de Rey (AVLT) (12) y la Prueba de Memoria Selectiva de Buschke (SRT) (13)
- 40 (Tabla 2). Este efecto es independiente de la presencia o número de los alelos de apolipoproteína E ϵ 4 (APOE4) en estos participantes más viejos ($P = 0.5$, datos no mostrados). De forma importante, no existen diferencias dependientes de alelo en el resultado de la Prueba de Clasificación de Cartas Wisconsin y la Tarea de Atención en Serie Auditiva con Ritmo, que sugiere que el rs17070145 no afecta las funciones ejecutivas, memoria de trabajo y atención también en esta población. El SPN rs6439886 falla en mostrar asociación significativa con la memoria episódica en esta población más viejas. A pesar de la posibilidad de falso-positivo en la primera muestra para este
- 45 SPN particular, la carencia de significancia en la segunda población también se puede relacionar con las diferencias en la etnia y la edad promedio entre las poblaciones, y por lo tanto no debe descartarse por completo como relevante al desempeño de la memoria. La etnicidad y la edad pueden influenciar las asociaciones de genotipo-fenotipo, por ejemplo cuando se han mostrado que ellos influyen la asociación entre APOE4 y el riesgo de
- 50 enfermedad de Alzheimer (14, 15). Decidimos seguir solo el SPN KIBRA debido a su asociación altamente significativa con la memoria episódica en ambas poblaciones.

Materiales y Métodos.

La prueba de memoria y genotipificación se hace en 256 sujetos cognitivamente normales (171 mujeres, 85 hombres; edad promedio 54.0 ± 0.7 años [error estándar]). Los participantes se reclutan a través de anuncios en el

periódico local para un estudio longitudinal sobre el impacto de los factores genéticos en las funciones cognitivas. Se obtienen datos demográficos, familiares, y de historias médicas en cada individuo que experimenta genotipificación. Todos los individuos dan su consentimiento informado por escrito, aprobado por la Clínica Mayo y la Junta de Revisión Institucional del Centro Médico del Buen Samaritano. En una historia médica completa, se realizan la Entrevista Siquiátrica Estructurada para el Manual Estadístico y Diagnóstico de Trastornos Mentales -III-R, el Examen de Estado Mini- Mental de Folstein, la Escala de Depresión de Hamilton y el examen neurológico. Se utilizan las Prueba de Aprendizaje Verbal Auditivas (AVLT) (12) y la Prueba de Recordación Selectiva de Buschke (SRT) (13) para cuantificar la memoria episódica verbal. Se cuantifican las funciones ejecutivas, la memoria de trabajo y atención mediante la Prueba de Clasificación de Cartas de Wisconsin y la Tarea de Atención en Serie Auditiva con Ritmo (13).

Ejemplo 3.

Desequilibrio de acoplamiento alrededor del locus KIBRA

El mapeo fino de la región genómica que aloja KIBRA y los genes de flanco RARS y ODZ2 con 13 SPN comunes adicionales (Figura 1) se realiza para asegurar que la asociación observada de KIBRA SPN rs17070145 con la memoria episódica no se debe al desequilibrio de acoplamiento (LD) con variaciones genéticas en los genes cercanos. Se detectan niveles LD significativos entre rs7727920 y rs2279698 (que abarca KIBRA 5'-UTR y el primer exón), entre rs11738934 y rs3733980 (que abarca un bloque de haplotipo completamente contenido en KIBRA), y entre rs244903 y rs 10516047 (que abarca KIBRA 3'-UTR y RARS). El SPN rs17070145 y el haplotipo KIBRA correspondiente produce los niveles de significancia mayores ($P = 0.000004$ y $P = 0.000008$, respectivamente, Figura 1). Concluimos que la asociación observada no se relaciona con LD con genes adyacentes.

Materiales y Métodos

Genotipificación Individual

La genotipificación de los SPN rs17070145 (KIBRA) y rs6439886 (CLSTN2) en las muestras de Estados Unidos y Suiza se hace mediante Pyrosequencing™ (Uppsala, Suiza) en una máquina PSQ 96 MA. Los cebadores para SPN KIBRA rs17070145 son: 5'- ACA CCT CTG TGG CTT TTC TCC -3' (SEQ ID NO: 5) (delantero), 5'- ACA AGG CTG TGG AAT CTC TTG A -3' (SEQ ID NO: 6) (inverso, 5' biotinilado), 5'- CCT TGA TCC TGG ACC -3' (SEQ ID NO: 7) (cebador de secuenciación). Los cebadores para rs6439886 son: 5'- GGG GCA GAG ATT GGT ATT GTC -3' (SEQ ID NO: 8) (delantero), 5'- CTA CAG CCC ATT ATG CTC ACC A -3' (SEQ ID NO: 9) (inverso, 5' biotinilado), 5'- AGT CAC TCA TCA CAG TAA TC -3' (SEQ ID NO: 10) (cebador de secuenciación). El mapeo fino individual de la región KIBRA en la población Suiza se hace mediante el método de Amplifluor (www.kbiosciences.com). Se analizan los siguientes SPN: rs1363560, rs7727920, rs2279698, rs11738934, rs6862868, rs2241368, rs17751608, rs4976606, rs3822660, rs3822659, rs3733980, rs244903, y rs10516047.

La genotipificación del SPN rs1477306 (KIBRA) en la muestra Suiza se hace mediante Pyrosequencing™ (Uppsala, Suiza) en una máquina PSQ 96 MA. Los cebadores para SPN KIBRA rs1477306 son: 5'- CTG ATT TGT GAG CGG GGT TTG -3' (delantero, 5' biotinilado) (SEQ ID NO: 11), 5'- GGT GCC TTT GAG AGG AAT AGA -3' (SEQ ID NO: 12) (inverso), 5'- AAT AGA CAC ATC CAG GAG A -3' (cebador de secuenciación) (SEQ ID NO: 13).

Análisis estadístico

Se utiliza la versión PowerMarker 3.22 (www.powermarker.net) para el análisis de desequilibrio de acoplamiento y para la reconstrucción del haplotipo. Se hacen análisis multifactoriales de covarianza para evaluación simultánea de la influencia de los efectos de la edad, sexo, educación, y genotipo en el desempeño de la prueba cognitiva. Todas las pruebas son de dos colas.

Ejemplo 4.

Expresión génica de KIBRA en el cerebro humano

Se determinan un enlace genético establecido entre KIBRA y el desempeño de la memoria humana, los niveles de expresión de KIBRA en el cerebro humano y especialmente en tales regiones relacionadas con la memoria en el hipocampo, el lóbulo frontal y parietal. Se diseñan amplicones RT-PCR para detectar el transcrito de longitud completa KIBRA y su forma truncada KIAA0869, que carece de los primeros 223 aminoácidos y que se forma probablemente a través de un sitio de inicio transcripcional alternativo (16). Son marginales los niveles de expresión del KIBRA de longitud completa en el cerebro humano. En contraste, los niveles de expresión del KIBRA truncado son altos en todas las regiones de cerebro examinadas, con los mayores niveles en el hipocampo (Figura 2). De forma

importante, el SPN rs 17070145 mapea en la forma truncada de KIBRA. Los patrones de expresión de KIBRA en el cerebro humano son consistentes con una función en el desempeño de la memoria.

Materiales y Métodos

Estudios de expresión génica

- 5 Se hace KIBRA qRT-PCR en una máquina ABI PRISM 7700 TaqMan® (ABI, Foster City, California USA) utilizando la mezcla maestra de SYBR (Stratagene, Gebouw California, Ámsterdam, Países Bajos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El cADN del el lóbulo frontal y parietal, hipocampo, homogenato de cerebro completo humano, se compran de BioCat (BioCat GmbH, Im Neuenheimer Feld, Heidelberg Alemania). Se diseñan los cebadores mediante PrimerDesign™ (v1.9, ABI) utilizando CCDS 4366.1 y la secuencia KIBRA de longitud completa
- 10 NM_015238. Se diseña un par de cebador que reconoce una secuencia en el exón 2 para detectar solo los transcritos KIBRA de longitud completa (delantero: 5'-GCT CAC CTT TGC TGA CTG CA-3' (SEQ ID NO: 14), inverso: 5'-TCC AAC CTG TGG GTC ATA TGC-3' (SEQ ID NO: 15)). Se diseña un par de cebadores que reconocen una secuencia en el exón 15 para detectar los transcritos KIBRA truncados y de longitud completa que contienen el exón 15 (delantero: 5'-GGC CTC TGG ACG CCT CA-3' (SEQ ID NO: 16), inverso: 5'-TGG TGA AGG GCT GGA TAG GA-3' (SEQ ID NO: 17)). Se diseña un par de cebadores intrónicos para detectar la contaminación genómica eventual (delantero: 5'-TGG GCT CAA ACA TTC AAC CTC- 3' (SEQ ID NO: 18), inverso: 5'-ACG CTG GCT CAT GCC TGT A-3' (SEQ ID NO: 19)).

Ejemplo 5.

Diferencias dependientes del alelo KIBRA en la función hipocámpica

- 20 Se investiga el impacto del genotipo KIBRA sobre las funciones cerebrales relacionadas con la memoria utilizando la formación de imágenes de resonancia magnética funcional (fMRI). El fMRI es una técnica que se ha utilizado para mapear las regiones cerebrales asociadas con diferentes aspectos de la memoria humana (17, 18). Treinta sujetos de la población Suiza (15 portadores del alelo rs17070145*T versus 15 no portadores) experimentaron fMRI. Los grupos alélicos se emparejan por sexo (5 hombres y 10 mujeres en cada grupo), educación (P = 0.7), edad (P = 0.8),
- 25 el genotipo His452Tyr del gen receptor 5-HT2a (2) (P = 0.4), y para el desempeño de memoria retrasada de 5-min (P = 1.0). La razón para emparejar grupos de genotipo para el desempeño de la memoria es estudiar las diferencias dependientes de alelo en la actividad cerebral relacionada con la memoria independientemente del desempeño diferencial. Debido a que el KIBRA se asocia con la memoria episódica humana que depende de la función del hipocampo (11, 19, 20) y debido a que la expresión de KIBRA es mayor en el hipocampo, se prueba la hipótesis que
- 30 los genotipos KIBRA pueden afectar la información relacionada con la memoria episódica en el hipocampo humano. Como los estudios de formación de neuroimágenes han encontrado que el hipocampo se activa especialmente mediante las tareas de memoria episódica asociativas (18, 21), se prueba el impacto del genotipo KIBRA en las activaciones hipocámpicas en una tarea asociativa de profesión-cara (21). Como se espera con base en el emparejamiento, no existen diferencias dependientes de alelo en el desempeño de la recuperación fMRI (P = 0.5).
- 35 Durante la recuperación de la memoria, los no portadores del alelo T muestran activaciones cerebrales significativamente incrementadas comparado con portadores de alelo T en el lóbulo temporal medio (máximo local en el hipocampo derecho en la posición de coordenadas [26, -12, -14], P < 0.001, Figura 3). Los no portadores del alelo T también muestran activaciones incrementadas en la corteza frontal (máxima local en el lobulillo frontal medio derecho (área Brodmann 8/9) en la posición de coordenadas [30, 42, 42], P < 0.001, y en el lobulillo frontal medio izquierdo (área Brodmann 6) a [-24, 10, 56], P < 0.001), y en la corteza parietal (máximo local en el lóbulo parietal inferior derecho (área Brodmann 40) en la posición de coordenadas [50, - 24, 30], P < 0.001). Además del hipocampo, también estas regiones neocorticales pertenecen a una red importante para la recuperación de la memoria episódica (17). Por lo tanto los hallazgos actuales sugieren que los no portadores de alelo T necesitan más activación en estas regiones cerebrales relacionadas con la recuperación de la memoria para alcanzar el mismo
- 45 nivel de desempeño de recuperación como portadores de alelo T. Durante codificación de la memoria, no se encuentran diferencias dependientes de alelo en las activaciones cerebrales, que sugiere que el genotipo no afecta la memoria episódica en esta etapa temprana de la formación de la memoria. En una tarea de memoria de trabajo adicional, no se ven diferencias dependientes de alelo en la activación cerebral en estas regiones, que indican que las activaciones reportadas anteriormente en los no portadores son específicas para la recuperación de la memoria episódica. Los algoritmos con base en voxel automatizados (SPM2) (22) y las mediciones del volumen manual fallan en revelar diferencias dependientes de alelo significativas en el hipocampo o el parahipocampo (P = 0.1), que sugiere que los resultados de la formación de imágenes no se sesgaron por las diferencias morfológicas.
- 50

Materiales y Métodos

Sujetos

- 55 10 hombres, 20 mujeres; edad promedio 22.1± 0.4 (e.e.) años.

Tareas de la memoria episódica

Existen tres series de tiempo fMRI (uno por serie de aprendizaje) para el aprendizaje intencional de pares de profesión-cara. Cada serie de tiempo consiste de la condición de aprendizaje asociada con la profesión-cara y una condición de valores iniciales visual. Se estudian dieciséis pares de profesión-cara - para aprendizaje asociativo y se estudian 24 contornos de la cabeza sin fisonomía en la condición de valores iniciales. La instrucción para el aprendizaje asociativo de los pares de profesión-cara es imaginar la persona presentada que actúa en una escena de la profesión escrita. Los sujetos responden al presionar botones si ellos encuentran fácil o difícil imaginar una escena. De forma importante, se les solicita a los sujetos imaginar la misma escena para un par de profesión-cara dada durante las series 2 y 3 como durante la serie 1. La tarea de valores iniciales es decidir si el área del oído derecho o izquierdo es mayor. Cada condición de aprendizaje consiste de cuatro bloques. Un bloque contiene 4 ensayos de 6 s cada uno. La condición de valores iniciales también consiste de 4 bloques. Aquí, un bloque contiene seis ensayos de 4 s cada uno. Posteriormente, cada bloque de tarea toma 24 s. Una diapositiva anuncia cada bloque de tareas. Para la recuperación de caras y asociaciones de profesión-cara previamente aprendidas, se aplican series de tiempo fMRI únicas. Esta serie de tiempo incluye la condición de recuperación asociativa y la misma condición de valores iniciales visual que se utiliza para la codificación de las series de tiempo. Para la recuperación de las asociaciones, se muestran de nuevo las caras presentadas previamente (sin las profesiones) como señales de recuperación con la instrucción de recordar cada ocupación de las personas y de indicar la categoría profesional superordinado al presionar el botón: académico o trabajador. La condición de recuperación consiste de cuatro bloques, cada bloque incluye cuatro ensayos de 6 s cada uno. Todos los bloques de tareas toman 24 s y se anuncian mediante una diapositiva de instrucción.

Memoria de trabajo

El experimento incluye una serie de tiempo fMRI con una tarea de dos apoyos para la evaluación de la memoria de trabajo y una tarea de valores iniciales ('objetivo x') para la evaluación de la concentración. La tarea de dos apoyos requiere que los sujetos respondan a una letra repetida con una letra que interviene (por ejemplo S - f - s - g). La tarea 'objetivo x' requiere que los sujetos respondan a la ocurrencia de la letra 'x'. Cada tarea se da en cinco bloques de 26 s cada uno. Los bloques se anuncian mediante una diapositiva de instrucción. Los estímulos fueron 50 letras en mayúsculas o minúsculas escritas en negro sobre un fondo blanco. Se presentan trece letras mayúsculas o minúsculas por bloque para duración de 2 s cada una.

Adquisición de datos

Se realizan mediciones MR sobre un explorador RM de cuerpo completo 3T Philips Intera equipado con una bobina de cabeza SENSE Philips de ocho canales. Los datos funcionales se obtienen a partir de 32 capas transversales paralelas al plano AC-PC que cubre el cerebro completo con una resolución espacial medida de $2.8 \times 2.8 \times 4 \text{ mm}^3$ (matriz de adquisición 80×80) y una resolución reconstruida de $1.7 \times 1.7 \times 4 \text{ mm}^3$. Se adquieren datos utilizando una secuencia SENSE-sshEPI (31) con un factor de aceleración de $R = 2.0$. Otros parámetros de exploración son $TE = 35 \text{ ms}$, $TR = 3000 \text{ ms}$, $\theta = 82^\circ$. Se obtiene una exploración de peso estándar 3D T1 para referencia anatómica con una resolución espacial medida de $1 \times 1 \times 1.5 \text{ mm}^3$ (matriz de adquisición 224×224) y una resolución reconstruida de $0.9 \times 0.9 \times 0.8 \text{ mm}^3$, $TE = 2.3 \text{ ms}$, $TR = 20 \text{ ms}$, $\theta = 20^\circ$. Una exploración anatómica de recuperación de la inversión ponderada 2D T1, orientada perpendicularmente a lo largo del eje del hipocampo, se obtiene para volumetría de hipocampo y parahipocampo sobre 33-39 capas con una resolución espacial medida de $0.5 \times 0.6 \times 1.5 \text{ mm}^3$ (matriz de adquisición 400×320) y una resolución espacial reconstruida de $0.4 \times 0.4 \times 1.5 \text{ mm}^3$, $TE = 15 \text{ ms}$, $TR = 4200 \text{ ms}$, $\theta = 20^\circ$, 1R retraso 400 ms, sin espacio intercapas.

Análisis de datos fMRI

Se realizan análisis estadísticos y pre y post-procesamiento de imágenes con SPM2 (<http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm>). Se aplican los procedimientos de preprocesamiento estándar, es decir, realineación, normalización y suavizamiento espacial (8 mm) (32). En el nivel de sujeto único, se analizan los datos de acuerdo con el modelo de efectos fijos (SPM2). Se incluyen los parámetros de movimiento de seis cabezas en el modelo como factores confusos. Los datos se filtran por paso alto con un valor específico de filtro para cada serie de tiempo fMRI. Este valor se determina de acuerdo con $2 * SOA * TR$. En el segundo nivel, se ingresan contrastes en sujeto en análisis de efectos aleatorios (ANOVA, pruebas T, SPM2) que cuentan la varianza entre los sujetos (33). También computamos las correlaciones entre los contrastes que se codifican en el sujeto (serie de aprendizaje 1 – serie 3) y las mediciones del comportamiento (regresión simple, SPM2). Los umbrales se fijan en un nivel de $p < 0.001$, incorrecto para múltiples comparaciones.

Análisis de datos MRI anatómicos

Con base en las imágenes MRI estructurales en peso 3D-T1 que cubren el cerebro completo, se computan los volúmenes de materia blanca y gris con SPM2. Las imágenes primero se normalizan en la plantilla MNI T1 utilizando

una caja estándar de delimitación y luego se segmentan en materia gris, materia blanca y fluido cerebroespinal. Los volúmenes de materia blanca y gris estandarizados luego se multiplican por el determinante de la matriz de transformación lineal para obtener los volúmenes de la materia gris y blanca en cm^3 . Con base en las imágenes MRI estructurales de resolución alta ponderada D-T1, dos clasificadores independientes delinean manualmente la formación hipocámpica (18) (regiones CA, lobulillo dentado y subículo, que excluye la fimbria) y el lobulillo parahipocámpico utilizando el software Pmod (<http://www.pmod.com>). El fluido cerebroespinal se excluye cuidadosamente lo que resulta en estimados de volumen conservadores. La confiabilidad entre los clasificadores varía entre $r = 0.8$ y 0.98 . Se computan los ANOVA con el genotipo APOE y el sexo como variables independientes para determinar las diferencias del grupo en los volúmenes de cerebro. Los umbrales se establecen a nivel $p < 0.05$, incorrecto para múltiples comparaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para evaluar la memoria episódica en un paciente que comprende las etapas de:
 - (a) detectar la presencia o ausencia del alelo CT/TT del rs17 070145 SPN en el gen KIBRA del paciente; y
 - (b) correlacionar la presencia o ausencia de la mutación con la memoria episódica en el paciente.

Figure 1

**Influencia de los SNPs rs17070145 (*KIBRA*) y rs6439886 (*CLSTN2*)
sobre la memoria episódica verbal en la población Suiza**

	Palabras inmediatamente recordadas (media \pm s.e)	Palabras recordadas después de 5 min. (media \pm s.e)	Palabras recordadas después de 24 h. (media \pm s.e)
rs17070145*			
C/C, $n = 164$	23.6 \pm 0.3	7.6 \pm 0.2 ^a	6.7 \pm 0.2 ^b
C/T & T/T, $n = 169$	24.1 \pm 0.3	9.4 \pm 0.2 ^a	8.0 \pm 0.2 ^b
rs6439886			
T/T, $n = 265$	23.9 \pm 0.2	8.4 \pm 0.2 ^c	7.3 \pm 0.2 ^d
T/C & C/C, $n = 76$	24.2 \pm 0.4	9.8 \pm 0.4 ^c	8.4 \pm 0.4 ^d

Medias con superíndices comunes son significativamente diferentes

* Genotipo de 8 sujetos que falla en pasar los criterios de control de calidad

^a: $P = 0.000004$, ^b: $P = 0.0008$, ^c: $P = 0.002$, ^d: $P = 0.022$

Figura 2

Influencia de los SNP rs17070145 (*KIBRA*) y rs6439886 (*CLSTN2*) sobre la memoria episódica verbal en la población Estadounidense*

	Palabras inmediata- mente recordadas (media \pm s.e)	Palabras recordadas después de 30 min (AVLT) (media \pm s.e)	Recordación libre de palabras (SRT) (media \pm s.e)
rs17070145			
C/C, $n = 126$	9.4 \pm 0.3	8.5 \pm 0.3 ^a	83.7 \pm 1.2 ^b
C/T & T/T, $n = 130$	10.0 \pm 0.3	9.7 \pm 0.3 ^a	90.3 \pm 1.1 ^b
rs6439886[#]			
T/T, $n = 185$	9.7 \pm 0.2	9.1 \pm 0.2	88.4 \pm 0.9
T/C & C/C, $n = 64$	9.9 \pm 0.4	9.2 \pm 0.4	88.9 \pm 1.6

Medias con superíndices comunes son significativamente diferentes

* El SRT se completa por 200 participantes (98 C/C portadores y 102 C/T & T/T portadores de rs17070145)

[#]: Genotipo de 7 sujetos que fallan en pasar los criterios del control de calidad

^a: $P = 0.004$, ^b: $P = 0.00005$

Figura 3
Significancia de los SNP y haplotipos

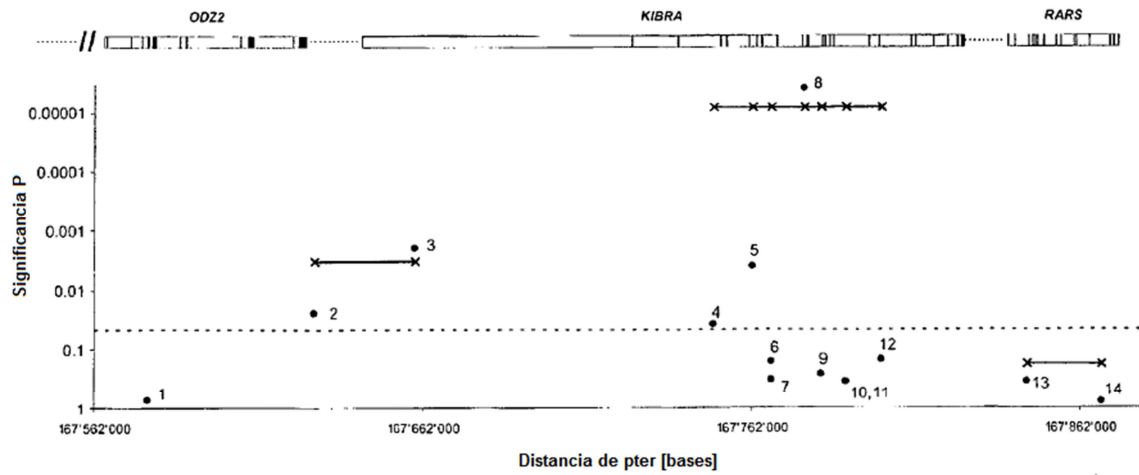


Figura 4

Niveles de Expresión de KIBRA en el cerebro humano

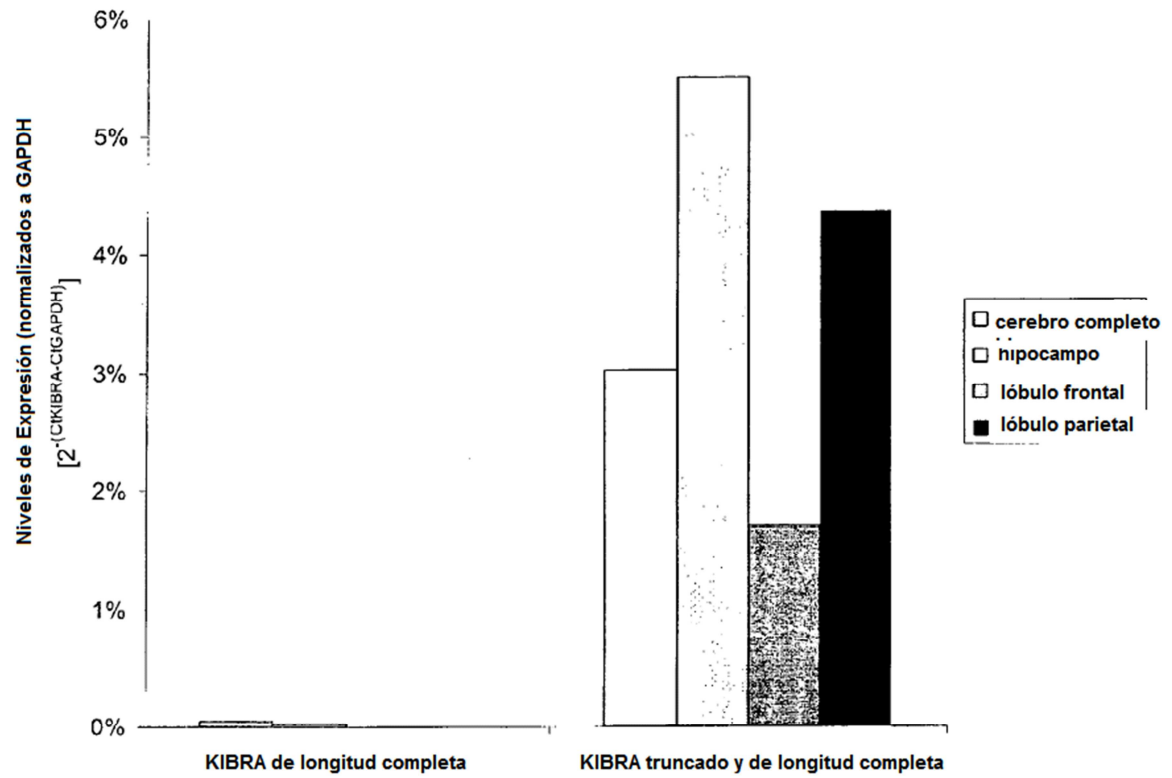


Figura 5

Diferencias dependientes del alelo KIBRA en la activación del hipocampo

