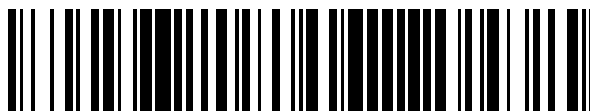


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 467**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2009 E 09790876 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015 EP 2326729**

54 Título: **Marcadores de perfil genómico inducidos por un estímulo que marcan la enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:

28.07.2008 US 84154 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.06.2015

73 Titular/es:

**BLANCHETTE ROCKEFELLER NEUROSCIENCES
INSTITUTE (100.0%)
8 Medical Center Drive
Morgantown, WV 26505-3409, US**

72 Inventor/es:

**ALKON, DANIEL L. y
KHAN, TAPAN KUMAR**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 538 467 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

Marcadores de perfil genómico inducidos por un estímulo que marcan la enfermedad de Alzheimer

5 **SECTOR DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer utilizando perfiles de expresión génica inducida por PKC.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La enfermedad de Alzheimer (AD) es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por la pérdida progresiva de memoria y las funciones cognitivas. La demencia asociada con la AD se denomina como demencia senil de tipo Alzheimer (SDAT) cuando se utiliza con la enfermedad de Alzheimer. La AD se caracteriza clínicamente por la pérdida progresiva de memoria, cognición, razonamiento, juicio y estabilidad emocional que conduce de manera gradual a un deterioro mental profundo y, finalmente, la muerte. Aunque existen muchas hipótesis para los posibles mecanismos de la AD, una teoría central es que la formación excesiva y la acumulación de péptidos beta-amiloide (A β) tóxicos, ya sea directa o indirectamente, afecta a una variedad de eventos celulares y conduce a un daño neuronal y la muerte celular (Selkoe, Neuron. 1991; 6(4): 487-98, 1991; Selkoe, J Clin Invest. 2002; 110 (10): 1375-1381).

La AD es un trastorno progresivo con una duración promedio de alrededor de 8 a 15 años entre el inicio de los síntomas clínicos y la muerte. Se cree que la AD representa la séptima causa médica más habitual de muerte y afecta a aproximadamente 5 millones de personas en los Estados Unidos. Se espera que la prevalencia alcance los 7,7 millones antes del 2030. Aproximadamente 1 de cada 8 personas mayores de 65 años, el 13% de esta población, tiene AD (Asociación del Alzheimer 2008 Alzheimer's Disease Facts and Figures ("Hechos y cifras sobre la enfermedad de Alzheimer")). La AD afecta actualmente a aproximadamente 15 millones de personas en todo el mundo (incluyendo todas las razas y grupos étnicos) y debido al aumento relativo de personas mayores en la población, su prevalencia probablemente aumentará en las próximas dos o tres décadas. La AD es actualmente incurable.

Hasta ahora, existen limitadas oportunidades para la intervención profiláctica para la AD debido a la insuficiencia de procedimientos de diagnóstico. En la actualidad, un diagnóstico definitivo de AD requiere la observación de lesiones en el tejido cerebral de pacientes post-mortem o, raramente, en pequeñas muestras de biopsias de tejido cerebral tomadas durante un procedimiento neuroquirúrgico invasivo. Sin embargo, los médicos intentan de manera rutinaria distinguir la AD de otras formas de demencia basadas en una serie de síntomas que dependen de la correlación conocida entre dichos síntomas y las lesiones observadas en las biopsias. Entre las pruebas utilizadas actualmente para diagnosticar la AD se incluyen combinaciones de cuestionarios cualitativos, tales como el mini examen del estado mental (MMSE), mini examen cognitivo, estudio cooperativo de la AD-actividades a escala de la vida diaria (ADCS-ADL); evaluación física y neurológica; y obtención de imágenes cerebrales estructurales (MRI, CT) y funcionales (PET; FDG-PET). Estas pruebas se realizan habitualmente para descartar otras enfermedades o afecciones en lugar de proporcionar un diagnóstico definitivo de la AD.

Existen algunos procedimientos para la detección de biomarcadores patogénicos para la AD, tales como A β , Tau, y la proteína de la cadena neural/AD7C en sujetos vivos. Por ejemplo, la detección de A β en un sujeto vivo incluye la detección directa (por imágenes) o indirecta (bioquímica). La obtención de imágenes *in vivo* de A β se puede conseguir utilizando derivados de flavona radioyodados como agentes de obtención de imágenes (Ono y otros, J Med Chem 2005; 48 (23): 7253-60) y con colorantes de unión a amiloide, tales como putresceína conjugada a un péptido A radioyodado de 40 residuos (que produce ¹²⁵I-PUT-A 1-40). Se observó que este agente cruzaba la barrera hemato-encefálica y se unía a las placas de A β (Wengenack y otros, Nature Biotechnology 2000; 18 (8): 868-72). También se observó la obtención de imágenes de A β utilizando estilbeno [¹¹C]SB-13 y el benzotiazol [¹¹C]6-OH-BTA-1 (también conocido como [¹¹C]PIB) (Nicholaas y otros, Am J Geriatr Psychiatry. 2004; 12: 584-595).

La cuantificación de A β (1-40) en la sangre periférica también se ha demostrado utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada con espectrometría de masas en tándem en una trampa de iones lineal (Du y otros, J Biomol Tech. 2005; 16(4): 356-63). También se ha descrito la detección de agregados proteínas A β individuales en el líquido cefalorraquídeo de pacientes de Alzheimer mediante espectroscopia de correlación de fluorescencia (Pitschke y otros, Nature Medicine 1998; 4: 832-834). La patente de Estados Unidos 5.593.846 describe un procedimiento para la detección de A β soluble. También se ha descrito la detección indirecta del péptido A β y receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE) utilizando anticuerpos. Por último, la detección bioquímica de aumento de la actividad de BACE-1 en el líquido cefalorraquídeo utilizando sustratos cromogénicos también se ha postulado como indicador del diagnóstico o pronóstico de la AD (Verheijen y otros, Clin Chem 2006; 52: 1168-1174). Entre otros procedimientos se incluyen la detección de Tau, y la proteína de la cadena neural/AD7C en el líquido cefalorraquídeo.

En un intento de mejorar el tratamiento y el diagnóstico de la AD, se han generado numerosos perfiles de expresión génica para comparar genes expresados en el tejido cerebral post-mortem con los expresados en tejido cerebral normal utilizando diversas técnicas que incluyen microdissección de captura por láser en micromatrices ("microarrays") (Loring y otros, DNA and Cell Biology 2001; 20(11): 683-95; Mufson y otros, Neurochem. Res. 2003; 27(10): 1035-1048; Duncley y otros, Neurobiol Aging, 1 de octubre de 2005; Brooks y otros, Brain Res 2007; 1127(1): 127-35; Liang y otros, Physiological Genomics. 2008; 33: 240-256; Liang y otros, Proc Natl Acad Sci USA. 10 de marzo de 2008). También se han generado algunos perfiles de expresión génica utilizando tejidos periféricos, tales como linfocitos o fibroblastos, en un intento de identificar los perfiles de expresión génica asociados con la AD familiar (hereditaria) o de evaluar el efecto de un tratamiento potencial en genes expresados diferencialmente (Nagasaka y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005; 102(41): 14854-14859).

Entre las medidas de diagnóstico actuales para la AD se incluyen la identificación de un núcleo clínico de la pérdida de memoria episódica temprana, progresiva y significativa más uno o más biomarcadores anormales (indicadores biológicos) característicos de la AD, incluyendo la atrofia (pérdida) del lóbulo temporal tal como se muestra en MRI; concentraciones anormales de proteína A β en el líquido cefalorraquídeo; un patrón específico que muestra un metabolismo de glucosa reducido en las exploraciones por PET del cerebro; y una mutación genética asociada con la familia inmediata.

Al igual que los exámenes físicos y mentales, los procedimientos anteriores no son todavía totalmente fiables o precisos para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer porque los mismos patrones de genes se encuentran en otras enfermedades o afecciones. Como resultado, los costes del diagnóstico de la AD son enormes debido a las numerosas pruebas y especialistas involucrados y debido a la incapacidad para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en etapas tempranas impide que los pacientes y sus familias planeen de manera adecuada el futuro, aumentando los costes de la atención a largo plazo. Además, las tasas estimadas de diagnósticos erróneos o de diagnósticos no definitivos están en el intervalo del 50-75%.

Sigue habiendo la necesidad de una manera más sencilla de conseguir diagnósticos más definitivos de la AD que sean menos costosos e invasivos, más precisos, y que se puedan utilizar en una etapa más temprana para una intervención más rápida. De manera destacada, debido a que el proceso neurodegenerativo y la pérdida sustancial de células comienza probablemente mucho antes de la manifestación de los síntomas cognitivos de la AD, una prueba de diagnóstico eficaz que pudiera diagnosticar la AD de manera más precisa, incluyendo la AD temprana e incluso una predisposición a la AD, tendría un valor incalculable.

El documento WO2006/054979 da a conocer un procedimiento para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (AD) mediante la medición del nivel de expresión de un único gen, de la proteína fosfatasa 2A (PP2A), en células de pacientes y células de control después de la estimulación con un activador de proteína quinasa C. El procedimiento comprende las etapas de obtener una muestra de células de dicho sujeto y detectar el nivel de expresión del gen de PP2A en dicha muestra, en el que un nivel elevado de la expresión del gen de PP2A en comparación con las células de control indica la presencia de la enfermedad de Alzheimer.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

Figura 1. La figura 1 representa la expresión disminuida de ciertos genes en células de AD activadas por PKC comparadas con células de control activadas por PKC según el procedimiento de la presente invención.

Figura 2. La figura 2 representa la expresión aumentada de ciertos genes en células de AD activadas por PKC comparadas con células de control activadas por PKC según el procedimiento de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención da a conocer procedimientos para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer (AD) tal como se define en las reivindicaciones.

Estos procedimientos se basan en la detección de cambios en la expresión génica después de la activación de la proteína quinasa C (PKC). La proteína quinasa C (PKC) es una de las mayores familias de genes de la proteína quinasa (Liu y Heckman, Cell Signal, 1998; 10: 529-542). Varias isoenzimas de PKC se expresan en el cerebro, incluyendo PKC, PKC β 1, PKC β 2, PKC δ , PKC ϵ y PKC γ . La PKC es principalmente una proteína citosólica, pero con estimulación se transloca a la membrana. Se ha observado que la PKC está implicada en numerosos procesos bioquímicos relevantes para la enfermedad de Alzheimer. Se han encontrado déficits de isoformas de PKC en tejido de cerebro con AD y en fibroblastos de pacientes con AD. La PKC también activa la enzima convertidora de TNF-alfa (TACE), que es una enzima que está implicada en la conversión proteolítica de la proteína precursora amiloide unida a membrana (APP) a su forma soluble no patógena, conocida como APP-alfa o sAPPalfa soluble (Alkon y otros, Trends in Pharmacological Sciences 2007; 28 (2): 51-60; Hurtado y otros, Neuropharmacology 2001; 40(8): 1094-1102). Estas enzimas productoras de sAPP α se denominan de manera genérica como alfa-secretasas. La activación de PKC por TACE también reduce los niveles celulares de A β patógeno, que se produce mediante la escisión de APP por la enzima beta-secretasa (BACE). Esto es probablemente debido al hecho de que el sitio de

escisión de TACE está dentro del dominio A β de APP. Se ha observado que la sobreexpresión de PKC ϵ aumenta de manera selectiva la actividad de la enzima convertidora de endotelina, que degrada A β (Choi y otros, Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103 (21): 8215-8220). Además, los estudios han demostrado que un activador de PKC, briostatina-1, reduce los niveles de A β soluble y mejora la memoria reciente (Etcheberrigaray y otros, Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101 (30): 11141-6; patente de Estados Unidos 6.825.229).

Además, otros estudios han demostrado que la PKC translocada puede fosforilar receptores de glutamato, incluyendo receptores de NMDA, así como otras proteínas que se encuentran en la densidad postsináptica (Suzuki y otros, Brain Res 1993; 619: 69-75). La PKC tiene varios impactos sobre los receptores de NMDA (MacDonald y otros, Curr Drug Targets. 2001; 2: 299-312). Específicamente, la PKC aumenta la expresión en la superficie de los receptores de NMDA (Xiong y otros, Mol Pharmacol. 1998; 54: 1055-1063; Lan y otros, Nat Neurosci. 2001; 4: 382-390). Se cree que el flujo de calcio a través de los receptores de NMDA desempeña un papel crítico en la plasticidad sináptica, un mecanismo celular para el aprendizaje y la memoria. Uno de los fármacos aprobados para el tratamiento de la AD, la memantina, se une al receptor de NMDA e inhibe el influjo prolongado de iones de calcio que forma la base de la excitotoxicidad neuronal en la AD.

Dado que diversas isoenzimas de PKC están implicadas en la AD, la detección de diferencias específicas de la enfermedad de Alzheimer en la expresión génica obtenida por PKC y la función en los tejidos periféricos proporciona la base para pruebas altamente prácticas y eficaces para el diagnóstico precoz de la enfermedad de Alzheimer, y proporciona una base para la identificación de dianas para el desarrollo de fármacos terapéuticos.

Definiciones

La proteína quinasa C se refiere a cualquier isoforma de PKC codificada por un gen de PKC. La familia de genes de PKC consiste actualmente de 11 genes que se dividen en cuatro subgrupos: 1) clásicas PKC α (alfa), β 1, β 2 (beta) (β 1 y β 2 son formas empalmadas de manera alternativa del mismo gen) y γ (gamma), 2) nuevas PKC δ (delta), ϵ (épsilon), η (eta) y θ (theta), 3) atípicas PKC ξ (zeta), λ (lambda), η (eta) y τ (iota) y 4) PKC μ (mu). Las isoformas α , β 1, β 2 y γ son dependientes del ion calcio, dependientes de fosfolípido y diacilglicerol y representan las isoformas clásicas de PKC, mientras que las otras isoformas son activadas por fosfolípidos y diacilglicerol, pero no son dependientes de calcio. Todas las isoformas comprenden 5 regiones variables (V1-V5), y las isoformas α , β 1, β 2 y γ contienen cuatro dominios estructurales (C1-C4) que están altamente conservados. Todas las isoformas, excepto PKC α , β 1, β 2 y γ carecen del dominio C2, y las isoformas λ , η también carecen de nueve de dominios de dedos de zinc ricos en dos cisteínas en C1 a las que se une el diacilglicerol. El dominio C1 también contiene la secuencia de pseudosustrato que está altamente conservada entre todas las isoformas, y que sirve como función autorreguladora mediante el bloqueo del sitio de unión a sustrato para producir una conformación inactiva de la enzima (House y otros, Science 1997; 238: 1726 -1728).

El término "enfermedad de Alzheimer" o "AD" se refiere a cualquier afección en la que A β y/o los ovillos neurofibrilares finalmente se acumulan en las células del sistema nervioso central, cuya acumulación que no puede atribuirse a otra enfermedad o afección, tal como CAA. La AD puede ser heredable en una manifestación familiar o puede ser esporádica. Tal como se utiliza en el presente documento, la AD incluye familiar, esporádica, así como intermedios y subgrupos de las mismas en base a las manifestaciones fenotípicas. Además, este término incluye el desarrollo de A β en sujetos con síndrome de Down.

El término "AD esporádica" se refiere a la AD que se desarrolla más tarde en la vida, habitualmente después de la edad de aproximadamente 65, y no está asociada con el historial familiar de la AD o una mutación en un gen identificado como un factor de riesgo para la AD.

El término de aparición temprana se refiere a la AD que aparece en una persona por debajo de la edad de 65. La aparición temprana incluye, pero sin limitarse a ésta, la AD familiar.

La AD familiar se refiere a la AD asociada con mutaciones heredadas en el gen de la presenilina-1 (PSEN-1), el gen de la presenilina-2 (PSEN-2); el gen que codifica la proteína precursora de beta amiloide (APP), y/o el gen que codifica la apolipoproteína E (APOE).

La AD de etapa temprana se refiere a la etapa de la AD asociada con síntomas moderados de deterioro cognitivo, tales como pérdida de la memoria o confusión. La pérdida de la memoria u otros déficits cognitivos son notables, sin embargo, la persona puede compensarlos y continuar la función de manera independiente. Esta etapa se correlaciona con la fase 4 de la escala de clasificación de la evaluación funcional (FAST) o la AD leve según los criterios definidos en el Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (Manual diagnóstico y estadístico de trastornos mentales), cuarta edición (DSM-IV-TR) (publicado por la Asociación Americana de Psiquiatría), NINCDS-ADRDA, o MMSE.

Un deterioro cognitivo leve (MCI, por sus siglas en inglés) se refiere a una etapa de transición entre los cambios cognitivos del envejecimiento normal y la AD. Un sujeto con MCI tiene problemas cognitivos más allá de lo esperado

para su edad y educación, pero no interfieren significativamente con sus actividades diarias. Una persona con MCI puede tener problemas con la memoria, el lenguaje, u otra función mental. No todos los sujetos con MCI desarrollan la AD. Tal como se utiliza en el presente documento, un sujeto con MCI se considera en riesgo de desarrollar Alzheimer.

Otros factores de riesgo para la AD son la edad avanzada, las mutaciones en PSEN-1, PSEN-2, APP y APOE.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" significa un mamífero. En una realización, el sujeto es un ser humano.

El término "sujeto normal", tal como se utiliza en el presente documento, es relativo a la AD. Es decir, el sujeto no presenta la AD, no está diagnosticado con la enfermedad específica, y no está en riesgo de desarrollar la enfermedad.

"Tejido periférico" se refiere a un tejido que no deriva de neuroectodermo, y de manera específica incluye el epitelio olfativo, lengua, piel (incluyendo la dermis y/o epidermis), y las capas mucosas del cuerpo.

El término "expresado diferencialmente" o "expresión diferencial", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una medición de un constituyente celular que varía en dos muestras, una muestra de control y una muestra de prueba. El constituyente celular puede regularse por incremento en el experimento en relación con el control o regularse por disminución en el experimento en relación con la muestra de control.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "detectar el nivel de expresión" incluye procedimientos que cuantifican los niveles de expresión, así como procedimientos que determinan si se expresa un gen de interés. La detección puede ser cualitativa o cuantitativa. En una realización específica, la expresión diferencial es estadísticamente significativa.

Tal como se utiliza en el presente documento, "regular por incremento" o "regulación por incremento" significa detectar un aumento de la cantidad o actividad de un gen o producto génico en relación con una línea base o estado de control, a través de cualquier mecanismo, incluyendo, pero sin limitarse a éstos, un aumento de la transcripción, traducción y/o un aumento de la estabilidad del producto de la transcripción o de la proteína. El aumento de la expresión en una célula de prueba incluye una situación en la que el gen correspondiente en una célula de control permanece invariable por la activación de PKC o se regula por disminución en respuesta a la activación de PKC.

Tal como se utiliza en el presente documento, "regular por disminución" o "regulación por disminución" significa detectar una disminución de la cantidad o actividad de un gen o producto génico en relación con una línea base o estado de control, a través de cualquier mecanismo, incluyendo, pero sin limitarse a éstos, una disminución de la transcripción, traducción y/o una disminución de la estabilidad del producto de la transcripción o de la proteína. La disminución de la expresión en una célula de prueba incluye una situación en la que el gen correspondiente en una célula de control permanece invariable por la activación de PKC o se regula por incremento en respuesta a la activación de PKC.

Un "cambio en la expresión génica" se refiere a la detección de la regulación por incremento o la regulación por disminución.

El término "micromatriz" o "micromatriz de ácidos nucleicos" se refiere a un grupo de ácidos nucleicos plurales unidos a un sustrato, siendo la hibridación a cada uno del grupo de ácidos nucleicos unidos detectable por separado. El sustrato puede ser sólido o poroso, plano o no plano, unitario o distribuido. Las micromatrices o micromatrices de ácido nucleico incluyen todos los dispositivos denominados en Schena (ed.), DNA Microarrays: A Practical Approach (Practical Approach Series) ("Micromatrices de ADN: un enfoque práctico (Serie de enfoques prácticos)"), Oxford University Press (1999); Nature Genet. 21(1) (suplemento): 1-60 (1999); Schena (ed.), Microarray Biochip: Tools and Technology ("Biochip con micromatrices: herramientas y tecnología"), Eaton Publishing Company/BioTechniques Books Division (2000). Estas micromatrices incluyen grupos de ácidos nucleicos plurales unidos a un sustrato en las que el grupo de ácidos nucleicos está dispuesto en un grupo de lechos, en lugar de sobre un sustrato plano unitario, tal como se describe, entre otros sitios, en Brenner y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000; 97(4): 1665-1670.

Los términos "alrededor" y "aproximadamente" significarán, en general, un grado aceptable de error para la cantidad medida dada la naturaleza o la precisión de las mediciones. Los grados de error habituales de ejemplo se encuentran dentro del 20 por ciento (%), de manera preferente dentro del 10%, y de manera más preferente dentro del 5% de un valor determinado o un intervalo de valores. De manera alternativa, y particularmente en los sistemas biológicos, los términos "alrededor" y "aproximadamente" pueden significar valores que se encuentran dentro de un orden de magnitud, de manera preferente dentro de 5 veces y de manera más preferente dentro de 2 veces un valor determinado. Las cantidades numéricas indicadas en el presente documento son aproximadas a menos que se indique lo contrario, lo que significa que el término "alrededor" o "aproximadamente" se puede deducir cuando no se indica expresamente.

Descripción de los aspectos preferentes

En un aspecto, la descripción proporciona un procedimiento de diagnóstico de la AD mediante la detección de diferencias en los niveles de expresión de genes en células de un sujeto que se sospecha que está desarrollando o que tiene la AD, en respuesta a la estimulación con un activador de PKC ("células de prueba"), en comparación con la expresión de los mismos genes en células normales de control ("células de control") después de la estimulación con un activador de PKC. En un aspecto específico, las células de control derivan de sujetos de control con la misma edad y se estimulan con el mismo activador de PKC que las células de prueba.

En otro aspecto de la descripción, el aumento de la expresión génica en células de prueba estimuladas por PKC en comparación con células de control estimuladas por PKC (regulación por incremento) indica la presencia de la AD. En otro aspecto, la disminución de la expresión génica en células de prueba estimuladas en comparación con las células control estimuladas por PKC (regulación por disminución) indica la presencia de la AD. En un tercer aspecto, la ausencia de la expresión génica incrementada en células de prueba estimuladas en comparación con células de control estimuladas por PKC indica la presencia de la AD. En un cuarto aspecto, la ausencia de expresión disminuida en células de prueba estimuladas en comparación con células de control estimuladas por PKC indica la presencia de AD.

En otro aspecto específico, la presente descripción da a conocer un procedimiento para el diagnóstico de AD en etapa temprana mediante la detección de los cambios diferenciales en la expresión génica. En aspectos específicos, el procedimiento de la descripción puede utilizarse para distinguir la patología o demencia de Alzheimer de la asociada con otras formas de demencia, tales como demencias degenerativas frontotemporales (por ejemplo, enfermedad de Pick, degeneraciones ganglionares corticobasales y la demencia frontotemporal), enfermedad de Huntington, enfermedad de Creutzfeldt Jakob, enfermedad de Parkinson, enfermedad cerebrovascular, traumatismo craneal y abuso de sustancias.

En un aspecto adicional, la descripción da a conocer un procedimiento para evaluar la progresión de la enfermedad mediante la aplicación de los procedimientos a dos o más muestras del mismo paciente tomadas en ocasiones separadas. Este aspecto también se puede utilizar para evaluar el efecto de cualquier tratamiento de AD administrado después de tomar la primera muestra, pero antes de tomar la muestra de envío. Entre los tratamientos contra la AD de ejemplo que pueden evaluarse se incluyen Namenda® (memantina), Aricept® (donapazil) y Razadyne® (galantamina), y Exelon® (rivastigmina).

La presente descripción da a conocer además un procedimiento de cribado de sustancias terapéuticas para el tratamiento o prevención de la AD mediante la evaluación de los efectos de un agente de prueba sobre la expresión diferencial de genes según los procedimientos descritos en el presente documento.

En otro aspecto, la presente descripción da a conocer kits para llevar a cabo el procedimiento de diagnóstico de la presente descripción.

La tabla 1 proporciona el número de acceso del banco de genes ("GenBank") para los genes identificados por estar regulados por disminución en las células de AD en comparación con las células de control. La tabla 2 proporciona el número de acceso del banco de genes para los genes identificados por estar regulados por incremento en las células de AD en comparación con las células de control. La tabla 3 proporciona los genes específicos y su relación o relaciones, y funciones biológicas, moleculares y celulares.

En aspectos específicos, el procedimiento de diagnóstico de la presente descripción comprende detectar la expresión diferencial en la muestra de control y la muestra de prueba, como mínimo, de dos genes enumerados en la tabla 1 o la tabla 2 en el ejemplo 1 a continuación. En otro aspecto específico, el procedimiento de diagnóstico de la presente descripción comprende detectar la expresión diferencial en la muestra de control y la muestra de prueba, como mínimo, de cinco genes enumerados en la tabla 1 o la tabla 2. En un aspecto específico adicional, el procedimiento de diagnóstico de la presente descripción comprende detectar la expresión diferencial en la muestra de control y la muestra de prueba, como mínimo, de diez genes enumerados en la tabla 1 o la tabla 2. En aún otro aspecto específico, el procedimiento de diagnóstico de la presente descripción comprende detectar la expresión diferencial en la muestra de control y la muestra de prueba, como mínimo, de quince genes enumerados en la tabla 1 o la tabla 2. Los genes específicos y su relación o relaciones, funciones biológicas, moleculares y celulares se describen en la tabla 3.

Muestras Biológicas

La presente descripción da a conocer procedimientos para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer utilizando células de sujetos sospechosos de estar en riesgo de desarrollar la AD o que se sospecha que tienen la AD. En los procedimientos de la descripción, entre las células que se toman del sujeto se incluyen cualquier célula viable. En un aspecto, las células son de tejidos periféricos, es decir, el tejido no neural. En otros aspectos específicos, el tejido es piel, sangre, mucosa o líquido cefalorraquídeo.

En otro aspecto específico, las células son fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales, o células hematopoyéticas, incluyendo linfocitos. En un aspecto específico adicional, las células son células epiteliales de la piel, células de fibroblastos de la piel, células sanguíneas o células de la mucosa bucal. Las células pueden ser frescas, cultivadas o congeladas antes del análisis. En un aspecto específico, se puede utilizar una biopsia de piel con sacabocado para obtener fibroblastos de piel de un sujeto. Estos fibroblastos se analizan directamente o se introducen en condiciones de cultivo celular. En otro aspecto específico, las células se aíslan del extirpado utilizando microdissección de captura por láser para obtener una población homogénea de células del mismo tipo.

Activadores de PKC

El procedimiento de la presente invención contempla la utilización de cualquier compuesto conocido por tener la capacidad de activar la PKC. Los activadores de PKC son conocidos en la técnica e incluyen bradiquinina, ésteres de forbol, tales como 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA), 12,13-dibutirato de forbol (PDBu), 12,13-didecanoato de forbol (PDD), bombesina, colecistoquinina, trombina, prostaglandina F₂ α y vasopresina. Entre otros activadores de PKC se incluyen diacilglicerolos naturales y no naturales (DAG), incluyendo diacilglicerolos con varios ácidos grasos en la configuración 1,2-sn que están activos. En un aspecto específico, el DAG contiene un ácido graso insaturado. En un aspecto, el activador de PKC es una lactona macrocíclica, incluyendo, pero sin limitarse a las mismas, a las de la clase del compuesto briostatina y la clase del compuesto neristatina. En otra realización, el activador de PKC es una benzolactama. En un aspecto adicional, el activador de PKC es una pirrolidinona. En un aspecto específico, la lactona macrocíclica es briostatina. En una realización más específica, la briostatina es briostatina-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14, -15, -16, -17, o -18.

La presente descripción también contempla el diagnóstico de la AD mediante la detección de cambios en la expresión génica en células puestas en contacto con activadores de PKC selectivos para una isoforma o isoformas específicas de PKC. Por ejemplo, la benzolactama activa las PKC α , β y γ . La briostatina-1 activa de manera selectiva PKC α . La bradiquinina activa PKC α , PKC δ , y PKC ξ . Se ha observado que las PKC ϵ y PKC η se activan tras la administración de donantes de óxido nítrico, tales como dietilentriamina/NO (DETA/NO) y S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) dietilentriamina/NO (DETA/NO) y S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) (Balafanova y otros, J. Biol. Chem. 2002; 277(17): 15021-15027). Más recientemente, se ha observado que los derivados de ácidos grasos poliinsaturados activan de manera selectiva PKC ϵ .

Las concentraciones de ejemplo de activadores de PKC que se pueden utilizar para estimular células, según los procedimientos de la presente descripción, están en un intervalo de aproximadamente 0,01 nM a 100 μ M, de manera preferente de 0,5 nM a 10 μ M, de manera más preferente de 1 nM a 1 μ M, y de la manera más preferente de 10 nM a 500 nM.

Perfiles de expresión génica

Los procedimientos de evaluación de los cambios en la expresión génica son bien conocidos en la técnica. La presente descripción contempla procedimientos de bajo rendimiento, tales como transferencia Northern, hibridación *in situ*, y la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa (RVQ-PCR), y procedimientos de alto rendimiento, tales como micromatrices y SAGE para detectar la expresión génica diferencial. De manera preferente, la detección se realiza utilizando un equipo informático automático en una configuración de alto rendimiento, tal como la tecnología de micromatrices. Dicho equipo de alto rendimiento está disponible comercialmente, y las técnicas son bien conocidas en el sector.

En un aspecto específico, el procedimiento de la presente descripción da a conocer la detección del transcrito del gen, tal como ARNm, incluyendo microARN, ADN o ARNc. El transcrito puede ser de regiones codificantes y no codificantes del gen. El transcrito se puede detectar *in situ* en la célula o en forma purificada extraída de la célula. En una realización específica, el ácido nucleico se aísla y se purifica a partir de la célula y, a continuación, se utiliza en la prueba de expresión génica.

En otro aspecto, el procedimiento de la presente descripción da a conocer la detección del producto de proteína, o parte del mismo, expresado a partir de un transcrito del gen. Las pruebas basadas en proteínas también son bien conocidas en la técnica e incluyen procedimientos de bajo rendimiento, tales como transferencia Western y ELISA, y micromatrices de proteínas de alto rendimiento.

En un aspecto adicional, el procedimiento de la presente descripción comprende además detectar la actividad o estado de activación del producto de proteína detectado, tal como la fosforilación de una proteína determinada.

En un aspecto específico, los transcritos del gen (por ejemplo, ARNc) de dos células diferentes se hibridan a los sitios de unión de transcritos de gen conocidos en una micromatriz, una que es la célula de prueba que ha sido estimulada con activador de PKC y otra célula de control, de manera preferente del mismo tipo de célula que ha sido estimulada con un activador de PKC, de manera preferente el mismo activador de PKC. El ácido nucleico derivado de cada uno de los dos tipos de células se marca de manera diferente, de manera que se pueden distinguir. La

utilización de micromatrices para evaluar los transcritos expresados de manera diferencial es bien conocida. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 6.973.388. Esta técnica implica habitualmente preparar o adquirir micromatrices que contienen transcritos de ADNc conocidas, extraer y marcar el ARN de las células de prueba, hibridar el ARN de prueba a la matriz, detectar y visualizar la señal, realizar un análisis estadístico de los resultados, y, de manera opcional, validar los resultados de las micromatrices utilizando técnicas de bajo rendimiento.

Las micromatrices de ADNc prefabricadas están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Affymetrix® (Santa Clara, CA), Agilent Technologies® (Santa Clara, CA) y AlphaGene® (Woburn, MA). Entre éstas se incluyen matrices de genoma completo y subconjuntos dirigidos de genes conocidos.

En otro aspecto específico, se detecta la expresión diferencial de genes utilizando el análisis en serie de la expresión génica (SAGE). El SAGE determina cuantitativamente la cantidad de veces que se expresa una pequeña parte de un transcrito de ARNm específico (una etiqueta). La salida del SAGE es una lista de etiquetas de secuencia corta y se observa el número de veces. La principal diferencia entre las técnicas de hibridación de micromatrices y el análisis en serie de la expresión génica (SAGE) es que éste último no requiere un conocimiento previo de las secuencias a analiza; el SAGE es una técnica de perfiles de expresión génica basada en la secuenciación.

En un aspecto, las células de prueba demostrarán una diferencia observable en el nivel de expresión de uno o más genes en comparación con el nivel de expresión del mismo gen o genes en las células control. En un aspecto específico, la expresión diferencial es cuantitativa. En un aspecto adicional, el nivel de expresión génica detectado en las células de prueba está aproximadamente 1 vez, 2 veces, 5 veces, 10 veces y 100 veces regulado por incremento o regulado por disminución en comparación con las células de control.

Procedimientos de cribado de sustancias terapéuticas

En todavía un aspecto adicional, la presente descripción se refiere a procedimientos de cribado de sustancias terapéuticas para el tratamiento o prevención de la AD utilizando las pruebas de diagnóstico descritas en el presente documento. Según este aspecto, se identificarían los compuestos que revierten o mejoran las diferencias observadas en la expresión génica descritas en el presente documento (es decir, retrocediendo o avanzando hacia niveles hallados en células de control activadas por PKC) y se seleccionarían como una sustancia potencialmente útil para el tratamiento o prevención de la AD.

En un aspecto, el procedimiento de cribado comprende las etapas de poner en contacto células de un sujeto que ha sido diagnosticado con la AD con un compuesto de prueba durante un período de tiempo, seguido por poner en contacto las células con un agente que es un activador de PKC, y determinar si el compuesto de prueba altera la expresión diferencial de los genes identificados según los procedimientos de la presente invención hacia los niveles observados en las células de control de sujetos normales.

En un aspecto específico, las células puestas en contacto con el compuesto de prueba derivan de un sujeto diagnosticado con la AD según los procedimientos de la presente invención.

Kits

La presente descripción también se refiere a kits que comprenden productos útiles para llevar a cabo los procedimientos de diagnóstico de la descripción. Los kits también pueden incluir instrumentos, soluciones tampón y recipientes de almacenamiento necesarios para realizar una o más biopsias, tales como biopsias de piel con sacabocado. Los kits pueden incluir matrices de oligonucleótidos de alta densidad, reactivos para utilizar con las matrices, instrumentos para la detección de señales y procesamiento de matrices, bases de datos de expresión génica y software de análisis y gestión de base de datos. Los kits también pueden contener instrucciones relativas a la identificación de genes expresados diferencialmente utilizados para el diagnóstico de la AD.

Tal como se ha indicado anteriormente, los kits pueden contener una única prueba de diagnóstico o cualquier combinación de las pruebas descritas en el presente documento. Todas las diferencias descritas en el presente documento entre las células de control y de la AD forman la base para las pruebas clínicas y los kits de diagnóstico para el diagnóstico de la enfermedad AD, así como los procedimientos de cribado de compuestos para el tratamiento o prevención de la AD descritos en el presente documento.

Combinación de procedimientos de diagnóstico

Se contempla que los procedimientos de diagnóstico de la presente descripción se pueden utilizar en combinación con cualquier otro procedimiento de diagnóstico. Entre los procedimientos de ejemplo se incluyen la evaluación física y neurológica; la detección de biomarcadores; y obtención de imágenes cerebrales estructurales (MRI, CT) y funcionales (PET; FDG-PET).

Como ejemplo, los procedimientos de la presente descripción se pueden utilizar en combinación con la evaluación de mutaciones en los genes que se sabe que están implicados en la AD familiar. Los procedimientos adicionales de

diagnóstico de la AD se dan a conocer en las patentes de Estados Unidos 6.080.582 y 6.300.085 de Alkon y otros, cuyos procedimientos detectan la ausencia de canales iónicos de potasio en las células de un paciente con AD, las diferencias en la concentración de ion de calcio intracelular en células de AD y sin AD en respuesta a bloqueadores de los canales de potasio específicos para el canal iónico de potasio que está ausente en las células de un paciente con AD, y las diferencias entre células de AD y sin AD en respuesta a activadores de la liberación de calcio intracelular, tales como activadores de inositol-1,4,5-trisfosfato (IP3). Los procedimientos adicionales de diagnóstico se dan a conocer en la publicación de solicitud número WO2007/047029 de Alkon y otros dirigida al diagnóstico de la AD en un sujeto mediante la detección de alteraciones en la proporción de proteínas MAP quinasas fosforiladas específicas (Erk1/Erk 2) en células después de la estimulación con un activador de PKC. Véase también, Zhao y otros, Neurobiol Dis. octubre de 2002; 11(1): 166-83.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Determinación de genes expresados diferencialmente en células de AD activadas por PKC

Este ejemplo describe la identificación de genes expresados diferencialmente en células de AD según el procedimiento de la presente invención.

Materiales y procedimientos

La bradiquinina (BK; peso molecular, 1.060,2) se adquirió de Calbiochem (San Diego, CA).

Cultivo celular de fibroblastos de piel. Se utilizaron sistemas de cultivo celular de fibroblastos de piel humana para estos estudios. Se cultivaron células fibroblastos de piel agrupadas y diagnosticadas con AD y control de la misma edad del Instituto Coriell de Investigación Médica (complementadas con suero al 10% y penicilina/estreptomicina) a 37°C con CO₂ al 5% hasta una fase de confluencia del 90-100% en matraces de cultivo celular de 25 ml. Las células se "privaron de alimento" en medio libre de suero (DMEM) durante 24 horas. Se preparó una solución de BK 10 nM (en DMSO) en DMEM con suero al 10%. Se añadieron siete mililitros de la solución de BK 10 nM a los matraces de cultivo y se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Para los controles, se añadió la misma cantidad de DMSO en DMEM con suero al 10%. Se añadieron siete mililitros de este medio con DMSO (<0,01%) a los matraces de cultivo y se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Después de lavar cuatro veces con 1 X PBS frío (4°C), los matraces se mantuvieron en una mezcla de hielo seco/etanol durante 15 minutos. A continuación, se extrajeron los matraces de la mezcla de hielo seco/etanol, y se trataron las células con tripsina-EDTA (Invitrogen), se centrifugaron a 400 x g durante 5 minutos, y los sedimentos celulares se lavaron dos veces en PBS. A continuación, los sedimentos celulares se congelaron rápidamente en etanol-hielo de CO₂ y se transfirieron a -70°C.

A continuación, se aisló el ARN total de los sedimentos celulares de fibroblastos cultivados utilizando un minikit RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania) según el protocolo del fabricante, habitualmente con un rendimiento de 5-10 µg de ARN por 10⁶ células. Se extrajo el ácido nucleico de las células según los procedimientos estándar.

Análisis de micromatrices. Para el sondeo de micromatrices, se realizaron la transcripción inversa, la síntesis de la segunda cadena, y la generación de sondas según el GeneChip Expression Analysis Technical Manual ("Manual técnico de análisis de la expresión de chips de genes") (Affymetrix, Santa Clara, CA). La sonda generada se sometió a hibridación de chips de ADN de oligonucleótidos, Human Genome ("Genoma humano") U133A (Affymetrix). Las matrices se rastrearon con un escáner GeneArray (Hewlett-Packard). Image Analysis and Data Quality Control ("Análisis de imágenes y control de calidad de datos"). Los archivos de imagen de salida del escáner se normalizaron y se filtraron utilizando el software SUITE MICROARRAYS 5.0 (Affymetrix). La normalización se realizó mediante el escalado global, con las matrices escaladas hasta un valor de intensidad de señal arbitrario de 100. La métrica de detección (llamadas de presencia o ausencia) y la decisión de expresión génica significativa para un gen determinado (conjunto de sondas) se determinaron mediante la utilización de parámetros por defecto en el software SUITE MICROARRAYS 5.0.

La tabla 1 muestra los genes regulados por disminución en líneas celulares de AD después de la estimulación con bradiquinina, pero activados o invariables después de la estimulación con bradiquinina en controles de la misma edad. La tabla 2 muestra los genes regulados por incremento en líneas celulares de AD después de la estimulación con bradiquinina, pero regulados por disminución o invariables después de la estimulación con bradiquinina en controles de la misma edad. La tabla 3 da a conocer los genes específicos y su relación o relaciones, y las funciones biológicas, moleculares y celulares.

Tabla 1: Genes regulados por disminución en la AD

Gen que codifica	No. de acceso del banco de genes	% de cambio
ARNm de proteína adaptadora de homo sapiens con homología de pleckstrina y 2 dominios con homología de src (APS)	NM_020979.1/DEF	99
ARNm de proteína KIAA1080 de homo sapiens; asociada a Golgi, que contiene gamma-adaptina de oído, proteína 2 de unión a ARF, clon MGC:1002	BC000284.1/DEF	64
ARNm de polipéptido beta (SCN1B), tipo I, de canales de sodio regulados por voltaje de homo sapiens	NM_001037.1/DEF	51
ARNm de fosfoserina de tipo fosfatasa (PSPHL) de homo sapiens	NM_003832.1/DEF	77
ARNm de proteína hipotética FLJ12455 (FLJ12455) de homo sapiens	NM_022078.1/DEF	73
EST Hs.50283 débilmente similares a DUS8_HUMAN DUAL SPECIFICITY PROTEIN PHOSPHATASE 8 de H. sapiens	AI492892	74
EST Hs.112451	T86629	76
Secuencia de ADN humano Hs.72325 del clon RP1-187J11 en el cromosoma 6q11.1-22.33. Contiene el gen para una proteína nueva similar a proteínas predichas de S. pombe y S. cerevisiae, el gen para una proteína nueva similar a inhibidores de proteína quinasa C, el extremo 3 del gen	AW418666	79
Homólogo de RP42 Hs.104613	AW468880	69
ARNm de proteína quinasa de homo sapiens, activada por AMP, subunidad no catalítica beta 2 (PRKAB2)	NM_005399.1/DEF	72
EST Hs.294141 débilmente similares al producto empalmado de forma alternativa utilizando el exón 13A de H. sapiens	BF433071	75
ARNm de homo sapiens similar a producto génico CG9578 (MGC3794)	NM_152902.1	61
Proteína 1 que activa GTPasa que contiene el motivo IQ Hs.1742	AI679073	88
ARNm de homeo caja 1 de mesodermo emparejado (PMX1) de homo sapiens, variante de transcrito pmx-1a	NM_006902.2/DEF	66
Proteína DKFZP566C134 Hs.20237	BF000166	85
ARNm de ATPasa 4 de membrana plasmática que transporta Ca++ (ATP2B4) de homo sapiens	NM_001684.1/DEF	87
EST Hs.127478 débilmente similares a la proteína hipotética T32252 T15B7.2	AI813654	79
EST Hs.50283 débilmente similares a DUS8_HUMAN DUAL SPECIFICITY PROTEIN PHOSPHATASE 8 de H. sapiens	AI492892	74

Tabla 2: Genes regulados por incremento en la AD

Gen que codifica	No. de acceso del banco de genes	% de cambio
Proteína KIAA1096 Hs.69559	AW238632	46
EST Hs.283732	AW611729	97
Proteína de respuesta 68 específica de polisacárido Hs.103189	AV740879	154
ADNc:FLJ21288 fis de homo sapiens Hs.6019, clon COL01927	AA639752	475
Clon de ADNc de inserto de longitud completa de homo sapiens	AF088033	74
EST Hs.9977	AW182938	155
Producto génico KIAA0447 Hs.214646	AL031282	150
Proteína KIAA0244 Hs.78893	BF430956	61
EST Hs.42699	AW956580	56
ARNm de homo sapiens Hs.3640	AI394529	60
ARNm de homo sapiens Hs.30957; ADNc DKFZp434E0626	AL137364.1	86
ARNm de forkhead caja F2 (FOXF2) de homo sapiens	NM_001452.1	97
Proteína KIAA1483	BF111616	84
EST Hs.28959	AI457436	80
ARNm de región crítica Cri-du-chat de clon FBD3 de homo sapiens	AF056433	52
ARNm de autoantígeno nuclear (GS2NA) de homo sapiens	NM_014574.1	71
ARNm de quinasa relacionada con Ste-20 (SPAK) de homo sapiens	NM_013233.1	46
IAP baculoviral Hs.250646	AI017106	285
sel-1 del tipo (supresor de lin-12, C. elegans) Hs.181300	AI927770	75
proteína 7 de unión a RAN Hs.5151	BG291787	74
EST miembro 3, subfamilia a, reguladora de cromatina dependiente de actina, asociada a matriz, relacionada con SW1SNF	AI760760	56
ARNm de factor 4 gamma 3 de inicio de la traducción eucariota (EIF4G3) de homo sapiens	NM_003760.2/DEF	68
ARNm de proteína G de condensación a cromosoma (HCAP-G) de homo sapiens	NM_022346.1/DEF	174
EST Hs.293690	AI816281	62
ARNm de proteína de tipo RBP1 (BCAA) de homo sapiens	NM_016374.2/DEF	68
EST Hs.265644	AW963328	74
EST Hs.8895	AA147933	63
ARNm similar a ADNc RIKEN del gen 1700073K01, clon MGC:12458	BC005357.1	63
Proteína hipotética PRO2975 /FL=gb:AF119911.1 Hs.144477	BG534245	55
ARNm para TGF-beta1IR alfa, cds completa, de homo sapiens	D50683.1/DEF	55
ADNc FLJ33255 fis, clon ASTRO2005553, de homo sapiens	BU689502	105
ARNm de proteasa 8 específica de ubiquitina (USP8) de homo sapiens	NM_005154.1/DEF	79
Proteína hipotética FLJ13576 (TFDPI) Hs.79353	R60866	66
Proteína hipotética FLJ20333 Hs.79828	AI823905	81
ARNm de proteína hipotética FLJ10461 (FLJ10461) de homo sapiens	NM_018098.1/DEF	45

Tabla 3: Subgrupos específicos de genes y sus funciones biológicas, moleculares y celulares

Título del gen	ID del banco de genes/símbolo del gen	Procesos biológicos	Funciones moleculares	Componentes celulares	Mecanismo
Factor de crecimiento transformante, receptor beta II (70/80 kDa)	D50683.1/DEF TGFB2	fosforilación de aminoácidos de proteínas	unión a nucleótidos	membrana	Mecanismo de señalización de TGF_Beta
		mecanismo de señalización de la proteína serina/treonina quinasa	unión a ion magnesio	integrado en membrana	
		receptora transmembrana			
		regulación positiva de proliferación celular	actividad de proteína quinasa	integrado en membrana	
			actividad de proteína serina/treonina quinasa	complejo receptor	
			actividad de proteína serina/treonina quinasa		
			receptora transmembrana		
			actividad de proteína serina/treonina quinasa de señalización receptora		
			actividad de receptor		
			actividad de receptor beta de factor de crecimiento transformante		
			actividad de receptor beta de factor de crecimiento transformante, tipo II		
			unión a proteínas		
			unión a ATP		
			actividad quinasa		
			actividad transferasa		
			unión a ion manganeso		
			unión a iones metálicos		

Tabla 3 (continuación)

Título del gen	ID del banco de genes/símbolo del gen	Procesos biológicos	Funciones moleculares	Componentes celulares	Mecanismo
ATPasa 4 de membrana plasmática que transporta Ca^{++}	NM_001684.1/DEF ATP2B4	transporte	unión a nucleótidos	membrana plasmática	
		transporte	unión a ion magnesio	membrana plasmática	
		transporte de iones	actividad catalítica	membrana plasmática	
		transporte de cationes	actividad de ATPasa que transporta calcio	integrado en la membrana plasmática	
		transporte de ion calcio	actividad de ATPasa que transporta calcio	membrana	
		proceso metabólico	unión a ion calcio	integrado en la membrana plasmática	
			unión a proteína		
			unión a calmodulina		
			unión a ATP		
			ion calcio		
			actividad transportadora transmembrana		
			actividad de ATPasa, acoplada a movimiento transmembrana de iones, mecanismo fosforilativo		
			actividad de hidrolasa		
			actividad de hidrolasa, que actúa sobre anhídridos ácidos, que cataliza el movimiento transmembrana de sustancias		
			unión a iones metálicos		

Tabla 3 (continuación)

Título del gen	ID del banco de genes/símbolo del gen	Procesos biológicos	Funciones moleculares	Componentes celulares	Mecanismo
fosfofoserina fosfatasa	NM_003832.1/DEF PSPH	proceso metabólico de L-serina	unión a ion magnesio		
		proceso biosintético de L-serina	actividad catalítica		
		proceso metabólico	actividad de fosfofoserina fosfatasa		
		proliferación celular	actividad de fosfofoserina fosfatasa		
		proceso biosintético de aminoácidos	unión a proteínas		
			actividad de hidrolasa		
			actividad de hidrolasa de monoéster fosfórico		
factor 4 gamma 3 de inicio de la traducción eucariota	NM_003760.2/DEF EIF4G3	traducción	unión a bloqueo de ARN	complejo del factor 4F de inicio de la traducción eucariota	Factores de traducción
		regulación de la traducción	unión a ARN		
		regulación del inicio de la traducción	actividad de factor de inicio de la traducción		
		regulación del inicio de la traducción	unión		
		proceso metabólico de ARN	unión a proteínas		
			unión a proteínas		
			actividad de factor de traducción, unión a ácidos nucleicos		
oncogén de la secuencia 2 transformante de células epiteliales	NM_018098.1/DEF ECT2	cascada de señalización intracelular	actividad de transductor de señales	intracelular	
		regulación de transducción de señal de proteína Rho	actividad de factor de intercambio de guanil-nucleótido		
		positivo	Rho guanil-nucleótido		

Tabla 3 (continuación)

Título del gen	ID del banco de genes/símbolo del gen	Procesos biológicos	Funciones moleculares	Componentes celulares	Mecanismo
		regulación de la cascada I-kappaB quinasa/NF-kappaB	actividad de factor de intercambio		
			unión a proteínas		
dominio de BAT2 que contiene 1	AW238632 BAT2D1				
factor de transcripción de tipo helicasa	A1760760 EST HLTF	transcripción regulación de la transcripción, dependiente de ADN	unión a nucleótidos unión a ácido nucleico	núcleo núcleo	
		regulación de la transcripción del promotor de ARN polimerasa II modificación de cromatina	unión a ADN		
			unión a ADN		
			actividad de factor de transcripción de ARN polimerasa II		
			actividad de helicasa		
			unión a proteínas		
			unión a ATP		
			unión a ion zinc		
			actividad de activador de transcripción		
			actividad de hidrolasa		
			actividad de ATPasa		
			unión a iones metálicos		
marco de lectura abierto 43 del cromosoma 14	AV740879 C14orf43	transcripción regulación de la transcripción, dependiente de ADN	unión a ADN	núcleo	

Tabla 3 (continuación)

Título del gen	ID del banco de genes/símbolo del gen	Procesos biológicos	Funciones moleculares	Componentes celulares		Mecanismo
				membrana	integrado en membrana	
similar a la familia 35 portadora de soluto, miembro E2	AL031282 RP11-345					
homeobox 1 relacionada emparejada	NM_006902.2/DEF PRRX1	regulación de la transcripción, dependiente de ADN desarrollo de organismos multicelulares regulación de la transcripción	unión a ADN actividad de factor de transcripción actividad de coactivador de transcripción unión a ADN específica de secuencia	núcleo		
dominio 4B interactivo rico en AT (similar a RBP1)	NM_016374.2/DEF ARID4B	ensamblaje o desensamblaje de cromatina transcripción regulación de la transcripción, dependiente de ADN	unión a ácidos nucleicos unión a ADN unión a cromatina	cromatina intracelular citoplasma nuclear		

Tabla 3 (continuación)

Título del gen	ID del banco de genes/símbolo del gen	Procesos biológicos	Funciones moleculares	Componentes celulares	Mecanismo
factor de transcripción Dp-1	TFDP1 R60866	fase S de ciclo celular mitótico	unión a ADN	núcleo	Ciclo celular KEGG
		transcripción	actividad de factor de transcripción	complejo de factor de transcripción	Ciclo celular G1 a S Reactome
		regulación de la transcripción, dependiente de ADN	actividad de factor de transcripción		
		regulación de la transcripción del promotor de ARN polimerasa II	actividad de coactivador de transcripción		
		apoptosis	unión a proteínas		
		ciclo celular	actividad de activador de la transcripción		
		proliferación celular			
		desarrollo de la epidermis			
		regulación positiva de la transcripción, dependiente de ADN			
		ciclo celular			
estriatina, proteína 3 de unión a calmodulina	NM_014574.1 STRN3	ciclo celular	unión a proteínas	fracción de membrana	
			unión a calmodulina	núcleo	
			unión a calmodulina	citoplasma	
				citósol	
dominio 2 de unión a calcio de mano EF	BC005337.1 EFCAB2		unión a ion calcio	membrana	

Tabla 3 (continuación)

Título del gen	ID del banco de genes/símbolo del gen	Procesos biológicos	Funciones moleculares	Componentes celulares		Mecanismo
peptidasa 8 específica de ubiquitina	NM_005154.1/DEF USP8	cambio tipológico de ADN	unión a ADN de doble cadena			
		proceso catabólico de proteína dependiente de ubiquitina	actividad de endopeptidasa de tipo cisteína			
		ciclo de ubiquitina	actividad de ubiquitina tiolsterasa			
		proliferación celular	actividad de proteasa específica de ubiquitina			
			unión a proteínas			
			unión a proteínas			
			actividad de peptidasa			
			actividad de peptidasa de tipo cisteína			
gamma adaptiva asociada a golgi	BC00284.1/DEF	ensamblaje de complejo de proteínas	unión a proteínas	intracelular		
		transporte	unión a proteínas	endosoma		
proteína 2 de unión a ARF que contiene ear	GGA2	transporte de proteínas intracelulares	actividad transportadora de proteínas	aparato de Golgi		
		transporte de proteínas intracelulares	unión a factor de ribosilación de ADP	red trans-Golgi		
		transporte de proteínas		membrana de endosoma		
		transporte mediado por vesícula		membrana		
				recubrimiento de membrana		
				complejo adaptador de clatrina		

Tabla 3 (continuación)

Título del gen	ID del banco de genes/símbolo del gen	Procesos biológicos	Funciones moleculares	Componentes celulares	Mecanismo
canal de sodio, regulado por voltaje, tipo I, beta	NM_001037.1/DEF SCN1B	transporte	actividad de canales de iones	fracción de membrana	
		transporte de iones	actividad de canales de iones regulados por voltaje	membrana	
		transporte de ion sodio	actividad de canales de sodio regulados por voltaje	integrado en membrana	
		transporte de ion sodio	actividad de canales de sodio		
proteína 3 de dedo PHD	BF430956 PHF3	transmisión sináptica	unión a ion sodio		
		transcripción	unión a proteínas		
		desarrollo de organismos multicelulares	unión a ion zinc		
proteína 1 que activa GTPasa que contiene el motivo IQ	AI679073 IQGAP 1		unión a iones metálicos		Mecanismo de señalización de G13
		transducción de señales	actividad inhibidora de GTPasa	intracelular	
		transducción de señales	actividad activadora de GTPasa	citoplasma	
		transducción de señales mediada por GTPasa pequeña	actividad activadora de GTPasa	filamento de actina	
		regulación de transducción de señales mediada por GTPasa pequeña	actividad activadora de GTPasa Ras	membrana plasmática	
			unión a proteínas	membrana	
			unión a proteínas		
			unión a calmodulina		
			unión a calmodulina		

Tabla 3 (continuación)

Título del gen	ID del banco de genes/símbolo del gen	Procesos biológicos	Funciones moleculares	Componentes celulares	Mecanismo
serina treonina quinasa 39 (homólogo a STE20/SPS1, levadura)	NM_013233.1 STK39	fosforilación de aminoácidos de proteínas	unión a nucleótidos	fracción de membrana	
		fosforilación de aminoácidos de proteínas	actividad de proteína quinasa	núcleo	
		respuesta a tensión	actividad de proteína serina/treonina quinasa	núcleo	
			proteína serina/treonina quinasa de señalización receptora	citoplasma	
			actividad		
			actividad de proteína tirosina quinasa	citoplasma	
			unión a proteínas	membrana plasmática basolateral	
			unión a ATP	membrana plasmática apical	
			unión a ATP		
			actividad de quinasa		
DCN1, defectuosa en nedilación de culina 1, dominio que contiene 1 (S. cerevisiae) proteína quinasa, activada por AMP, subunidad beta 2 no catalítica	AW468880 DCUN1D1 NM_005399.1/DEF PRKAB2		actividad de transferasa		Síntesis de ácidos grasos
		proceso biosintético de ácidos grasos	unión a proteínas	complejo de proteínas quinasa dependiente de AMPc	
		transducción de señales	actividad de quinasa	complejo de proteínas quinasa activadas por AMP	
		proceso biosintético de lípidos	unión a proteína quinasa		
			actividad catalítica		
proteína 3 de unión a nucleótidos de la triada de histidina	AW418666 HINT3				

Tabla 3 (continuación)

Título del gen	ID del banco de genes/símbolo del gen	Procesos biológicos	Funciones moleculares	Componentes celulares	Mecanismo
TIP41, del tipo de regulador del mecanismo de señalización de TOUR (S. cerevisiae)	NM_152902.1 TIPRL		unión a proteínas		
proteína que interacciona con serina/treonina/tirosina	A1492892 LOC730432	desfosforilación de aminoácidos de proteínas	actividad de fosfoproteína fosfatasa		
similar a la proteína que interacciona con serina/treonina/tirosina	A1492892 STYX	desfosforilación	actividad de proteína tirosina/serina/treonina fosfatasa		
			actividad de hidrolasa		
			actividad de hidrolasa de monoéster fosfórico		
repetición IAP baculoviral que contiene 6 (apollon)	A1017106 BIRC6	ciclo de ubiquitina	actividad ligasa ubiquitina-proteína	intracelular	
		apoptosis	actividad inhibidora de endopeptidasa	fracción de membrana	
		antiapoptosis	actividad inhibidora de cisteína proteasa		
		antiapoptosis	actividad de ligasa		
		regulación positiva de proliferación celular	actividad de ligasa de proteínas pequeñas conjugantes		
		modificación de proteína post-traducciona			
		regulación del proceso metabólico de proteínas			
del tipo de proteína tirosina fosfatasa (prolina en lugar de arginina catalítica), miembro b	A1813654 PTPLB		unión a proteínas		

Tabla 3 (continuación)

Título del gen	ID del banco de genes/símbolo del gen	Procesos biológicos	Funciones moleculares	Componentes celulares		Mecanismo
				integrado en membrana plasmática	membrana	
receptor de proteína morfogenética de hueso, tipo II (serina/treonina quinasa)	A1457436 BMPR2	desarrollo esquelético	unión a nucleótidos	integrado en membrana plasmática		
		fosforilación de aminoácidos de proteínas	unión a ion magnesio			
		mecanismo de señalización de proteína serina/treonina quinasa	actividad de proteína quinasa	integrado en membrana plasmática		
		receptora transmembrana				
		mecanismo de señalización de proteína serina/treonina quinasa	actividad de proteína serina/treonina quinasa			
		receptora transmembrana				
		regulación de la proliferación celular	actividad de proteína serina/treonina quinasa receptora transmembrana			
			proteína serina/treonina quinasa de señalización receptora			
			actividad de receptor			
			actividad de receptor beta de factor de crecimiento transformante			
			unión a proteínas			
			unión a proteínas			
			unión a ATP			
			actividad de quinasa			
y dedo de zinc			actividad de transferasa			
			unión a ion manganeso			
		transcripción	unión a iones metálicos unión a ácidos nucleicos	intracelular		

Tabla 3 (continuación)

Título del gen	ID del banco de genes/símbolo del gen	Procesos biológicos	Funciones moleculares	Componentes celulares	Mecanismo
dominio BTB que contiene 2	BF111616 ZBTB2	regulación de la transcripción dependiente de ADN	unión a ADN	núcleo	
			unión a proteínas		
			unión a ion zinc		
KIAA1333	A1823905 KIAA1333		unión a iones metálicos		
		proceso de modificación de proteínas	actividad de ligasa de ubiquitina-proteína	intracelular	
		ciclo de ubiquitina	unión a proteínas	núcleo	
			unión a proteínas	citoplasma	
			unión a ion zinc		
repetición Ketch y dominio BTB (POZ) que contiene 2	BF000166 KBTBD2		actividad de ligasa		
			unión a iones metálicos		
			unión a proteínas		

Tabla 3 (continuación)

Título del gen	ID del banco de genes/símbolo del gen	Procesos biológicos	Funciones moleculares	Componentes celulares	Mecanismo
forkhead caja F2	NM_001452.1 FOXF2	transcripción	unión a ADN	núcleo	
		regulación de la transcripción dependiente de ADN	unión a ADN	núcleo	
		transcripción del promotor de ARN polimerasa II	actividad de factor de transcripción	núcleo	
		organización y biogénesis de la matriz extracelular	actividad de factor de transcripción	complejo de factores de transcripción	
		establecimiento de la polaridad de epitelio embrionario	actividad de factor de transcripción de ARN polimerasa II		
		regulación negativa de la transcripción dependiente de ADN	actividad de coactivador de transcripción		
		regulación positiva de la transcripción dependiente de ADN	actividad de activador de transcripción		
		desarrollo de intestinos embrionarios	unión a ADN específica de secuencia		
			unión a ADN específica de secuencia		
			unión a ácidos nucleicos	intracelular	
Dominio parche G que contiene 3	NM_022078.1/DEF GPATCH3				
Proteína 2 adaptadora SH2B	NM_020979.1/DEF SH2B2	homeostasis de células B B-1	actividad de transductor de señales	fibra de estrés	
		transducción de señales	actividad de proteína adaptadora de proteína tirosina quinasa receptora transmembrana	pliegues ("ruffle")	

Tabla 3 (continuación)

Título del gen	ID del banco de genes/símbolo del gen	Procesos biológicos	Funciones moleculares	Componentes celulares	Mecanismo
		cascada de señalización intracelular	actividad de adaptador SH3/SH2	citoplasma	
		cascada de señalización intracelular	actividad de adaptador SH3/SH2	citoplasma	
		mecanismo de señalización de receptor de insulina	unión a proteínas	filamento de actina	
		mecanismo de señalización mediado por citoquinas y quimioquinas	actividad de adaptador de transducción de señales del mecanismo JAK	membrana plasmática	
		regulación de proceso metabólico		membrana plasmática	
		organización y biogénesis de citoesqueleto de actina		membrana	
		regulación de la respuesta inmunitaria			
		mecanismo de señalización mediado por receptor de antígeno			
		ciclo celular	unión	núcleo	
		mitosis	unión a proteínas	núcleo	
complejo de condensina I no SMC, subunidad G	NM_022346.1/DEF NCAPG	condensación de cromosoma mitótico		citoplasma	
		condensación de cromosoma mitótico			
		condensación de cromosoma mitótico			
		división celular			

Tabla 3 (continuación)

Título del gen	ID del banco de genes/símbolo del gen	Procesos biológicos	Funciones moleculares	Componentes celulares	Mecanismo
supresor sel-1 del tipo lin-12 (C. elegans)	A1927770 SEL-1L	mecanismo de señalización de Notch	unión	retículo endoplasmático membrana del retículo endoplasmático membrana integrado en membrana integrado en membrana citoplasma	
caseína quinasa 1, alfa 1	BG534245 CSNK1A1	fosforilación de aminoácidos de proteínas fosforilación de aminoácidos de proteínas mecanismo de señalización del receptor Wnt	unión a nucleótidos actividad de proteína serina/treonina quinasa actividad de caseína quinasa I unión a ATP actividad de transferasa		
leucemia 2 mieloide/linfoide o de linaje mezclado	AI394529 MLL2	desarrollo embrionario en el útero transcripción regulación de la transcripción dependiente de ADN regulación de la transcripción dependiente de ADN	unión a ADN unión a ADN unión a proteínas unión a proteínas unión a ion zinc unión a iones metálicos	núcleo núcleo complejo de histona metiltransferasas	
proteína hipotética MGC24039	AL137364.1				

Tabla 3 (continuación)

Título del gen	ID del banco de genes/símbolo del gen	Procesos biológicos	Funciones moleculares	Componentes celulares	Mecanismo
ADNc FLJ30652 fis, clon DFNS200001 1	MGC24039 T86629				
ADNc FLJ33255 fis, clon ASTRO200555 3	BU689502				
Importina 7	BG291787 IPO7	importación de proteínas al núcleo, acoplamiento transporte de proteínas intracelulares transducción de señales transporte de proteínas	actividad reguladora de GTPasa pequeña actividad transportadora unión	fracción soluble núcleo poro nuclear	
			unión a proteínas unión a proteínas unión a GTPasa Ran actividad transportadora de proteínas unión a histonas	poro nuclear citoplasma	
ADNc FLJ31066 fis, clon HSYRA20011 53	AA147933				
ARNm de region Cri-du-chat, clon NIBB11	AF056433				
	AF088033	ciclo de ubiquitina	actividad de proteasa específica de ubiquitina	citoplasma	
		ciclo de ubiquitina	actividad de proteasa específica de ubiquitina actividad de peptidasa tipo cisteína actividad de hidrolasa	retículo endoplasmático aparato de Golgi	
ADNc FLJ42233 fis, clon THYMU30004 20	A1816281				

Tabla 3 (continuación)

Título del gen	ID del banco de genes/símbolo del gen	Procesos biológicos	Funciones moleculares	Componentes celulares	Mecanismo
trombospondina 1	AW956580	motilidad celular	actividad de inhibidor de endopeptidasa	región extracelular	Mecanismo de respuesta inflamatoria
	THBS1	adhesión celular	actividad de transductor de señales	región extracelular	Mecanismo de señalización de TGF Beta
		desarrollo de organismos multicelulares	actividad de molécula estructural		
		desarrollo de sistema nervioso	unión a ion calcio		
		coagulación de la sangre	unión a proteínas		
			unión a heparina		
proteína hipotética LOC144871	AA639752 LOC144871				
homólogo de clasificación de proteína vacuolar 41 (S. cerevisiae)	AW963328 VPS41	transporte intracelulares	unión		
		transporte de proteínas	unión a proteínas		
		transporte de proteínas por vesículas	unión a ion zinc		
			unión a iones metálicos		
locus transcrito, moderadamente similar a XP_222679.3 PREDICTED: similar a proteína FRBZ1 (FRBZ1) [Rattus Norvegicus]	BF433071				
EST	AW611729	desconocidos	Moderadamente similar a la subfamilia ALU_HUMAN ALU	desconocidos	
EST	AW 182938	desconocidos		desconocidos	

Lo anterior demuestra que la activación por PKC produce diferentes perfiles genómicos en células de AD, en comparación con células de control, que se pueden utilizar para diagnosticar la AD e individuos en riesgo de desarrollar la AD.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
 i) poner en contacto una población de células de fibroblastos de piel de prueba obtenidas de un sujeto sospechoso de tener la enfermedad de Alzheimer con un agente que es un activador de proteína quinasa C; y
 ii) detectar cambios en la expresión de uno o más genes en las células de fibroblastos de piel de prueba cuando se comparan con la expresión de los mismos uno o más genes en células de células de fibroblastos de piel de control obtenidas de un individuo sin la enfermedad de Alzheimer,

en el que un cambio en la expresión génica en las células de fibroblastos de piel de prueba en comparación con la expresión génica en las células de fibroblastos de piel de control indica que el individuo tiene la enfermedad de Alzheimer,

el cambio en la expresión génica detectada en las células de fibroblastos de piel de prueba en comparación con las células de fibroblastos de piel de control es un incremento en la expresión génica o una disminución en la expresión génica,

dicho uno o más genes que presentan una disminución en la expresión génica se seleccionan del grupo que comprende los genes que tienen los números de acceso del banco de genes NM_020979.1, BC000284.1, NM_001037.1, NM_003832.1, NM_022078.1, AI492892, T86629, AW418666, AW468880, NM_005399.1, BF433071, NM_152902.1, AI679073, NM_006902.2, BF000166, NM_001684.1, AI813654, AI492892, y dicho uno o más genes que presentan un incremento en la expresión génica se seleccionan del grupo que comprende los genes que tienen los números de acceso del banco de genes AW238632, AW611729, AV740879, AA639752, AF088033, AW182938, AL031282, BF430956, AW956580, AI394529, AL137364.1, NM_001452.1, BF111616, AI457436, AF056433, NM_014574.1, NM_013233.1, AI017106, AI927770, BG291787, AI760760, NM_003760.2, NM_022346.1, AI816281, NM_016374.2, AW963328, AA147933, BC005357.1, BG534245, D50683.1, BU689502, NM_005154.1, R60866, AI823905, y NM_018098.1.

2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el activador de proteína quinasa C se selecciona del grupo que comprende bradiquinina, briostatina, bombesina, colecistoquinina, trombina, prostaglandina F₂-alfa o vasopresina.

3. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que dichos uno o más genes presentan un incremento en la expresión génica.

4. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que dichos uno o más genes presentan una disminución en la expresión génica.

5. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que dichos uno o más genes, como mínimo, dos genes, en el que el cambio de expresión, como mínimo, de un gen de dichos, como mínimo, dos genes es un incremento en la expresión génica, y el cambio de expresión, como mínimo, de otro gen de dichos, como mínimo, dos genes es una disminución en la expresión génica.

6. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el cambio en la expresión génica se mide utilizando una micromatriz.

7. Procedimiento, según la reivindicación 6, en el que la micromatriz es un grupo de ácidos nucleicos plurales unidos a sustrato de la célula de prueba y las células de control.

8. Procedimiento, según la reivindicación 7, en el que el ácido nucleico es ADNc.

9. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el cambio en la expresión génica se mide utilizando la reacción en cadena de la polimerasa.

10. Procedimiento, según la reivindicación 9, en el que la reacción en cadena de la polimerasa es reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.

11. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la enfermedad de Alzheimer es enfermedad de Alzheimer esporádica.

12. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la enfermedad de Alzheimer es la enfermedad de Alzheimer de etapa temprana que se correlaciona con la fase 4 de la escala de clasificación de la evaluación funcional (FAST) o la AD leve según los criterios definidos en el Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders ("Manual diagnóstico y estadístico de trastornos mentales"), cuarta edición (DSM-IV-TR) (publicado por la Asociación Americana de Psiquiatría), NINCDS-ADRDA, o MMSE.

13. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la enfermedad de Alzheimer es enfermedad de Alzheimer de aparición temprana que aparece en una persona por debajo de 65 años.

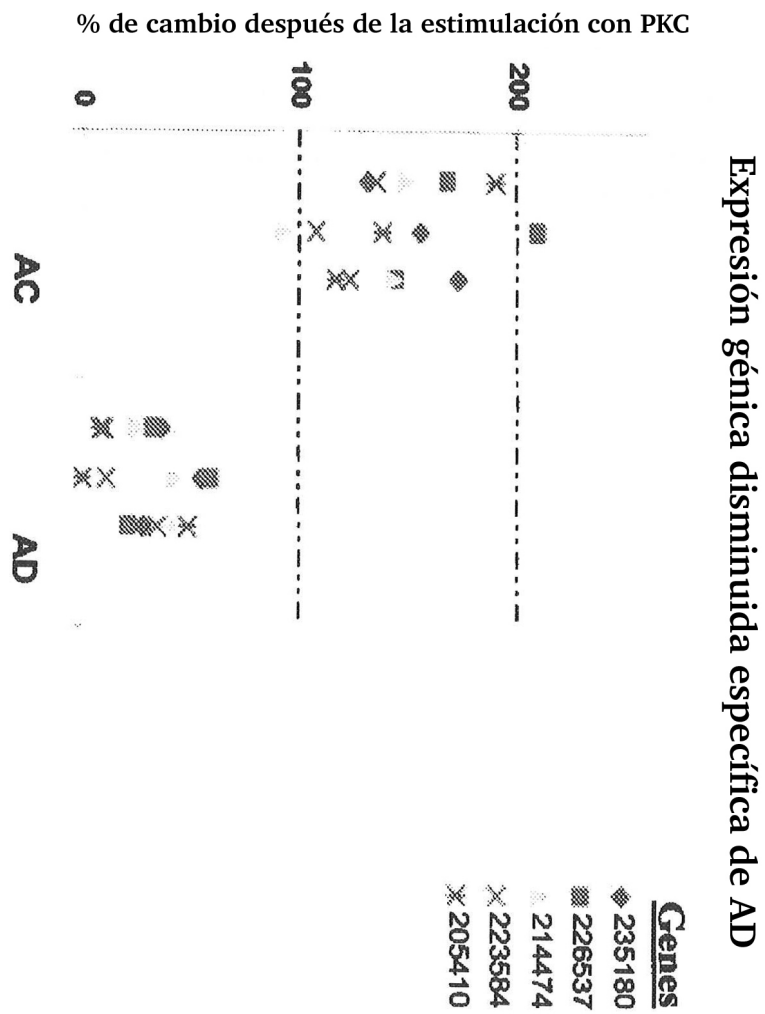


Figura 1

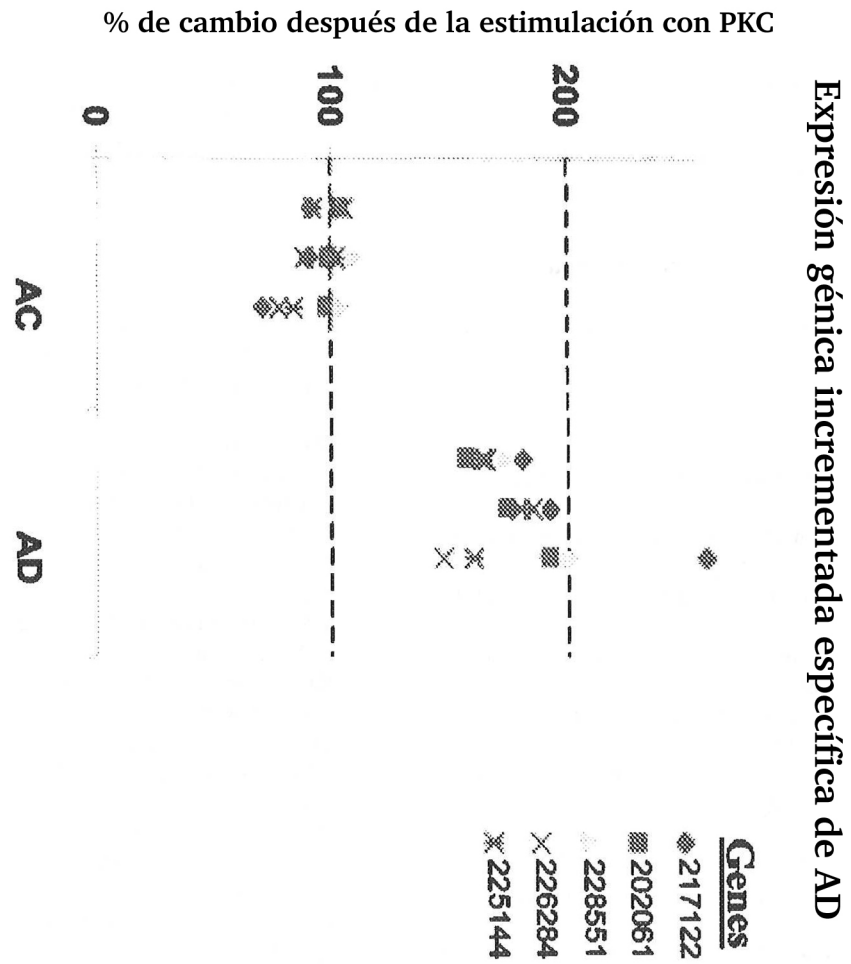


Figura 2