

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA
DOTTORATO INTERNAZIONALE DI RICERCA IN
NEUROBIOLOGIA
XXIV CICLO**

**IL RUOLO DEI METALLI NEI PROCESSI
NEURODEGENERATIVI**

Dott.ssa Donatella Anna Distefano

TESI DI DOTTORATO

Coordinatore:

Tutor:

Chiar.mo Prof. Roberto Avola

Chiar.mo Prof. Vincenzo G. Nicoletti

ANNO ACCADEMICO 2011-2012

INDICE

Introduzione	pag. 3
• <i>Neurodegenerazione e metalli</i>	pag. 3
• <i>Metalli e stress ossidativo</i>	pag. 7
• <i>APP e peptide β-amiloide</i>	pag. 9
• <i>Fibrillogenesi</i>	pag. 15
• <i>Metalli e proteine $A\beta$</i>	pag. 16
• <i>Ruolo dei recettori RAGE e p75 nella patogenesi dell'Alzheimer</i>	pag. 18
• <i>Targeting terapeutico degli ioni metallici nell'AD</i>	pag. 21
• <i>Malattie da disordine conformazionale: β-amiloide ed amilina</i>	pag. 23
Materiali e metodi	pag. 27
• <i>Colture cellulari di neuroblastoma SH-SY5Y</i>	pag. 27
• <i>Preparazione dei peptidi $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{25-35}$ e hA_{17-29}</i>	pag. 27
• <i>Analisi dell'aggregazione mediante tioflavina T</i>	pag. 28
• <i>Analisi dell'aggregazione mediante microscopia a forza atomica (AFM)</i>	pag. 28
• <i>Saggio ELISA</i>	pag. 29
• <i>Trattamento delle colture cellulari</i>	pag. 30
• <i>Saggio MTT</i>	pag. 30
Risultati	pag. 31
• <i>Analisi dell'aggregazione del peptide $A\beta_{1-42}$</i>	pag. 31
• <i>Analisi della tossicità del peptide $A\beta_{1-42}$</i>	pag. 34
• <i>Analisi dell'aggregazione e della tossicità del peptide $A\beta_{25-35}$</i>	pag. 35
• <i>Analisi dell'aggregazione del peptide hA_{17-29}</i>	pag. 39
• <i>Analisi della tossicità del peptide hA_{17-29}</i>	pag. 42
Discussione	pag. 44
Bibliografia	pag. 93

INTRODUZIONE

Neurodegenerazione e metalli

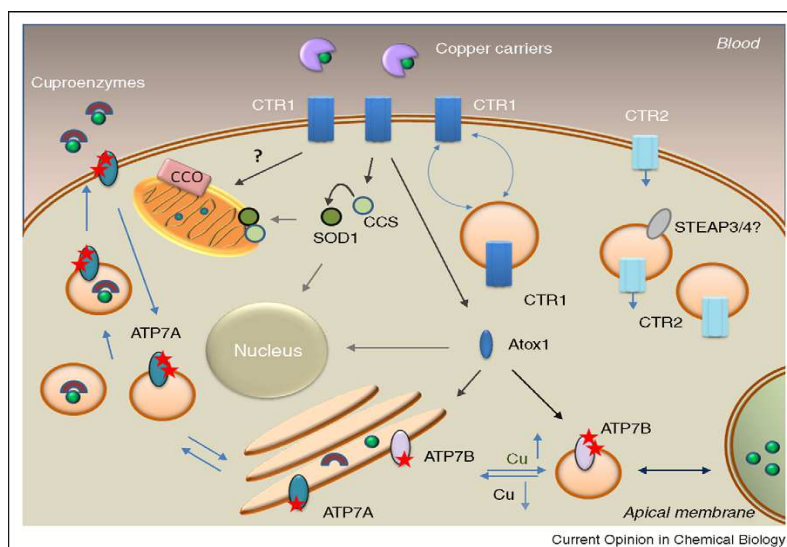
La progressiva morte neuronale che caratterizza i processi neurodegenerativi può essere dovuta a fattori genetici, ambientali (metalli, infezioni), biologici (aggregazione, accumulo ed alterazioni conformazionali di proteine), metabolici (stress ossidativo), autoimmuni o da invecchiamento. In relazione ai cambiamenti patologici osservati, si possono distinguere malattie neurodegenerative (AD, PD, morbo di Huntington) caratterizzate dall'accumulo di componenti proteiche anormali, causa della perdita di neuroni in funzione dell'età, e patologie neurodegenerative dovute a disfunzione o degenerazione (sclerosi multipla).

I metalli possono essere classificati come tossici o biochimicamente funzionali. I metalli tossici, come mercurio, cadmio, piombo ed alluminio, non hanno una normale funzione biologica nota, e, quando assorbiti, sono dannosi per qualsiasi organismo. È interessante notare che il cervello sembra essere l'organo bersaglio primario per tali metalli. Mentre i metalli biochimicamente funzionali sono strettamente regolati omeostaticamente, i metalli tossicologici non essenziali possono avere facilmente accesso ad un organismo, perché condividono alcune proprietà, come la carica ionica, con le loro controparti biochimicamente funzionali (Duce et al., 2010). In generale, gli ioni metallici sono legati a ligandi specifici; il termine “libero” viene utilizzato per definire il pool di metalli scambiabili o debolmente legati che sono accessibili al legame con i chelanti. Sia il rame che lo zinco liberi sono noti per agire come secondi messaggeri all'interno della fessura sinaptica, mentre è noto che il pool intracellulare di ferro libero modula l'espressione di svariate proteine.

Metalli come rame, zinco e ferro sono essenziali per alcune attività neuronali (neurotrasmissione, crescita assonale, biosintesi dei neurotrasmettitori,

fosforilazione ossidativa e trasporto dell'ossigeno). Il contenuto cerebrale in ioni metallici è strettamente regolato a livello della barriera emato-encefalica e non esiste alcun flusso passivo di metalli dal sistema circolatorio al cervello. Dato che le forme libere dei metalli sono potenzialmente dannose, l'assorbimento, la distribuzione e l'escrezione sono strettamente controllate e dirette da una varietà di proteine. Per esempio, nel plasma le principali proteine che legano il rame sono la ceruloplasmina, l'albumina e la transcupreina, che trasportano il rame assunto verso tutti i tessuti.

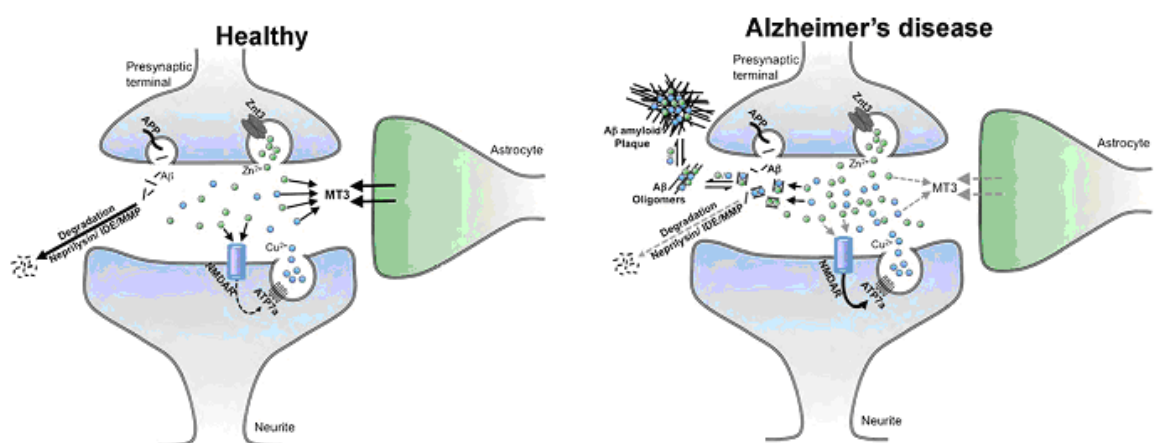
Il rame è un metallo redox attivo che viene utilizzato prevalentemente dagli organismi che vivono in ambienti ricchi di ossigeno, ed esiste sia nella forma ossidata (Cu^{2+}) che in quella ridotta (Cu^+) (Ridge et al., 2008). Il rame assunto con la dieta, ed associato alla ceruloplasmina per la distribuzione a livello tissutale, penetra nel cervello in maniera regolata grazie al trasportatore ATP7A, altamente espresso a livello del plesso coroide (Choi et al. 2009); l'ingresso nella cellula neuronale avviene attraverso il trasportatore ad alta affinità Ctr1 (Kuo et al. 2001; Lee et al. 2001). A livello intracellulare, tre metallo-chaperone indirizzano il rame verso pathway differenti: Atox1 per il pathway secretorio mediato da ATP7A e ATP7B, CCS verso l'enzima citoplasmatico Cu,Zn-SOD, e Cox17 verso la citocromo-c ossidasi (CCO) mitocondriale (Kim et al. 2008).



Nella sinapsi è stata riscontrata la presenza delle specie ioniche a concentrazioni micromolari. In questo ambiente, i neuriti postsinaptici NMDA (N-metil-D-aspartato) rilasciano ioni rame dopo attivazione da parte dell'NMDA (Schlief et al., 2005). Nei neuroni ippocampali, all'attivazione dei recettori sinaptici NMDA consegue il trafficking di ATP7A a cui è associato un efflusso di rame libero (15 μM) verso la fessura sinaptica (Schlief et al., 2005). Al momento, questo è l'unico microambiente noto dove si riscontra rame libero. È stato dimostrato che il rame protegge in maniera specifica dalla morte cellulare eccitotossica mediata dall'NMDA nei neuroni primari ippocampali. L'espressione di ATP7A è regolata durante lo sviluppo ed ha un ruolo fondamentale nel facilitare il trasporto di rame nel cervello attraverso le cellule endoteliali che fanno parte della barriera ematoencefalica (El Meskini et al., 2007; Niciu et al., 2007; Qian et al., 1998). È noto che i livelli di rame nel plasma, nel liquido cerebrospinale e nel tessuto cerebrale cambiano con l'età. Alterazioni dell'omeostasi dei livelli di rame nel cervello sono associate alla patogenesi di diverse malattie neurologiche tra cui malattia di Alzheimer, morbo di Parkinson e malattia prionica (Brown and Kozlowski, 2004; Mercer, 2001; Torsdottir et al., 1999). Infatti, i livelli di rame nel siero e nel liquido cerebrospinale sono significativamente più alti nei pazienti affetti da morbo di Alzheimer (Basun et al., 1991; Squitti et al., 2002a). All'interno del cervello, il rame è associato alle placche senili, dove si osserva un significativo aumento della concentrazione da 79 μM (nel neuropilo normale) a 390 μM (Lovell et al., 1998).

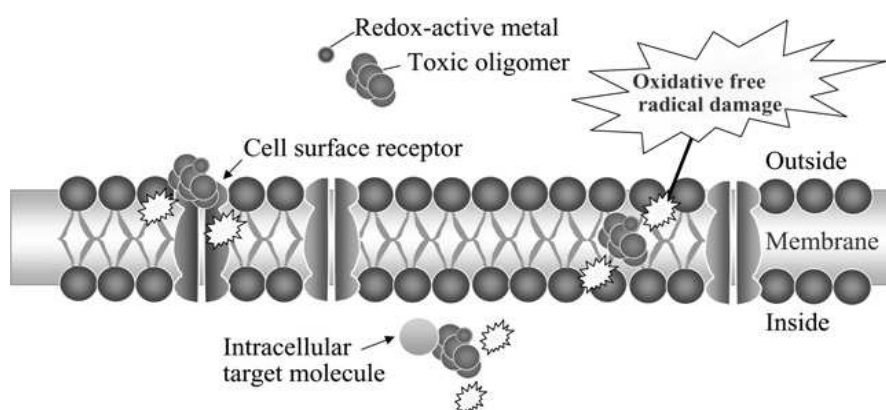
Lo zinco è un altro metallo di transizione abbondantemente presente in tutti i tessuti animali. Diverse classi di proteine richiedono il legame con zinco per il normale funzionamento; tra tutti gli organi, probabilmente il cervello possiede i livelli più alti di zinco (Frederickson, 1989). Nella sua forma ionica libera, lo zinco è altamente concentrato nelle terminazioni nervose glutamatergiche (10–15%), dove viene rilasciato dopo l'attivazione

neuronale; lo zinco rilasciato nelle sinapsi interagisce con i recettori neuronali come l'NMDA (Smart et al., 2004). Per evitare che lo zinco libero possa diventare tossico, a livello del citosol lo zinco è legato da una moltitudine di trasportatori (ZnTs), proteine che importano lo zinco (ZIPs) e proteine tampone come le metallotioneine (Sensi et al., 2009). Il trasportatore ZnT3 è essenziale nelle vescicole sinaptiche (Cole et al., 1999; Linkous et al., 2008) dove rappresenta probabilmente il maggior trasportatore di zinco; presumibilmente regola gli effetti a valle dello zinco sinaptico in una grande varietà di pathway di trasduzione del segnale, responsabili delle più alte funzioni cognitive. Al contrario del rame, i livelli di zinco nel plasma umano e di ratto sono più alti alla nascita e diminuiscono costantemente con l'età (Bunker et al., 1987; Martinez Lista et al., 1993; Monget et al., 1996; Munro et al., 1987; Ravaglia et al., 2000); sia nel plasma che nel liquido cerebrospinale la presenza di ioni zinco diminuisce ulteriormente con la malattia di Alzheimer (Basun et al., 1991; Baum et al., 2010; Molina et al., 1998). Tale ulteriore diminuzione può a sua volta influenzare i livelli cerebrali dello ione ed aumentare la patologia amiloide, attraverso la sua cattura all'interno delle placche. Lo zinco è infatti altamente concentrato nelle placche senili (1055 μM) rispetto al normale neuropilo (350 μM) (Lovell et al., 1998).



Metalli e stress ossidativo

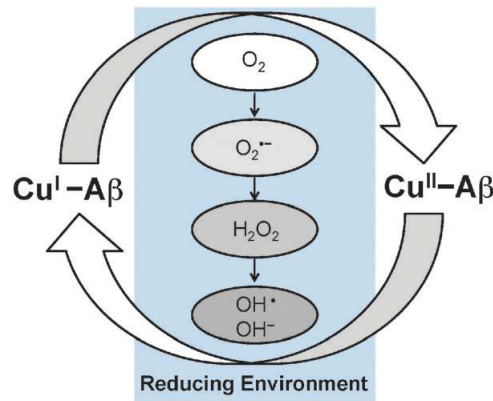
La disomeostasi dei metalli è una potenziale causa di stress ossidativo e consente l'interazione aberrante tra metallo e proteine. L'associazione metallo-proteina porta alla formazione di aggregati proteici che coinvolgono ioni metallici sia redox inerti (Zn^{2+}), che redox attivi (Cu^{2+} , Fe^{3+}); ferro e rame svolgono un ruolo fondamentale nell'aggregazione proteica, fornendo in tal modo un legame tra i due processi patologici di aggregazione e danno ossidativo. La mancata regolazione dei metalli di transizione redox attivi ha un ruolo essenziale nella patologia di Alzheimer, come dimostrato dalle elevate concentrazioni, nelle placche amiloidi, di Cu^{2+} e Fe^{3+} i quali interagiscono con il peptide A β rendendolo tossico per le cellule in coltura. Rimane ancora da chiarire se la tossicità delle specie solubili oligomeriche sia dovuta alla presenza di ioni metallici nella loro struttura sopramolecolare, rendendoli redox attivi (Curtain et al. 2001; Smith et al. 2006), o se la loro oligomerizzazione sia un risultato delle reazioni redox catalizzate da metalli che portano al cross-linking tra 2 residui di tirosina (Barnham et al. 2004). Gli aggregati oligomerici, associati ai metalli redox-attivi, possono essere causa di danno cellulare, attraverso la generazione di ROS (specie reattive dell'ossigeno), tramite: interazioni non-specifiche con la membrana, interazioni specifiche con recettori di superficie o molecole bersaglio intracellulari (Tabner et al. 2005).



Il cervello di un paziente affetto da Alzheimer è soggetto ad un elevato stress ossidativo che deriva dal danno dovuto ai radicali liberi. Tra le svariate prove a sostegno del ruolo chiave dello stress ossidativo nella fisiopatologia dell'Alzheimer:

- Aumentata perossidazione lipidica (Butterfield, D.A. et Lauderback, 2002; Sayre, L.M. *et al.*, 1997);
- Aumentata ossidazione di proteine, sottolineata da elevati livelli di gruppi carbonilici e nitrificazione, indotta dai perossinitriti, dei residui di tirosina (Butterfield, D.A. et Stadtman, E.R., 1997; Smith, M.A. *et al.*, 1997);
- Ossidazione del DNA, associata ad alti livelli di 8-idrossi-2-deossiguanosina (8OHdG) ed 8-idrossiguanosina (8OHG) (Gabbita, S.P. *et al.*, 1998; Lovell, M.A. et Markesbery, W.R., 2001);
- Presenza di prodotti finali della glicazione avanzata (AGE), formati da reazioni ossidative delle proteine con i carboidrati (Vitek *et al.*, 1994);
- Produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Butterfield, D.A. 2002).

L'A β può innescare la formazione di ROS, e produce direttamente perossido d'idrogeno (H₂O₂) attraverso la riduzione degli ioni metallici (Huang *et al.*, 1999a). La metionina in posizione 35 (Met-35) di A β è il residuo più sensibile all'ossidazione *in vivo*, in particolare nelle condizioni di stress ossidativo (Vogt, W., 1995). A β ₁₋₄₂ ha un dominio di legame per il rame (Cu²⁺) (Atwood *et al.*, 1998) e può ridurre Cu²⁺ a Cu⁺ (Huang *et al.*, 1999b). Lo ione risultante associato ad A β porta alla formazione di H₂O₂ (Huang *et al.*, 1999a). Lo ione Cu⁺, in cambio, può reagire con H₂O₂ per formare radicali ossidrilici ($\cdot$ OH). Questo trasferimento di un singolo elettrone dal metallo al peptide porta alla formazione di radicali peptidilici, che rappresentano una possibile spiegazione della formazione di radicali A β .

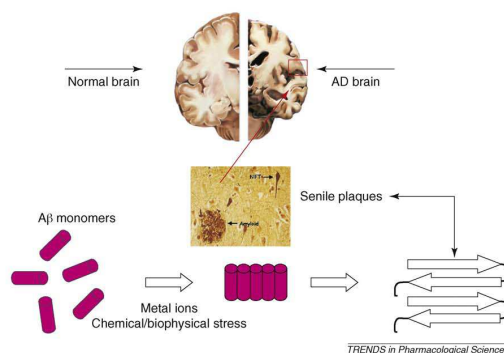


Formazione di ROS facilitata dal ciclo redox dell'Aβ legato al rame in condizioni riducenti (reazione di Fenton). De Toma et al., 2012

Il danno ossidativo causato da Aβ (Mark, RJ *et al.*, 1995) sembra avere un ruolo chiave nella distruzione della pompa Na⁺/K⁺-ATPasi nei neuroni ippocampali di ratto. L'alterazione della Na⁺/K⁺-ATPasi può influenzare il potenziale di membrana, e portare all'apertura dei canali del calcio voltaggio-dipendenti, aumentando così i livelli intracellulari dello ione Ca²⁺. L'alterazione dell'omeostasi del Ca²⁺ può avere conseguenze gravi sulla funzionalità cellulare, causando modifiche nei pathway di trasduzione del segnale, alterazione dei secondi messaggeri, attivazione del fattore di trascrizione NF-kB ed apoptosi.

APP e peptide β-amiloide

La caratteristica della malattia di Alzheimer è la presenza di placche amiloidi e grovigli neurofibrillari (NFTs), oltre alla perdita progressiva dell'integrità sinaptica ed alla morte delle cellule neuronali (Braak, H. *et al.*, 1993).



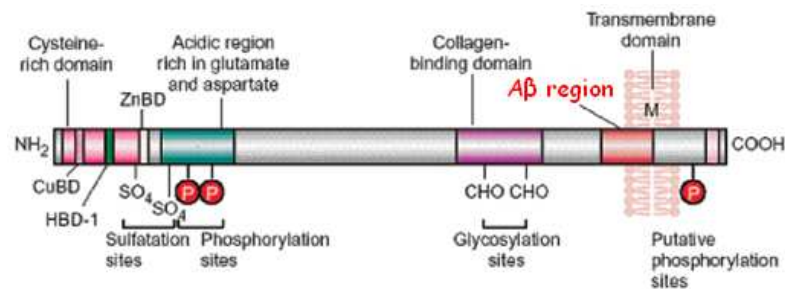
Le placche senili sono depositi extracellulari di fibrille ed aggregati amorfi formati dal peptide β -amiloide (Selkoe, D.J., 1994), un peptide di 39-42 aminoacidi che deriva dal taglio di una proteina transmembrana chiamata proteina precursore dell'amiloide (APP) (Hartmann, T. *et all.*, 1997; Tienari, P.J. *et all.*, 1997). I grovigli neurofibrillari sono aggregati intracellulari formati dalla proteina tau, associata ai microtubuli, che presenta iperfosforilazione e modifiche ossidative. Tale proteina ha un ruolo fondamentale nell'assemblaggio e nell'attività dei microtubuli, stabilizzando la struttura citoscheletrica, e partecipa al trasporto assonale. Nei pazienti affetti da AD, la proteina tau risulta essere iperfosforilata con conseguente riduzione della sua capacità di legare i microtubuli; può quindi aggregare e precipitare all'interno della cellula (Selkoe, D. J., 2004).

Le isoforme di $A\beta$ derivano dalla proteolisi di APP, con funzioni di adesione e controllo dell'attività proteolitica e dell'integrità dei canali ionici (Pontieri, 2005). L'APP è accoppiata alla proteina trimerica G_o mediante la sua porzione intracellulare (Okamoto, T. *et all.*, 1995; Brouillet, E. *et all.*, 1999). Dal momento che G_o è accoppiata a numerosi pathway di trasduzione del segnale, come adenilato ciclasi (Carter, B.D. et Medzihradsky, F., 1993), fosfolipasi c (Moriarty, T.M. *et all.*, 1990), canali Ca^{2+} voltaggio-dipendenti (Hescheler, J. *et all.*, 1987) ed apoptosi (Giambarella, U. *et all.*, 1997), l'APP può agire tramite uno o più di tali pathway.

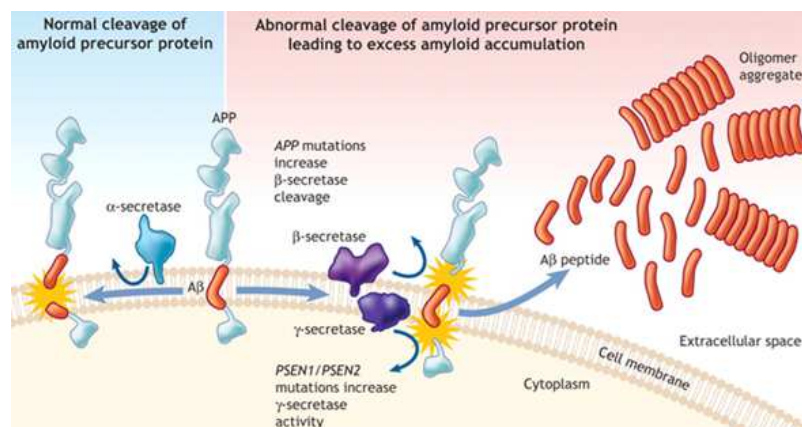
Diversi studi hanno messo in evidenza il ruolo dell'APP nelle funzioni di adesione e motilità cellulare (Breen, K.C. *et all.*, 1991; Chen, M. et Yankner, B.A., 1991; Sabo, S.L. *et all.*, 2001); è coinvolta nella formazione delle sinapsi, ed è stata dimostrata la sua presenza nelle estremità in crescita della fibra nervosa durante lo sviluppo cerebrale dei criceti (Moya, K.L. *et all.*, 1994). Questa proteina viene prodotta e trasportata attraverso il trasporto assonale verso le sinapsi centrali e periferiche dell'adulto (Sisodia, S.S. *et*

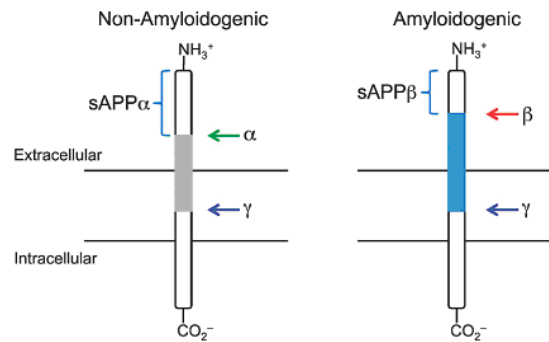
all., 1993); è stato così ipotizzato un ruolo nella regolazione della funzione sinaptica.

I peptidi A β sono stati ritrovati anche nei soggetti sani, quindi è possibile che abbiano un ruolo fisiologico di regolatori endogeni dell'eccitabilità sinaptica (Kamenetz et al. 2003).



La proteina APP subisce normale proteolisi ad opera dell'enzima α -secretasi che taglia a livello del residuo 687; altri due enzimi, la β - e la γ -secretasi, operano invece un taglio in corrispondenza dei due estremi del peptide (residui 670-671 e 712-717 rispettivamente), permettendo così la liberazione del peptide intero che di per sé assume la configurazione β -fibrillare amiloidogena.



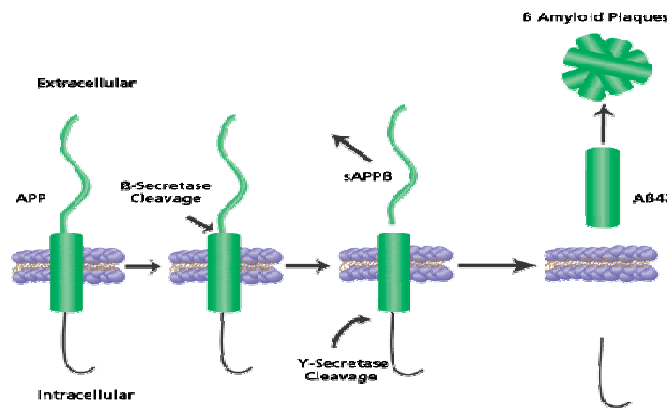


Il taglio nel sito α blocca la formazione di A β e porta alla formazione di un frammento solubile extracellulare di 612 aminoacidi (sAPP- α) ed un frammento carbossi-terminale (CTF) di 83 aminoacidi legato alla membrana, chiamato C83. Il taglio della β -secretasi rilascia un frammento extracellulare (sAPP- β) ed un frammento carbossi-terminale (CTF) di 99 aminoacidi legato alla membrana, chiamato C99. Gli enzimi responsabili del taglio nel sito β sono stati identificati come aspartil-proteasi BACE 1 (Yan, R. *et al.*, 1999; Vassar, R. *et al.*, 1999) e l'omologo BACE 2 (Farzan, M. *et al.*, 2000). Entrambi gli enzimi sono legati alla membrana e vengono espressi nel sistema nervoso (Bennet, B.D. *et al.*, 2000). Un terzo candidato è la carbossipeptidasi B che, a differenza di BACE 1 e BACE 2, è un enzima solubile localizzato nel citosol dei neuroni e delle cellule astrogliali, in particolare nell'ippocampo (Matsumoto, A. *et al.*, 2000). Il sito di taglio della γ -secretasi è situato all'interno della porzione transmembrana di APP. Dopo il taglio da parte dell' α -secretasi, il frammento C83 può essere tagliato dalla γ -secretasi, producendo un corto frammento proteico chiamato p3 ed un frammento citoplasmatico solubile chiamato AICD. Allo stesso modo, dopo il taglio proteolitico nel sito per la β -secretasi, il frammento C99 produce i peptidi A β ₁₋₄₀ e A β ₁₋₄₂, così come A β ₁₋₃₉ e A β ₁₋₄₃, assieme al dominio intracellulare AICD. L'attività della γ -secretasi è stata identificata negli enzimi presenilina-1 (PS1) e presenilina-2 (PS2) (Cruts, M. *et al.*, 1995; Hutton, M. *et al.*, 1996).

Le attività di α - e β -secretasi sono state individuate all'interno del reticolo endoplasmatico (ER), nelle vescicole trans del Golgi e nella membrana cellulare (Huse, J.T. *et al.*, 2000). Dopo la sintesi nel RER, l'APP viene trasportata attraverso il Golgi nella membrana plasmatica. Se il taglio dell'APP avviene ad opera di α - e γ -secretasi, diminuisce il pathway che utilizza le secretasi β e γ (Vassar, R. *et al.*, 1999; Luo, Y. *et al.*, 2001). Ciò fa supporre l'esistenza di un equilibrio tra le attività di α - e β -secretasi; quindi, quando aumenta il taglio da parte di β - e γ -secretasi, si ha produzione di $A\beta$ e diminuzione nei livelli del frammento neurotrofico sAPP α .

Il peptide $A\beta$ è composto da un numero variabile di aminoacidi (39-43); l' $A\beta$ extracellulare può regolare l'eccitabilità neuronale. Un meccanismo possibile di regolazione consiste nel promuovere il flusso di ioni Ca^{2+} attraverso i canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti (VDCCs). Per esempio, l'applicazione di $A\beta_{1-42}$ alla linea cellulare di neuroblastoma SHSY5Y aumenta la fosforilazione e l'apertura dei canali VDCCs attraverso un pathway che sembra essere mediato da una protein-chinasi attivata dalla mitosi (MAPK). Un elevato flusso di ioni Ca^{2+} può promuovere una o più forme di plasticità sinaptica; d'altra parte un eccesso nei livelli di Ca^{2+} può provocare neurotossicità. Svariate prove sperimentali confermano la regolazione, da parte di $A\beta$, dei segnali cellulari attraverso i recettori nACh; ad esempio, $A\beta$ provoca una significativa inibizione della corrente nicotinic nelle cellule piramidali dell'ippocampo (Pettit *et al.*, 2001). Probabilmente il peptide agisce direttamente bloccando il recettore e l'accesso del ligando acetilcolina (ACh) o causando la desensibilizzazione del recettore (Pettit, D.L. *et al.*, 2001). Inoltre, $A\beta$ può regolare la funzione pre-sinaptica dei neuroni colinergici e blocca il rilascio di ACh dalle terminazioni sinaptiche nella corteccia e nell'ippocampo (Kar, S. *et al.*, 1996). $A\beta$ quindi regola la trasmissione colinergica attraverso l'inibizione dell'attività dei recettori pre- e post-sinaptici.

$A\beta_{1-42}$ è il peptide che aggrega più facilmente (Snyder et al., 1994).



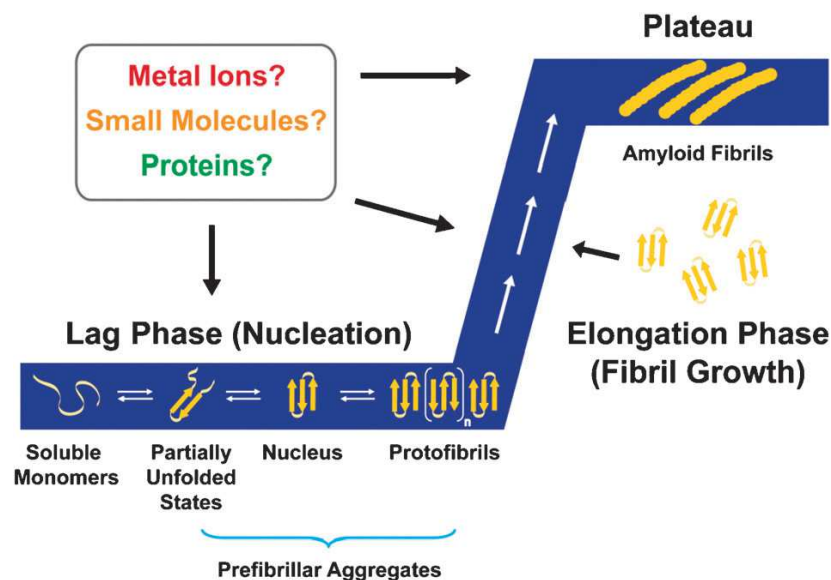
L'ipotesi della cascata amiloide implica la deposizione di $A\beta_{1-42}$ nelle placche, che si presentano inizialmente amorfe senza un'organizzazione fibrillare (Yamaguchi, H. *et al.*, 1988); successivamente, l'acquisizione di una struttura fibrillare e la formazione di placche insolubili costituiscono l'evento fondamentale nella genesi dell'AD.

La tossicità delle fibrille può derivare dalla formazione di radicali liberi (Hensley, K. *et al.*, 1994) o dalla destabilizzazione delle membrane con conseguente alterazione dell'omeostasi del Ca^{2+} (Mark, R. *et al.*, 1996; Mattson, M. et Goodman, Y., 1995). Studi recenti dimostrano che le strutture non fibrillari, che comprendono oligomeri, ligandi diffusibili derivati da $A\beta$ (ADDLs) (Walsh, D.M. *et al.*, 2002; Lambert, M.P. *et al.*, 1998) e proto fibrille (Ward, R.V. *et al.*, 2000; Hartley, D.M. *et al.*, 1999), hanno effetti neurotossici. Piccoli e stabili oligomeri di $A\beta_{1-42}$ sono stati isolati dal cervello, dal plasma e dal liquido cerebrospinale (Kuo, Y.M. *et al.*, 1996; Roher, A.E. *et al.*, 2000) e sono stati correlati con la gravità della neurodegenerazione (McLean, C.A. *et al.*, 1999). Evidenze sperimentali sempre più numerose provano che gli oligomeri sono molto più neurotossici delle fibrille (Caughey et Lansbury, 2003), e riducono la vitalità cellulare dieci volte più degli aggregati fibrillari (Dalhgren, K.N. *et al.*, 2002).

Fibrillogenesi

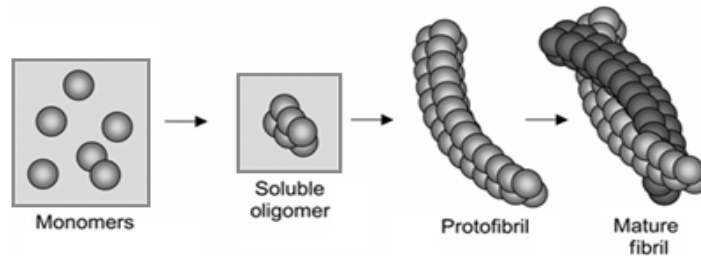
Non è ancora del tutto chiara la causa del misfolding proteico e del conseguente accumulo nel cervello, tuttavia si ritiene che siano coinvolti fattori genetici, ambientali ed invecchiamento. Nelle forme ereditarie di AD, PD e malattia prionica, mutazioni geniche causano la produzione di proteine mutanti con un'elevata tendenza a formare le cosiddette fibrille amiloidi, patogene. Analisi NMR, microscopia elettronica e tecniche di diffrazione a raggi X hanno evidenziato alcune caratteristiche comuni a tutte le proteine amiloidogene (Dobson 2003; Antzutkin et al. 2002; Torok et al. 2002), tra cui strutture rigide ricche in β -sheet, non ramificate ed intrecciate, e diametro delle fibrille compreso tra 5 e 13 nm.

Il legame con ioni metallici può influenzare l'aggregazione, causando un cambiamento nella velocità della precipitazione e della fibrillogenesi, una variazione della tossicità degli aggregati amiloidi ed alterazioni nella morfologia finale degli stessi aggregati (Noy et al. 2008).



La costruzione delle fibrille è un processo a cascata che implica la formazione di strutture intermedie: innanzitutto le proteine formano piccoli oligomeri solubili che si aggregano a formare protofibrille ad elevato peso molecolare; la solubilità delle protofibrille diminuisce causando l'accumulo delle fibrille insolubili (Rochet and Lansbury 2000). Per quanto riguarda la

tossicità, è stato dimostrato che i piccoli aggregati oligomerici sono molto più tossici delle fibrille insolubili, sia per l'A β che per l' α -sinucleina (Lambert et al. 1998; Walsh et al. 1999; Hardy and Selkoe 2002).



L'accumulo di fibrille sembra essere responsabile della progressione della malattia anche se le forme oligomeriche hanno effetto neurotossico. Il peptide appena formato si organizza in oligomeri all'interno di vescicole intracellulari che vengono successivamente secrete all'esterno; gli oligomeri secreti possono interagire con i neuroni, influenzandone il normale funzionamento. Le forme protofibrillari di A β presentano azione neurotossica, provocando cambiamenti elettrofisiologici quali depolarizzazione di membrana ed aumento del potenziale d'azione che alla fine causano morte neuronale (Hartley et al. 1999); si può quindi concludere che la disfunzione neuronale comincia con la formazione delle strutture oligomeriche e protofibrillari.

Metalli e proteine A β

Nella sequenza di APP ci sono siti di legame per i metalli come rame (Atwood et al., 2000; Barnham et al., 2003; Hesse et al., 1994; Simons et al., 2002; Valensin et al., 2004) e zinco (Bush et al., 1993, 1994a,b,c). I siti di legame per il rame sono localizzati nel dominio extracellulare amino terminale ed anche all'interno della sequenza A β di APP. Il legame dello zinco all'APP coinvolge una regione di aminoacidi conservata tra le posizioni 170 e 188 (Bush et al., 1993, 1994a). Numerosi studi *in vivo* dimostrano come APP sia sensibile ai livelli di rame; la modulazione dei livelli di rame

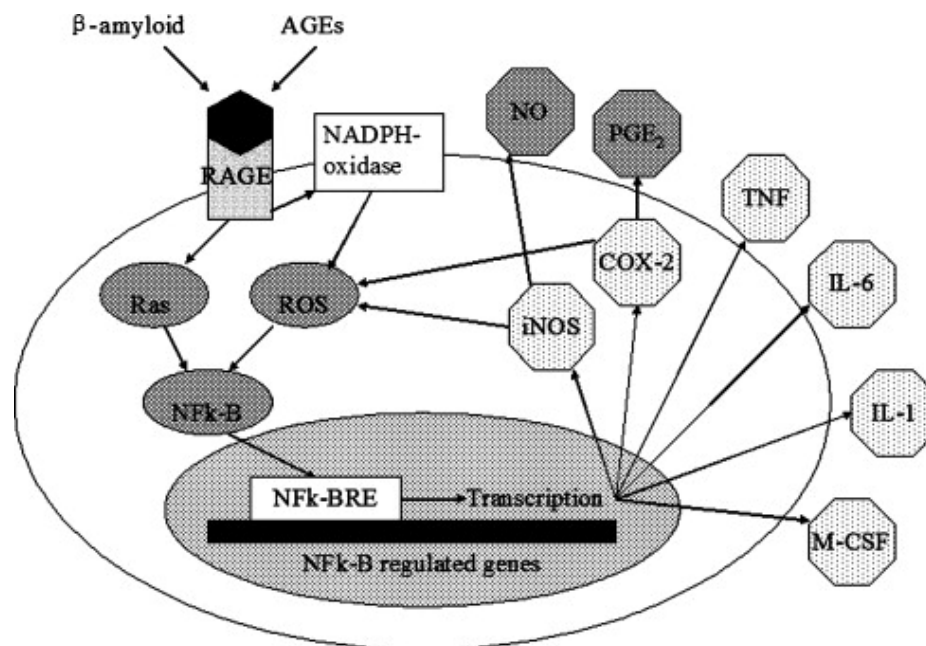
in fibroblasti di topo con sovraccarico o mancanza di rame può rispettivamente aumentare o diminuire l'espressione dell'mRNA di APP (Armendariz et al., 2004; Bellingham et al., 2004b). I metalli possono anche influenzare indirettamente APP alterandone il processamento. Tutte le secretasi interagiscono con differenti specie metalliche: dopo la sintesi, TACE viene mantenuta in uno stato inattivo mediato da un legame intramolecolare tra un residuo di cisteina nel prodominio ed un atomo di zinco nel sito catalitico della proteina; BACE 1 lega il rame nel suo dominio C-terminale e co-immunoprecipita con la chaperone CCS negli omogenati cerebrali (Angeletti et al., 2005). L'endocitosi di APP verso gli endosomi ricchi di BACE 1 viene richiesta per iniziare il taglio in β (Vassar et al., 1999). Colture corticali neonatali di topo mostrano che la somministrazione di zinco esogeno aumenta i frammenti C-terminali della presenilina 1, favorendo la sintesi *de novo* della proteina (Park et al., 2001). Il cloruro di zinco provoca l'oligomerizzazione di un substrato della γ -secretasi ed inibisce il taglio di APP *in vitro*, sostenendo quindi l'ipotesi di un ruolo fondamentale della disregolazione dello zinco nel processamento anormale di $A\beta$ (Hoke et al., 2005). $A\beta$ viene rapidamente precipitato dallo zinco in un ampio range di pH mentre l'aggregazione del peptide ad opera di rame e zinco viene indotta solamente in condizioni moderatamente acide (pH 6.8–7.0) (Atwood et al., 1998, 2000; Ha et al., 2007). $A\beta$ lega quantità equimolari di rame e zinco a pH 7.4 ma, nelle condizioni di acidosi che si pensa si verifichino in un cervello affetto da AD (pH 6.6), il rame sposta lo zinco dal legame con $A\beta$ (Atwood et al., 2000). Dato che è stato dimostrato che il rame promuove l'aggregazione di $A\beta$ *in vitro* ed è noto che $A\beta$ lega il rame nel cervello AD (Dong et al., 2003; Lovell et al., 1998; Opazo et al., 2002), può sembrare sorprendente che aumentati livelli di rame nel cervello, in modelli transgenici della malattia, possano inibire la patologia; ciò è coerente con le prove che

dimostrano come il rame si ridistribuisca in maniera anormale nell'AD e si accumuli all'esterno della cellula, lasciando il tessuto relativamente carente. Il coinvolgimento degli ioni metallici nell'aggregazione di A β nel cervello rappresenta solo una parte dell'equazione biologica, in quanto i metalli possono anche partecipare alla clearance/degradazione di A β . Due dei principali enzimi identificati che degradano A β sono l'enzima che degrada l'insulina (IDE) e la neprilisina (NEP), un'endopeptidasi neutra. IDE è espresso in maniera ubiquitaria ed è localizzato a livello intra- ed extracellulare nel sistema nervoso centrale. Entrambe queste proteasi sono membri delle zinco metallopeptidasi che condividono una comune struttura primaria nella loro sequenza coinvolta nel legame con lo zinco. La formazione di ROS, probabilmente come prodotti dell'interazione dei metalli con A β , può disattivare i principali enzimi di degradazione coinvolti nella regolazione di A β . In modelli animali biologicamente rilevanti, un dismetabolismo nell'omeostasi dei metalli è sufficiente ad alterare significativamente il normale processamento di APP e la formazione, deposizione e degradazione di A β . La coordinazione di A β con le forme ossidate di rame (Cu²⁺) e ferro (Fe³⁺) porta alla riduzione degli ioni metallici (Hureau and Faller, 2009). L'attività redox di A β porta alla formazione di specie reattive dell'ossigeno ed alla produzione di H₂O₂; ciò può causare l'ossidazione di una varietà di catene laterali ed oligomerizzazione covalente. Il sottoprodotto H₂O₂ è inoltre liberamente permeabile attraverso tutti i confine cellulari e tissutali, e può inoltre reagire con gli ioni metallici ridotti (Fe²⁺, Cu⁺) per generare radicali idrossilici tramite reazione di Fenton.

Ruolo dei recettori RAGE e p75 nella patogenesi dell'Alzheimer

Il recettore RAGE è espresso normalmente nel tessuto cerebrale in una grande varietà di cellule, tra cui neuroni, microglia ed astrociti (Li, JJ *et al.*, 1998). Viene espresso in maniera costitutiva durante lo sviluppo embrionale,

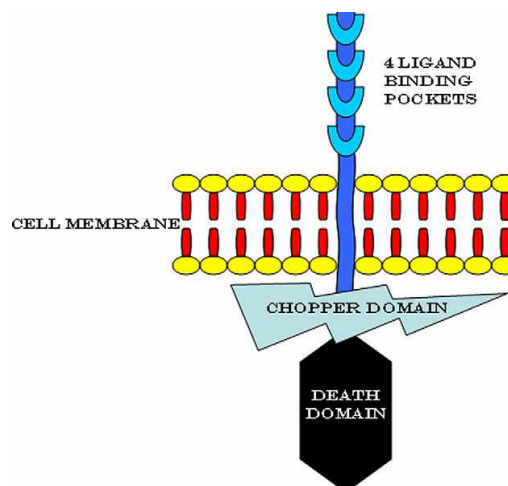
mentre subisce down-regulation durante la vita adulta (Brett, J. *et al.*, 1993); un'espressione indotta di RAGE è spesso associata a patologie come la malattia di Alzheimer (Yan, S. *et al.*, 1996). Il recettore riconosce strutture tridimensionali, come β -sheets e fibrille, piuttosto che specifiche sequenze aminoacidiche (Bucciarelli, LG, *et al.*, 2002). Oltre ai prodotti finali della glicazione avanzata (AGE), RAGE lega anche il peptide A β (Yan, S. *et al.*, 1996; Yan, SD *et al.*, 2000).



Il ruolo di RAGE consiste nella generazione di un segnale intracellulare che porta all'attivazione del fattore di trascrizione pro-infiammatorio NF- κ B. Nelle cellule non stimulate, NF- κ B è localizzato nel citoplasma nella sua forma inattiva legata all'inibitore I κ B- α ; dopo l'attivazione, I κ B- α viene rapidamente fosforilato e degradato mentre NF- κ B viene rilasciato, dimerizza e trasloca nel nucleo (Barnes, PJ et Karin, M., 1997), attivando così la trascrizione di geni bersaglio come quelli per citosine, molecole di adesione, RAGE, l'inibitore I κ B α (Barnes, PJ et Karin, M., 1997; Li, J. et Schmidt, AM, 1997), e geni antiapoptotici come Bcl-2 e Bcl-XL (Barnes, PJ et Karin, M., 1997). L'attivazione di NF- κ B è seguita da una sua nuova sintesi (Bierhaus, A. *et al.*, 2001) e ciò provoca una crescita costante del pool di NF-

kB. Dato che l'espressione di RAGE è indotta da NF-kB (Li, J. et Schmidt, AM, 1997), un'attivazione sostenuta di NF-kB risulta nell'induzione di RAGE ed assicura il mantenimento e l'amplificazione del segnale. Inoltre, l'interazione RAGE-ligando può indurre direttamente la generazione di ROS via NADPH ossidasi ed altri meccanismi (Lander, HM *et al.*, 1997; Wautier, MP *et al.*, 2001). È stato inoltre dimostrato che RAGE è coinvolto nell'attivazione di iNOS, portando così alla formazione dello stress ossidativo mediato da NO (Wong *et al.* 2001).

P75 fa parte della super famiglia di recettori TNF (fattore di necrosi tumorale) (Friedman et al., 1999) ed è coinvolto nell'apoptosi cellulare, nella crescita assonale e nel differenziamento (Chen et al., 2009). Trk è un recettore tirosina-chinasico selettivo per il ligando (DeFreitas et al., 2001), ed interagisce con p75 per segnalare la sopravvivenza o l'apoptosi della cellula neuronale. Studi precedenti suggeriscono che la perdita neuronale osservata nei pazienti affetti da Alzheimer è dipendente da p75 (DeFreitas et al., 2001; Yaar et al. 1997); inoltre, A β funge da ligando per p75 (Davies et al. 2003). TrkA riduce il β -clivaggio di APP per generare il peptide A β mentre p75 aumenta il clivaggio (Costantini et al. 2005), ed è stato osservato che A β causa neurotossicità mediata da p75 in svariate linee cellulari (Yaar et al. 1997; Coulson et al. 2006; Sotthibundhu et al. 2008). Il recettore p75 è strutturalmente composto da tre parti principali.



Innanzitutto, presenta delle ripetizioni extracellulari ricche in residui di cisteina che formano quattro siti di legame per il ligando (Chen et al. 2009; Coulson et al. 2006). La seconda parte è formata da un dominio che attraversa la membrana per legarsi al dominio intracellulare (Hashimoto et al. 2004). Infine, la parte intracellulare è composta da un dominio “chopper” e da un dominio di morte TNF-simile (Coulson et al. 2006). Per segnalare l’apoptosi, p75 attiva JNK (c-jun N-terminal kinase) (Friedman 2000) e le caspasi con conseguente produzione di ceramide (Friedman et al. 1999; Harrington et al. 2002). È stato dimostrato che il legame delle catene A β , in particolare gli aminoacidi all’interno della sequenza 29–35, induce neurotossicità. A β lega il recettore p75 ma non TrkA, ed induce apoptosi (Yaar et al. 1997; Coulson et al. 2006) attraverso il meccanismo di trasduzione del segnale del dominio di morte intracellulare (Hashimoto et al. 2004). Il dominio di morte a sua volta attiva G₀ che porta alla fosforilazione di JNK (Hashimoto et al. 2004; Coulson et al. 2006). Durante l’invecchiamento si verifica un graduale aumento dell’espressione di p75 accompagnato dalla diminuzione dell’espressione di TrkA. La diminuzione di TrkA in rapporto a p75 e la regolazione coordinata delle neurotrofine attiva la sfingomielinasi ed aumenta la produzione di ceramidi (Haines 2006; Costantini et al. 2006), che possono fungere da secondi messaggeri per indurre apoptosi, e stabilizzano BACE1 o la β secretasi (Haines 2006; Costantini et al. 2006) che taglia APP dando luogo alla formazione di peptide A β .

Targeting terapeutico degli ioni metallici nell’AD

Una teoria sempre più popolare per l’uso di piccole molecole neuroterapeutiche nella malattia di Alzheimer è quella di indirizzarle verso le prime fasi della generazione dei radicali liberi. Ciò può essere effettuato somministrando antiossidanti o utilizzando agenti che complessano i metalli per evitare che questi possano prendere parte in reazioni redox. Al momento

non esiste alcuna prova che l'AD risponda alla tradizionale terapia chelante, ed il rischio più grande è quello che la rimozione di ioni metallici essenziali possa scatenare effetti collaterali. Le molecole antiossidanti possono essere impiegate per la loro capacità di neutralizzare metalli liberi o legati in maniera errata, interferendo in tal modo nella generazione a valle di specie reattive dell'ossigeno ed altri radicali (Behl and Moosmann, 2002). In un organismo, la chelazione dei metalli elimina il pool totale di metalli biodisponibili; la metallotioneina-3 (MT-3) possiede proprietà chelanti ed è importante per l'omeostasi del rame e dello zinco all'interno di neuroni, astrociti e nello spazio extracellulare cerebrale (Vasak and Hasler, 2000). Il meccanismo di MT-3 consiste nel ridurre e sequestrare il rame dall'A β e scambiarlo con uno ione zinco portato al suo interno. Gli MPAC (metal-protein attenuating compounds, o ionofori) sono capaci di competere con i ligandi endogeni per gli ioni metallici. Prendono di mira le reazioni nocive metallo-proteina a monte usando la loro affinità per i metalli, moderata e reversibile, e ristabiliscono i normali livelli dei metalli in specifici compartimenti cellulari (Masters and Beyreuther, 2006). La molecola di prima generazione era il cliochinolo (CQ; 5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoline). Il trattamento orale con CQ in un modello murino di AD ha portato alla riduzione del deposito corticale di amiloide, a sostegno di studi iniziali che dimostravano la capacità di CQ di dissolvere gli aggregati sintetici A β :rame/zinco ed i depositi di amiloide da cervelli AD post-mortem (Cherny et al., 2001). Comunque, altri studi evidenziano come CQ aumenti la neurotossicità ossidativa (Benvenisti-Zarom et al., 2005); penetra nel cervello ed è attratto verso il pool extracellulare di metalli che sono in equilibrio dissociabile all'interno delle placche amiloidi. La molecola quindi lega lo zinco ed il rame dell'amiloide ed il complesso farmaco-metallo penetra dentro la cellula (Deraeve et al., 2006; Rozga et al., 2009). Nella neocorteccia affetta dell'AD si trova un pool di A β che viene tenuto in aggregati

sedimentabili dagli ioni metallici, come Cu(I) e Zn(II), e questi aggregati vengono solubilizzati dal trattamento con chelanti. La batocupreina disolfonato (BCS), un potente chelante del Cu(I), mostra una capacità dose-dipendente lineare nel solubilizzare A β in campioni cerebrali da pazienti affetti da AD. I metalli di transizione sono intrinseci nella struttura degli aggregati di A β ed i chelanti per i metalli, specialmente quelli che legano zinco e rame, possono dissociare gli aggregati legati ai metalli (Cherny *et al.*, 1999). I composti disaggreganti che possono avere valore terapeutico devono sia prevenire le interazioni metallo-A β che rendere possibile la disgregazione di aggregati preesistenti in componenti non tossiche. Analisi NMR dimostrano che BCS lega A β ; questo comportamento, combinato alla disaggregazione di A β mediata dal rame, implica che l'eccezionale efficacia di BCS nel solubilizzare A β in maniera dose-dipendente possa essere il risultato della combinazione delle proprietà chelante ed intercalante (o "di rottura delle catene"). Recentemente è stato dimostrato che BCS elimina la formazione di perossido di idrogeno mediata da Cu-A β (Huang *et al.*, 1999).

Malattie da disordine conformazionale: β -amiloide ed amilina

Morbo di Alzheimer e diabete mellito di tipo II, essendo entrambe caratterizzate dall'accumulo di proteine con alterato ripiegamento, sono raggruppate sotto il nome di "disordini conformazionali proteici" (PCD) (Soto, 2001). Proteine che sono normalmente solubili si trasformano in aggregati insolubili che possono formare depositi spesso tossici, non solo a livello del cervello ma anche nei muscoli, nelle ossa, nel cuore e nel fegato (Gaggelli et al., 2006). Oltre all'insolubilità, gli aggregati riscontrati nelle diverse patologie condividono una serie di caratteristiche chimico-fisiche e morfologiche come la natura fibrillare delle placche, l'elevata percentuale di struttura secondaria β -sheet e la resistenza alle proteasi.

Il cambiamento nella funzione delle cellule β pancreatiche include una riduzione della secrezione d'insulina in risposta al glucosio ed una diminuzione della secrezione di un altro peptide, l'amilina (hA) che, al pari dell'insulina, svolge un ruolo centrale nella regolazione del metabolismo del glucosio (Kahn et al., 1991; Sanke et al., 1991; Ahren et al., 1998); è stato dimostrato che l'amilina accentua gli effetti dell'insulina rallentando lo svuotamento gastrico, riducendo il tasso di glucosio che entra nel sangue e segnalando al cervello di ridurre la dimensione del pasto (Woods et al. 2006). Inoltre esperimenti *in vivo* suggeriscono che l'amilina funzioni da neuromodulatore a livello del SNC (Baldo and Kelley 2001; Young 1997). Uno dei meccanismi proposti per un'alterata funzione delle cellule β è correlato alla deposizione di amiloide. Depositi di amiloide sono stati trovati nelle cellule β delle isole pancreatiche di Langerhans in più del 90% dei pazienti affetti da DM di tipo II (Höppener and Lips, 2006). Responsabile della formazione di questi depositi è l'amilina (Cooper et al., 1987; Jaikaran and Clark, 2001; Kapurniotu, 2001), un ormone peptidico prodotto e cosecreto con l'insulina. L'amilina è composta da 37 aminoacidi e presenta un ponte disolfuro tra i residui 2 e 7 e un'estremità C-terminale amidata. Alcuni autori attribuiscono alla regione 20-29 un ruolo chiave nell'amiloidogenesi e hanno dimostrato che un frammento di peptide corrispondente ai residui 20-29 è capace di formare amiloidi *in vitro* (Westermarck et al., 1990).



Nonostante ci sia un'omologia limitata nella sequenza primaria, hA ed A β condividono diverse proprietà biofisiche, come la capacità di aggregare in strutture β -sheet in soluzione acquosa. Di grande rilievo risulta essere la proprietà neurotossica dell'amilina umana nei confronti dei neuroni corticali ed ippocampali, in maniera del tutto simile all'A β anche per quanto concerne

l'induzione dell'apoptosi tempo- e concentrazione-dipendente (May et al. 1993; Tucker et al. 1998). È stato proposto che tale tossicità possa essere dovuta alla capacità di entrambi i peptidi di formare canali di membrana selettivi per i cationi che consentirebbero al calcio di entrare nella cellula in quantità non regolate (Kawahara et al. 2000).

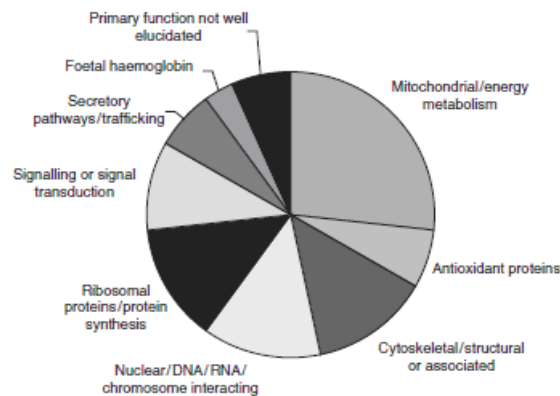
Sia nell'AD che nel diabete mellito di tipo II è stato osservato un elevato tasso di formazione ed accumulo di prodotti finali della glicazione avanzata (AGEs) (Munch et al. 1998; Yamagishi et al. 2003).

Riguardo all'interazione con gli ioni metallici, è noto che il rame, interagendo con l'amilina umana, possa stimolare la produzione di H_2O_2 e quindi causare stress ossidativo in maniera del tutto simile all' $A\beta$ (Schubert et al. 1995); inoltre, il rame media l'interazione con la membrana del frammento 17-29 dell'amilina (Pappalardo et al. 2007).

hA ed $A\beta$ potrebbero avere lo stesso meccanismo d'azione; infatti AC 187, un antagonista del recettore per l'amilina, blocca sia gli effetti di hA che quelli di $A\beta$ nei neuroni colinergici basali (Jhamandas et al. 2003). Gli effetti iniziali di $A\beta$ ed amilina umana che portano a neurotossicità sono espressi attraverso l'attivazione del recettore per l'amilina, un recettore accoppiato alla proteina G compreso del recettore della calcitonina (CTR) e della proteina di membrana 3 associata al recettore (RAMP3) (Jhamandas et al. 2012). Secondo questa ipotesi, il recettore dell'amilina potrebbe essere un nuovo target terapeutico per l'AD.

Recentemente, è stato dimostrato che hA ed $A\beta$ possono esercitare il loro effetto tossico tramite riduzione dei livelli delle proteine mitocondriali e metaboliche; la disfunzione mitocondriale potrebbe quindi essere un meccanismo di patogenesi comune tra malattia di Alzheimer e diabete mellito di tipo II.

Cellule SHSY5Y trattate con questi due peptide hanno mostrato una risposta simile (Lim et al. 2010).



Il gruppo funzionale con il numero più grande di proteine significativamente alterate in risposta ai trattamenti con entrambi i peptidi è associato con le funzioni mitocondriali, il metabolismo energetico ed antiossidante, e rappresenta più del 25 % delle proteine significativamente deregolate.

Mentre la maggior parte delle proteine mitocondriali/metaboliche sono sottoesprese, le proteine antiossidanti sono maggiormente sovraesprese, suggerendo una risposta cellulare tipica ad uno stato di stress ossidativo. Altri gruppi deregolati comuni sono quelli del citoscheletro, dell'interazione cromosomica, ribosomiali, del signaling e del trafficking.

MATERIALI E METODI

Culture cellulari di neuroblastoma SH-SY5Y

Dopo espansione in fiasche da 75 cm², le cellule di neuroblastoma (ATCC number CRL - 2266) sono state piastrate in multiwell da 48 alla densità di 20000 cellule/pozzetto, in DMEM/F12 1:1 contenente FBS (siero fetale bovino) al 10% e Pen-Strep (penicillina-streptomicina) (50 U/ml - 50 µg/ml) all'1%; le colture sono state mantenute a 37°C al 5% di CO₂ in atmosfera umidificata. Il terreno di coltura è stato cambiato due volte a settimana e, raggiunta una confluenza del 70%, le cellule sono state utilizzate per gli esperimenti.

Preparazione dei peptidi A β ₁₋₄₂, A β ₂₅₋₃₅ e hA₁₇₋₂₉

Il peptide hA₁₇₋₂₉ è stato sintetizzato su resina PALPEG-PS (polietilene glicole-polistirene) usando un sintetizzatore di peptidi Applied Biosystems Pioneer; la purificazione è stata effettuata tramite RP-HPLC preparativa usando una Vydac C-18 con un gradiente lineare di acqua/aceto nitrile contenente lo 0.1% di TFA. L'identità e la purezza del peptide sono state confermate tramite spettrometria di massa ad elettrospray ionizzazione (ESI-MS) e RP-HPLC analitica, rispettivamente. I peptidi A β ₁₋₄₂ and A β ₂₅₋₃₅ utilizzati per gli esperimenti sono stati acquistati da Bachem.

Il protocollo di monomerizzazione consiste in una prima dissoluzione in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP, Sigma), che agisce come solvente per eliminare eventuali strutture secondarie presenti (Stine *et al* 2001). Il peptide solubilizzato in HFIP alla concentrazione finale (Cf) di 1 mM è stato diviso in aliquote e lasciato evaporare a temperatura ambiente; il peptide essiccato ottenuto può essere usato immediatamente o conservato a -80°C. Prima del processo di aggregazione, i peptidi trattati con HFIP sono stati solubilizzati in dimetilsolfossido (DMSO) alla Cf di 5 mM e diluiti alla

concentrazione di aggregazione (100 μM) con PBS 0.01 M pH 7.4, quindi incubati a 37°C, da soli o in presenza di metalli in rapporto 1:1.

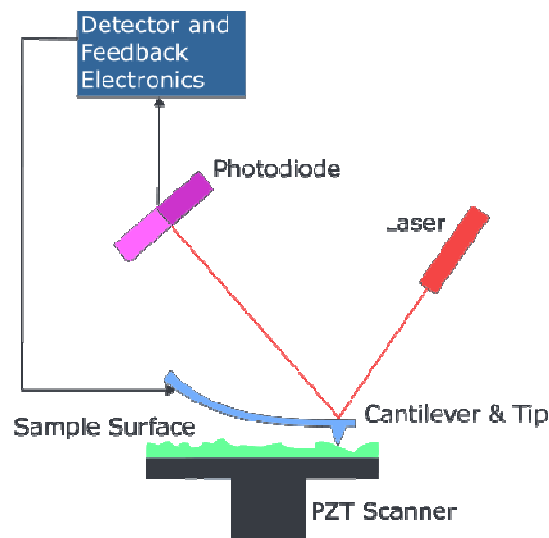
Analisi dell'aggregazione mediante tioflavina T

Il grado di aggregazione dei peptidi è stato determinato misurando la fluorescenza prodotta dalla Tioflavina T (Th-T) (LeVine III, 1993) che lega specificamente molecole con struttura β -sheet. In soluzione acquosa ha un picco di emissione di fluorescenza a 430 nm se eccitato a 342 nm; in presenza di fibrille lo spettro di emissione si sposta verso il rosso con un picco a 482 nm se eccitato a 450. La Th-T (3 μM) è stata incubata con i peptidi (5 $\mu\text{g/ml}$) in assenza di luce per 10 minuti. La successiva misura della fluorescenza a 450/482 nm (ex/em) ha permesso di verificare l'eventuale presenza di aggregati con strutture β -sheet.

Analisi dell'aggregazione mediante microscopia a forza atomica (AFM)

La microscopia a forza atomica (AFM) o scanning force microscopy (SFM) è un tipo di microscopia a scansione ad alta risoluzione, dimostrata nell'ordine di frazione di nanometro; è uno degli strumenti principali di acquisizione di immagini, misurazioni e manipolazione di sostanze in nanoscala. L'informazione viene acquisita mediante scansione della superficie con una sonda meccanica, come un elemento piezoelettrico che consente movimenti precisi. Il microscopio AFM consiste di un supporto con una punta sottile (sonda) alla sua estremità, usata per esaminare la superficie. Il supporto è tipicamente di silicone o nitrato di silicone con un raggio di curvatura dell'ordine del nanometro. Quando la punta viene portata in prossimità della superficie del campione, le forze che si instaurano tra la punta ed il campione portano alla deviazione del supporto. A seconda della situazione, le forze misurate con AFM includono: forze di contatto meccanico, di Van der Waals, legame chimico, forze elettrostatiche, magnetiche, ecc. Tipicamente, la

deviazione viene misurata con uno spot laser riflesso dalla superficie superiore del supporto verso un sistema di fotodiodi.



Saggio ELISA

La presenza di oligomeri nei campioni dei peptidi è stata determinata mediante tecnica ELISA con l'anticorpo A11 (Invitrogen) specifico per il riconoscimento di forme oligomeriche, ma non monomeriche o fibrillari, dei polipeptidi amiloidogenici. L'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) è una tecnica immunoenzimatica che sfrutta la specificità della reazione antigene-anticorpo per il riconoscimento di determinate sostanze depositate sul fondo di un pozzetto; l'anticorpo è legato ad un enzima e, nel passaggio finale, viene aggiunta una sostanza contenente il substrato adatto. La conseguente reazione produce un segnale misurabile, molto comunemente un cambiamento di colore nel substrato. Una quantità minima di peptide (5 ng), preparato fresco o incubato a 37° (100 μ M in PBS), è stata depositata nei pozzetti di una multiwell da 96 in presenza di coating buffer; dopo trattamento con anticorpo primario (A11, 1 μ g/ml), anticorpo secondario HRP-coniugato e substrato per HRP (TMB), è stata misurata l'assorbanza a 450 nm utilizzando un lettore di piastre a micropozzetti.

Trattamento delle colture cellulari

Allo scopo di valutare la citotossicità prodotta dai peptidi, le colture cellulari di neuroblastoma sono state trattate per 24-48 ore con le diverse preparazioni di peptide. Per determinare il contributo di alcuni recettori specifici alla tossicità indotta da A β ed hA, le cellule sono state pre-incubate per 2 ore in presenza di inibitori o anticorpi e quindi incubate con i peptidi.

Saggio MTT

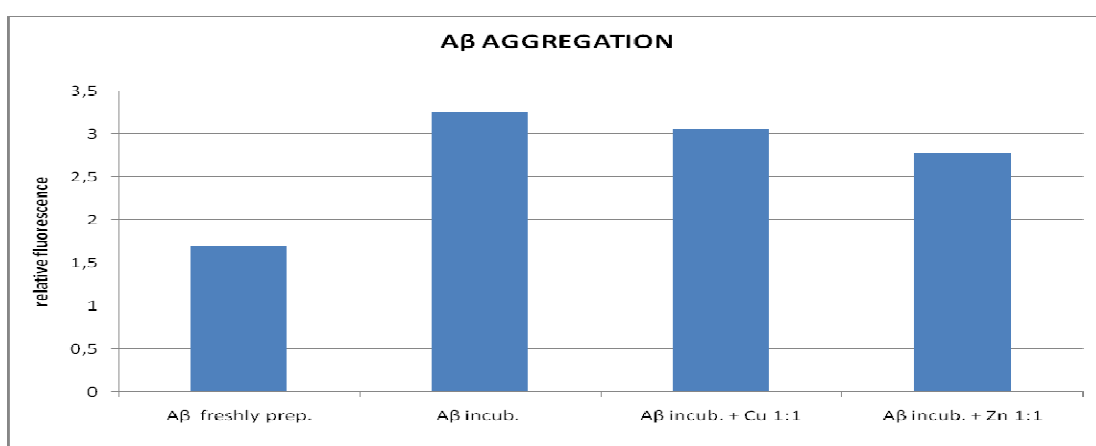
La valutazione della tossicità dei peptidi è stata effettuata attraverso la determinazione della vitalità delle cellule in coltura, nei trattati rispetto ai controlli, mediante il saggio dell'MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], che si avvale della capacità degli enzimi mitocondriali, citocromo c ossidasi e succinato deidrogenasi, di scindere l'anello tetrazolico della molecola dell'MTT colorata in giallo per dare un sale di formazano dal colore violetto che, non essendo in grado di attraversare la membrana plasmatica, si accumulerà all'interno delle cellule vitali presenti in coltura. Utilizzando un opportuno detergente si ottengono dei lisati colorati in violetto in misura proporzionale alla quantità di formazano prodotta e di conseguenza alla vitalità delle cellule.

Le cellule sono state quindi incubate per due ore a 37°C con una soluzione di MTT (1 mg/ml). I cristalli formati sono stati solubilizzati con dimetilsolfossido per poi procedere a lettura dell'assorbanza a 569 nm, utilizzando un lettore di piastre a micropozzetti.

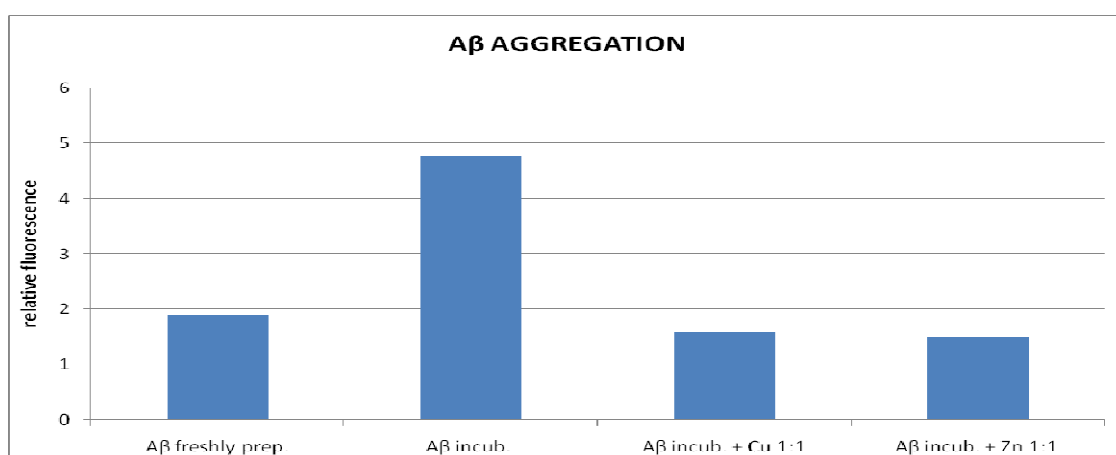
RISULTATI

Analisi dell'aggregazione del peptide $A\beta_{1-42}$

Al fine di valutare lo stato di aggregazione e l'influenza dei metalli nella cinetica di tale processo, le diverse preparazioni del peptide $A\beta_{1-42}$, fresco ed incubato a 37°C in presenza o meno di metalli, sono state analizzate mediante il saggio della Th-T, che consente di individuare le eventuali strutture β -sheet presenti. Si è riscontrato un aumento della fluorescenza prodotta dai campioni incubati rispetto al controllo (peptide preparato fresco).

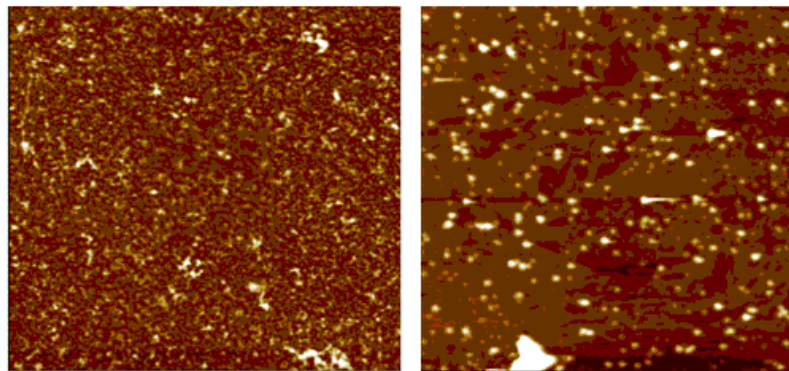


Saggio Th-T su campioni di $A\beta_{1-42}$ preparati alla concentrazione finale di 100 μ M in PBS 0.01 M ed incubati a 37°C per 72 ore. Il rame e lo zinco sono in rapporto di concentrazione 1:1 con il peptide.



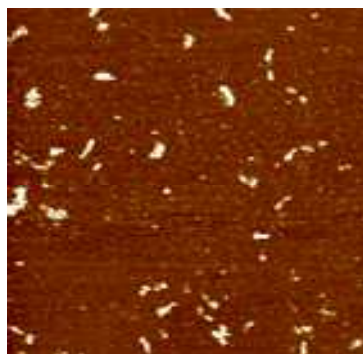
Saggio Th-T su campioni di $A\beta_{1-42}$ preparati alla concentrazione finale di 100 μ M in PBS 0.01 M ed incubati a 37°C per 144 ore. Il rame e lo zinco sono in rapporto di concentrazione 1:1 con il peptide.

Ciò sta ad indicare che il peptide, dopo l'incubazione a 37°C, forma aggregati solubili che danno un segnale di fluorescenza elevato rispetto al controllo (ThT-positivi); con l'aumentare del tempo di incubazione, si può ipotizzare che la presenza di Cu^{2+} e Zn^{2+} nei campioni favorisca la disgregazione degli aggregati formatisi spontaneamente o la formazione di aggregati insolubili, che non generano un segnale di fluorescenza elevato (ThT-negativi). Dato che le misure del grado di aggregazione con il metodo della Th-T non forniscono informazioni circa la struttura degli aggregati, i campioni di peptide sono stati analizzati tramite microscopia AFM. Il peptide $\text{A}\beta_{1-42}$ preparato fresco si presenta ricco in oligomeri; dopo incubazione per 72 ore a 37°C è possibile riscontrare la presenza di aggregati solubili (ThT-positivi).



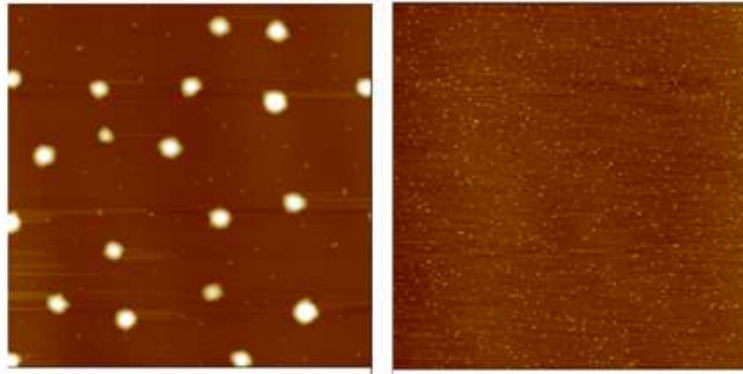
AFM di $\text{A}\beta_{1-42}$ 15 μM fresco ed incubato 72 ore in PBS 0.01 M

Il peptide incubato per 144 ore forma fibrille non ramificate (solubili), come evoluzione dei piccoli aggregati che si osservano nel campione incubato solo 72 h.



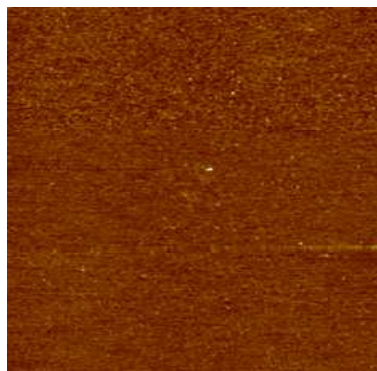
AFM di $\text{A}\beta_{1-42}$ 15 μM incubato 144 ore in PBS 0.01 M

In presenza di Cu^{2+} , a 72 h di incubazione a 37° , è possibile individuare grossi e numerosi aggregati globulari, mentre in presenza di Zn^{2+} si formano solo strutture oligomeriche di piccole dimensioni. In entrambi i casi non si distinguono strutture fibrillari organizzate.



AFM di $\text{A}\beta_{1-42}$ 15 μM incubato 72 ore in PBS 0.01 M in presenza di Cu^{2+} e Zn^{2+} 15 μM

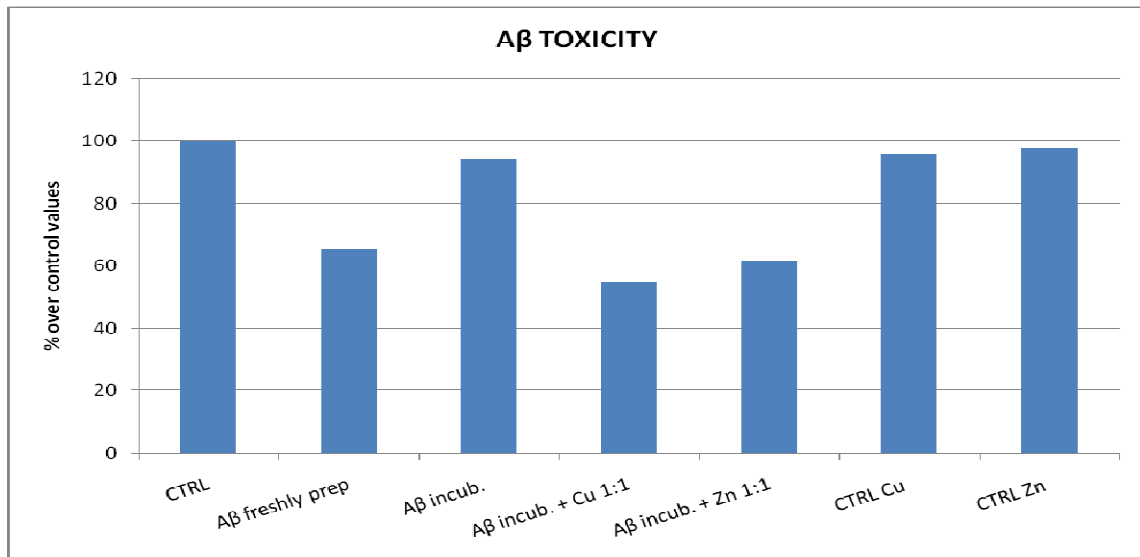
Dopo 144 ore di incubazione in presenza di rame, permane l'assenza di fibrille e non si distinguono più grossi aggregati globulari ma solo piccole strutture che non producono variazioni significative del segnale di fluorescenza della ThT. Si potrebbero quindi formulare due ipotesi: 1) scomparsa (disgregazione?) delle strutture precedentemente osservate ; 2) massiccia precipitazione di macroaggregati (che non danno segnali ThT positivi) i quali sfuggono nella preparazione dei campioni per l'analisi in AFM.



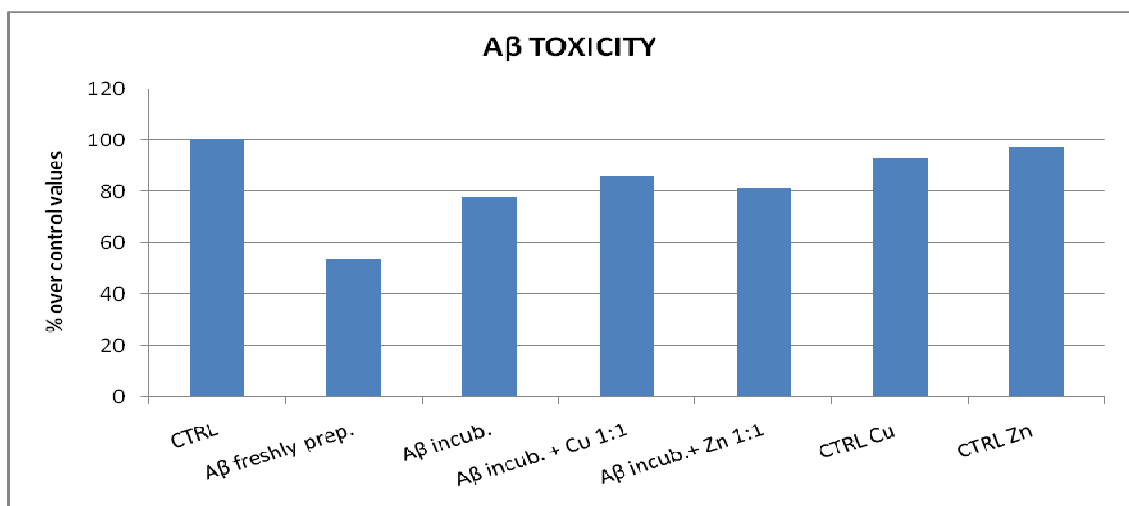
AFM di $\text{A}\beta_{1-42}$ 15 μM incubato 144 ore in PBS 0.01 M in presenza di Cu^{2+} 15 μM .

Analisi della tossicità del peptide $A\beta_{1-42}$

Per effettuare una correlazione fra lo stato di aggregazione/oligomerizzazione e la tossicità del peptide, colture cellulari di neuroblastoma sono state trattate con diverse preparazioni di $A\beta_{1-42}$.



Saggio dell'MTT dopo trattamento con $A\beta_{1-42}$ (15 μ M), fresco ed incubato 72 h a 37° in presenza di rame e zinco (15 μ M), su colture cellulari di neuroblastoma.



Saggio dell'MTT dopo trattamento con $A\beta_{1-42}$ (15 μ M), fresco ed incubato 96 h a 37° in presenza di rame e zinco (15 μ M), su colture cellulari di neuroblastoma.

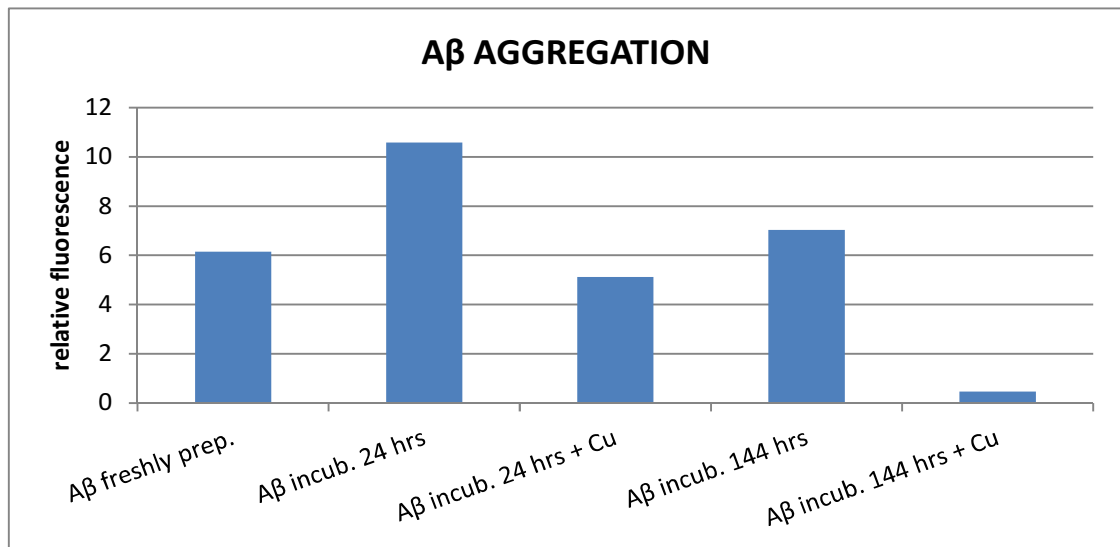
I dati ottenuti dopo trattamento delle cellule di neuroblastoma con le differenti preparazioni di $A\beta_{1-42}$ hanno mostrato un abbassamento della capacità di

riduzione dell'MTT rispetto ai controlli, quindi minore vitalità sia delle cellule trattate con il peptide fresco che di quelle esposte al peptide incubato in presenza dei metalli in rapporto (1:1), mentre il campione incubato da solo non influenza particolarmente la vitalità cellulare. In accordo con quanto già osservato nel saggio di aggregazione tramite ThT, è possibile ipotizzare una normale evoluzione del processo di aggregazione che si conclude con la formazione di strutture non tossiche sulle cellule in coltura (SH-SY5Y). Tale fenomeno subisce un'alterazione in presenza dei metalli che, modificando la struttura degli aggregati, causano un rallentamento dell'evoluzione verso le strutture non tossiche. In particolare, la tossicità del peptide incubato con metallo è particolarmente evidente entro le 72 ore di incubazione prima del trattamento delle colture, a differenza del peptide incubato da solo che sembra perdere tale caratteristica molto rapidamente. Tale osservazione è confermata dal fatto che, dopo un tempo di incubazione più lungo, anche in presenza di metalli si raggiungono stati di aggregazione non tossici. In qualche modo, anche il preparato fresco del peptide ha influenzato negativamente la vitalità cellulare; tale tossicità è dovuta alla presenza di oligomeri tossici solubili, come già evidenziato dalle analisi in microscopia AFM.

Analisi dell'aggregazione e della tossicità del peptide A β ₂₅₋₃₅

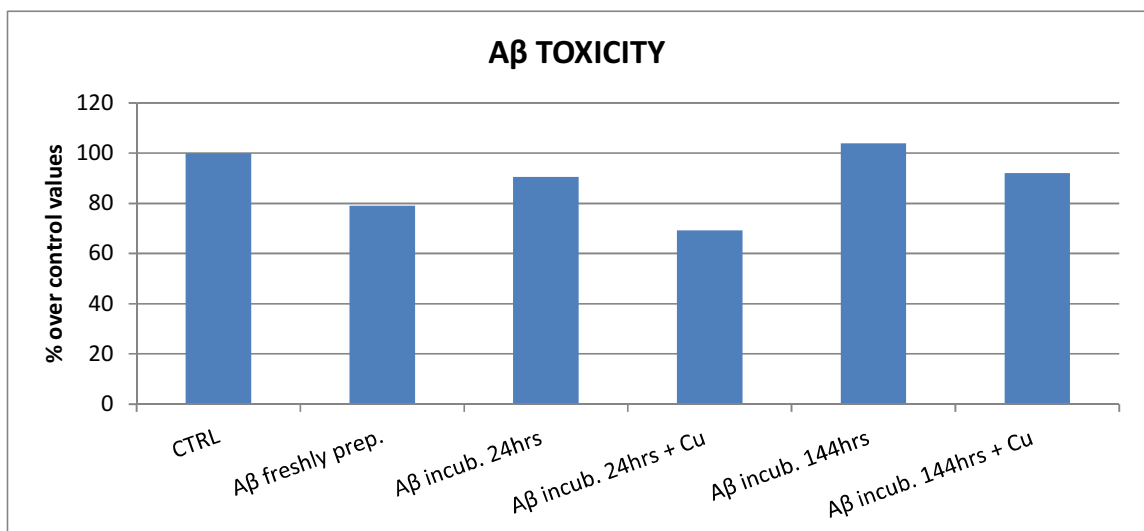
Anche per il peptide 25-35 della β -amiloide lo stato di aggregazione è stato misurato mediante il saggio della Th-T. Si è riscontrato un aumento della fluorescenza prodotta soprattutto dal campione incubato in assenza di metallo rispetto al controllo (peptide preparato fresco). Dopo l'incubazione a 37°C, il peptide forma aggregati solubili (ThT-positivi) che tendono a perdere la loro caratteristica di solubilità con l'aumentare del tempo di incubazione, riportando i valori di fluorescenza ad un livello paragonabile a quello del controllo; la presenza di Cu²⁺ durante il tempo di incubazione favorisce la

formazione di aggregati insolubili (ThT-negativi) o la disgregazione di quelli formatisi spontaneamente.



Saggio Th-T su campioni di Aβ₂₅₋₃₅ preparati alla concentrazione finale di 100 μM in PBS 0.01 M ed incubati a 37°C per 24-144 ore. Il rame è in rapporto di concentrazione 1:1 con il peptide.

Per effettuare una correlazione fra lo stato di aggregazione e la tossicità, colture cellulari di neuroblastoma sono state trattate con diverse preparazioni di Aβ₂₅₋₃₅.

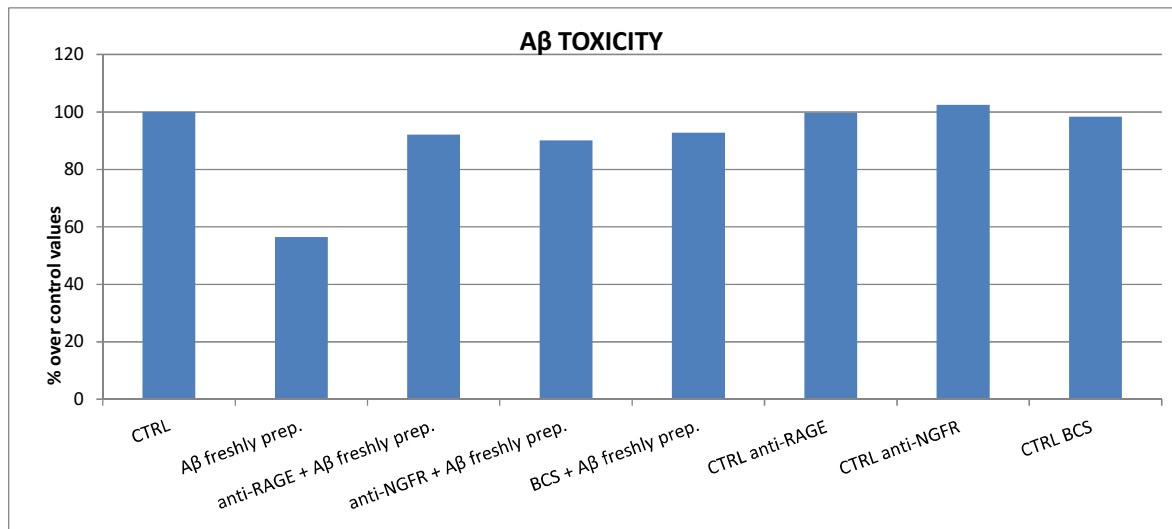


Saggio dell'MTT dopo trattamento con Aβ₂₅₋₃₅ (3 μM), fresco ed incubato 24-144 h a 37° in presenza di rame (3 μM), su colture cellulari di neuroblastoma.

I dati ottenuti hanno mostrato minore vitalità nelle cellule trattate con il peptide fresco ed, in misura maggiore, in quelle esposte al peptide incubato per 24 ore in presenza di rame in rapporto 1:1; il campione incubato da solo, invece, non influenza particolarmente la vitalità cellulare. Ad un tempo di incubazione più lungo (144 ore), la tossicità diminuisce per entrambi i peptidi, sia in presenza che in assenza di rame. In accordo con quanto già osservato nel saggio di aggregazione tramite ThT, è possibile ipotizzare una normale evoluzione del processo di aggregazione che si conclude con la formazione di strutture non tossiche. Tale fenomeno subisce un'alterazione in presenza dei metalli che, modificando la struttura degli aggregati, causano un rallentamento dell'evoluzione verso le strutture non tossiche. In particolare, la tossicità del peptide incubato con metallo è particolarmente evidente entro le 24 ore di incubazione prima del trattamento delle colture, a differenza del peptide incubato da solo che sembra perdere tale caratteristica molto rapidamente. Tale osservazione è confermata dal fatto che, dopo un tempo di incubazione più lungo, anche in presenza di metalli si raggiungono stati di aggregazione non tossici. Anche il preparato fresco del peptide influenza negativamente la vitalità cellulare, probabilmente a causa della presenza di oligomeri tossici solubili che si vengono a formare durante il tempo di trattamento delle colture a 37°C.

Il trattamento delle colture cellulari con le diverse preparazioni di A β ha avuto lo scopo di creare quelle condizioni di stress cellulare che probabilmente si verificano durante la patogenesi dell'AD. Quindi, sono stati valutati i possibili effetti protettivi e le probabili vie di danno cellulare trattando le cellule in presenza di diversi composti quali: anticorpo anti-RAGE, anticorpo anti-p75 (NGFR) ed il chelante batocupreina (BCS). Il pre-trattamento con gli anticorpi anti-RAGE ed anti-p75 e con la batocupreina ha determinato un effetto protettivo nei confronti del trattamento con il peptide

A β , misurato come capacità di riduzione dell'MTT, nelle colture cellulari SHSY5Y trattate con il peptide fresco.



Saggio dell'MTT dopo trattamento con A β_{25-35} (3 μ M) fresco, in seguito a pretrattamento (2 ore) con anticorpi (2.5 μ g/ml) e batocupreina (50 μ M), su colture cellulari di neuroblastoma.

L'interazione RAGE–ligando può indurre direttamente la generazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) via NADPH ossidasi e/o altri meccanismi (Lander, H.M. et al., 1997; Wautier, M.P. et al., 2001). Il pre-trattamento con l'anticorpo anti-RAGE ha ridotto la tossicità indotta dal peptide dimostrando l'importanza del recettore nella mediazione del danno cellulare osservato (Lue, L.F. et al., 2005).

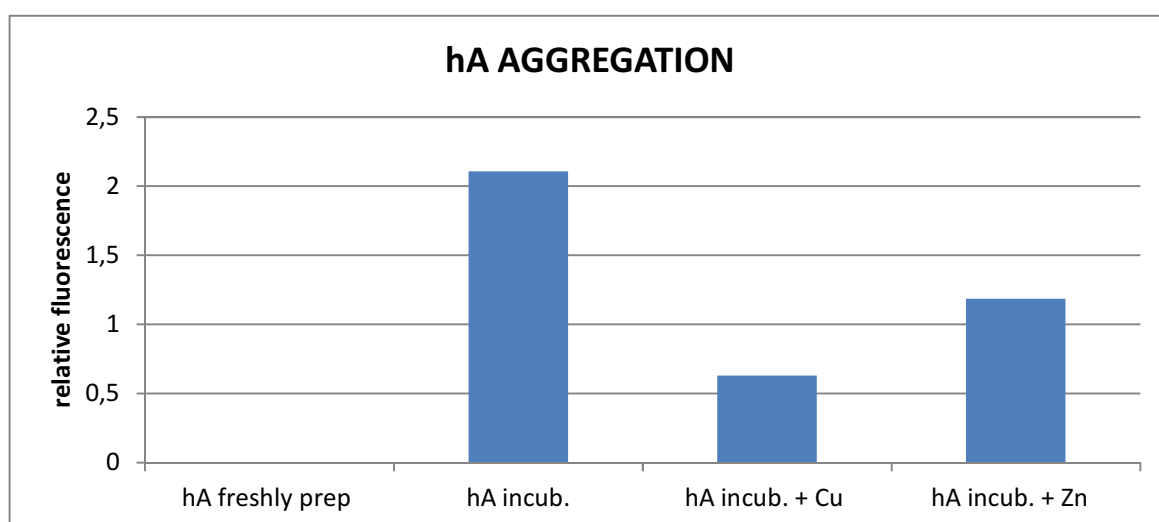
L'A β è anche un ligando del recettore p75 (Davies A.M., 2003). È stato dimostrato che le catene A β , in particolare le sequenze aminoacidiche che comprendono i residui 29-35, legano p75 causando neurotossicità (Coulson E.J., 2006) ed apoptosi (Yaar, M. et al., 1997; Maloney, M.T., et al., 2005), attraverso il meccanismo di trasduzione del segnale del dominio di morte intracellulare del recettore (Hashimoto, Y. et al, 2004). Il dominio di morte attiva G₀ provocando la fosforilazione di JNK (Coulson E.J., 2006; Hashimoto, Y. et al, 2004). Il pre-trattamento con l'anticorpo anti-p75 ha

ridotto la tossicità indotta dal peptide, dimostrando quindi il coinvolgimento del recettore nella mediazione della risposta tossica osservata.

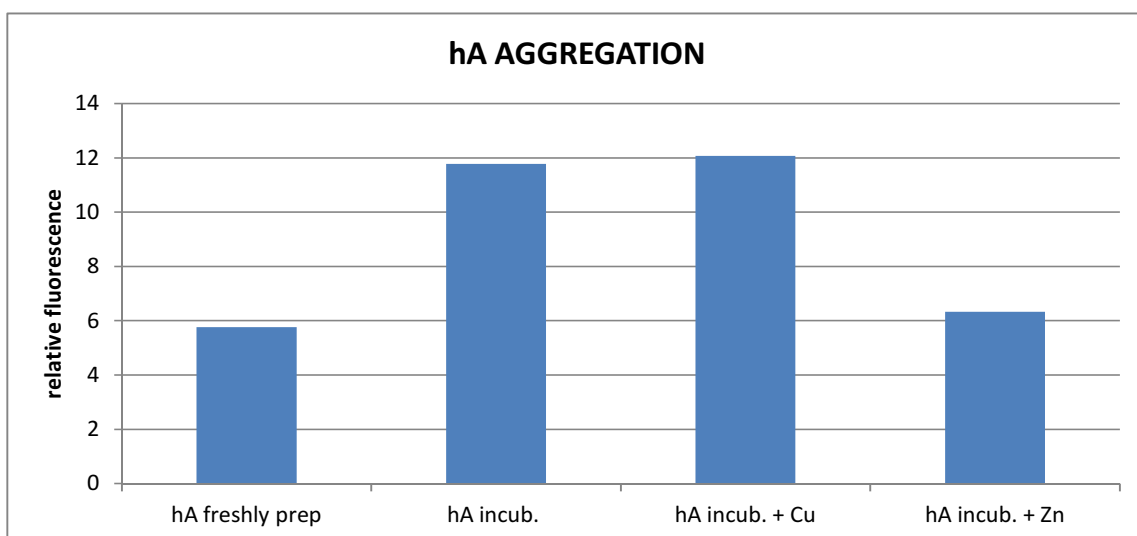
I chelanti, in particolare quelli per rame e zinco, possono dissociare gli aggregati che si formano per interazione con i metalli (Cherny et al.,1999), tra cui anche quelli intrinseci alla struttura degli aggregati che si osservano nel cervello umano. La batocupreina, un potente chelante del Cu (I), solubilizza gli aggregati di A β , rendendoli non tossici, in maniera dose-dipendente. Il pre-trattamento con BCS ha ridotto la tossicità indotta dal peptide, dimostrando quindi l'azione solubilizzante di questo chelante nei confronti delle strutture aggregate del peptide, tipicamente tossiche per le cellule in coltura (Cherny et al.,1999).

Analisi dell'aggregazione del peptide hA₁₇₋₂₉

Prendendo in considerazione le caratteristiche amiloidogeniche dell'amilina umana, è stato effettuato uno studio della cinetica di aggregazione del peptide hA₁₇₋₂₉, incubato da solo o in presenza di metalli, per verificare le analogie di comportamento con l'A β e l'influenza dei metalli in tale processo.

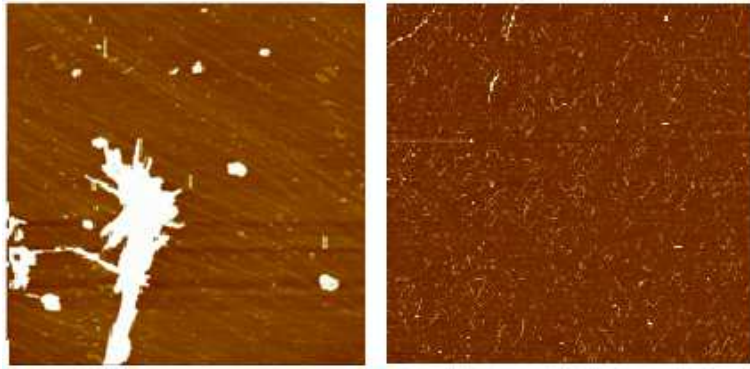


Saggio Th-T su campioni di hA₁₇₋₂₉ preparati alla concentrazione finale di 100 μ M in PBS 0.01 M ed incubati a 37°C per 24 ore. Il rame e lo zinco sono in rapporto di concentrazione 1:1 con il peptide.



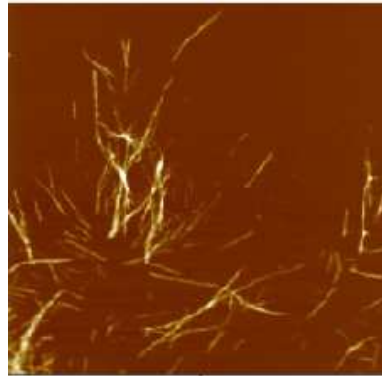
Saggio Th-T su campioni di hA₁₇₋₂₉ preparati alla concentrazione finale di 100 μ M in PBS 0.01 M ed incubati a 37°C per 120 ore. Il rame e lo zinco sono in rapporto di concentrazione 1:1 con il peptide.

Lo stato di aggregazione del peptide è stato misurato mediante il metodo della Th-T. Dopo 24 ore di incubazione si è riscontrato un aumento della fluorescenza prodotta in particolare dal campione incubato da solo rispetto al controllo (peptide preparato fresco); il peptide incubato in presenza di Cu²⁺ o di Zn²⁺ mostra una minore intensità di fluorescenza, a dimostrazione dell'azione di contrasto del metallo durante la fibrillogenesi. Come evoluzione del processo di aggregazione, dopo 120 ore di incubazione è possibile osservare un aumento dell'intensità di fluorescenza anche per il campione incubato in presenza di rame o di zinco. Per avere informazioni circa la struttura degli aggregati dopo un tempo di incubazione di 72 ore a 37°C, i campioni di peptide sono stati analizzati tramite microscopia AFM. Nel campione di hA incubato da solo, si osserva la formazione sia di grossi depositi fibrillari rigidi che di fasci di fibrille sottili; il peptide incubato con rame presenta invece solo numerosi aggregati corti e sottili.



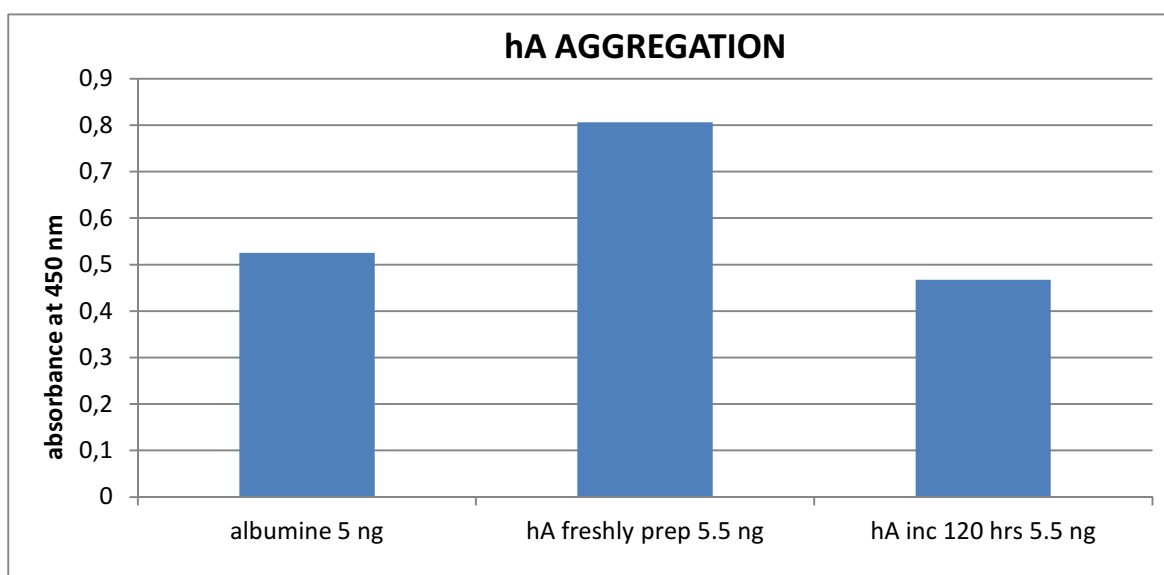
AFM di hA₁₇₋₂₉ 100 μ M incubato da solo e con CuSO₄ per 72 h a 37°C.

La presenza di Zn²⁺ durante il tempo di incubazione porta alla formazione di aggregati fibrillari di varia lunghezza, sottili e non ramificati.



AFM di hA₁₇₋₂₉ 100 μ M incubato con ZnSO₄ 100 μ M

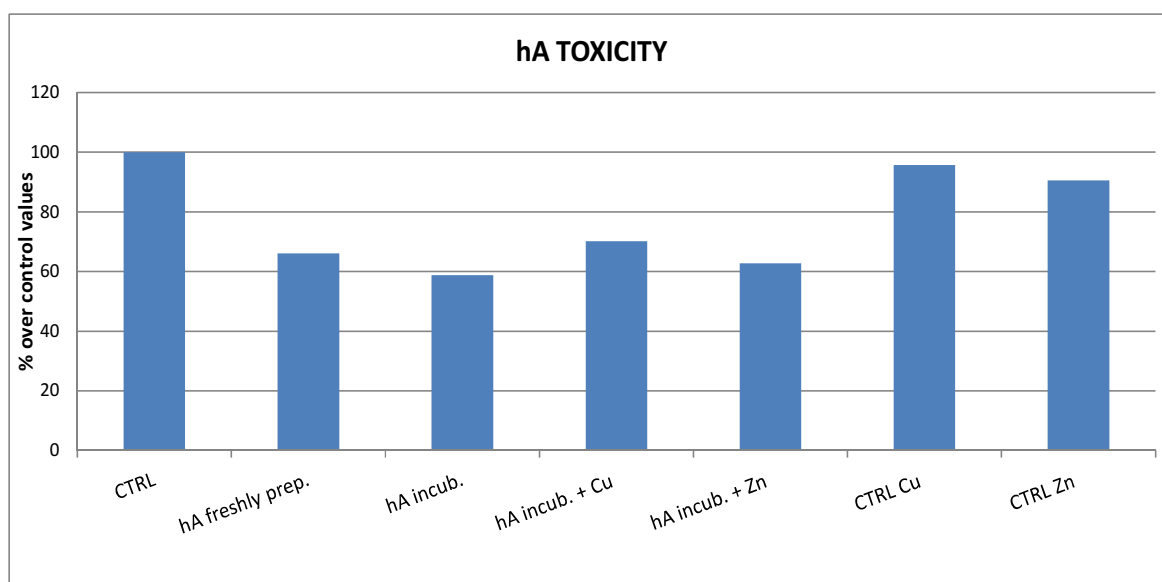
Al fine di verificare come cambia il contenuto in oligomeri durante il tempo di incubazione a 37°C, i campioni di peptide sono stati analizzati mediante saggio ELISA con anticorpo A11, specifico per gli oligomeri. Il contenuto in specie oligomeriche è particolarmente elevato nel campione preparato fresco; dopo incubazione a 37°C per un tempo prolungato (120 ore), il peptide perde invece la sua forma oligomerica, in seguito all'evoluzione del normale processo di aggregazione che porta alla formazione di strutture fibrillari.



Saggio ELISA con anticorpo A11 (1 $\mu\text{g/ml}$) su campioni di hA₁₇₋₂₉ fresco ed incubato (100 μM in PBS 0.01 M) 120 ore a 37°C.

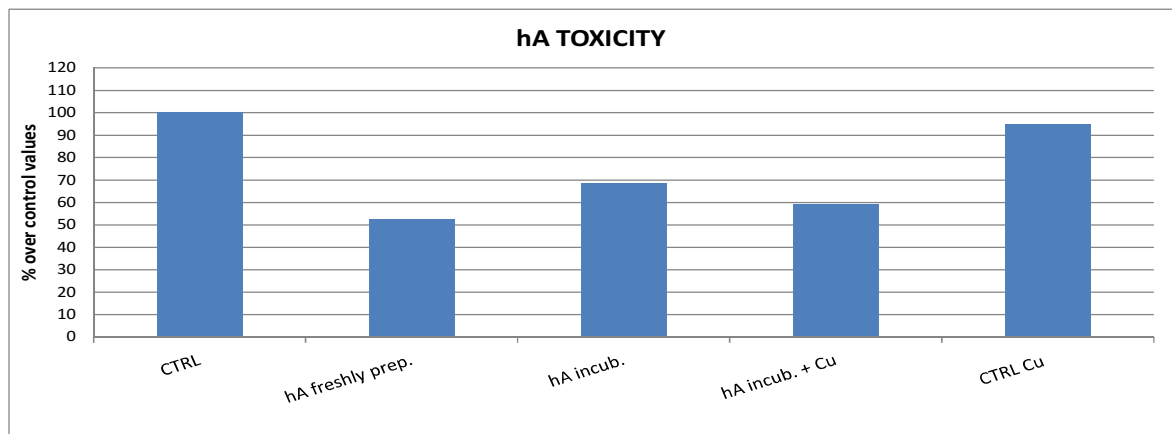
Analisi della tossicità del peptide hA₁₇₋₂₉

Per effettuare una correlazione fra lo stato di aggregazione e la tossicità, colture cellulari di neuroblastoma sono state trattate con diverse preparazioni di hA₁₇₋₂₉ preventivamente incubato con Cu²⁺ e Zn²⁺ in rapporto 1:1.



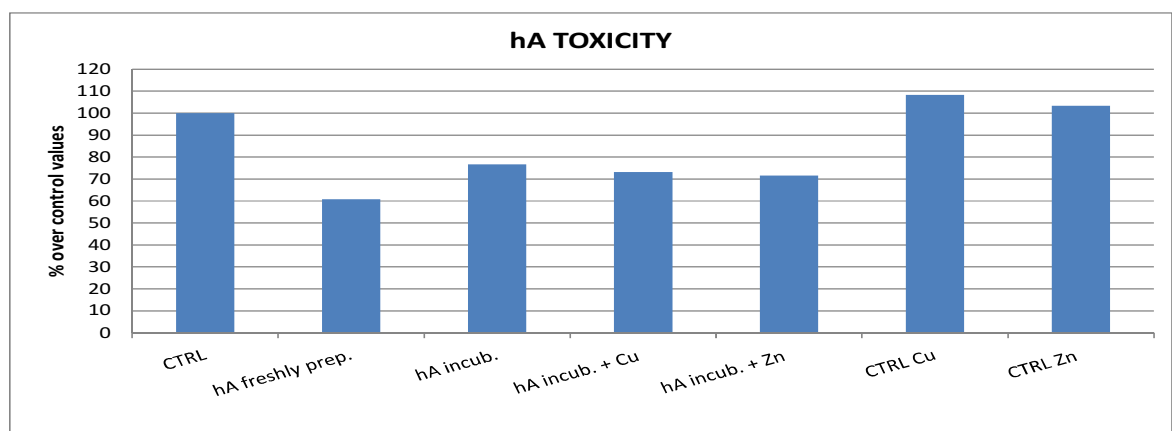
Saggio dell'MTT su colture cellulari di neuroblastoma dopo trattamento con hA₁₇₋₂₉ (25 μM), fresco ed incubato 2 h a 37°C in presenza di rame e zinco in rapporto 1:1 con il peptide.

La pre-incubazione dell'amilina con zinco determina la formazione di strutture con una tossicità sulle colture cellulari paragonabile a quella causata dal peptide incubato con rame. La tossicità del peptide incubato da solo si deve al breve tempo di pre-incubazione (2 ore) e quindi alla presenza in coltura di oligomeri tossici, presenti anche nel peptide preparato fresco.



Saggio dell'MTT su colture cellulari di neuroblastoma dopo trattamento con hA₁₇₋₂₉ (25 µM), fresco ed incubato 24 h a 37°C in presenza di rame in rapporto 1:1 con il peptide.

Con l'aumentare del tempo di pre-incubazione dell'amilina, è possibile constatare una graduale diminuzione della tossicità del peptide incubato da solo, mentre si mantiene elevata quella causata dal peptide incubato in presenza del metallo, segno della formazione di una specie oligomerica tossica favorita dal rame.



Saggio dell'MTT su colture cellulari di neuroblastoma dopo trattamento con hA₁₇₋₂₉ (25 µM), fresco ed incubato 120 h a 37°C in presenza di rame e zinco in rapporto 1:1 con il peptide.

Ad un tempo di pre-incubazione ancora più lungo (120 ore) corrisponde un'ulteriore diminuzione della tossicità sulle colture di neuroblastoma trattate con il peptide incubato da solo; nelle colture trattate con il peptide pre-incubato con rame e zinco si riscontra una graduale diminuzione della tossicità, segno dell'evoluzione degli oligomeri tossici verso una forma fibrillare insolubile e quindi non tossica.

DISCUSSIONE

I dati ottenuti mostrano come i peptidi hA₁₇₋₂₉, A β ₁₋₄₂ e A β ₂₅₋₃₅, dopo incubazione a 37°C, formino spontaneamente aggregati fibrillari o amorfi; in presenza di rame e zinco il fenomeno subisce delle modifiche, soprattutto nei cambiamenti da una forma all'altra, legate al tempo di incubazione. Queste modificazioni possono essere correlate al grado di tossicità misurato dopo il trattamento di colture cellulari di neuroblastoma (SHSY5Y).

L'aumento della tossicità cellulare indotto dal pretrattamento con rame e zinco può essere interpretato con un rallentamento dell'evoluzione verso le strutture non tossiche ed una conseguente stabilizzazione degli aggregati oligomerici, notoriamente più tossici rispetto alle forme fibrillari.

In passato, il coinvolgimento del peptide A β nell'AD veniva interpretato principalmente mediante l'ipotesi della "cascata amiloidea", secondo la quale la sovrapproduzione dell'A β e la sua aggregazione in placche senili costituiscono la causa fondamentale della malattia (Hardy, J. et Allsop, D., 1991.). Molte manifestazioni cliniche non possono essere però interamente spiegate dall'ipotesi amiloidea tradizionale; per esempio, non vi è una perfetta correlazione tra numero, tempi o distribuzione delle placche amiloidi ed i parametri della patologia, quali il grado di demenza e la neurodegenerazione (Hardy, J. et Gwinn-Hardy, K., 1998); al contrario, le concentrazioni di oligomeri solubili nel cervello sono altamente correlate con la gravità del

morbo (McLean, C.A. et al., 1999) ed inoltre sono stati dimostrati effetti tossici per le forme non fibrillari del peptide A β (Lambert, M.P. et al., 2001; Wang, H.W. et al., 2002). In più, svariate evidenze sperimentali dimostrano che la forma oligomerica dell'A β riduce la vitalità cellulare circa 10 volte di più rispetto alla specie fibrillare (Dalhgren, K.N. et al., 2002). Il trattamento delle colture cellulari di neuroblastoma con le preparazioni del peptide ha condotto ad una diminuzione della vitalità; questi dati sono in accordo con quelli riportati in letteratura secondo cui la forma oligomerica del peptide β -amiloide possiede proprietà neurotossiche (Walsh, D.M. et al., 2002; Lambert, M.P. et al., 1998). Inoltre, il trattamento con il peptide incubato in presenza di metalli risulta essere più tossico nel tempo, grazie ad un'azione oligomero-stabilizzante degli stessi metalli, che rallentano l'evoluzione degli aggregati verso le forme fibrillari non tossiche. In accordo con i dati di letteratura precedentemente mostrati, il pretrattamento delle colture con gli anticorpi anti-RAGE ed anti-p75 ha dimostrato il coinvolgimento di questi recettori nella tossicità indotta da A β , così come l'utilizzo del chelante batocupreina ha dato luogo ad un effetto protettivo dovuto alla sua capacità di solubilizzare le specie tossiche.

I dati ottenuti utilizzando il peptide dell'amilina umana sono in accordo con altri studi secondo cui, ad esempio, la citotossicità di questo sarebbe mediata dalla sua interazione con il Cu²⁺ (Masad et al., 2007). La donazione di elettroni da parte dell'amilina agli ioni Cu²⁺ potrebbe portare alla formazione di complessi Cu⁺-peptide, che si possono formare anche direttamente attraverso il legame del peptide agli ioni Cu⁺. Il complesso Cu⁺-peptide potrebbe stimolare la formazione di H₂O₂ a partire da O₂ con conseguente ritorno del Cu⁺ allo stato di ossidazione superiore Cu²⁺. Questo meccanismo potrebbe ripetersi ciclicamente dando luogo alla generazione di radicali idrossilici a partire dall'H₂O₂ tramite reazione di Fenton.

Il legame con ioni metallici influenza l'aggregazione, causando un cambiamento nella velocità della precipitazione e della fibrillogenesi, una variazione della tossicità degli aggregati amiloidi ed alterazioni nella morfologia finale degli stessi aggregati (Noy et al. 2008). Grazie alla scoperta dell'elevata concentrazione di ioni metallici nei depositi amiloidi, lo studio della loro disomeostasi è quindi di importanza rilevante nella comprensione del meccanismo di tossicità. Le conseguenze tossiche dell'interazione tra metallo e peptidi amiloidi potrebbero quindi essere evitate mediante la comprensione del ruolo dei trasportatori dei metalli in tale processo.

I peptidi A β ed hA, nonostante la scarsa somiglianza nella loro struttura primaria, condividono diverse caratteristiche tra cui la capacità di assumere conformazioni secondarie simili e formare aggregati proteici insolubili, rispettivamente nel cervello e nelle isole pancreatiche. Inoltre, diverse evidenze sperimentali lasciano pensare ad un meccanismo di tossicità comune, tra questi: la capacità di un antagonista del recettore dell'amilina (AC187) di bloccare la tossicità indotta da A β (Jhamandas et al. 2003); l'incremento indotto da entrambi i peptidi nei livelli di APP, la proteina precursore dell'amiloide, in colture neuronali ed astrocitarie (White et al. 2003); il coinvolgimento della via di trasduzione del segnale dell'integrina nella neurotossicità indotta sia da A β che da hA (Wright et al. 2007); la capacità di entrambi i peptidi di causare disfunzione mitocondriale e stress ossidativo e la conseguente risposta delle cellule alle proteine con ripiegamento anomalo (unfolded protein response) (Song et al. 2008; David et al. 2006). Un'ulteriore prova a sostegno dell'ipotesi di un meccanismo comune di citotossicità potrebbe essere fornita dal riconoscimento degli oligomeri (e non delle forme fibrillari), sia di A β che di hA, da parte dell'anticorpo A11; ciò farebbe supporre un motivo strutturale comune e quindi una possibile via verso la comprensione di un meccanismo generale di

tossicità nelle patologie caratterizzate da misfolding proteico (Kayed et al. 2003).

Tramite uno studio comparativo dell'aggregazione e della tossicità dei due peptidi, si potrebbero quindi identificare i recettori e/o le vie di trasduzione comuni coinvolti nei meccanismi di tossicità e, conseguentemente, aprire la strada allo sviluppo di efficaci strategie di trattamento per morbo di Alzheimer e diabete mellito di tipo 2.

INDEX

Introduction	page 49
• <i>Neurodegeneration and metals</i>	page 49
• <i>Metals and oxidative stress</i>	page 53
• <i>APP and β-amyloid peptide</i>	page 55
• <i>Fibrillogenesis</i>	page 61
• <i>Metals and $A\beta$ proteins</i>	page 62
• <i>Role of RAGE and p75 in the pathogenesis of AD</i>	page 64
• <i>Therapeutics targeting of metal ions in AD</i>	page 67
• <i>Protein conformation disorders: β-amyloid and amylin</i>	page 69
Materials and methods	page 72
• <i>Human neuroblastoma cell line (SHSY5Y) culture</i>	page 72
• <i>hA_{17-29}, $A\beta_{1-42}$ and $A\beta_{25-35}$ peptides preparation</i>	page 73
• <i>Analysis of aggregation by Thioflavin T (ThT) Assay</i>	page 73
• <i>Analysis of aggregation by Atomic Force Microscopy (AFM)</i>	page 74
• <i>ELISA Assay</i>	page 75
• <i>Treatment of cell culture</i>	page 75
• <i>MTT Assay</i>	page 76
Results	page 77
• <i>Aggregation analysis of $A\beta_{1-42}$ peptide</i>	page 77
• <i>Toxicity analysis of $A\beta_{1-42}$ peptide</i>	page 80
• <i>Aggregation and toxicity analysis of $A\beta_{25-35}$ peptide</i>	page 81
• <i>Aggregation analysis of hA_{17-29} peptide</i>	page 85
• <i>Toxicity analysis of hA_{17-29} peptide</i>	page 88
Discussion	page 90
Bibliography	page 93

INTRODUCTION

Neurodegeneration and metals

Neurodegenerative processes are characterized by a progressive neuronal cell death, due to several factors: genetic, environmental (metals, infections), biological (protein aggregation, accumulation and conformational changes), metabolic (oxidative stress), autoimmune or age related. It is possible to distinguish two kinds of neurodegenerative diseases: pathologies with accumulation of abnormal proteic components (AD, PD, Huntington disease) responsible of the age-related neuronal loss, and pathologies with neuronal dysfunction or degeneration (multiple sclerosis).

Metals can be classified as either toxicological or biochemically functional. Toxicological metals, such as mercury, cadmium, lead and aluminium, have no known normal biological function and are detrimental to any organism when absorbed. Interestingly, the brain appears to be the primary target organ for such metals. While biochemically functional metals are tightly homeostatically regulated, non-essential toxicological metals may be able to freely gain access to an organism because they share properties, such as ionic charge, with their biochemically functional counterparts (Duce et al., 2010). In general, metal ions are bound to ligands; the term “free” is used to explain the pool of labile, exchangeable or loosely ligated metals that are accessible by chelator binding. Both free zinc and copper have been reported to act as secondary messengers within the synaptic cleft and the intracellular pool of labile iron has been well established to modulate the expression of various proteins. Metals such as copper, zinc and iron are essential for several neuronal activities (neurotransmission, neurite outgrowth, neurotransmitters biosynthesis, oxidative phosphorylation and oxygen transport). The quantity of metal ions in the brain is strictly regulated at the level of the blood brain barrier and there is no passive flux from the circulatory system to the brain.

Copper is a redox-active metal that is predominantly used by organisms living in oxygen-rich environments and exists either in the oxidized (Cu^{2+}) and reduced (Cu^{+}) valence states (Ridge et al., 2008).

Cuproenzymes

Copper carriers

Blood

CTR1

CTR1

CTR2

CCO

CCS

SOD1

STEAP3/4?

CTR1

CTR2

ATP7A

Nucleus

Atox1

ATP7B

ATP7A

ATP7B

Cu

Cu

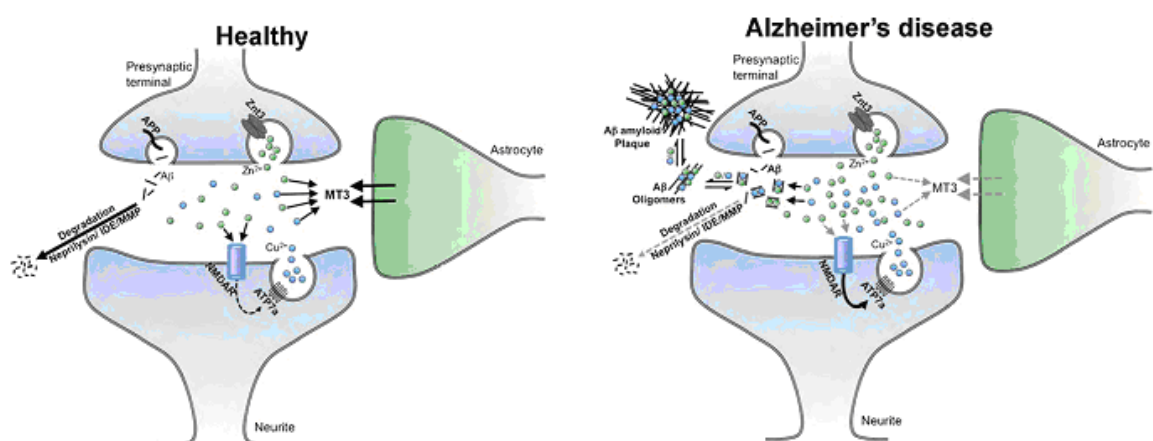
Apical membrane

Current Opinion in Chemical Biology

The presence of the ionic species has been reported in the synapse at micromolar concentrations. In this environment, postsynaptic N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) neurites release ionic copper upon NMDA activation (Schlief et al., 2005). Activation of synaptic NMDA receptors in the hippocampal neurons results in trafficking of ATP7A and an associated efflux of free copper (15 μ M) into the synaptic cleft (Schlief et al., 2005). At present, this is the only known microenvironment where free copper is known. Copper has also been reported to specifically protect against NMDA mediated excitotoxic cell death in primary hippocampal neurons. ATP7A expression is developmentally regulated and plays a role in facilitating copper transport into the brain through the endothelial cells that comprise the BBB (El Meskini et al., 2007; Niciu et al., 2007; Qian et al., 1998). Levels of copper have been reported to change with age in plasma, cerebral spinal fluid (CSF) and brain tissue. Homeostatic alterations in brain copper levels have been implicated in the pathogenesis of several neurological disorders including Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases (Brown and Kozlowski, 2004; Mercer, 2001; Torsdottir et al., 1999). The serum and CSF levels of copper are significantly higher in patients with AD (Basun et al., 1991; Squitti et al., 2002a). Within the brain, copper has been shown to be associated with senile plaques; significantly increasing copper content within these plaques goes from 79 μ M (in the normal age-matched neuropil) to 390 μ M (Lovell et al., 1998).

Zinc is another transition metal abundantly present in all animal tissues. Diverse classes of proteins require bound zinc for normal function; of all organs, the brain probably contains the highest levels of zinc, (Frederickson, 1989). In its free ionic form, zinc in the brain is highly enriched in many of the glutamatergic nerve terminals (10–15%), where it is released upon neuronal activation; synaptically released zinc interacts with neuronal receptors such as NMDA (Smart et al., 2004). A multitude of zinc

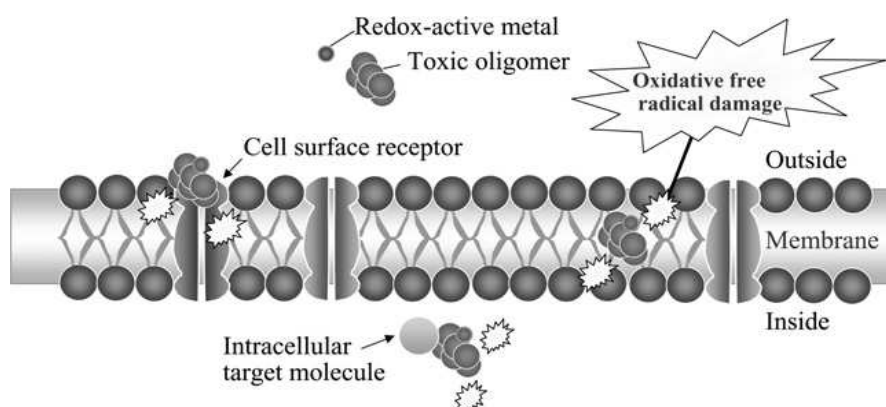
transporters (ZnTs), zinc-importing proteins (ZIPs) and buffering proteins such as the metallothioneins bind cytosolic zinc to prevent free zinc becoming toxic (Sensi et al., 2009). The zinc transporter ZnT3 has been shown to be essential for loading zinc into synaptic vesicles (Cole et al., 1999; Linkous et al., 2008) and is likely to represent the major synaptic vesicle zinc transporter. ZnT3 is likely to govern the downstream effects of synaptic zinc on a variety of signaling pathways that mediate higher cognitive function. In contrast to copper, zinc levels in rodent and human plasma has been reported to be highest at birth and steadily decrease with age (Bunker et al., 1987; Martinez Lista et al., 1993; Monget et al., 1996; Munro et al., 1987; Ravaglia et al., 2000). The presence of zinc ions in both plasma and CSF have been reported to further decrease in AD (Basun et al., 1991; Baum et al., 2010; Molina et al., 1998). This further decrease in AD zinc levels may in turn affect brain levels of the ion and exaggerate amyloid pathology, through its entrapment within the plaque. Zinc is highly enriched within AD plaques (1055 μM) compared to normal age-matched neuropil (350 μM) (Lovell et al., 1998).



Metals and oxidative stress

Metals dyshomeostasis is a potential cause of oxidative stress and permits an aberrant interaction between metal and proteins. Metal-protein association leads to the formation of proteic aggregates which involve redox-active metal ions (Cu^{2+} , Fe^{3+}) or redox-inactive (Zn^{2+}); iron and copper have a primary role in the phenomenon of proteic aggregation, and provide a link between the two pathological processes of aggregation and oxidative damage. Any dyshomeostasis in redox-active transition metal ions has an essential role in Alzheimer's disease; in fact, amyloid plaques are characterized by great concentrations of metal ions, such as Cu^{2+} e Fe^{3+} , which interact with A β peptide and make it toxic for cultured cells. It is still unknown if toxicity of soluble oligomeric species is a consequence of the presence of metal ions in their supramolecular structure, making them redox-active (Curtain et al. 2001; Smith et al. 2006), or if oligomerization is the result of redox reactions, catalized by metals, which cause a cross-linking between two tyrosine residues (Barnham et al. 2004).

Oligomeric aggregates, associated with redox-active metals, can cause cellular damage and ROS (reactive oxygen species) generation through: non-specific membrane interactions, specific interactions with surface receptors, or intracellular target molecules (Tabner et al. 2005).

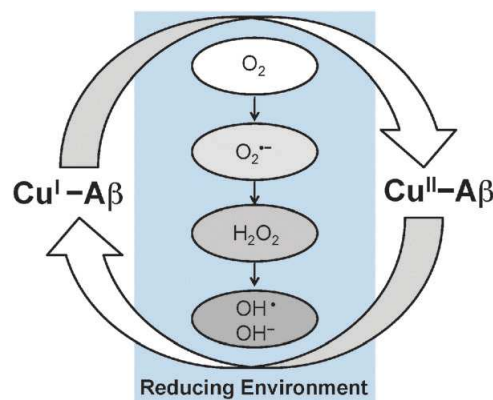


The AD brain is subjected to increased oxidative stress resulting from free radical damage. Several evidences suggest a key role of oxidative stress in the physiopathology of AD, for example:

- Increased lipid peroxidation (Butterfield, D.A. et Lauderback, 2002; Sayre, L.M. *et all.*, 1997);
- Increased oxidation of proteins, pointed out by increased levels of carbonyl groups and peroxynitrite-induced nitration of tyrosine residues (Butterfield, D.A. et Stadtman, E.R., 1997; Smith, M.A. *et all.*, 1997);
- Oxidation of DNA, pointed out by high-levels of 8-hydroxy-2-deoxiguanosine (8OHdG) and 8-hydroxyguanosine (8OHG) (Gabbita, S.P. *et all.*, 1998; Lovell, M.A. et Markesbery, W.R., 2001);
- Presence of advanced glycation end-products (AGE) formed by oxidative reaction of protein with carbohydrates (Vitek *et all.*, 1994);
- Production of reactive oxygen species (ROS) (Butterfield, D.A. 2002).

A β can trigger the formation of ROS, and directly produces hydrogen peroxide (H₂O₂) through the reduction of metal ions (Huang *et al.*, 1999a).

Methionine at position 35 (Met-35) of A β is the more susceptible to oxidation residue *in vivo*, particularly under oxidative stress conditions (Vogt, W., 1995). A β ₁₋₄₂ has a binding domain for copper (Cu²⁺) (Atwood *et al.*, 1998) and can reduce Cu²⁺ to Cu⁺ (Huang *et al.* , 1999b). The resulting ion A β -associated leads to the formation of H₂O₂ (Huang *et al.*, 1999a). Cu⁺, in turn, can react with H₂O₂ to form hydroxyl radicals ($\cdot$ OH). This transfer of a single electron from the metal to the peptide results in the formation of a peptidyl radical, which is a possible explanation of the formation of A β radicals.



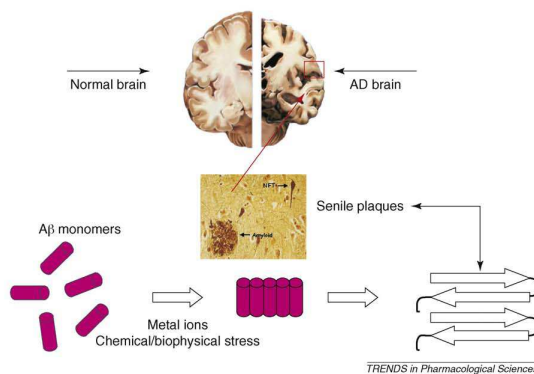
ROS generation facilitated by redox cycling of Cu-bound Aβ under reducing conditions (Fenton chemistry).

De Toma et al., 2012

The oxidative damage caused by Aβ (Mark, RJ *et al.*, 1995) appears to play a key role in the destruction of Na⁺/K⁺-ATPase pump in rat hippocampal neurons. Alteration of Na⁺/K⁺-ATPase could affect the membrane potential, and bring the opening of dependent-voltage calcium channel, thus increasing the levels of intracellular Ca²⁺ ion. Alteration of Ca²⁺ homeostasis could have serious consequences on cellular function, causing different signal pathways, alteration of second messengers, activation of the transcription factor NF-κB and apoptosis.

APP and β-amyloid peptide

The presence of amyloid plaques and neurofibrillary tangles (NFTs) and the progressive loss of the synaptic integrity together with the neuronal cells death are the hallmark of AD (Braak, H. *et al.*, 1993).



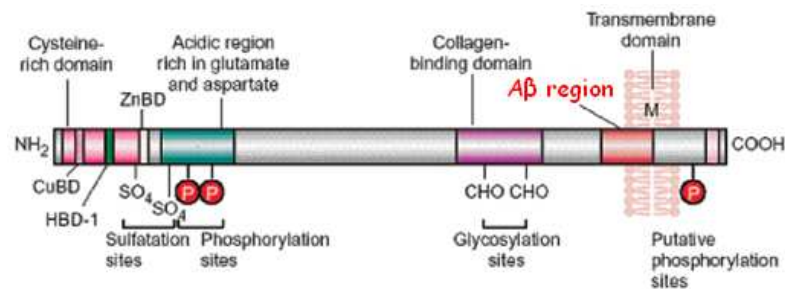
The senile plaques are extracellular deposits of fibrils and amorphous aggregates formed by the β -amyloid peptide (Selkoe, D.J., 1994), that is a peptide of 39-42 aminoacids which derives from the cleavage of a transmembrane protein called amyloid precursory protein (APP) (Hartmann, T. *et all.*, 1997; Tienari, P.J. *et all.*, 1997). NFTs are intracellular aggregates composed by the microtubule-associated protein tau that exhibits hyperphosphorylation and oxidative modifications. This protein has a fundamental role in the assemblage and activity of the microtubules, stabilizing the cytoscheletric structure, and participates in the axonal transport. In AD patients, protein tau results to be hyperphosphorylated with consequent reduction of its ability to bind the microtubules and therefore it can aggregate and precipitate within the cell (Selkoe, D. J., 2004).

A β isoforms derive from proteolysis of APP, which has physiological functions of adhesion and control of proteolytic activity and ion channels integrity (Pontieri, 2005). APP is coupled to the trimeric protein G_o through its intracellular portion (Okamoto, T. *et all.*, 1995; Brouillet, E. *et all.*, 1999). Since G_o is coupled to numerous signal pathways, like adenylate-cyclase (Carter, B.D. et Medzihradsky, F., 1993), phospholipase c (Moriarty, T.M. *et all.*, 1990), Ca²⁺ voltage-dependent channels (Hescheler, J. *et all.*, 1987) and apoptosis (Giambarella, U. *et all.*, 1997), APP could act through one or more of these signal transduction pathways.

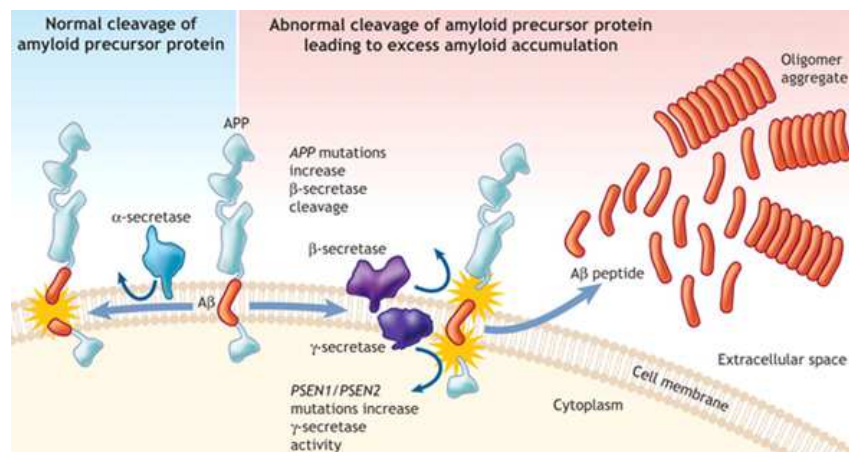
Different studies have underlined a role of APP in the functions of adhesion and cellular motility (Breen, K.C. *et all.*, 1991; Chen, M. et Yankner, B.A., 1991; Sabo, S.L. *et all.*, 2001). APP is involved in the formation of the synapses; its presence has been demonstrated in the growing extremity of the nervous fiber during the cerebral development in hamsters (Moya, K.L. *et all.*, 1994). This protein is produced and transported through the axonal transport towards the central and peripheral synapses in the adult (Sisodia,

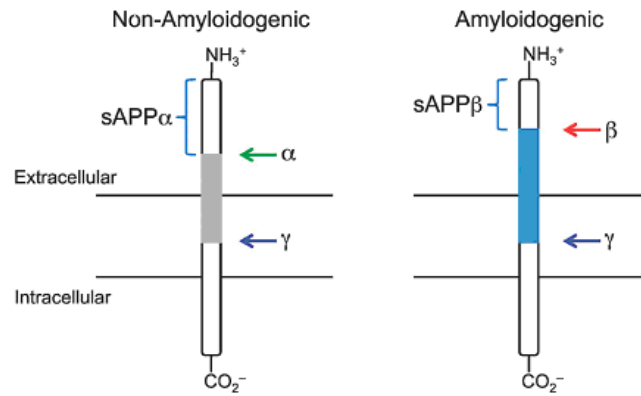
S.S. *et al.*, 1993), suggesting that APP has a role in the regulation of the synaptic function.

A β peptides have been found even in healthy subjects, so it is possible a physiological role as endogenous regulators of synaptic excitability (Kamenetz et al. 2003).



APP is normally cleaved by α -secretase at the level of 687 residue; β - and γ -secretase cut at the level of residues 670-671 and 712-717, respectively, thus allowing the liberation of the whole peptide, which assumes an amyloidogenic β -fibrillary conformation.





The cleavage in the α -site blocks the formation of A β and leads to the generation of an extracellular soluble fragment of 612 aminoacids (sAPP- α) and a carboxy-terminal fragment (CTF) of 83 aminoacids linked to the membrane, denominated C83. The cleavage by β -secretase releases an extracellular fragment (sAPP- β) and a carboxy-terminal fragment (CTF) of 99 aminoacids linked to the membrane, denominated C99. The enzymes responsible of the cleavage on β -site have been identified as the aspartyl-proteases BACE 1 (Yan, R. *et al.*, 1999; Vassar, R. *et al.*, 1999) and the homologous BACE 2 (Farzan, M. *et al.*, 2000). Both enzymes are linked to the membrane and are expressed in the nervous system (Bennet, B.D. *et al.*, 2000). A third candidate is the carboxipeptidase B, that unlike BACE 1 and BACE 2 is a soluble enzyme located in the cytosol of neurons and in astroglial cells, particularly in the hippocampus (Matsumoto, A. *et al.*, 2000). The cleavage site for γ -secretase is located inside the transmembrane portion of APP. After the cleavage by the α -secretase, the C83 fragment can be cut by the γ -secretase, producing a short protein fragment called p3 and an intracellular soluble cytosolic fragment called AICD. In the same way, after the proteolytic cut in the site for β -secretase, the C99 fragment produces the fragments A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂, as well as A β ₁₋₃₉ and A β ₁₋₄₃ together with the intracellular domain AICD. The activity of γ -secretase has been identified in the enzymes presenilin-1 (PS1) and presenilin-2 (PS2) (Cruts, M. *et al.*, 1995; Hutton, M. *et al.*, 1996).

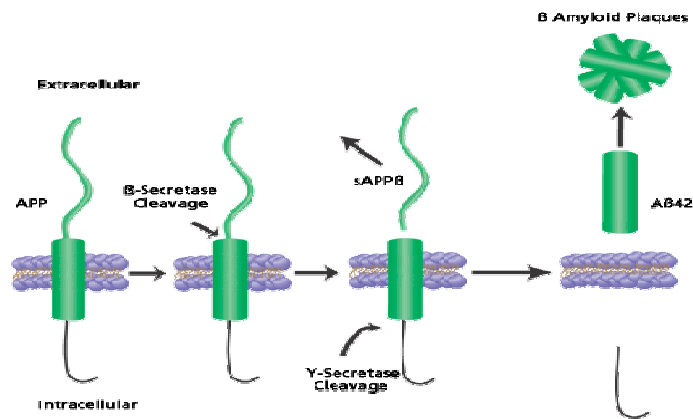
The activity of the α - and β -secretase has been shown inside the endoplasmic reticulum (ER), in the trans-vesicles of Golgi and in the cellular membrane (Huse, J.T. *et al.*, 2000). After the synthesis in the RER, APP is transported through the Golgi inside the plasmatic membrane.

If the cleavage of APP occurs by the α - and γ -secretase, the pathway that uses β - and γ -secretase is decreased (Vassar, R. *et al.*, 1999; Luo, Y. *et al.*, 2001). This suggests that the activities of the α - and β -secretases have an equilibrium; therefore, when the β - and γ -cleavage increases, there is production of A β and also a decrease in the levels of the neurotrophic sAPP α fragment.

A β peptide is made of a variable number of aminoacids (39-43); the extracellular A β can regulate the excitability of the neurons. A possible mechanism of regulation consists in promoting the Ca²⁺ influx through the voltage-dependent channels of Ca²⁺ (VDCCs). For example, the application of A β ₁₋₄₂ to the neuroblastoma cell line SHSY5Y increases the phosphorylation and the opening of the VDCCs through a pathway that seems to be mediated by a protein-kinase activated by mitosis (MAPK). An increased Ca²⁺ influx could promote one or more forms of synaptic plasticity; on the other hand, an excess in the levels of Ca²⁺ can induce neurotoxicity.

Different evidences sustain that A β regulates cellular signals through the receptors nACh. For example, A β causes a significant inhibition of the nicotinic current in the pyramidal cells of hippocampus (Pettit *et al.*, 2001). It is probable that the peptide acts directly blocking the receptor and the access of the ligand acetylcholine (ACh) or causing the desensibilization of the receptor (Pettit, D.L. *et al.*, 2001). A β can also regulate the pre-synaptic function of the cholinergic neurons; A β blocks the release of ACh from the pre-synaptic terminal in the cortex and in the hippocampus (Kar, S. *et al.*, 1996). Therefore A β regulates the cholinergic transmission through the inhibition of the pre-synaptic and post-synaptic activity of receptors.

A β_{1-42} is the more easily aggregating form (Snyder et al., 1994).



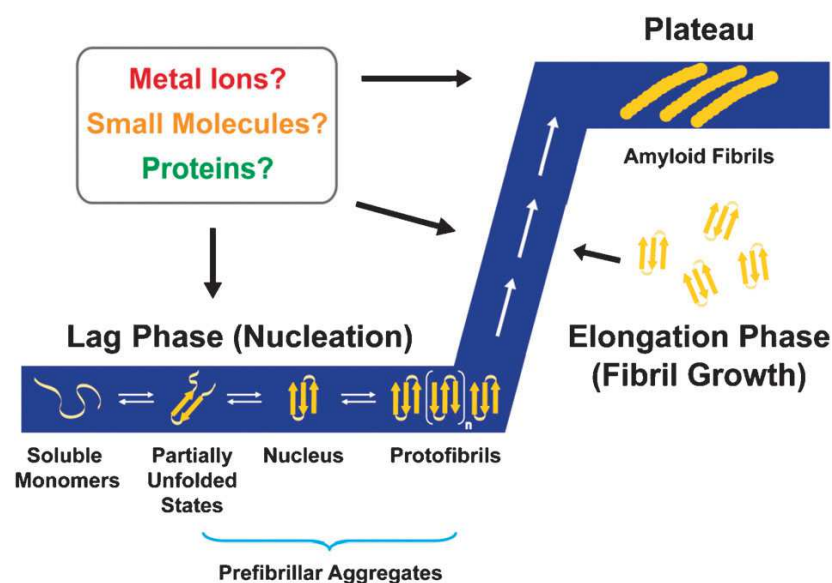
The hypothesis of the "amyloid cascade" involves the deposition of A β_{1-42} peptides in the diffused plaques, which are initially amorphous without a fibrillary organization (Yamaguchi, H. *et al.*, 1988); subsequently, the adoption of a fibrillary structure and the formation of insoluble plaques constitute the primary event in the genesis of AD. The toxicity of fibrils could derive from the generation of free radicals (Hensley, K. *et al.*, 1994) or from the destabilization of the membranes with the consequent alteration of the Ca²⁺ homeostasis (Mark, R. *et al.*, 1996; Mattson, M. et Goodman, Y., 1995). Recent studies have shown that not fibrillary structures, that include oligomers, A β derived diffusible ligands (ADDLs) (Walsh, D.M. *et al.*, 2002; Lambert, M.P. *et al.*, 1998) and protofibrils (Ward, R.V. *et al.*, 2000; Hartley, D.M. *et al.*, 1999) have neurotoxic effects. Small and stable oligomers of A β_{1-42} have been isolated from brain, plasma and cerebro-spinal liquid (Kuo, Y.M. *et al.*, 1996; Roher, A.E. *et al.*, 2000) and they have been correlated with the gravity of neurodegeneration (McLean, C.A. *et al.*, 1999).

There are increasing evidences that oligomers are more neurotoxic than fibrils (Caughey et Lansbury, 2003); oligomers reduce cellular viability 10 times more compared to the fibrillary aggregates (Dalhgren, K.N. *et al.*, 2002).

Fibrillogenesis

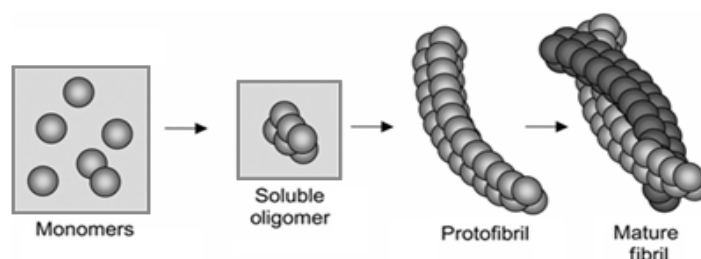
It is still uncertain the cause of proteic misfolding and subsequent accumulation in the brain but, probably, genetic, environmental and age-related factors are involved. In hereditary AD, PD and prion disease, genetic mutations cause the production of mutant proteins which easily aggregate and form pathological amyloid fibrils. NMR analysis, electron microscopy and X-ray diffraction techniques have demonstrated several characteristics of amyloidogenic proteins (Dobson 2003; Antzutkin et al. 2002; Torok et al. 2002), such as β -sheet rich rigid structures, unbranched and interwoven, and 5-13 nm fibrils diameter.

The presence of metal ions influences aggregation, causing a change in fibrillogenesis and precipitation speed and in the toxicity of amyloid aggregates, and an alteration in the aggregates' final morphology (Noy et al. 2008).



Fibrillogenesis is a cascade process which proceeds with the formation of intermediate structures: first, proteins form small soluble oligomers that aggregate in high molecular weight protofibrils; as the solubility decreases, fibrils accumulate in insoluble deposits (Rochet and Lansbury 2000). Regarding toxicity, it has been demonstrated that the small oligomeric

aggregates are much more toxic than insoluble fibrils, in A β and α -synuclein (Lambert et al. 1998; Walsh et al. 1999; Hardy and Selkoe 2002).



Fibrils accumulation seems to be responsible of the disease progression, even if the oligomeric species have a neurotoxic effect. Newly formed peptide organizes in oligomers in intracellular vesicles which are then secreted outside; secreted oligomers can interact with neurons, affecting their normal functions.

Protofibrillary forms of A β have neurotoxic action and cause electrophysiological changes, such as membrane depolarization and action potential increase, leading finally at neuronal death (Hartley et al. 1999); hence, neuronal dysfunction begins with the formation of oligomeric and protofibrillary structures.

Metals and A β proteins

There are putative metal binding sites for copper (Atwood et al., 2000; Barnham et al., 2003; Hesse et al., 1994; Simons et al., 2002; Valensin et al., 2004) and zinc (Bush et al., 1993, 1994a,b,c) in the APP sequence. Copper binding sites are located at the aminoterminal ectodomain of APP and also within the A β sequence of APP. The binding of zinc to APP involves a conserved region of amino acids between position 170 and 188 of APP (Bush et al., 1993, 1994a). There are a number of *in vivo* studies that highlight the sensitivity of APP to copper levels. Modulation of copper levels in fibroblasts

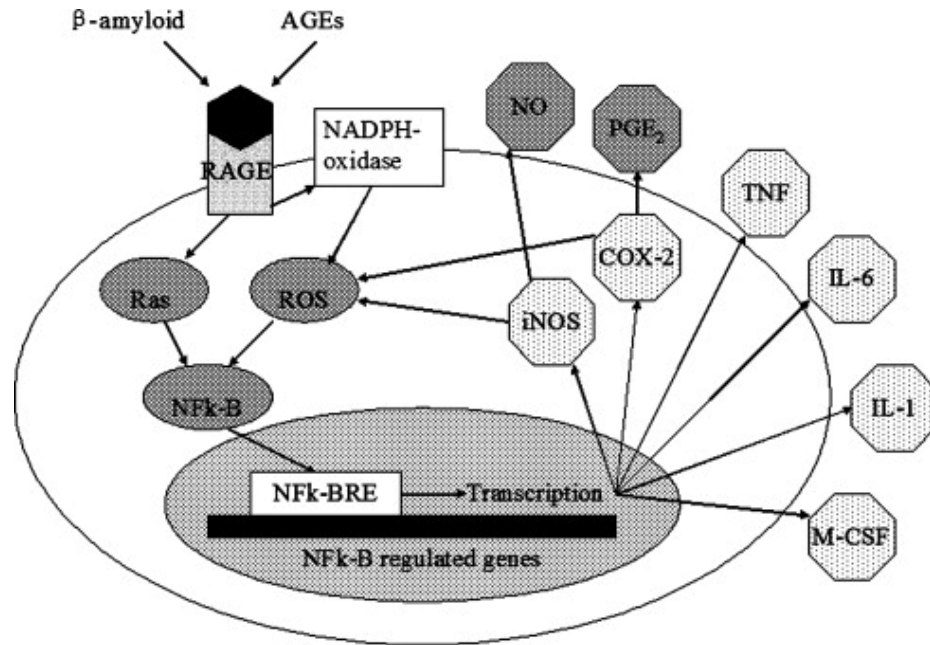
from mice with either chronic copper overload or copper deficiency can both up- and down-regulate APP mRNA expression (Armendariz et al., 2004; Bellingham et al., 2004b). Metals may also indirectly affect APP by altering APP processing. All three secretases are known to have interactions with different metal species. Following TACE synthesis, it is maintained in an inactive state mediated by an intramolecular bond between a cysteine in the prodomain and a zinc atom in the catalytic site of the protein. BACE1 binds copper in its C-terminal domain and co-immunoprecipitates in brain homogenate with the copper chaperone CCS (Angeletti et al., 2005). Endocytosis of APP to BACE1-rich endosomes is required to initiate β -cleavage of APP (Vassar et al., 1999). Neonatal mouse cortical cultures have shown that exogenous zinc administration increases the C-terminal fragments of presenilin 1 by enhancing de novo synthesis of the protein (Park et al., 2001). Zinc chloride causes the oligomerization of an APP γ -secretase substrate and inhibits its cleavage *in vitro*, supporting a role for zinc dysregulation in abnormal A β processing (Hoke et al., 2005). A β is rapidly precipitated by zinc over a broad pH range whereas aggregation of A β by copper and iron is only induced under mildly acidic conditions (pH 6.8–7.0) (Atwood et al., 1998, 2000; Ha et al., 2007). A β binds equimolar amounts of copper and zinc at pH 7.4, but under the conditions of acidosis that are thought to occur in the AD brain (pH 6.6), copper displaces zinc from A β (Atwood et al., 2000). As copper has been shown to promote the aggregation of A β *in vitro* and A β is known to bind copper in AD brain (Dong et al., 2003; Lovell et al., 1998; Opazo et al., 2002), it may seem surprising that increasing brain copper levels in transgenic models of the disease would inhibit A β pathology. However, this is consistent with evidence that copper abnormally redistributes in AD and collects outside of the cell, leaving the tissue relatively deficient. The involvement of metal ions

in the aggregation of A β within the brain only represents one part of the biological equation, as metal ions may also participate in the clearance/degradation of A β . Two of the primary A β degrading enzymes identified are insulin-degrading enzyme (IDE) and neprilysin (NEP), a neutral endopeptidase. IDE is ubiquitously expressed and localized intra- and extracellularly within the CNS. Both these proteases are members of the zinc metallopeptidase family of proteins that share a common primary structure in their sequence that is involved in the binding of zinc. The generation of reactive oxygen species, perhaps as a product of metal interactions with A β may serve to inactivate the principal degradative enzymes involved in the regulation of A β . A mis-metabolism of metal ion homeostasis is sufficient to significantly alter the normal course of APP processing and A β generation, deposition and degradation in biologically relevant animal models. The coordination of either oxidized copper (Cu²⁺) or iron (Fe³⁺) to A β results in the reduction of the metal ions (Hureau and Faller, 2009). A β redox activity leads to the generation of reactive oxygen species (ROS), and the production of H₂O₂. This can lead to a variety of A β side-chains being oxidized, and to covalent oligomerization. The byproduct H₂O₂ is also freely permeable across all tissue and cellular boundaries, and can thus further react with reduced metal ions (Fe²⁺, Cu⁺) to generate hydroxyl radicals via Fenton chemistry.

Role of RAGE and p75 in the pathogenesis of AD

The RAGE receptor is expressed in normal brain tissue in a variety of cells such as neurons, microglia and astrocytes (Li, JJ *et al.*, 1998). It is constitutively expressed during embryonic development, while its expression is down-regulated during adult life (Brett, J. *et al.*, 1993); induced expression of RAGE is frequently associated with pathologies such as AD (Yan, S. *et al.*, 1996). The receptor recognizes three-dimensional structures, such as β -

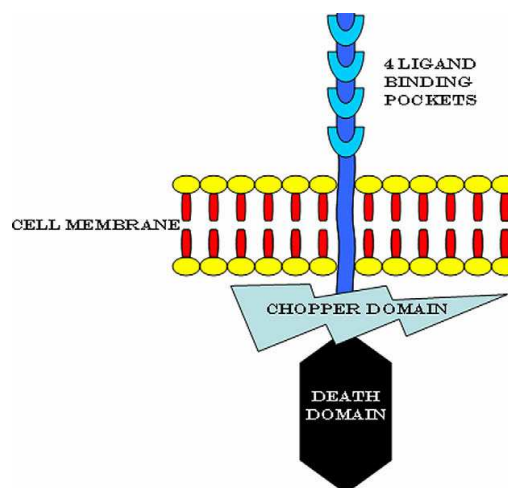
sheets and fibrils, rather than specific aminoacidic sequences (Bucciarelli, LG, *et al.*, 2002). In addition to AGE, RAGE binds A β peptide (Yan, S. *et al.*, 1996; Yan, SD *et al.*, 2000).



The role of RAGE results in intracellular signal that leads to the activation of the pro-inflammatory transcription factor NF- κ B. In not stimulated cells, NF- κ B is located in the cytoplasm in its inactive form linked to the inhibitor I κ B- α ; after activation, I κ B- α is rapidly phosphorylated and degraded and NF- κ B is released, dimerizes and translocates into the nucleus (Barnes, PJ et Karin, M., 1997), thus activating the transcription of target genes, such as those for cytokines, adhesion molecules, RAGE, the inhibitor I κ B α (Barnes, PJ et Karin, M., 1997; Li, J. et Schmidt, AM, 1997), and antiapoptotic genes such as Bcl-2, Bcl-XL (Barnes, PJ et Karin, M., 1997). The activation of NF- κ B is followed by a new synthesis (Bierhaus, A. *et al.*, 2001) and this leads to a steadily growing pool of NF- κ B. Since the expression of RAGE is induced by NF- κ B (Li, J. et Schmidt, AM, 1997), a sustained activation of NF- κ B results in the induction of RAGE and ensures the maintenance and amplification of the signal. In addition, the RAGE-ligand interaction can

directly induce the generation of ROS via NADPH oxidase and other mechanisms (Lander, HM *et al.*, 1997; Wautier, MP *et al.*, 2001). It has also been shown that RAGE is involved in the activation of iNOS leading to the establishment of NO-mediated oxidative stress (Wong *et al.* 2001).

p75 is a member of the tumor necrosis factor (TNF) super family of receptors (Friedman *et al.*, 1999) and is implicated in cellular apoptosis, cell survival and differentiation, neurite outgrowth (Chen *et al.*, 2009). Trk is a ligand-selective tyrosine kinase receptor (DeFreitas *et al.*, 2001), and interacts with p75 to signal the neuronal cell survival or apoptosis. Previous reports suggested that the neuronal loss observed in the basal forebrain of Alzheimer's patients is p75 dependent (DeFreitas *et al.*, 2001; Yaar *et al.* 1997). A β also serves as a p75 ligand (Davies *et al.* 2003). TrkA reduces the β -cleavage of APP to generate A β peptide while p75 enhances the cleavage (Costantini *et al.* 2005), and A β was observed to cause p75-mediated neurotoxicity in several cell lines (Yaar *et al.* 1997; Coulson *et al.* 2006; Sotthibundhu *et al.* 2008). The structural organization of p75 is composed of three main parts.



First, it has the cysteine-rich extracellular repeats that form four ligand-binding sites (Chen *et al.* 2009; Coulson *et al.* 2006). The second part is made of a single pass domain that crosses the plasma membrane to link with the

intracellular domains (Hashimoto et al. 2004). Lastly, the intracellular component is composed of a chopper domain and TNF-like death domain (Coulson et al. 2006). To signal apoptosis, p75 activates c-jun N-terminal kinase (JNK) (Friedman 2000) and caspases which results in ceramide production (Friedman et al. 1999; Harrington et al. 2002). The binding of A β chains, especially aminoacids within the 29–35 sequence, has been shown to induce neurotoxicity. A β binds to the p75 receptor, but not TrkA, and induces apoptosis (Yaar et al. 1997; Coulson et al. 2006) through the intracellular death domain signaling mechanism (Hashimoto et al. 2004). The death domain in turn activates G₀ which leads to JNK phosphorylation (Hashimoto et al. 2004; Coulson et al. 2006). In normal aging there is a gradual increase in the expression of p75 receptor accompanied by a decrease in TrkA expression. Decrease in the TrkA to p75 ratio and coordinate regulation of neurotrophins activates sphingomyelinase, and enhances production of ceramides (Haines 2006; Costantini et al. 2006), which can act as second messenger to induce apoptosis [5], and stabilize BACE1 or β secretase (Haines 2006; Costantini et al. 2006) that cleaves APP to form A β peptide.

Therapeutics targeting of metal ions in AD

One logical and increasingly popular theory for the use of neurotherapeutic small molecules in AD is to target the initiating event in the generation of free radicals. This may be done by administering antioxidants or by employing metal complexing agents to prevent the metal ions from participating in redox chemistry. Yet there is still no evidence that AD will respond to traditional medical chelation and the greater risk is that the removal of essential metal ions will result in adverse effects. Antioxidant molecules may be used for their ability to neutralize free or incorrectly bound metals, thereby interfering with the ‘down-stream’ generation of reactive

oxygen species and other radicals (Behl and Moosmann, 2002). Metal chelation in an organism depletes the total pool of bioavailable metals; metallothionein-3 (MT-3) has chelating properties and is important for copper and zinc homeostasis within neurons, astrocytes and the extracellular space of the brain (Vasak and Hasler, 2000). MT-3's mechanism appears to consist of reducing and sequestering the copper from A β and swapping it for a zinc ion carried within MT-3. MPACs (metal-protein attenuating compounds, or ionophore) are able to compete with endogenous ligands for metal ions. They target the harmful 'upstream' metal-protein reactions by using their moderate, reversible, affinity towards metals and restore normal metal levels in specific cellular compartments (Masters and Beyreuther, 2006). The first-generation molecule was clioquinol (CQ; 5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoline). Oral treatment with CQ in an AD mouse model resulted in a reduction of cortical deposition of amyloid, supporting initial studies showing CQ's ability to dissolve synthetic A β :copper/zinc aggregates and amyloid deposits from post-mortem AD brain (Cherny et al., 2001). However, other studies still highlight that CQ increases oxidative neurotoxicity (Benvenisti-Zarom et al., 2005). CQ enters the brain and is attracted to the extracellular pool of metals that are in a dissociable equilibrium within the amyloid plaque. The compound then binds zinc and copper in the amyloid and the drug-metal complex then enters the cell (Deraeve et al., 2006; Rozga et al., 2009).

There is a pool of A β within the affected neocortex in AD that is held in sedimentable aggregates by metal ions, likely to be Cu(I) and Zn(II), and these aggregates are solubilized by treatment with chelators. Bathocuproine disulfonate (BCS), a potent chelator of Cu(I), shows linear dose dependence in solubilizing A β from AD brain samples across all cases studied. Transition metals are intrinsic to the architecture of A β aggregates in the human brain

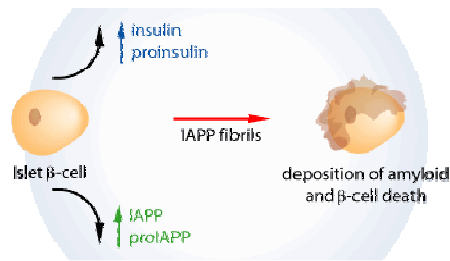
and metal chelators, especially those that target zinc and copper, can dissociate metal-bound aggregates (Cherny *et al.*, 1999). Disaggregating compounds which may have therapeutic value in AD must both prevent metal-A β interactions and make possible the disintegration of preexisting aggregates into nontoxic components. NMR spectra show that BCS binds to A β ; this behaviour, in combination with the copper-mediated A β disaggregation, implies that the exceptional effectiveness of BCS in solubilizing brain A β in a doselinear manner may be a result of a combination of chelating and intercalating (or “chain breaking”) properties. BCS has recently been shown to abolish Cu-A β mediated hydrogen peroxide formation (Huang *et al.*, 1999).

Protein conformation disorders: β -amyloid and amylin

Alzheimer’s disease and type II diabetes mellitus belong to PCD (Protein conformation disorders), as they are characterized by accumulating misfolded protein (Soto, 2001). Normally soluble proteins develop in insoluble aggregates, toxic at level of brain, muscles, bones, heart and liver (Gaggelli *et al.*, 2006); these species have common chemical, physical, and morphological characteristics, such as fibrillary nature of plaques, high percentage of β -sheet structures and proteases resistance.

Altered function in pancreatic β -cells causes a reduction in the secretion of insulin in response to glucose, and a decrease in the production of amylin (hA), a peptide that has an important role in the regulation of glucose metabolism (Kahn *et al.*, 1991; Sanke *et al.*, 1991; Ahren *et al.*, 1998). It has been shown to enhance the effects of insulin by slowing gastric emptying, reducing the rate of glucose entering the blood, and signalling the brain to reduce meal size (Woods *et al.* 2006). *In vivo* experiments suggest that

amylin has a neuromodulating function in the central nervous system (CNS) (Baldo and Kelley 2001; Young 1997).



Alteration in functioning of β cells is related to amyloid deposition; in fact, amyloid deposits have been found in Langerhans islet β cells of patients affected by type II diabetes mellitus (Höppener and Lips, 2006). The formation of these deposits is caused by amylin (Cooper et al., 1987; Jaikaran and Clark, 2001; Kapurniotu, 2001), a peptidic hormone produced and cosecreted with insulin; it is composed of 37 aminoacids and has a disulfide bond between residues 2 and 7, and an amide C-terminal. Several experiments suggest that region 20-29 has a key role in amyloidogenesis; in fact, a fragment corresponding to the sequence 20-29 can form amyloids *in vitro* (Westermarck et al., 1990).



Despite of a limited homology in the primary sequence, hA and $A\beta$ share several biophysical properties, such as aggregation in β -sheet structures in aqueous solutions.

Amylin has neurotoxic effects against cortical and hippocampal neurons, as well as $A\beta$, with the same characteristics of time and concentration dependent induction of apoptosis (May et al. 1993; Tucker et al. 1998). It has been proposed that toxicity derives from the capacity to induce the formation of

membrane channels, selective for cations, which allow calcium to penetrate in the cell in unregulated quantities (Kawahara et al. 2000).

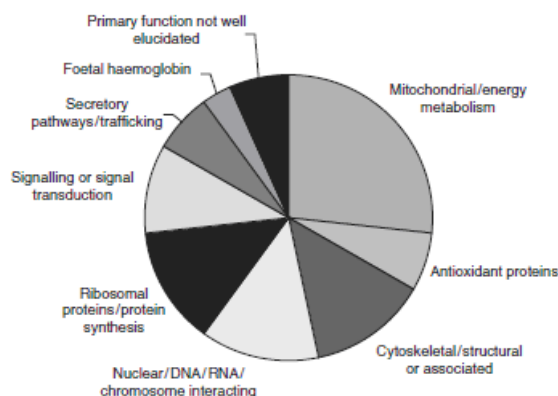
Accelerated rate of formation and accumulation of advanced glycation end products (AGEs) are observed in both T2DM and AD. (Munch et al. 1998; Yamagishi et al. 2003).

Regarding the interaction with metal ions, it is well known that copper, interacting with human amylin, can stimulate H₂O₂ production and then cause oxidative stress, in the same manner as A β (Schubert et al. 1995); besides, copper mediates the interaction of 17-29 fragment with membrane (Pappalardo et al. 2007).

hA and A β could have the same mechanism of action; in fact AC 187, an antagonist of amylin receptor, blocks the effects of hA and A β in basal cholinergic neurons (Jhamandas et al. 2003). The early effects of A β and human amylin that lead to neurotoxicity are expressed through activation of the amylin receptor, a G-protein coupled receptor comprised of the calcitonin receptor (CTR) and receptor associated membrane protein 3 (RAMP3) (Jhamandas et al. 2012). According to this hypothesis, amylin receptor could be a new therapeutic target for AD.

Recently, it has been demonstrated that hA and A β can exert their toxic effect through the reduction in the levels of metabolic and mitochondrial proteins; hence, mitochondrial dysfunction could be a common mechanism of pathogenesis in AD and type II diabetes mellitus.

SHSY5Y cells treated with these two peptides have shown a similar response (Lim et al., 2010).



The functional group with the largest number of proteins significantly altered in response to both peptide treatments is associated with mitochondrial functions/energy metabolism and antioxidant representing more than 25% of all significantly deregulated proteins.

While the majority of mitochondrial/metabolic proteins are downregulated, antioxidant proteins are mostly up-regulated, suggesting a typical cellular response to a state of oxidative stress. Other shared deregulated groups are, among others, cytoskeletal, chromosome interacting, ribosomal, signaling and trafficking.

MATERIALS AND METHODS

Human neuroblastoma cell line (SHSY5Y) culture

After expansion in tissue culture flask of 75 cm², the neuroblastoma cells (ATCC number CRL - 2266) were plated in 48 wells multiwell plates at the density of 20000 cells/well, in medium DMEM/F12 1:1, containing 10% of FBS, penicillin (50 U/ml) and streptomycin (50 µg/ml). The cultures were maintained at 37°C with 5% CO₂ in humidified atmosphere and the medium was changed every three days. Cells were treated at a confluence of 70%.

hA₁₇₋₂₉, A β ₁₋₄₂ and A β ₂₅₋₃₅ peptides preparation

The hA₁₇₋₂₉ peptide was assembled on a polyethylene glycol–polystyrene resin (PALPEG-PS) by using an Applied Biosystems Pioneer peptide synthesiser. Purification of the peptide was carried out by preparative RP-HPLC using a Vydac C-18 with a linear gradient of acetonitrile/water containing 0.1% TFA. The identity and purity of the peptide were confirmed by electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS) and analytical RP-HPLC, respectively. The A β ₁₋₄₂ and A β ₂₅₋₃₅ peptides used in the experiments were purchased by Bachem.

The protocol of monomerization consists in a first dissolution in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP, Sigma), that acts as a solvent to eliminate any secondary structures present (Stine *et al* 2001). The peptide dissolved in HFIP at the final concentration (Cf) of 1mM is divided into aliquots and the HFIP left to evaporate under chemical hood; the dried peptide can be used immediately or stored at -80°C. Before the aggregation process, peptides treated with HFIP are dissolved in dimetilsulfoxid (DMSO) to Cf of 5mM and subsequently diluted to the concentration of aggregation (100 μ M) with PBS 0.01 M pH 7.4, and then incubated at 37°C, alone or in presence of metals in ratio 1:1.

Analysis of aggregation by Thioflavin T (ThT) Assay

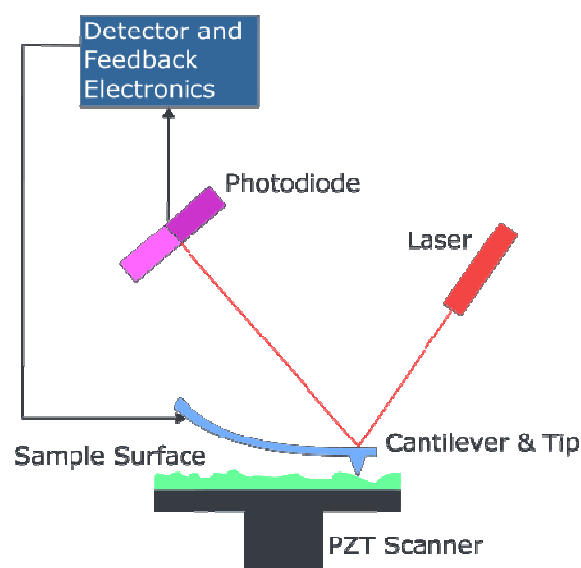
Thioflavin T is a dye which generates a fluorescent signal in case of link with β -sheet structures. In aqueous solution this pigment has a fluorescence emission peak at 430 nm when excited at 342 nm; in presence of fibrils, emission spectrum moves towards the red with a peak at 482 nm when excited at 450 nm (LeVine, 1999). For measures with the ThT we used the ratio of ThT 3 μ M and 5 μ g/ml of peptide according to LeVine III *et al*.

Before reading, the peptide is incubated for 10 minutes with the ThT, then fluorescence at 450/482 ex/em is measured to determine the presence or absence of aggregates with β -sheet structures.

Analysis of aggregation by Atomic Force Microscopy (AFM)

Atomic force microscopy (AFM) or scanning force microscopy (SFM) is a very high-resolution type of scanning probe microscopy, with demonstrated resolution on the order of fractions of a nanometer; it is one of the principal tools for imaging, measuring, and manipulating matter at the nanoscale. The information is gathered by scanning the surface with a mechanical probe, such as piezoelectric elements that facilitate precise movements.

The AFM consists of a cantilever with a sharp tip (probe) at its end that is used to scan the surface. The cantilever is typically silicon or silicon nitride with a tip radius of curvature on the order of nanometer. When the tip is brought into proximity of a sample surface, forces between the tip and the sample lead to a deflection of the cantilever. Depending on the situation, forces that are measured in AFM include mechanical contact force, Van der Waals forces, capillary forces, chemical bonding, electrostatic forces, magnetic forces, etc. Typically, the deflection is measured using a laser spot reflected from the top surface of the cantilever into an array of photodiodes.



ELISA Assay

The presence of oligomeric species in peptide preparations was determined by ELISA assay with A11 antibody (Invitrogen), directed specifically against oligomeric species of amyloidogenic polypeptides. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) is an immunoenzymatic assay useful to detect the presence of an antigen, immobilized on a solid support, with a specific antibody further applied over the surface; this antibody is linked to an enzyme and, in the final step, a substance containing the enzyme substrate is added. The subsequent reaction produces a detectable signal, most commonly a colour change in the substrate. A little amount (5 ng) of peptide, freshly prepared or incubated at 37° (100 μ M in PBS), was immobilized on a microtiter plate; after treatment with primary antibody A11 (1 μ g/ml), a HRP-conjugated antibody and then a substrate for HRP (TMB), absorbance at 450 nm was measured with a microtiter plate reader.

Treatment of cell culture

In order to evaluate the cytotoxicity produced by the amyloidogenic peptides, neuroblastoma cell cultures were treated for 24-48 hours with different

preparations of the peptides. In order to determine the contribution of some specific receptors on A β - and hA-induced toxicity, cells were pre-incubated for 2 hours in the presence of inhibitors or antibodies and then incubated with the peptides.

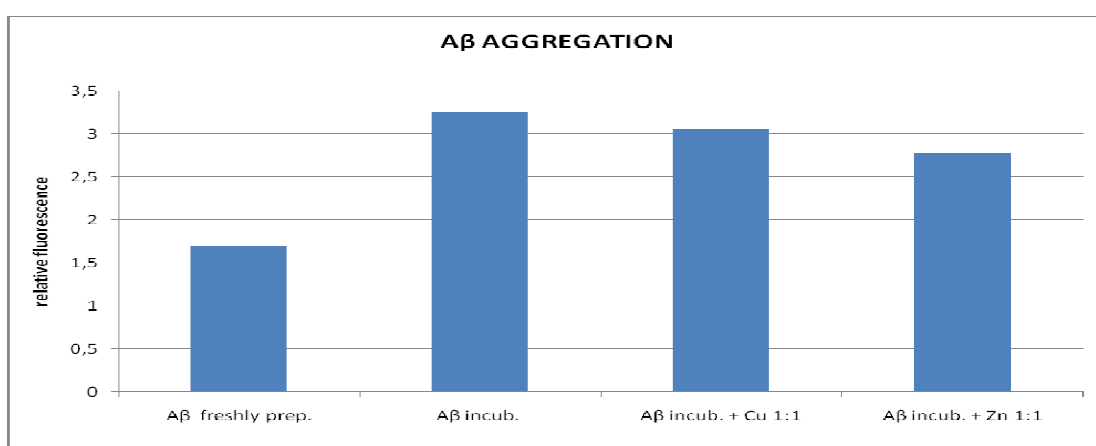
MTT Assay

The toxicity of the peptides was measured through the determination of cell viability in the treated cells compared to control untreated cells, by MTT test [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2 , 5-diphenyltetrazolium bromide]. The test is based on the ability of the mitochondrial enzyme, cytochrome c oxidase and succinate dehydrogenase, to reduce yellow tetrazole into purple formazan that, being unable to cross the plasma membrane, will accumulate within the viable cell in culture. Solubilization of formazan with an appropriate detergent will yield purple colour in proportion to the amount of formazan produced and consequently to the viability of cells. After treatment with the peptides, cell cultures are incubated for 2 hours at 37°C with a solution of MTT (1mg/ml) in PBS; the formed crystals are melted with DMSO. After the solubilization of the formazan crystals, a rate of supernatant is used to read the absorbance at 590nm using a microplate reader.

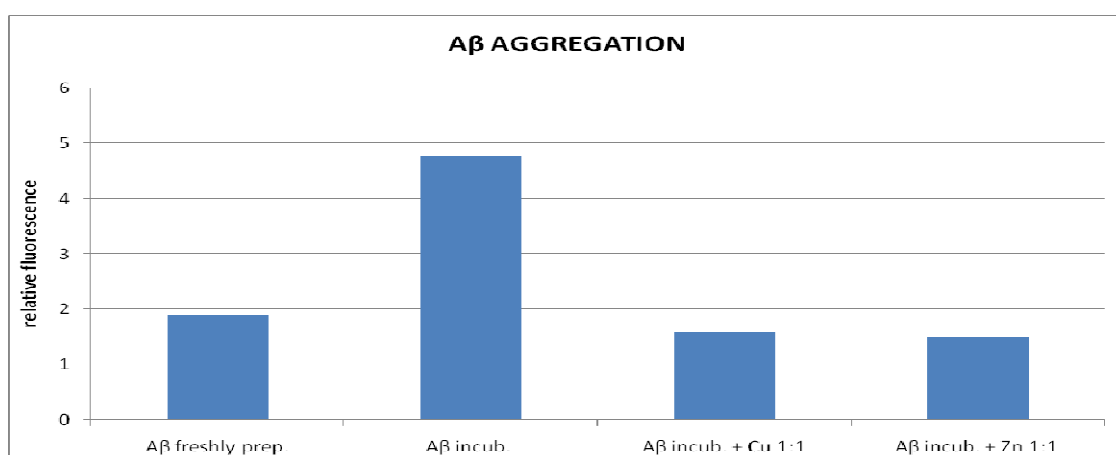
RESULTS

Aggregation analysis of A β ₁₋₄₂ peptide

In order to evaluate the aggregation state and the influence of metals in the kinetics of fibrillogenesis, different preparations of A β ₁₋₄₂ peptide, freshly prepared and incubated at 37°C with or without metals, were analyzed by Th-T assay, a useful method to detect the presence of β -sheet structures. Incubated samples showed an increase in relative fluorescence compared to controls (freshly prepared peptide).

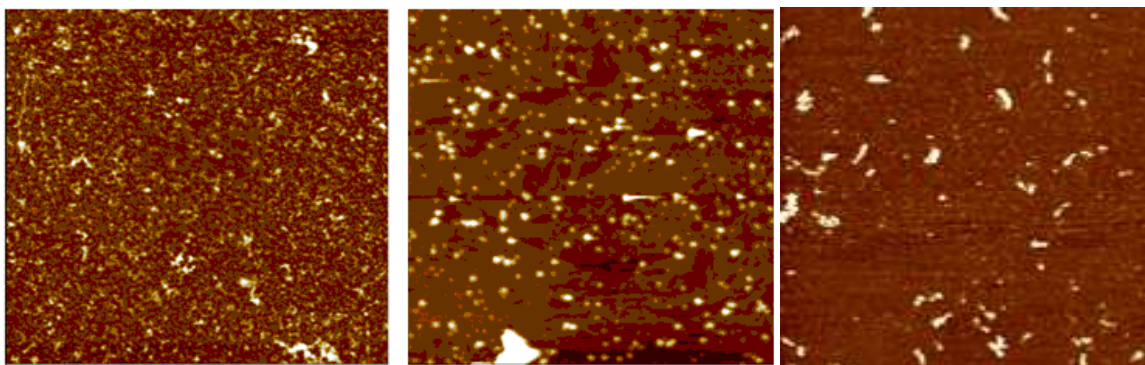


Th-T assay on A β ₁₋₄₂ samples, prepared at the final concentration of 100 μ M in PBS 0.01 M and incubated at 37°C for 72 hours. Copper and zinc are in 1:1 concentration ratio with the peptide.



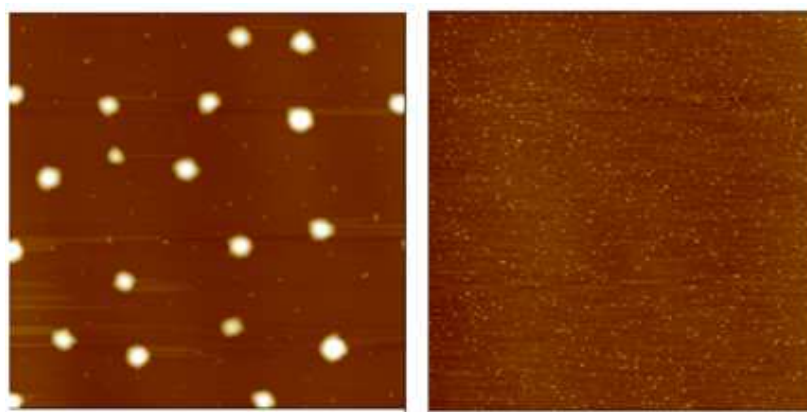
Th-T assay on A β ₁₋₄₂ samples, prepared at the final concentration of 100 μ M in PBS 0.01 M and incubated at 37°C for 144 hours. Copper and zinc are in 1:1 concentration ratio with the peptide.

These data show that, after incubation at 37° C, the peptide tends to form soluble aggregates with a high fluorescence signal compared to controls (Th-T positive); as incubation time increases, it is possible to hypothesize that Cu^{2+} and Zn^{2+} promote the disintegration of spontaneously formed aggregates or the formation of insoluble precipitates without a high fluorescence signal (Th-T negative). Since analysis of aggregation state through Th-T assay is not sufficient to gain information about the structure of aggregates, samples were analyzed by AFM microscopy. $\text{A}\beta_{1-42}$ peptide, freshly prepared, presents a lot of oligomers; after incubation at 37°C for 72 hours, it is possible to notice the presence of soluble aggregates (ThT-positive). $\text{A}\beta_{1-42}$ peptide incubated for 144 hours forms unbranched soluble fibrils, as an evolution of the small aggregates visible in the sample incubated 72 hours.



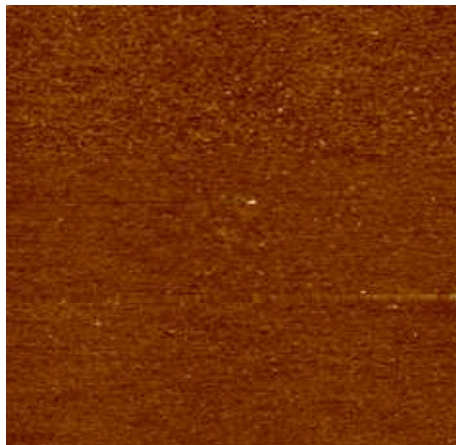
AFM of $\text{A}\beta_{1-42}$ 15 μM freshly prepared and incubated for 72 hrs and 144 hrs in PBS 0.01 M

After 72 hours of incubation at 37°C, in presence of Cu^{2+} , it is possible to notice numerous large and globular aggregates; instead, in presence of Zn^{2+} there are only small oligomeric structures. Both samples lack of well organized fibrillary structures.



AFM of A β_{1-42} 15 μ M incubated 72 hrs in PBS 0.01 M in presence of Cu²⁺ and Zn²⁺ 15 μ M.

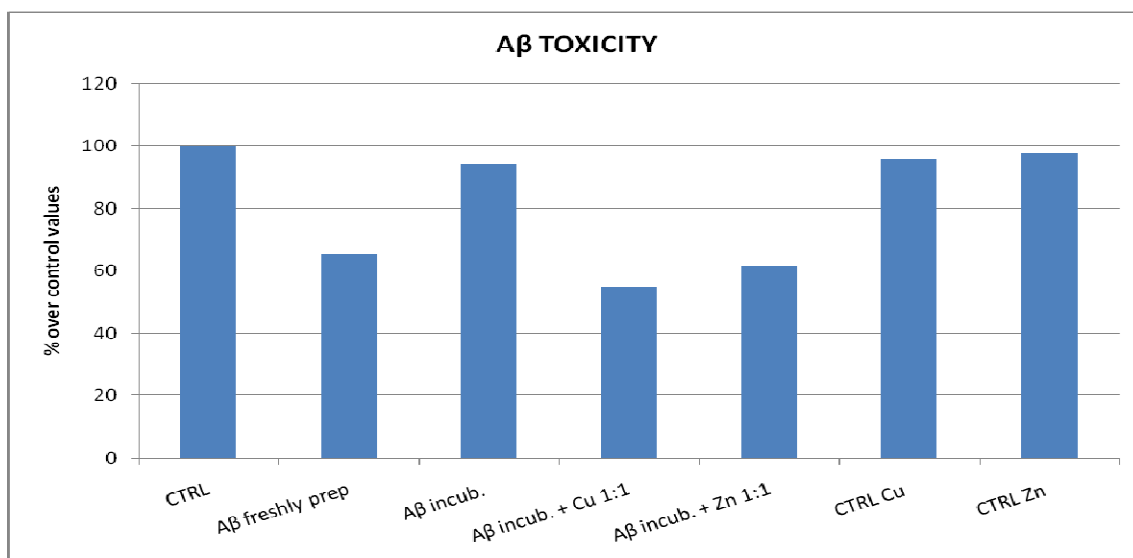
After 144 hours of incubation in presence of copper, AFM images of the sample show the absence of fibrils and large globular aggregates while only small structures (ThT-negative) are visible. Hence, two hypothesis are possible: 1) disappearing (disintegration?) of all those species observed; 2) massive precipitation of macroaggregates (not ThT positive) that could slip out during the sample preparation for AFM analysis.



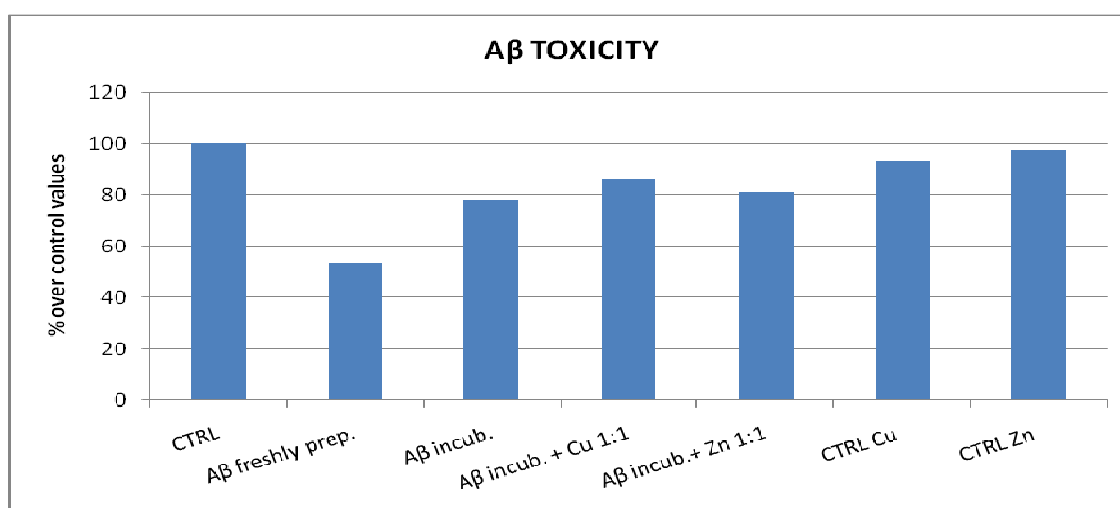
AFM images of A β_{1-42} 15 μ M incubated 144 hrs in PBS 0.01 M in presence of Cu²⁺ 15 μ M.

Toxicity analysis of A β ₁₋₄₂ peptide

In order to evaluate the relationship between aggregation/oligomerization state and toxicity, neuroblastoma cell cultures were treated with different preparations of A β ₁₋₄₂.



MTT assay after treatment with A β ₁₋₄₂ (15 μ M), freshly prepared and incubated 72 hrs at 37°C in presence of copper and zinc (15 μ M), of neuroblastoma cell cultures.



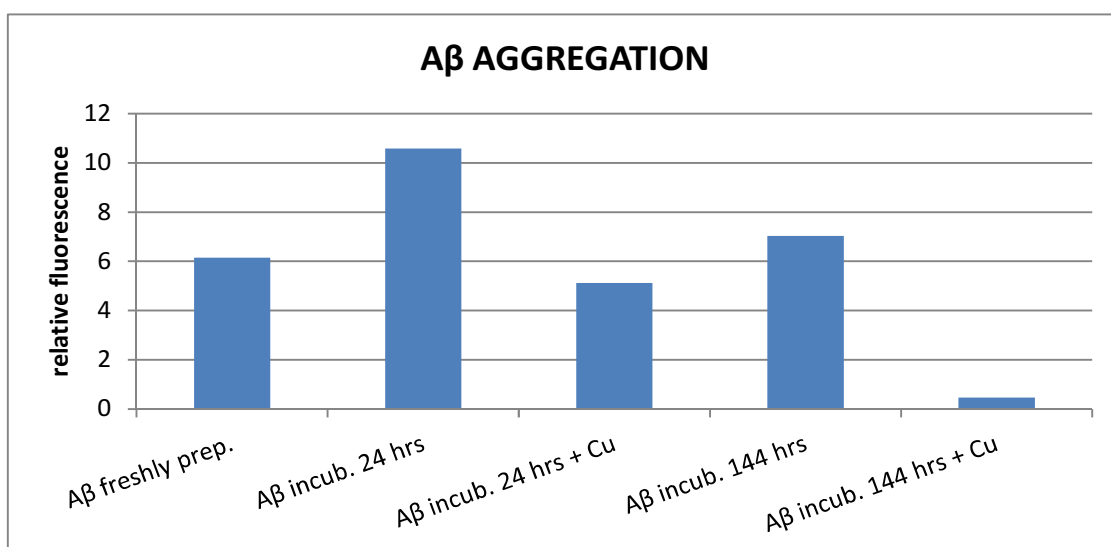
MTT assay after treatment with A β ₁₋₄₂ (15 μ M), freshly prepared and incubated 96 hrs at 37°C in presence of copper and zinc (15 μ M), of neuroblastoma cell cultures.

Data obtained after treatment of neuroblastoma cell cultures with different preparations of A β ₁₋₄₂ show a decrease in the viability of treated cells towards

controls; this effect is visible on both cells treated with a freshly prepared peptide or with a peptide incubated with metals in a 1:1 ratio; cellular viability is not particularly influenced by the peptide incubated alone. These data are in agreement with those ones seen in aggregation Th-T assay; in fact, it is conceivable an evolution of the aggregation process, which finishes with the formation of structures not toxic for cultured cells (SH-SY5Y). This process is influenced by the presence of metals which, altering the aggregates structure, cause a slowdown in the evolution to not toxic structures. Particularly, metal-incubated peptide toxicity is strongly evident within 72 hours of incubation before cells treatment; vice versa, the peptide incubated without metals quickly loses this toxic effect. This hypothesis is sustained by the observation that, after a longer incubation period, the peptide reaches not toxic aggregation states, even in presence of metals. Cellular viability is negatively influenced even by the freshly prepared peptide; this toxicity results from the presence of soluble toxic oligomers, clearly visible in the sample analyzed by AFM microscopy.

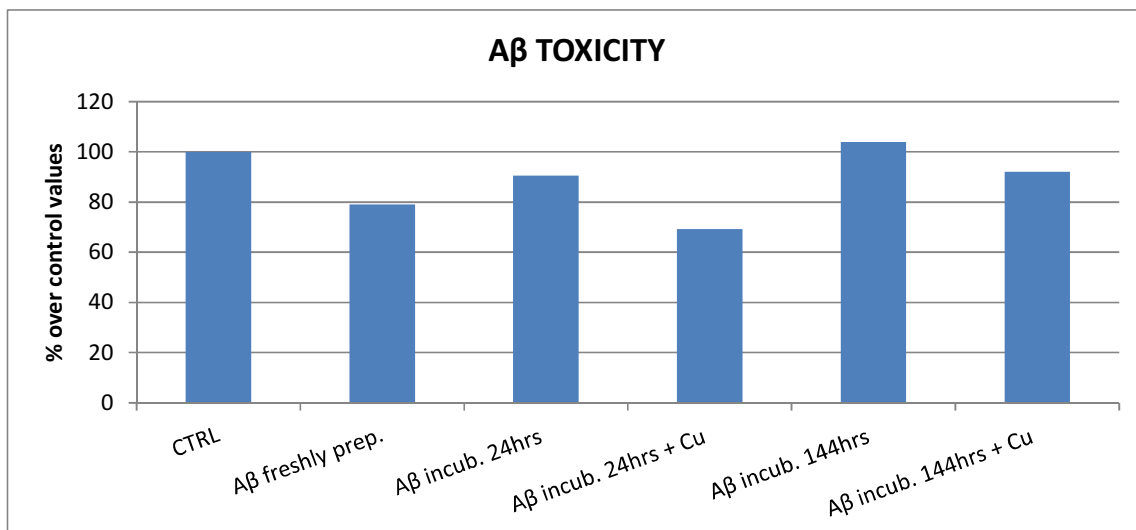
Aggregation and toxicity analysis of A β ₂₅₋₃₅ peptide

Also for the 25-35 peptide of β -amyloid, aggregation state was measured by Th-T assay. In particular, it is possible to notice an increase in the fluorescence signal produced by the incubated peptide, without metal, compared to the freshly prepared control. After incubation at 37°C, the peptide forms soluble (ThT-positive) aggregates which lose their solubility as the time of incubation increases, and fluorescence values return to levels similar to control; the presence of copper during incubation promotes the formation of insoluble (ThT-negative) aggregates or the disintegration of those spontaneously formed.



Th-T assay on Aβ₂₅₋₃₅ samples, prepared at the final concentration of 100 μM in PBS 0.01 M and incubated at 37°C for 24-144 hours. Copper is in 1:1 concentration ratio with the peptide.

In order to evaluate the relationship between aggregation state and toxicity, neuroblastoma cells were treated with different preparations of Aβ₂₅₋₃₅.

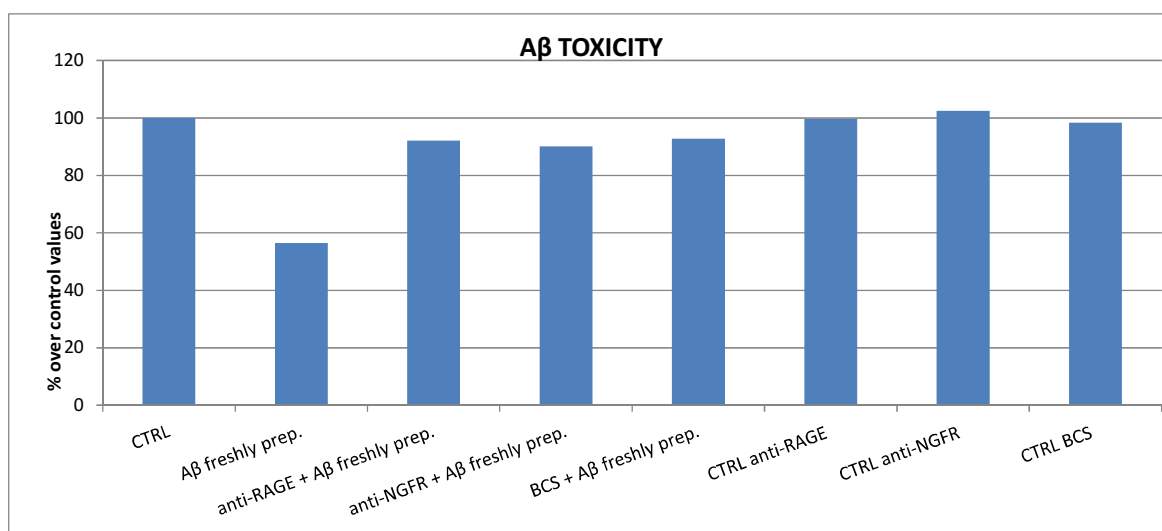


MTT assay after treatment with Aβ₂₅₋₃₅ (3 μM), freshly prepared and incubated 24-144 hrs at 37°C in presence of copper (3 μM), on neuroblastoma cell cultures.

Data obtained after treatment of neuroblastoma cell cultures show a decrease in the viability of cells treated with the freshly prepared peptide and, in greater extent, in cells treated with the peptide incubated for 24 hours in

presence of copper in 1:1 ratio; instead, incubated alone peptide does not influence cellular viability in a particular way. After a longer incubation time (144 hours), toxicity decreases for both peptides, with or without copper. These data are in agreement with those ones seen in aggregation Th-T assay; it is conceivable an evolution of the aggregation process, which finishes with the formation of not toxic structures. This process is influenced by the presence of metals which, altering the aggregates structure, cause a slowdown in the evolution to not toxic structures. Particularly, metal-incubated peptide toxicity is strongly evident within 24 hours of incubation before cells treatment; vice versa, the peptide incubated without metals quickly loses this toxic effect. This hypothesis is sustained by the observation that, after a longer incubation period, the peptide reaches not toxic aggregation states, even in presence of metals. Cellular viability is negatively influenced even by the freshly prepared peptide, because of the presence of soluble toxic oligomers, which spontaneously form during the cells treatment time at 37°C.

Treatment of cell cultures with the different preparations of A β had the aim to create the conditions of cellular stress probably occurring during AD pathogenesis. Then experiments were done to evaluate the possible protective effects and the probable cellular damage pathway, treating the cells in presence of different compounds such as: anti-RAGE antibody, anti-p75 (NGFR) antibody and the chelating compound bathocuproine (BCS). Pretreatment with anti-RAGE and anti-p75 antibodies and with bathocuproine resulted in a protective effect against the treatment with A β peptide, measured as reduction capacity of MTT, in SHSY5Y cell cultures treated with the freshly prepared peptide.



MTT assay after treatment with A β ₂₅₋₃₅ (3 μ M) freshly prepared, after a 2 hours pre-treatment with antibodies (2.5 μ g/ml) and bathocuproine (50 μ M), on neuroblastoma cultures.

RAGE–ligand interaction can directly promote reactive oxygen species (ROS) generation via NADPH oxidase and other mechanisms (Lander, H.M. et al., 1997; Wautier, M.P. et al., 2001). Pre-treatment with anti-RAGE antibody reduces peptide-induced toxicity, showing thus the importance of this receptor in mediating the observed cellular damage (Lue, L.F. et al., 2005).

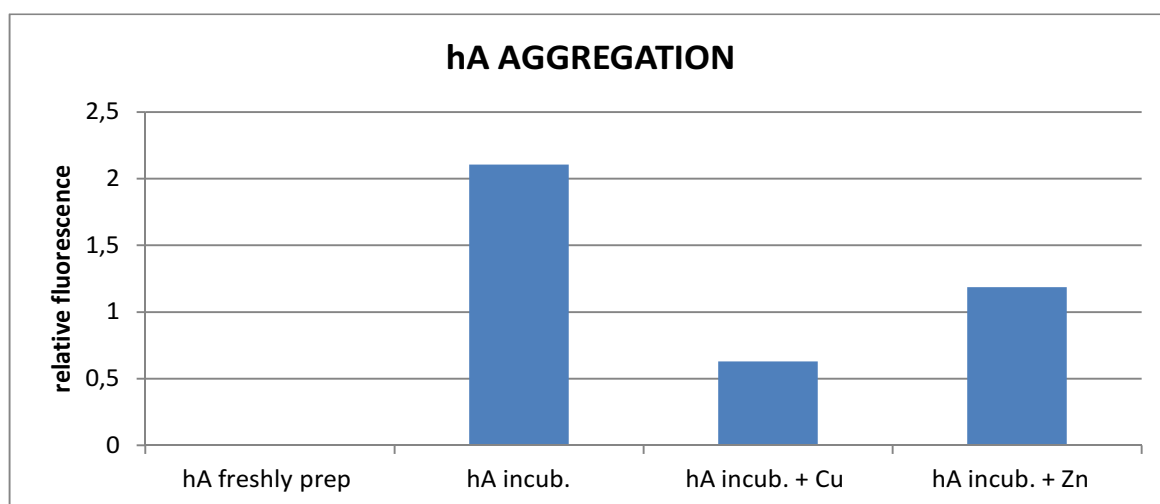
A β also serves as a p75 ligand (Davies A.M., 2003). The binding of A β chains, especially aminoacid within the 29–35 sequence, to p75 has been shown to induce neurotoxicity (Coulson E.J., 2006) and apoptosis (Yaar, M. et al., 1997; Maloney, M.T., et al., 2005), through the receptor’s intracellular death domain signaling mechanism (Hashimoto, Y. et al, 2004). The death domain in turn activates G₀ which leads to JNK phosphorylation (Coulson E.J., 2006; Hashimoto, Y. et al, 2004). Pre-treatment with anti-p75 antibody reduces peptide-induced toxicity, showing thus the involvement of this receptor in mediating the observed toxic response.

Metal chelators, especially those that target zinc and copper, can dissociate metal-bound aggregates (Cherny et al., 1999), and those one intrinsic to the architecture of A β aggregates in the human brain. Bathocuproine disulfonate

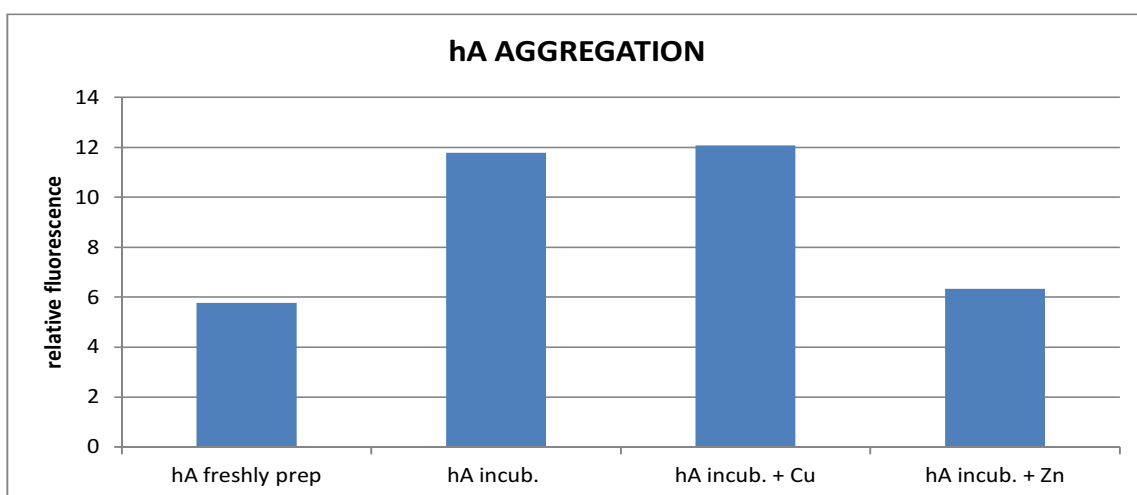
(BCS), a potent Cu(I) chelator, shows linear dose dependence in solubilizing A β aggregates, making them not toxic. Pre-treatment with BCS reduces peptide-induced toxicity, showing thus the solubilizing effect of this chelating compound in the peptide aggregated structures, typically toxic for cultured cells (Cherny et al.,1999).

Aggregation analysis of hA₁₇₋₂₉ peptide

Taking into account the amyloidogenic characteristics of human amylin, it was done a study of the aggregation kinetics for the hA₁₇₋₂₉ peptide, incubated alone or in presence of metals, in order to analyze the similarities of behaviour with A β and the influence of metals in this process.

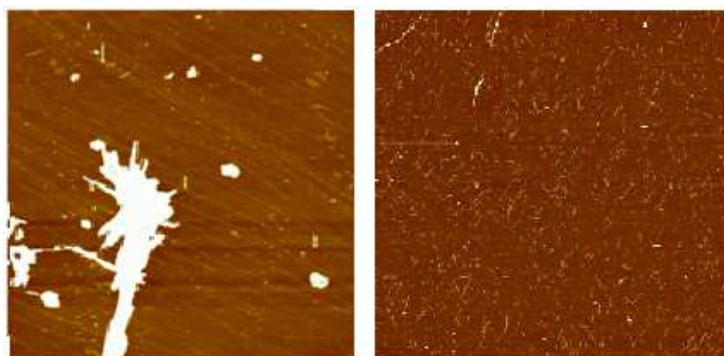


Th-T assay on hA₁₇₋₂₉ samples, prepared at the final concentration of 100 μ M in PBS 0.01 M and incubated at 37°C for 24 hours. Copper and zinc are in 1:1 concentration ratio with the peptide.



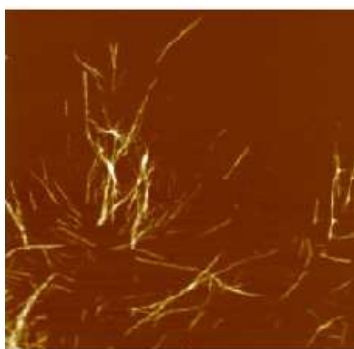
Th-T assay on hA₁₇₋₂₉ samples, prepared at the final concentration of 100 μ M in PBS 0.01 M and incubated at 37°C for 120 hours. Copper and zinc are in 1:1 concentration ratio with the peptide.

Aggregation state of the peptide was measured with Th-T assay. After 24 hours of incubation, it is possible to see an increase in fluorescence intensity for the peptide incubated alone towards control (freshly prepared peptide); in presence of Cu²⁺ and Zn²⁺ during incubation, the peptide shows a lower fluorescence intensity, as a consequence of the contrast to fibrillogenesis given by metals. As an evolution of the aggregation process, after 120 hours of incubation, fluorescence intensity increases even in presence of copper and zinc. In order to obtain some information about the structure of the aggregates after 72 hours of incubation at 37°C, peptide samples were analyzed by AFM microscopy. Images show the presence of large and rigid fibrillary deposits and the formation of thin fibrils in the peptide sample incubated alone; in presence of copper, the peptide forms only numerous short and thin aggregates.



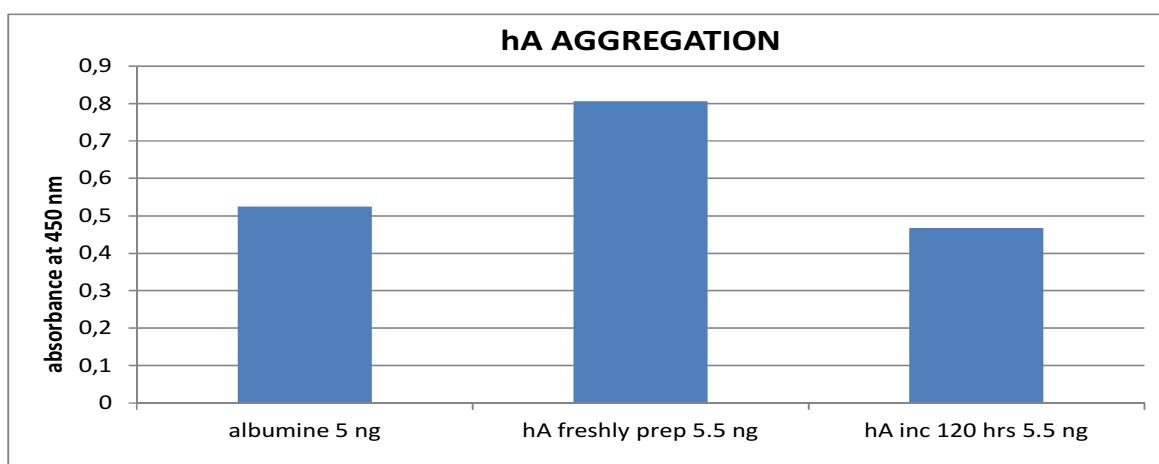
AFM images of hA₁₇₋₂₉ 100 μ M incubated alone and with CuSO₄ for 72 hrs at 37°C.

Fibrillary aggregates of varying length, thin and unbranched, are visible in the sample incubated with Zn²⁺.



AFM images of hA₁₇₋₂₉ 100 μ M incubated with ZnSO₄ 100 μ M

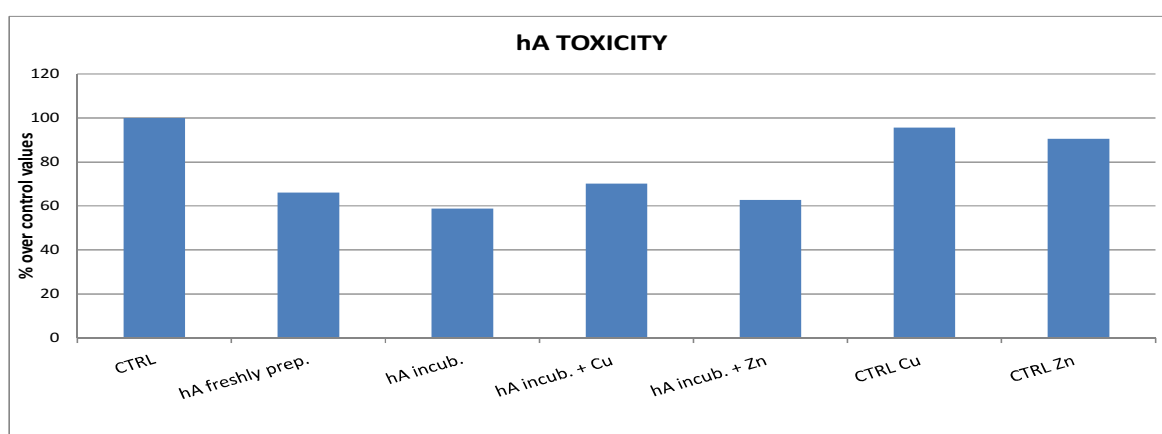
In order to evaluate the change in oligomers content during incubation at 37°C, peptide samples were analyzed by ELISA assay with A11 antibody, specific for oligomers. Oligomeric species are particularly elevated in the freshly prepared sample; after incubation at 37°C for a long time (120 hrs), the peptide loses its oligomeric form, as a consequence of the aggregation process evolution towards fibrillary structures.



ELISA assay with A11 antibody (1 $\mu\text{g/ml}$), in samples of hA₁₇₋₂₉ freshly prepared and incubated (100 μM in PBS 0.01 M) 120 hrs at 37°C

Toxicity analysis of hA₁₇₋₂₉ peptide

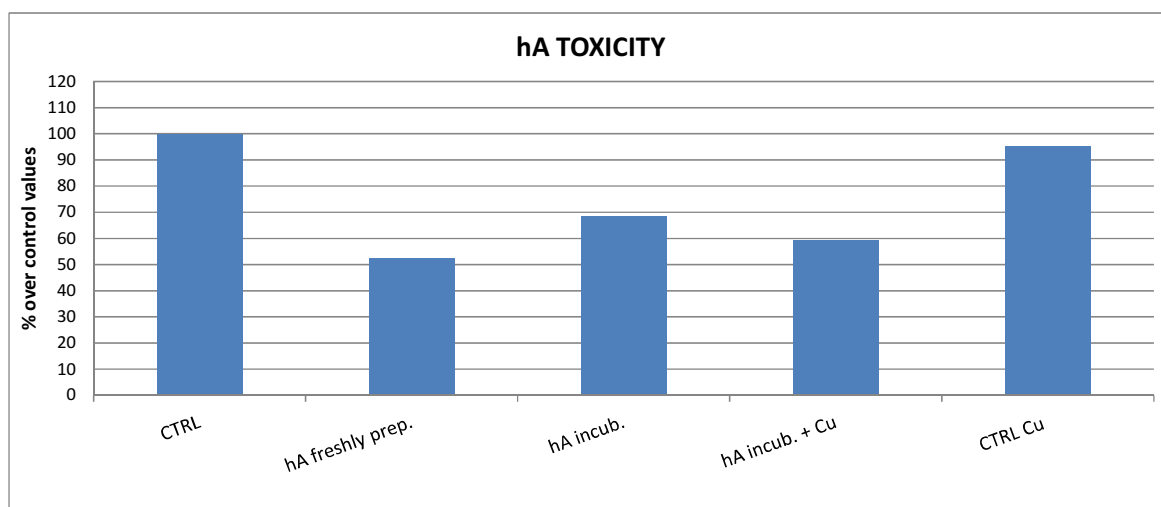
In order to evaluate the relationship between aggregation state and toxicity, neuroblastoma cells were treated with hA₁₇₋₂₉ peptide preincubated with Cu^{2+} and Zn^{2+} in 1:1 ratio.



MTT assay on neuroblastoma cultures after treatment with hA₁₇₋₂₉ (25 μM), freshly prepared and incubated for 2 hrs at 37°C in presence of copper and zinc in 1:1 ratio with the peptide.

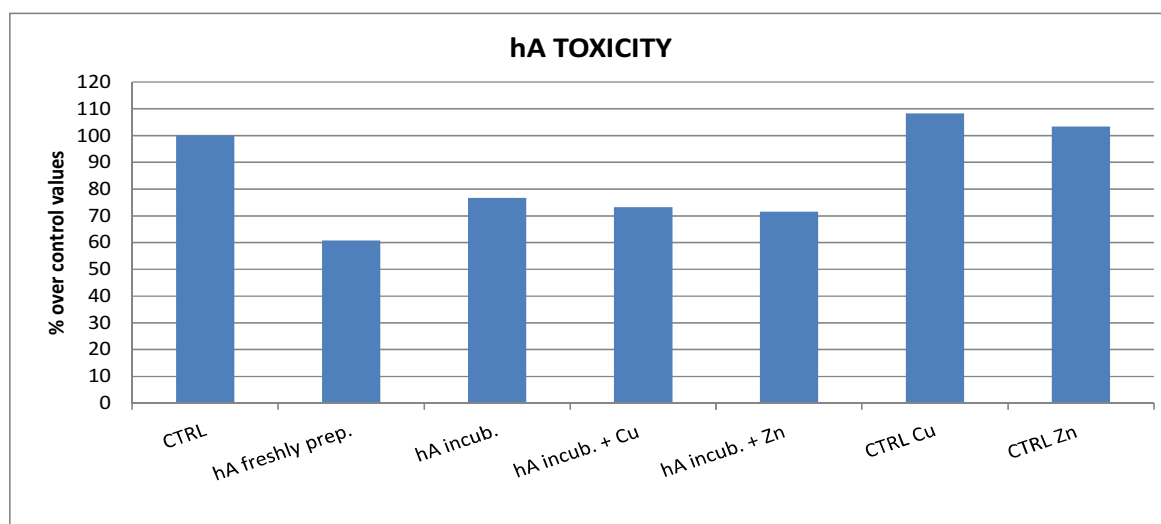
Pre-incubation of amylin with zinc causes the formation of structures with a toxicity similar to that caused by the peptide incubated with copper. Incubated alone peptide toxicity depends on the short time of preincubation

(2 hours), which allows the formation of toxic oligomers, species that are present even in the freshly prepared peptide.



MTT assay on neuroblastoma cells after treatment with hA₁₇₋₂₉ (25 μM), freshly prepared and incubated for 24 hrs at 37°C in presence of copper in 1:1 ratio with the peptide.

As preincubation time increases, a gradual decrease in peptide toxicity occurs, when it is incubated in absence of metals; instead, if metal is present during incubation, peptide toxicity remains high, because of the formation of toxic oligomeric species favored by copper.



MTT assay on neuroblastoma cells after treatment with hA₁₇₋₂₉ (25 μM), freshly prepared and incubated for 120 hrs at 37°C in presence of copper and zinc in 1:1 ratio with the peptide.

At a time of pre-incubation even longer (120 hrs), in absence of metals, it is possible to observe a further decrease in the peptide toxicity towards neuroblastoma cells; if copper and zinc are present during pre-incubation time, a gradual decrease of toxicity occurs, as an evolution of toxic oligomeric species towards an insoluble fibrillary, and consequently not toxic form.

DISCUSSION

Data show that hA₁₇₋₂₉, A β ₁₋₄₂ and A β ₂₅₋₃₅ peptides, after incubation at 37°C, spontaneously form amorphous or fibrillary aggregates; in presence of copper or zinc fibrillogenesis undergoes changes, tightly linked to the time of incubation, especially in the shift from one species to another. These changes may be related to the toxicity degree measured after treatment of neuroblastoma cell cultures (SHSY5Y).

Cellular toxicity increase, induced by pretreatment with copper or zinc, may be explained with a slowdown in the evolution toward not toxic structures, and a consequent stabilization of oligomeric aggregates, notoriously much more toxic than fibrillary species.

In the past, the involvement of A β peptide in AD was interpreted primarily through the hypothesis of "amyloid cascade" according to which the overproduction of A β and its aggregation into senil plaques constitute the fundamental cause of AD (Hardy, J. et Allsop, D., 1991).

Several clinical manifestations of AD may not, however, be entirely explained by the "amyloid hypothesis"; for example, there is not a perfect correlation between number, time or distribution of amyloid plaques and some parameters of the disease, such as the degree of dementia and neurodegeneration (Hardy, J. et Gwinn-Hardy, K., 1998); conversely, the concentrations of soluble oligomers in the brain are highly correlated with the

severity of the disease (McLean, CA *et al.*, 1999) and toxic effects for non-fibrillary forms of A β -peptide were demonstrated (Lambert, MP *et al.*, 2001; Wang, HW *et al.*, 2002). Moreover, there are increasing evidences that oligomeric species of A β reduce cell viability about 10 times more than the fibrillary aggregates (Dalhgren, KN *et al.*, 2002).

Treatment of neuroblastoma cultures with the different preparations of peptide led to a decrease of viability; these data are consistent with those reported in literature according to which the oligomeric forms of A β have neurotoxic properties (Walsh, DM *et al.*, 2002; Lambert, MP *et al.*, 1998).

Furthermore, treatment with the peptide incubated in presence of metals is much more toxic over the time, thanks to an oligomer-stabilizing action of the metals, which slow down the aggregates evolution towards not toxic fibrillary forms. In agreement with literature data previously shown, cultures pre-treatment with anti-RAGE and anti-p75 antibodies shows the involvement of these receptors in A β -induced toxicity, as well as the use of bathocuproine causes a protective effect, due to its ability in solubilizing the toxic species.

Experimental data obtained using the human amylin peptide are in agreement with other studies, according to which amylin cytotoxicity could be mediate by the interaction with Cu²⁺ (Masad *et al.*, 2007). Electron donation from amylin to Cu²⁺ ions could lead to the formation of Cu⁺-peptide complexes, which can also derive from the direct bound of the peptide to Cu⁺ ions. Cu⁺-peptide complex could stimulate H₂O₂ formation starting from O₂, with consequent reversion of Cu⁺ to the higher oxidation state Cu²⁺. This mechanism could be repeated cyclically, giving rise to the generation of hydroxyl radicals from H₂O₂, through Fenton reaction.

The bond with metal ions influences aggregation, causing changes in precipitation and fibrillogenesis speed, amyloid aggregates toxicity and their final morphology (Noy *et al.* 2008). Thanks to the discovery of metal ions high concentration in amyloid deposits, their dyshomeostasis comprehension

is thus fundamental to understand the toxicity mechanism. Toxic consequences of metal-amyloid peptide interaction could be avoided by understanding the role of metal transporters in this process.

Despite the lack of similarity in their primary structure, A β and hA peptides share several characteristics, such as the ability to assume the same secondary conformation and form insoluble proteic aggregates, in the brain and pancreatic islets, respectively. Furthermore, several experimental data suggest a common toxicity mechanism, for example: the ability of AC187, an antagonist of amylin receptor, to block A β -induced toxicity (Jhamandas et al. 2003); the increase in APP levels, induced by both peptides in neuronal and astrocytic cultures (White et al. 2003); the involvement of integrin signalling transduction pathway in A β - and hA-induced neurotoxicity (Wright et al. 2007); the capacity of both peptides to induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress, and the consequent cell response to abnormal protein folding (unfolded protein response) (Song et al. 2008; David et al. 2006).

Further evidence to support the hypothesis of a common mechanism of cytotoxicity may be provided by the recognition of oligomers (but not fibrillary structures), both for A β and hA, by A11 antibody; this would suggest a common structural motif and thus a possible way to understand a general mechanism of toxicity in diseases characterized by protein misfolding (Kayed et al. 2003).

Through a comparative study of the aggregation and toxicity of the two peptides, it could be possible then to identify common receptors and/or transduction pathways involved in the mechanisms of toxicity and, consequently, open the way for the development of effective treatment strategies for Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus.

BIBLIOGRAFIA

- Ahren, B., Oosterwijk, C., Lips, C.J., Höppener, J.W.. Transgenic overexpression of human islet amyloid polypeptide inhibits insulin secretion and glucose elimination after gastric glucose gavage in mice. *Diabetologia* 41: 1374-13780 (1998).
- Angeletti, B., Waldron, K.J., Freeman, K.B., Bawagan, H., Hussain, I., Miller, C.C., Lau, K.F., Tennant, M.E., Dennison, C., Robinson, N.J., Dingwall, C., BACE1 cytoplasmic domain interacts with the copper chaperone for superoxide dismutase-1 and binds copper. *J. Biol. Chem.* 280, 17930–17937. (2005)
- Antzutkin ON, Leapman RD, Balbach JJ, Tycko R. Sopramolecular structural constraints on Alzheimer's β -amyloid fibrils from electron microscopy and solidstate nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* 41:15436–15450 (2002).
- Armendariz, A.D., Gonzalez, M., Loguinov, A.V., Vulpe, C.D., Gene expression profiling in chronic copper overload reveals upregulation of Prnp and App. *Physiol. Genomics* 20, 45–54. (2004).
- Atwood, C.S., Moir, R.D., Huang, X., Bacarra, N.M.E., Scarpa, R.C., Romano, D.M., Hartshorn, M.A., Tanzi, R.E., and Bush, A.I., Dramatic aggregation of Alzheimer A β by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis, *J. Biol. Chem.* 273, 12817–12826 (1998).
- Atwood, C.S., Scarpa, R.C., Huang, X., Moir, R.D., Jones, W.D., Fairlie, D.P., Tanzi, R.E., Bush, A.I., Characterization of copper interactions with alzheimer amyloid beta peptides: identification of an attomolar-affinity copper binding site on amyloid beta1-42. *J. Neurochem.* 75, 1219–1233. (2000).

- Baldo BA and Kelley AE. Amylin infusion into rat nucleus accumbens potently depresses motor activity and ingestive behavior. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 281: 1232–1242 (2001).
- Barnes, P.J., Karin, M.,. Nuclear factor-kB – a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.* 336, 1066–1071. (1997)
- Barnham KJ, HaeVner F, Ciccotosto GD, Curtain CC, Tew D, Mavros C, Beyreuther K, Carrington D, Masters CL, Cherny RA, Cappai R, Bush AI. Tyrosine gated electron transfer is key to the toxic mechanism of Alzheimer’s disease beta-amyloid. *FASEB J* 18:1427–1439 (2004).
- Barnham, K.J., McKinstry, W.J., Multhaup, G., Galatis, D., Morton, C.J., Curtain, C.C., Williamson, N.A., White, A.R., Hinds, M.G., Norton, R.S., Beyreuther, K., Masters, C.L., Parker, M.W., Cappai, R.,. Structure of the Alzheimer’s disease amyloid precursor protein copper binding domain. A regulator of neuronal copper homeostasis. *J. Biol. Chem.* 278, 17401–17407. (2003)
- Basun, H., Forssell, L.G., Wetterberg, L., Winblad, B.,. Metals and trace elements in plasma and cerebrospinal fluid in normal aging and Alzheimer’s disease. *J. Neural. Transm. Park Dis. Dement. Sect. 3*, 231–258. (1991)
- Baum, L., Chan, I.H., Cheung, S.K., Goggins, W.B., Mok, V., Lam, L., Leung, V., Hui, E., Ng, C., Woo, J., Chiu, H.F., Zee, B.C., Cheng, W., Chan, M.H., Szeto, S., Lui, V., Tsoh, J., Bush, A.I., Lam, C.W., Kwok, T.,. Serum zinc is decreased in Alzheimer’s disease and serum arsenic correlates positively with cognitive ability. *Biometals* 23, 173–179. (2010)
- Behl, C., Moosmann, B.,. Antioxidant neuroprotection in Alzheimer’s disease as preventive and therapeutic approach. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 182–191 (2002).
- Bellingham, S.A., Lahiri, D.K., Maloney, B., La Fontaine, S., Multhaup, G., Camakaris, J., Copper depletion down-regulates expression of the

Alzheimer's disease amyloid-beta precursor protein gene. *J. Biol. Chem.* 279, 20378–20386. (2004b).

- Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Loeloff, R., Louis, J.C., Curran, E., Citron, M., Vassar, R.,. Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. *J. Biol. Chem.* 275, 20647–20651. (2000)
- Benvenisti-Zarom, L., Chen, J., Regan, R.F.,. The oxidative neurotoxicity of clioquinol. *Neuropharmacology* 49, 687–694 (2005).
- Bierhaus, A., Schiekofe, S., Schwaninger, M., Andrassy, M., Humpert, P., Chen, J., Hong, M., Luther, T., Henle, T., Klöting, I., Morcos, M., Hofmann, M., Tritschler, H., Weigle, B., Kasper, M., Smith, M.A., Perry, G., Schmidt, A.M., Stern, D.M., Häring, H.U., Schleicher, E., Nawroth, P.P., Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor NF- κ B. *Diabetes* 50, 2792–2809. (2001).
- Braak, H., Braak, E., Bohl, J., Staging of Alzheimer-related cortical destruction. *Eur. Neurol.* 33, 403–408 (1993).
- Breen, K.C., Bruce, M., Anderton, B.H.,. Beta amyloid precursor protein mediates neuronal cell–cell and cell–surface adhesion. *J. Neurosci. Res.* 28, 90–100. (1991)
- Brett, J., Schmidt, A.M., Yan, S.D., Zhou, Y.S., Weidmann, E., Pinsky, D., Nowygrod, R., Neeper, M., Przysiecki, C., Dhaw, A., Migheli, A., Stern, D.M.,. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissue. *Am. J. Pathol.* 143, 1699–1712. (1993)
- Brouillet, E., Trembleau, A., Galanaud, D., Volovitch, M., Bouillot, C., Valenza, C., Prochiantz, A., Allinquant, B., The amyloid precursor protein interacts with G_o heterotrimeric protein within a cell compartment specialized in signal transduction. *J. Neurosci.* 19, 1717–1727. (1999).

- Brown, D.R., Kozlowski, H.,. Biological inorganic and bioinorganic chemistry of neurodegeneration based on prion and Alzheimer diseases. *Dalton Trans.* 1907–1917. (2004)
- Bucciarelli, L.G., Wendt, T., Rong, L., Lalla, E., Hofmann, M.A., Goova, M.T., Taguchi, A., Yan, S.F., Yan, S.D., Stern, D.M., Schmidt, A.M.,. RAGE is a multiligand receptor of the immunoglobulin superfamily: implications for homeostasis and chronic disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 1117–1128. (2002)
- Bunker, V.W., Hinks, L.J., Stansfield, M.F., Lawson, M.S., Clayton, B.E., Metabolic balance studies for zinc and copper in housebound elderly people and the relationship between zinc balance and leukocyte zinc concentrations. *Am. J. Clin. Nutr.* 46, 353–359. (1987).
- Bush, A.I., Multhaup, G., Moir, R.D., Williamson, T.G., Small, D.H., Rumble, B., Pollwein, P., Beyreuther, K., Masters, C.L., A novel zinc(II) binding site modulates the function of the beta A4 amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 268, 16109–16112. (1993)
- Bush, A.I., Pettingell Jr., W.H., de Paradis, M., Tanzi, R.E., Wasco, W.,. The amyloid beta-protein precursor and its mammalian homologues. Evidence for a zinc-modulated heparin-binding superfamily. *J. Biol. Chem.* 269, 26618–26621. (1994a)
- Bush, A.I., Pettingell Jr., W.H., Paradis, M.D., Tanzi, R.E., Modulation of A beta adhesiveness and secretase site cleavage by zinc. *J. Biol. Chem.* 269, 12152–12158. (1994b).
- Bush, A.I., Pettingell, W.H., Multhaup, G., d Paradis, M., Vonsattel, J.P., Gusella, J.F., Beyreuther, K., Masters, C.L., Tanzi, R.E., Rapid induction of Alzheimer A beta amyloid formation by zinc. *Science* 265, 1464–1467. (1994c).

- Butterfield, D.A., Amyloid beta-peptide (1–42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic. Res.* 36, 1307–1313 (2002).
- Butterfield, D.A., Lauderback, C.M., Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 1050–1060. (2002).
- Butterfield, D.A., Stadtman, E.R., Protein oxidation processes in aging brain. *Adv. Cell Aging Gerontol.* 2, 161–191. (1997).
- Carter, B.D., Medzihradsky, F., Go mediates the coupling of the mu opioid receptor to adenylyl cyclase in cloned neural cells and brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 4062–4066. (1993).
- Caughey, B., Lansbury, P.T., Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu. Rev. Neurosci.* 26, 267–298. (2003).
- Chen, M., Yankner, B.A., An antibody to beta amyloid and the amyloid precursor protein inhibits cell-substratum adhesion in many mammalian cell types. *Neurosci. Lett.* 125, 223–226. (1991).
- Chen, Y., Zeng, J., Chen, Y., Wang, X., Yao, G., Wang, W., Qi, W., Kong K., Multiple roles of the p75 neurotrophin receptor in the nervous system, *J. Int. Med. Res.* 37 281–288. (2009)
- Cherny, R.A., Atwood, C.S., Xilinas, M.E., Gray, D.N., Jones, W.D., McLean, C.A., Barnham, K.J., Volitakis, I., Fraser, F.W., Kim, Y., Huang, X., Goldstein, L.E., Moir, R.D., Lim, J.T., Beyreuther, K., Zheng, H., Tanzi, R.E., Masters, C.L., Bush, A.I., Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits betaamyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neuron* 30, 665–676.(2001).
- Cherny, R. A., Legg, J. T., McLean, C. A., Fairlie, D., Huang, X., Atwood, C. S., Beyreuther, K., Tanzi, R. E., Masters, C. L., and Bush, A. I. Aqueous

- dissolution of Alzheimer's disease A β amyloid deposits by biometal depletion, *J. Biol. Chem.* 274, 23223–23228 (1999).
- Choi BS, Zheng W. *Brain Res* 1248:14–21 (2009).
 - Cole, T.B., Wenzel, H.J., Kafer, K.E., Schwartzkroin, P.A., Palmiter, R.D., Elimination of zinc from synaptic vesicles in the intact mouse brain by disruption of the ZnT3 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 1716–1721. (1999).
 - Cooper, G.J.S., Willis, A.C., Clark, A., Turner, R.C., Sim, R.B., Reid, K.B.M. Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84: 8628-8632 (1987).
 - Costantini C., Scrable H., Puglielli L., An aging pathway controls the TrkA to p75NTR receptor switch and amyloid β -peptide generation, *EMBO J.* 25 1997–2006 (2006).
 - Costantini C., Weindruch R., Della Valle G., Puglielli L., A TrkA to p75NTR molecular switch activates amyloid beta-peptide generation during aging, *Biochem. J.* 391 59–67 (2005)
 - Coulson E.J., Does p75 neurotrophin receptor mediate A β -induced toxicity in Alzheimer's disease?, *J Neurochem.* 98 654–660 (2006).
 - Cruts, M., Backhovens, H., Wang, S.Y., Van Gassen, G., Theuns, J., De Jonghe, C.D., Wehnert, A., De Voecht, J., De Winter, G., Cras, P., et al.,. Molecular genetic analysis of familial early-onset Alzheimer's disease linked to chromosome 14q24.3. *Hum. Mol. Genet.* 4, 2363–2371. (1995)
 - Curtain CC, Ali F, Volitakis I, Cherny RA, Norton RS, Beyreuther K, Barrow CJ, Masters CL, Bush AI, Barnham KJ. Alzheimer's disease amyloid-beta binds copper and zinc to generate an allosterically ordered membrane-penetrating structure containing superoxide dismutase-like subunits. *J Biol Chem* 276:20466–20473 (2001).

- Dahlgren, K.N., Manelli, A.M., Blaine Stine, W.Jr., Baker, L.K., Krafft, G.A., LaDu M.J.,. Oligomeric and Fibrillar Species of Amyloid- β Peptides Differentially Affect Neuronal Viability. *J. Biol. Chem.* 277, 32046–32053. (2002)
- David,D.C., Ittner, L.M., Gehrig, P., Nergenu,D., Shepherd, C., Halliday, G. and Gotz, J. Beta-amyloid treatment of two complementary P301L tau-expressingAlzheimer_s disease models reveals similar deregulated cellular processes. *Proteomics* 6, 6566–6577 (2006)
- Davies A.M., Regulation of neuronal survival and death by extracellular signals during development, *EMBO J.* 22 2537–2545 (2003).
- DeFreitas, M.F., McQuillen, P.S., Shatz, C.J. A novel p75NTR signaling pathway promotes survival, not death, of immunopurified neocortical subplate neurons, *J. Neurosci.* 21 5121–5129 (2001).
- Deraeve, C., Pitie, M., Meunier, B.,. Influence of chelators and iron ions on the production and degradation of H₂O₂ by beta-amyloid-copper complexes. *J. Inorg. Biochem.* 100, 2117–2126. (2006)
- DeToma Alaina S., Salamekh Samer, Ramamoorthy Ayyalusamy and Lim Mi Hee. Misfolded proteins in Alzheimer’s disease and type II diabetes. *Chem. Soc. Rev.*, , **41**, 608–621 (2012)
- Dobson MC. Protein folding and disease: a view from the first horizon symposium. *Nat Drug Disc* 2:154–160 (2003).
- Dong, J., Atwood, C.S., Anderson, V.E., Siedlak, S.L., Smith, M.A., Perry, G., Carey, P.R.,. Metal binding and oxidation of amyloid-beta within isolated senile plaque cores: Raman microscopic evidence. *Biochemistry* 42, 2768–2773. (2003)
- Duce James A. and Bush Ashley I.. Biological metals and Alzheimer’s disease: Implications for therapeutics and diagnostics *Progress in Neurobiology* 92: 1–18 (2010).

- El Meskini, R., Crabtree, K.L., Cline, L.B., Mains, R.E., Eipper, B.A., Ronnett, G.V., ATP7A (Menkes protein) functions in axonal targeting and synaptogenesis. *Mol. Cell. Neurosci.* 34, 409–421. (2007).
- Farzan, M., Schnitzler, C.E., Vasilieva, N., Leung, D., Choe, H., BACE2, a beta-secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 9712–9717. (2000)
- Frederickson, C.J., Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons. *Int. Rev. Neurobiol.* 31, 145–238. (1989)
- Friedman, W.J., Greene, L.A. Neurotrophin signaling via trk and p75, *Exp. Cell Res.* 253, 131–142 (1999)
- Friedman W.J., Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor, *J. Neurosci.* 20 6340–6346 (2000).
- Gabbita, S.P., Lovell, M.A., Markesbery, W.R., Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 71, 2034–2040 (1998).
- Gaggelli, E., Kozlowski, H., Valensin, D., Valensin, G.. Copper homeostasis and neurodegenerative disorders (Alzheimer's, prion and Parkinson's diseases and amyotrophic lateral sclerosis). *Chem. Rev.* 106: 1995-2044 (2006).
- Giambarella, U., Yamatsuji, T., Okamoto, T., Matsui, T., Ikezu, T., Murayama, Y., Levine, M.A., Katz, A., Gautam, N., Nishimoto, I., G protein $\beta\gamma$ complex-mediated apoptosis by familial Alzheimer's disease mutant of APP. *EMBO J.* 16, 4897–4907. (1997).
- Ha, C., Ryu, J., Park, C.B., Metal ions differentially influence the aggregation and deposition of Alzheimer's beta-amyloid on a solid template. *Biochemistry* 46, 6118–6125. (2007)
- Haines D.E., Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications, third ed., *Livinstone Elsevier*, Churchill, Philadelphia, 2006.

- Hardy, J., Allsop, D., Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 383–388. (1991)
- Hardy, J. et Gwinn-Hardy, K., *Science* 282, 1075–1079. (1998)
- Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353–356 (2002).
- Harrington A.W., Kim J.Y., Yoon S.O., Activation of Rac GTPase by p75 is necessary for c-jun N-terminal kinase-mediated apoptosis, *J. Neurosci.* 22 156–166 (2002).
- Hartley DM, Walsh DM, Ye CP et al. Protofibrillar intermediates of amyloid β -protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurones. *J Neurosci* 19(20):8876–8884 (1999).
- Hartmann, T., Bieger, S.C., Bruhl, B., Tienari, P.J., Ida, N., Allsop, D., Roberts, G.V., Masters, C.L., Dotti, C.G., Unsicker, K., Beyreuther, K.,. Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease α - β -40/42 amyloid peptides. *Nat. Med.* 3, 1016–1020. (1997)
- Hashimoto Y., Kaneko Y., Tsukamoto E., Frankowski H., Kouyama K., Kita Y., Niikura T., Aiso S., Bredesen D.E., Matsuoka M., Nishimoto I., Molecular characterization of neurohybrid cell death induced by Alzheimer's amyloid- β peptides via p75NTR/PLAIDD, *J. Neurochem.* 90 549–558 (2004).
- Hensley, K., Carney, J.M., Mattson, M.P., Aksenova, M., Harris, M., Wu, J.F., Floyd, R.A., Butterfield, D.A., A model for β -amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: Relevance to Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 3270–3274. (1994).

- Hescheler, J., Rosenthal, W., Trautwein, W., Schultz, G.,. The GTP-binding protein, G_o, regulates neuronal calcium channels. *Nature* 325, 445–447. (1987)
- Hesse, L., Beher, D., Masters, C.L., Multhaup, G.,. The beta A4 amyloid precursor protein binding to copper. *FEBS Lett.* 349, 109–116. (1994)
- Hoke, D.E., Tan, J.L., Ilaya, N.T., Culvenor, J.G., Smith, S.J., White, A.R., Masters, C.L., Evin, G.M.,. In vitro gamma-secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein correlates to a subset of presenilin complexes and is inhibited by zinc. *FEBS J.* 272, 5544–5557. (2005)
- Höppener, J.W., Lips, C.J.M.,. Role of islet amyloid in type 2 diabetes mellitus. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 38: 726-736 (2006).
- Huang, X., Atwood, C.S., Cuajungco, M.P., Hartshorn, M.A., Tyndall, J., Hanson G.R., Stokes, K.C., Leopold, M., Multhaup, G., Goldstein, L.E., Scarpa, R.C., Saunders, A.J., Lim, J., Moir, R.D., Glabe, C., Bowden, E.F., Masters, C.L., Fairlie, D.P., Tanzi, R.E., and Bush, A.I.,. Cu(II) potentiation of Alzheimer A β neurotoxicity: Correlation with cell-free hydrogen peroxide production and metal reduction, *J. Biol. Chem.* 274, 37111–37116 (1999)
- Huang, X., Atwood, C.S., Hartshorn, M.A., Multhaup, G., Goldstein, L.E., Scarpa, R.C., Cuajungco, M.P., Gray, D.N., Lim, J., Moir, R.D., Tanzi, R.E., Bush, A.I., The A β peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry* 38, 7609–7616 (1999).
- Hureau, C., Faller, P.,. A β -mediated ROS production by Cu ions: structural insights, mechanisms and relevance to Alzheimer's disease. *Biochimie* 91, 1212–1217. (2009)
- Huse, J.T., Pijak, D.S., Leslie, G.J., Lee, V.M., Doms, R.W.,. Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving

enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. *J. Biol. Chem.* 275, 33729–33737. (2000)

- Hutton, M., Busfield, F., Wragg, M., Crook, R., Perez-Tur, J., Clark, R.F., Prihar, G., Talbot, C., Phillips, H., Wright, K., Baker, M., Lendon, C., Duff, K., Martinez, A., Houlden, H., Nichols, A., Karran, E., Roberts, G., Roques, P., Rossor, M., Venter, J.C., Adams, M.D., Cline, R.T., Phillips, C.A., Goate, A., et al., Complete analysis of the presenilin 1 gene in early onset Alzheimer's disease. *NeuroReport* 7, 801–805. (1996)
- Jaikaran, E.T., Clark, A.. Islet amyloid and type 2 diabetes: from molecular misfolding to islet pathophysiology. *Biochim. Biophys. Acta.* 1537: 179-203 (2001).
- Jhamandas J. H., Harris K.H., Cho C., Fu W., MacTavish D. Human Amylin Actions on Rat Cholinergic Basal Forebrain Neurons: Antagonism of Beta-Amyloid Effects. *J Neurophysiol* 89: 2923–2930 (2003).
- Jhamandas Jack H., MacTavish David. β -Amyloid protein ($A\beta$) and human amylin regulation of apoptotic genes occurs through the amylin receptor. *Apoptosis* 17:37–47 (2012)
- Kahn, S.E., Fujimoto, W.Y., D'Alessio, D.A., Ensink, J.W., Porte, D. Jr.. Glucose stimulates and potentiates islet amyloid polypeptide secretion by the B-cell. *Horm. Metab. Res.* 23: 577-580 (1991).
- Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H et al. APP processing and synaptic function. *Neuron* 37:925–937 (2003).
- Kapurniotu, A.. Amyloidogenicity and cytotoxicity of islet amyloid polypeptide. *Biopolymers* 60: 438-459 (2001).
- Kar, S., Seto, D., Gaudreau, P., Quirion, R.,. Beta-amyloid-related peptides inhibit potassium-evoked acetylcholine release from rat hippocampal slices. *J. Neurosci.* 16, 1034–1040. (1996)
- Kawahara M, Kuroda Y, Arispe N, and Rojas E. Alzheimer's β -amyloid, human islet amylin and prion protein fragment evoke intracellular free

calcium elevations by a common mechanism in a hypothalamic GnRH neuronal cell line. *J Biol Chem* 274: 14077–14083 (2000).

- Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*. Apr 18;300 (5618):486-9. (2003)
- Kim BE, Nevitt T, Thiele DJ. *Nat Chem Biol* 4:176–185 (2008)
- Kuo, Y.M., Emmerling, M.R., Vigo-Pelfrey, C., Kasunic, T.C., Kirkpatrick, J.B., Murdoch, G.H., Ball, M.J., Roher, A.E., *J. Biol. Chem.* 271, 4077–4081. (1996).
- Kuo YM, Zhou B, Cosco D, Gitschier. *J Proc Natl Acad Sci* 98:6836–6841 (2001)
- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA et al. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β ₁₋₄₂ are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6448–6453 (1998).
- Lambert, M.P., Viola, K.L., Chromy, B.A., Chang, L., Morgan, T.E., Yu, J., Venton, D.L., Krafft, G.A., Finch, C.E., Klein, W.L., *J. Neurochem.* 79, 595–605. (2001)
- Lander, H.M., Taurus, J.M., Ogiste, J.S., Hori, O., Moss, R.A., Schmidt, A.M. Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. *J. Biol. Chem.* 272, 17810–17814 (1997).
- Lee J, Prohaska JR, Thiele DJ. *Proc Natl Acad Sci* 98:6842–6847 (2001)
- Li, J.J., Dickson, D., Hof, P.R., Vlassara, H.,. Receptors for advanced glycosylation endproducts in human brain: role in brain homeostasis. *Mol. Med.* 4, 46–60. (1998)
- Li, J., Schmidt, A.M.,. Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J. Biol. Chem.* 272, 6498–6506. (1997)

- Lim Yun-An, Rhein Virginie, Baysang Ginette, Meier Fides, Poljak Anne, Raftery Mark J., Guilhaus Michael, Ittner Lars M., Eckert Anne and Go'tz Jurgen. A β and human amylin share a common toxicity pathway via mitochondrial dysfunction. *Proteomics*, 10, 1621–1633 (2010)
- Linkous, D.H., Flinn, J.M., Koh, J.Y., Lanzirrotti, A., Bertsch, P.M., Jones, B.F., Giblin, L.J., Frederickson, C.J., Evidence that the ZNT3 protein controls the total amount of elemental zinc in synaptic vesicles. *J. Histochem. Cytochem.* 56, 3–6. (2008).
- Lovell, M.A., Markesbery, W.R.,. Ratio of 8-hydroxyguanine in intact DNA to free 8-hydroxyguanine is increased in Alzheimer disease ventricular cerebrospinal fluid. *Arch. Neurol.* 58, 392–396 (2001)
- Lovell, M.A., Robertson, J.D., Teesdale, W.J., Campbell, J.L., Markesbery, W.R.,. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J. Neurol. Sci.* 158, 47–52. (1998)
- Lue, L.F., Yan, S.D., Stern, D.M., Walker, D.G., Preventing activation of receptor for advanced glycation endproducts in Alzheimer's disease. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* 4, 249–66. (2005)
- Luo, Y., Bolon, B., Kahn, S., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Denis, P., Fan, W., Kha, H., Zhang, J., Gong, Y., Martin, L., Louis, J.C., Yan, Q., Richards, W.G., Citron, M., Vassar, R.,. Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat. Neurosci.* 4, 231–232. (2001)
- Maloney M.T., Minamide L.S., Kinley A.W., Boyle J.A., Bamberg J.R., β -Secretase-cleaved amyloid precursor protein accumulates at actin inclusions induced in neurons by stress or amyloid β : a feedforward mechanism for Alzheimer's disease, *J. Neurosci.* 25 11313–11321 (2005).
- Mark, R., Blanc, E., Mattson, M., *Mol. Neurobiol.* 12, 915–924. (1996)
- Mark, R.J., Hensley, K., Butterfield, D.A., Mattson, M.P.,. Amyloid β -peptide impairs ion-motive ATPase activities: Evidence for a role in loss of

- neuronal Ca²⁺ homeostasis and cell death, *J. Neurosci.* 15, 6239–6249. (1995)
- Martinez Lista, E., Sole, J., Arola, L., Mas, A.,. Changes in plasma copper and zinc during rat development. *Biol. Neonate* 64, 47–52. (1993)
 - Masad, A., Hayes, L., Tabner, B.J., Turnbull, S., Cooper, L.J., Fullwood, N.J., German, M.J., Kametani, F., El-Agnaf, O.M.A., Allsop, D.. Copper-mediated formation of hydrogen peroxide from the amylin peptide: a novel mechanism for degeneration of islet cells in type-2 diabetes mellitus? *FEBS Lett.* 581: 3489–3493 (2007).
 - Masters, C.L., Beyreuther, K.,. Alzheimer's centennial legacy: prospects for rational therapeutic intervention targeting the Abeta amyloid pathway. *Brain* 129, 2823–2839 (2006).
 - Matsumoto, A., Itoh, K., Matsumoto, R., A novel carboxypeptidase B that processes native beta-amyloid precursor protein is present in human hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 12, 227–238. (2000).
 - Mattson, M., Goodman, Y., *Brain Res.* 676, 219–224. (1995).
 - May PC, Boggs LN, and Fuson KS. Neurotoxicity of human amylin in rat primary hippocampal cultures: similarity to Alzheimer's disease amyloid- β neurotoxicity. *J Neurochem* 61: 2330–2333, (1993).
 - McLean, C.A., Cherny, R.A., Fraser, F.W., Fuller, S.J., Smith, M.J., Beyreuther, K., Bush, A.I., Masters, C.L.,. *Ann. Neurol.* 46, 860–866. (1999)
 - Mercer, J.F., The molecular basis of copper-transport diseases. *Trends Mol. Med.* 7, 64–69. (2001)
 - Molina, J.A., Jimenez-Jimenez, F.J., Aguilar, M.V., Meseguer, I., Mateos-Vega, C.J., Gonzalez-Munoz, M.J., de Bustos, F., Porta, J., Orti-Pareja, M., Zurdo, M., Barrios, E., Martinez-Para, M.C.,. Cerebrospinal fluid levels of transition metals in patients with Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm.* 105, 479–488. (1998)

- Monget, A.L., Galan, P., Preziosi, P., Keller, H., Bourgeois, C., Arnaud, J., Favier, A., Hercberg, S.,. Micronutrient status in elderly people. *Geriatric/Min. Vit. Aux Network. Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 66, 71–76. (1996)
- Moriarty, T.M., Padrell, E., Carty, D.J., Omri, G., Landau, E.M., Iyengar, R.,. G₀ protein as signal transducer in the pertussis toxin-sensitive phosphatidylinositol pathway. *Nature* 343, 79–82. (1990)
- Moya, K.L., Benowitz, L.I., Schneider, G.E., Allinquant, B.,. The amyloid precursor protein is developmentally regulated and correlated with synaptogenesis. *Dev. Biol.* 161, 597–603. (1994)
- Munch G, Schinzel R, Loske C, Wong A, Durany N, Li JJ, Vlassara H, Smith MA, Perry G, Riederer P. Alzheimer's disease synergistic effects of glucose deficit, oxidative stress and advanced glycation endproducts. *J Neural Transm* 105:439–461 (1998)
- Munro, H.N., Suter, P.M., Russell, R.M.,. Nutritional requirements of the elderly. *Annu. Rev. Nutr.* 7, 23–49. (1987)
- Niciu, M.J., Ma, X.M., El Meskini, R., Pachter, J.S., Mains, R.E., Eipper, B.A.,. Altered ATP7A expression and other compensatory responses in a murine model of Menkes disease. *Neurobiol. Dis.* 27, 278–291. (2007)
- Noy, D.; Solomonov, I.; Sinkevich, O.; Arad, T.; Kjaer, K.; Sagi, I. *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 1376–1383 (2008).
- Okamoto, T., Takeda, S., Murayama, Y., Ogata, E., Nishimoto, I.,. Ligand-dependent G protein coupling function of amyloid transmembrane precursor. *J. Biol. Chem.* 270, 4205–4208. (1995)
- Opazo, C., Huang, X., Cherny, R.A., Moir, R.D., Roher, A.E., White, A.R., Cappai, R., Masters, C.L., Tanzi, R.E., Inestrosa, N.C., Bush, A.I.,. Metalloenzyme-like activity of Alzheimer's disease beta-amyloid. Cu-dependent catalytic conversion of dopamine, cholesterol, and biological reducing agents to neurotoxic H₂O₂. *J. Biol. Chem.* 277, 40302–40308 (2002)

- Pappalardo, G.; Milardi, D.; Magri, A.; Attanasio, F.; Impellizzeri, G.; La Rosa, C.; Grasso, D.; Rizzarelli, E. *Chem.sEur. J.*, *13*, 10204–10215 (2007).
- Park, I.H., Jung, M.W., Mori, H., Mook-Jung, I., Zinc enhances synthesis of presenilin 1 in mouse primary cortical culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *285*, 680–688. (2001).
- Pettit, D.L., Shao, Z., Yakel, J.L.,. β -Amyloid1–42 peptide directly modulates nicotinic receptors in the rat hippocampal slice. *J Neurosci* *21*, 1–5. (2001)
- Pontieri, G.M., Russo, M.A., Frati, L.. *Patologia Generale*; Tomo I - Ed. Piccin (2005).
- Qian, Y., Tiffany-Castiglioni, E., Welsh, J., Harris, E.D., Copper efflux from murine microvascular cells requires expression of the menkes disease Cu-ATPase. *J. Nutr.* *128*, 1276–1282. (1998).
- Ravaglia, G., Forti, P., Maioli, F., Nesi, B., Pratelli, L., Savarino, L., Cucinotta, D., Cavalli, G.,. Blood micronutrient and thyroid hormone concentrations in the oldest-old. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *85*, 2260–2265. (2000)
- Ridge, P.G., Zhang, Y., Gladyshev, V.N.,. Comparative genomic analyses of copper transporters and cuproproteomes reveal evolutionary dynamics of copper utilization and its link to oxygen. *PLoS One* *3*, e1378. (2008)
- Rochet JC, Lansbury PT. Amyloid fibrillogenesis: themes and variations. *Curr Opin Struct Biol* *10*:60–80 (2000).
- Roher, A.E., Baudry, J., Chaney, M.O., Kuo, Y.M., Stine, W.B., Emmerling, M.R.,. *Biochim. Biophys. Acta* *1502*, 31–43. (2000)
- Rozga, M., Bal, W.,. The Cu(II)/A β /human serum albumin model of control mechanism for copper-related amyloid neurotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.* *23*, 298–308 (2009).

- Sabo, S.L., Ikin, A.F., Buxbaum, J.D., Greengard, P., The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement. *J. Cell Biol.* 153, 1403–1414. (2001).
- Sanke, T., Hanabusa, T., Nakano, Y., Oki, C., Okai, K., Nishimura, S., Kondo, M., Nanjo, K.. Plasma islet amyloid polypeptide (amylin) levels and their responses to oral glucose in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 34: 129-132 (1991).
- Sayre, L.M., Zelasko, D.A., Harris, P.L., Perry, G., Salomon, R.G., Smith, M.A.,. 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 68, 2092–2097 (1997).
- Schlieff, M.L., Craig, A.M., Gitlin, J.D.,. NMDA receptor activation mediates copper homeostasis in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 25, 239–246. (2005)
- Schubert, D.; Behl, C.; Lesley, R.; Brack, A.; Dargusch, R.; Sagara, Y.; Kimura, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92, 1989–1993 (1995).
- Selkoe, D.J.,. Normal and abnormal biology of the beta-amyloid precursor protein. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 489–517. (1994)
- Selkoe, D.J.,. Cell biology of protein misfolding: he examples of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Nat.Cell. Biol.* 6: 1054–1061. (2004)
- Sensi, S.L., Paoletti, P., Bush, A.I., Sekler, I., Zinc in the physiology and pathology of the CNS. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 780–791. (2009).
- Simons, A., Ruppert, T., Schmidt, C., Schlicksupp, A., Pipkorn, R., Reed, J., Masters, C.L., White, A.R., Cappai, R., Beyreuther, K., Bayer, T.A., Multhaup, G.,. Evidence for a copper-binding superfamily of the amyloid precursor protein. *Biochemistry* 41, 9310–9320. (2002)
- Sisodia, S.S., Koo, E.H., Hoffman, P.N., Perry, G., Price, D.L., Identification and transport of full-length amyloid precursor proteins in rat peripheral nervous system. *J. Neurosci.* 13, 3136–3142. (1993).

- Smart, T.G., Hosie, A.M., Miller, P.S.,. Zn²⁺ ions: modulators of excitatory and inhibitory synaptic activity. *Neuroscientist* 10, 432–442 (2004)
- Smith DP, Smith DG, Curtain CC, Boas JF, Pilbrow JR, Ciccotosto GD, Lau TL, Tew DJ, Perez K, Wade JD, Bush AI, Drew SC, Separovic F, Masters CL, Cappai R, Barnham KJ. Coppermediated amyloid-beta toxicity is associated with an intermolecular histidine bridge. *J Biol Chem* 281:15145–15154 (2006).
- Smith, M.A., Richey-Harris, P., Sayre, L.M., Beckman, J.S., Perry, G., Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 17, 2653–2657. (1997).
- Snyder, S.W., Lador, U.S., Wade, W.S., Wang, G.T., Barrett, L.W., Matayoshi, E.D., Huffaker, H.J., Krafft, G.A., Holzman, T.F.. Amyloid-beta aggregation: selective inhibition of aggregation in mixtures of amyloid with different chain lengths. *Biophys. J.* 67: 1216-1228 (1994).
- Song, B., Scheuner, D., Ron, D., Pennathur, S. and Kaufman, R. J. Chop deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *J. Clin. Invest.* 118, 3378–3389 (2008)
- Soto, C.. Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy. *FEBS Lett.* 498: 204-207 (2001).
- Sotthibundhu A., Sykes A.M., Fox B., Underwood C.K., Thangnipon W., Coulson E.J., β -Amyloid₁₋₄₂ induces neuronal death through the p75 neurotrophin receptor, *J. Neurosci.* 28 3941–3946 (2008).
- Squitti, R., Lupoi, D., Pasqualetti, P., Dal Forno, G., Vernieri, F., Chiovenda, P., Rossi, L., Cortesi, M., Cassetta, E., Rossini, P.M.,. Elevation of serum copper levels in Alzheimer's disease. *Neurology* 59, 1153–1161. (2002)

- Tabner B. J., El-Agnaf O. M. A., German M. J., Fullwood N. J., Allsop D. Protein aggregation, metals and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Biochemical Society Transactions* Volume 33, part 5 (2005)
- Tienari, P.J., Ida, N., Ikonen, E., Simons, M., Weidemann, A., Multhaup, G., Masters, C.L., Dotti, C.G., Beyreuther, K., Intracellular and secreted Alzheimer beta-amyloid species are generated by distinct mechanisms in cultured hippocampal neurons. *Proc. Acad. Sci. USA* 94, 4125–4130. (1997).
- Torok M, Milton S, Kaye R et al. Structural and dynamic features of Alzheimer's A β peptide in amyloid fibrils studied by site-directed spin labelling. *J Biol Chem* 277:40810–40815 (2002).
- Torsdottir, G., Kristinsson, J., Sveinbjornsdottir, S., Snaedal, J., Johannesson, T., Copper, ceruloplasmin, superoxide dismutase and iron parameters in Parkinson's disease. *Pharmacol. Toxicol.* 85, 239–243. (1999).
- Tucker HM, Rydel RE, Wright S, and Estus S. Human amylin induces “apoptotic” pattern of gene expression concomitant with cortical neuronal atrophy. *J Neurochem* 71: 506–516 (1998).
- Valensin, D., Mancini, F.M., Luczkowski, M., Janicka, A., Wisniewska, K., Gaggelli, E., Valensin, G., Lankiewicz, L., Kozlowski, H., Identification of a novel high affinity copper binding site in the APP(145–155) fragment of amyloid precursor protein. *Dalton Trans.* 16–22. (2004)
- Vasak, M., Hasler, D.W., Metallothioneins: new functional and structural insights. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4, 177–183 (2000).
- Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M.A., Biere, A.L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J.C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., Citron, M.,

Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735–741. (1999)

- Vitek, M.P., Bhattacharya, K., Glendening, J.M., Stopa, E., Vlassara, H., Bucala, R., Manogue, K., Cerami, A., Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 4766–4770 (1994).
- Vogt, W., Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free. Radic. Biol. Med.* 18, 93–105 (1995)
- Walsh DM, Hartley DM, Kusumoto Y et al. Amyloid β protein fibrillogenesis: structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J Biol Chem* 274:25945–25952 (1999).
- Wang, H.W., Pasternak, J.F., Kuo, H., Ristic, H., Lambert, M.P., Chromy, B., Viola, K.L., Klein, W.L., Stine, W.B., Krafft, G.A., Trommer, B.L., Soluble oligomers of β amyloid (1–42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain Res.* 924, 133–140. (2002)
- Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., Selkoe, D.J., *Nature* 416, 535–539. (2002).
- Ward, R.V., Jennings, K.H., Jepras, R., Neville, W., Owen, D.E., Hawkins, J., Christie, G., Davis, J.B., George, A., Karran, E.H., Howlett, D.R., *Biochem. J.* 348, 137–144. (2000).
- Wautier, M.P., Chappey, O., Corda, S., Stern, D.M., Schmidt, A.M., Wautier, J.L., Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280, E685–E694. (2001)
- Westermark, P., Engström, U., Johnson, K.H., Westermark, G.T., Betsholtz, C., Islet amyloid polypeptide: pinpointing amino acid residues linked to amyloid fibril formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 5036–5040 (1990).

- White AR, Du T, Laughton KM, Volitakis I, Sharples RA, Xilinas ME, Hoke DE, Holsinger RM, Evin G, Cherny RA, Hill AF, Barnham KJ, Li QX, Bush AI, Masters CL. Degradation of the Alzheimer disease amyloid beta-peptide by metal-dependent up-regulation of metalloprotease activity. *J Biol Chem* 281:17670–17680 (2006).
- White, A. R., Maher, F., Brazier, M. W., Jobling, M. F., Thyer, J., Stewart, L. R., Thompson, A., Gibson, R., Masters, C. L., Multhaup, G., Beyreuther, K., Barrow, C. J., Collins, S. J. and Cappai, R. Diverse fibrillar peptides directly bind the Alzheimer's amyloid precursor protein and amyloid precursorlike protein 2 resulting in cellular accumulation. *Brain Res.* 966, 231–244 (2003)
- Wong, A., Lüth, H., Deuther-Conrad, W., Dukic-Stefanivic, S., Gasic-Milencovic, J., Arendt, T., Münch, G.,. Advanced glycation endproducts co-localized with inducible nitric oxide synthase in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 920, 32–40. (2001)
- Woods S. C., Lutz T. A., Geary N. and Langhans W., *Philos. Trans. R. Soc., B*, 361, 1219–1235 (2006)
- Wright, S., Malinin, N. L., Powell, K. A., Yednock, T., Rydel, R. E. and Griswold-Prenner, I. Alpha2beta1 and alphaVbeta1 integrin signaling pathways mediate amyloid beta-induced neurotoxicity. *Neurobiol. Aging* 28, 226–237 (2007)
- Yaar M., Zhai S., Pilch P.F., Doyle S.M., Eisenhauer P.B., Fine R.E., Gilchrist B.A., Binding of beta-amyloid to the p75 neurotrophin receptor induces apoptosis. A possible mechanism for Alzheimer's disease, *J. Clin. Invest.* 100 2333–2340 (1997)
- Yamagishi S, Takeuchi M, Inagaki Y, Nakamura K, Imaizumi T. Role of advanced glycation end products (AGEs) and their receptor (RAGE) in the pathogenesis of diabetic microangiopathy. *Int J Clin Pharmacol Res* 23:129–134 (2003)

- Yamaguchi, H., Hirai, S., Morimatsu, M., Shoji, M., Harigaya, Y., Diffuse type of senile plaques in the brains of Alzheimer-type dementia. *Acta Neuropathol.* 77, 113–119. (1988).
- Yan, R., Bienkowski, M.J., Shuck, M.E., Miao, H., Tory, M.C., Pauley, A.M., Brashier, J.R., Stratman, N.C., Mathews, W.R., Buhl, A.E., Carter, D.B., Tomasselli, A.G., Parodi, L.A., Heinrikson, R.L., Gurney, M.E., Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402, 533–537. (1999).
- Yan, S., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H., Roher, A., Slattery, T., Nagashima, M., Morser, J., Migheli, A., Nawroth, P., Godman, G., Stern, D., Schmidt, A., RAGE and amyloid- β peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 382, 685–691. (1996)
- Yan, S.D., Zhu, H., Fu, J., Yan, S.F., Roher, A., Tourtellotte, W.W., Rajavashisth, T., Chen, X., Godman, G.C., Stern, D., Schmidt, A.M., Amyloid-beta peptide-receptor for advanced glycation endproduct interaction elicits neuronal expression of macrophage- colony stimulating factor: a proinflammatory pathway in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5296–5301. (1997)
- Young A. Role of amylin in nutrient intake—animal studies. *Diabet Med* 14 Suppl 2: S14–S18 (1997).
- Woods S. C, Lutz T. A., Geary N. and Langhans W., *Philos. Trans. R. Soc., B*, 361: 1219–1235 (2006)