

Metales de transición y enfermedad de Alzheimer

C. Opazo

Laboratorio de Neurobiometales. Departamento de Fisiología. Facultad de Ciencias Biológicas. Casilla 160-C. Universidad de Concepción. Concepción. Chile.

RESUMEN

El hipocampo y la corteza del cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA), presentan: a) una extensa lesión neuronal; b) un incremento de los productos de daño oxidativo, y c) una acumulación de agregados/oligómeros proteicos, que en conjunto podrían ser responsables de la pérdida progresiva de las capacidades cognitivas observadas en la EA. El principal componente de los agregados/oligómeros proteicos, llamados placas seniles (PS), es el péptido β -amiloide (β A), generado por el corte proteolítico de la proteína precursora del amiloide (PPA). Las evidencias genéticas, bioquímicas y de biología celular obtenidas hasta el momento sugieren que los oligómeros del péptido β A serían los responsables del daño neuronal observado en la EA.

Además, se ha propuesto que moléculas accesorias modularían la toxicidad del péptido β A.

En este contexto, se ha demostrado que algunos metales de transición como el cobre, el hierro y el cinc, que se acumulan en las placas seniles, se asocian al péptido β A, induciendo su agregación y la producción de especies reactivas de oxígeno. Por lo tanto, la interacción entre estos metales de transición y el péptido β A podría explicar en parte la lesión neuronal y la presencia de daño oxidativo detectado en el cerebro de pacientes que presentan EA.

Palabras clave

Enfermedad de Alzheimer. Placas seniles. Péptido β -amiloide. Metales de transición.

Transition metals and Alzheimer's disease

ABSTRACT

The hippocampus and cortex of the brains of patients with Alzheimer's disease (AD) show 1) extensive neuronal death; 2) an increase in oxidative damage products; and 3) an accumulation of proteinaceous oligomers/aggregates, which all together may be

responsible for the progressive loss of cognitive capacities observed in AD. The principal component of these proteinaceous oligomers/aggregates, called senile plaques (SP), is the amyloid- β peptide ($A\beta$), which is generated by proteolytic processing of the amyloid precursor protein. The genetic, cellular and biochemical evidence obtained so far suggests that the oligomeric species of the $A\beta$ peptide may be responsible for the neuronal damage in AD. Moreover, it has been proposed that some accessory molecules could modulate $A\beta$ peptide toxicity.

In this context, it has been shown that transition metals such as copper, iron and zinc, which accumulate in SP, can interact with the $A\beta$ peptide, promoting amyloid aggregation and the formation of reactive oxygen species. Therefore, the interaction between transition metals and the $A\beta$ peptide may partially explain the neuronal and oxidative damage detected in the brains of patients with AD.

Key words

Alzheimer's disease. Senile plaques. Amyloid- β peptide. Transition metals.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa, caracterizada por la pérdida progresiva e irreversible de la memoria, la orientación y el razonamiento, lo que finalmente termina con las funciones intelectuales y la vida del individuo¹.

La EA se caracteriza patológicamente por una degeneración neuronal selectiva que se manifiesta como una pérdida de las conexiones sinápticas², además de la presencia de agregados proteicos (ovillos neurofibrilares [ON] y placas seniles [PS]) en la corteza cerebral y el hipocampo¹. El comienzo y el desarrollo de la EA estarían determinados por factores genéticos y/o factores ambientales.

Durante los últimos 20 años, los estudios enfocados a entender el desarrollo y la progresión de la EA han caracterizado tanto los aspectos morfológicos y bioquímicos de los constituyentes de las PS como los aspectos de la biología celular de algunos de sus componentes. A través de estos estudios, se ha establecido que las PS corresponden a estructuras heterogéneas formadas principal-

Correspondencia: Dr. C. Opazo.

Laboratorio de Neurobiometales. Departamento de Fisiología. Facultad de Ciencias Biológicas. Casilla 160-C. Universidad de Concepción. Concepción. Chile.

Correo electrónico: carlosopazo@udec.cl

Este trabajo fue financiado por proyectos DIUC (Universidad de Concepción) y Fundación Andes otorgados al autor.

mente por el péptido β -amiloide (β A), que tiene 40-42 aminoácidos de extensión¹. Por una parte, el estudio molecular de la EA ha generado información importante acerca de la biología del péptido β A, y por otro lado numerosa información sobre las posibles causas de esta enfermedad. De esta forma, y utilizando como base la evidencia obtenida en estudios genéticos, bioquímicos y de biología molecular, se ha originado la hipótesis de «la cascada del amiloide», que propone a la generación y la formación de oligómeros neurotóxicos del péptido β A como los elementos principales en el desarrollo de la EA³.

EL PROCESAMIENTO PROTEOLÍTICO DE LA PROTEÍNA PRECURSORA DEL AMILOIDE (PPA) Y EL ORIGEN DEL PÉPTIDO β -AMILOIDE

La PPA es una glucoproteína tipo I de transmembrana^{4,5} (fig. 1), que se expresa como distintas isoformas, lo que es regulado por un mecanismo de procesamiento alternativo⁶. Las isoformas del PPA 751 y 770, que contienen un dominio inhibidor de proteasas tipo Kunitz⁷, se expresan en forma ubicua, mientras que el PPA 695, que carece del dominio Kunitz, se expresa específicamente en el sistema nervioso central (SNC)⁸.

La PPA es procesada por proteasas denominadas secretasas⁹. La secretasa α corta la PPA en forma constitutiva dentro del dominio extracelular del péptido β A, generándose una PPA soluble no amiloidogénica (sPPA) y un fragmento truncado del β A. Alternativamente, la PPA puede ser cortada por la secretasa β en el dominio extracelular y por la secretasa γ en el dominio de transmembrana, con la consecutiva generación del péptido β A de 39 a 42 mer⁹.

Si bien la función fisiológica de la PPA neuronal o la de sus fragmentos es desconocida, estudios *in vitro* sugieren que la PPA asociada a la membrana y la PPA secretada tendrían un papel neuritogénico, en especial en: a) la adhesión celular; b) la extensión y formación de neuritas, y c) el transporte de vesículas sinápticas¹⁰⁻¹³. Además la PPA podría tener una función neurotrófica protegiendo a las neuronas frente a la lesión inducida por hipoglucemia, glutamato y daño oxidativo¹⁴⁻¹⁷.

POSIBLE PAPEL DE LA PPA EN EL TRANSPORTE DEL ION COBRE

El ion cobre es un micronutriente esencial para la fisiología humana, que se encuentra coordinado a la estructura de diversas proteínas, como las superóxido dismutasa (SOD), la citocromo C oxidasa y la ceruloplasmina. La homeostasis del ion cobre está altamente regulada por proteínas localizadas en diferentes compartimientos celulares como membrana plasmática, organelos y citoplasma¹⁸. En este contexto, es interesante que la PPA, que está localizada en la membrana plasmática y tiene sus sitios de unión a cobre orientados hacia el extracelular, pu-

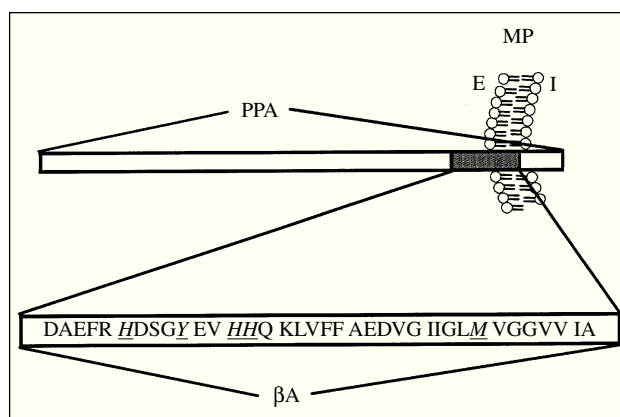


Figura 1. Esquema topológico de la proteína precursora de amiloide (PPA) y el péptido β -amiloide (β A). PPA es una proteína de transmembrana de tipo I. En gris se representa el péptido β A, que se genera a partir del corte proteolítico de la PPA por enzimas específicas (véase texto). En la secuencia aminoacídica del péptido β A, los aminoácidos destacados (H, Y y M) corresponden a aminoácidos involucrados en la coordinación y reducción del ion cobre. MP: membrana plasmática; E: medio extracelular; I: medio intracelular.

diera participar en las etapas iniciales de la incorporación del metal desde el espacio extracelular al espacio intracelular¹⁹⁻²². La PPA presenta al menos dos sitios putativos de unión a cobre: uno localizado entre los aminoácidos 135 y 156 (PPA₁₃₅₋₁₅₆)²⁰⁻²³, y el segundo localizado dentro de la secuencia que corresponde al péptido β A, dominio (PPA₆₇₂₋₇₁₁)^{24,25} (fig. 1).

Considerando que el gen de la PPA tiene todas las características de un gen de expresión constitutiva y que la PPA es expresado en todos los tejidos de los mamíferos⁵, la capacidad reductora de cobre que la PPA presenta en la superficie de la membrana plasmática afectaría tanto a las células neuronales como a las no neuronales, favoreciendo la formación de complejos metal-proteína en el espacio intracelular. Por lo tanto, en células normales la actividad reductora de cobre de la PPA podría ser favorable, presentando el Cu(I) al transportador de Cu(I). En condiciones desfavorables, un aumento en los niveles de la PPA sobre la superficie celular incrementaría los niveles de cobre(I) y favorecería la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO)²⁵⁻²⁷. En estas circunstancias, la PPA o el péptido β A, al coordinar el metal, adquirirían una actividad pro-oxidante^{26,28-30} (fig. 2), lo que podría explicar algunos aspectos del daño oxidativo que se presenta en la EA^{28,31}. En un contexto celular, los efectos generados por la interacción de la PPA (PPA₁₃₅₋₁₅₆) o el β A con cobre dependerían de la expresión y la localización subcelular de la PPA, así como de la generación del β A.

EL PÉPTIDO β A COMO ELEMENTO CENTRAL EN LA PATOLOGÍA DE LA EA

El péptido β A se acumula en la corteza cerebral de pacientes que presentan EA, ya sea en forma de PS en el pa-

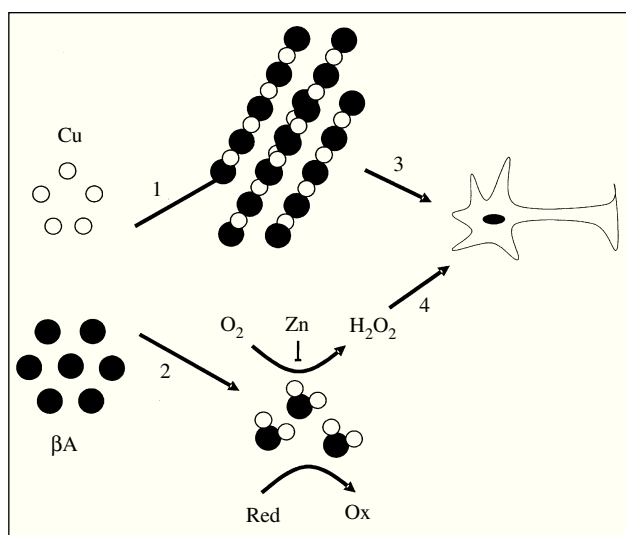


Figura 2. Modelo del posible papel del ion cobre sobre la neurotoxicidad del péptido β -amiloide en la enfermedad de Alzheimer. El ion cobre podría inducir la agregación del péptido β A (1), o inducir la formación de complejos β A-Cu solubles con propiedades redox (2). Los agregados podrían tener una acción tóxica directa sobre las neuronas (3). De forma alternativa, los complejos β A-Cu podrían generar peróxido de hidrógeno, que podría desencadenar daño oxidativo en la membrana plasmática o en el espacio intracelular de la neurona (4). Esta última reacción podría ser inhibida parcialmente por el ion cinc. Red: agente reductor; Ox: agente oxidado.

rénquima cerebral o en forma de depósitos congofílicos en la vasculatura cerebral. El péptido β A₁₋₄₀ es la especie soluble que se encuentra en mayor abundancia en fluidos biológicos como el plasma y el líquido cefalorraquídeo³², mientras que el péptido β A₁₋₄₂, que es la especie del β A menos abundante, se acumula de forma particular en las PS presentes en el cerebro de pacientes con EA^{33,34}.

Todavía no se conocen todos los factores involucrados en el comienzo y el desarrollo de la EA. Al respecto, se han identificado 3 genes asociados al desarrollo de la EA, que al estar mutados favorecerían el inicio temprano de esta enfermedad. Las mutaciones en estos genes (*PPA*, *presenilina-1* y *presenilina-2*) conducen a la aparición temprana de depósitos de amiloide, aumento en la concentración total del β A e incremento relativo de la concentración del β A₁₋₄₂ respecto a las otras especies de menor peso molecular como el β A₁₋₄₀^{35,36}. Sin embargo, las mutaciones en estas proteínas sólo explicarían un bajo porcentaje de la enfermedad (~10%)¹, lo que sugiere que otros factores genéticos y no genéticos determinarían la aparición de esta enfermedad.

El β A es conocido por ser neurotóxico en el rango micromolar³⁷. Sin embargo, aún no ha sido dilucidado el mecanismo por el que el β A es neurotóxico, aunque es probable que sea mediado en parte por la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO)³⁸ (fig. 2). Recientemente se ha descrito que el péptido β A une cobre con una alta afinidad²⁴ y presenta en su estructura un sitio de co-

ordinación cooperativa y alostérico por este metal³⁹. El complejo β A-Cu tiene un potencial de óxido-reducción positivo y produce H_2O_2 desde el O_2 a través de la reducción de Cu (II) a Cu (I)^{25,26,29,30}. En esta reacción, aminoácidos como las histidina 13 y 14 tendrían un cierto papel en la coordinación del metal, y aminoácidos como la tirosina 10 y la metionina 35 ejercerían un posible papel en la transferencia de electrones desde el péptido β A al ion cobre³⁹ (fig. 1). El H_2O_2 que es generado directamente por el complejo β A-Cu podría contribuir a la neurotoxicidad que el β A genera sobre cultivos primarios^{26,30} y a la oxidación de moléculas biológicas que se detecta en la corteza de pacientes con EA^{26,30,31} (fig. 2). Este patrón de daño oxidativo también se ha observado en ratones transgénicos (PPA 2576) que sobreexpresan el PPA, donde es posible detectar PS enriquecidas en hierro y en moléculas oxidadas^{40,41}.

Considerando que los niveles de cobre, hierro y cinc se encuentran elevados en las PS de pacientes con EA^{42,43}, y que estos metales potencian la neurotoxicidad del β A^{26,30}, se ha sugerido que quelantes hidrofóbicos de metales podrían servir como agentes terapéuticos para tratar a los pacientes con EA. Al respecto, hay evidencia experimental que apoya este planteamiento. El clioquinol (CQ), quelante del cobre y cinc, inhibe la formación de los depósitos de β A que se presentan en el cerebro de ratones transgénicos que sobreexpresan la PPA⁴⁴. De la misma forma, en estudios preliminares realizados en humanos, se ha observado que la administración de esta sustancia a pacientes con EA disminuye el deterioro cognitivo⁴⁵.

METALES DE TRANSICIÓN, AGREGACIÓN Y NEUROTOXICIDAD DEL PÉPTIDO β A

Los agregados amiloides formados a partir del péptido β A presentan propiedades fisicoquímicas características como: a) birrefringencia a la luz polarizada después de ser teñidos con rojo Congo; b) patrón de difracción de rayos X característico, y c) aspecto fibrilar en imágenes registradas por microscopía electrónica^{46,47}.

La formación de los agregados de amiloide depende de variables que afectan el tipo de estructura secundaria que el péptido β A adopta en solución, como pH, temperatura, solvente y concentración peptídica⁴⁸⁻⁵⁰. Los dominios hidrofóbicos (17-21; 39-42) y los dominios hidrofílicos (12-15) del β A serían de gran importancia para la formación de los agregados de amiloide⁵¹⁻⁵³.

Los agregados del péptido β A tienen un efecto neurotóxico en el rango de concentración micromolar³⁷. Estos efectos tóxicos podrían estar mediados por una acción directa sobre la membrana celular⁵⁴⁻⁵⁸ (fig. 2). De hecho, el péptido β A es capaz de interactuar con elementos que componen la membrana plasmática como receptores de membrana^{55,58}, colesterol, fosfolípidos y gangliósido-

dos^{57,59}. Esta interacción directa de la β A con la membrana puede incluso resultar en la formación de poros que permiten el paso de iones calcio al interior de la célula⁵⁶.

Sumado a esto, se ha descrito que el β A presenta una estructura química que facilita la formación de ERO⁶⁰, lo que podría inducir la oxidación de proteínas y lípidos localizados en la membrana plasmática alterando la función celular^{61,62}. En estos procesos intervendrían metales como hierro y cobre, que podrían catalizar la generación de especies reactivas de oxígeno vía las reacciones de Fenton o Haber-Weiss^{25,29}.

Además las ERO generadas por la acción del péptido β A facilitarían su agregación, lo que se potenciaría en presencia de metales como hierro y cobre. Por lo tanto los metales tendrían un efecto dual: a) promoviendo la agregación del péptido β A, y b) potenciando su acción tóxica vía la generación de ERO⁶³ (fig. 2). Hay evidencia experimental que apoya la participación de metales como el ion cobre en el mecanismo de toxicidad de los agregados del péptido β A. Al igual que el hierro, este metal se encuentra acumulado en las PS⁴³, y tiene la capacidad de inducir la agregación del péptido β A *in vitro* e *in vivo*^{64,65}. En conclusión, el ion cobre podría participar en el mecanismo de daño oxidativo, catalizando la formación de ERO, promoviendo la agregación del péptido β A y potenciando los efectos neurotóxicos de los agregados de β A (fig. 2).

Estudios previos han sugerido que el péptido β A formaría complejos solubles al coordinar cobre o cinc^{66,67}, y esto podría ser modulado por la concentración de los metales, así como por factores tales como pH y fuerza iónica^{24,64}. La estequiometría y la identidad del metal asociado al péptido β A serían determinantes en las propiedades redox de los complejos bioinorgánicos resultantes²⁸. Además, la toxicidad generada por los complejos solubles e insolubles dependería del sistema antioxidante que posea la célula blanco.

De esta forma, los complejos bioinorgánicos formados por la asociación de los metales de transición que se acumulan en las placas seniles^{63,69} y el péptido β A generarían el daño oxidativo que se detecta en el cerebro de pacientes con EA³¹.

La idea de que los metales de transición tendrían un papel en la EA se ha visto reforzada por estudios recientes que muestran que los niveles del ion cobre se encuentran aumentados en el plasma de pacientes con EA⁷⁰⁻⁷², sugiriendo que los pacientes con esta enfermedad presentan alteraciones en la homeostasis de este ion metálico. Además, estudios preliminares muestran que la agregación del péptido β A podría ser acelerada por metales de transición vía un mecanismo oxidativo catalizado por metales como el hierro⁶³. Además, hemos encontrado que las fibras de amiloide son capaces también de reducir el cobre, lo que sugiere que las ERO podrían ser generadas

durante etapas iniciales o en etapas tardías del proceso de agregación²⁵.

En el contexto de la EA se puede formular la hipótesis de que la formación de H_2O_2 por el complejo β A podría sobrepasar las defensas celulares antioxidantes (catalasa, glutatión peroxidasa). El H_2O_2 podría difundirse a través de las membranas biológicas, y de esta forma ser la fuente de daño oxidativo que se detecta en diversos compartimientos celulares afectados en el cerebro de pacientes con la EA^{40,73-76}. Por lo tanto, el daño oxidativo presente en la EA podría ser consecuencia de la sobreproducción de H_2O_2 por fuentes biológicas como el complejo β A-Cu. Además, la actividad oxidasa del β A-Cu podría generar un daño secundario como resultado de la oxidación y consumo de sustratos biológicos importantes para diversos procesos biológicos como la vitamina C, las catecolaminas y el colesterol.

No se han determinado los factores que favorecen la formación del complejo β A-Cu. Sin embargo, se podría especular que un incremento en los niveles de cobre en la corteza cerebral aumentaría la probabilidad de formación de este tipo de complejos neurotóxicos. De hecho, se ha establecido experimentalmente que hay una correlación directa entre los niveles cerebrales del ion cobre y la edad de los ratones de experimentación, lo que es modulado por la expresión de la PPA y el péptido β A⁷⁷⁻⁷⁹. Esto indica que el envejecimiento podría favorecer la formación de este tipo de complejos y por lo tanto el desarrollo de esta enfermedad. Es interesante destacar que existe una mayor susceptibilidad a desarrollar la EA al envejecer. Además se ha encontrado que hay un incremento de la concentración de agentes reductores en la EA⁸⁰. Este incremento en equivalentes reductores podría corresponder a una compensación en respuesta al incremento del daño oxidativo, como la regulación positiva de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que regula los niveles de glutatión intracelular y cuya actividad es aumentada en la EA⁸⁰. En estas condiciones, un incremento inapropiado de equivalentes reductores se acompañaría de un incremento en los valores de H_2O_2 , lo que generaría un efecto paradójico al inducir un mayor aumento en la formación de H_2O_2 catalizado por el complejo β A-Cu, y de esta forma originar un círculo bioquímico vicioso.

El papel del ion cinc en la patología de la EA es, al parecer, complejo. El ion cinc induce la precipitación del β A para formar parte de las placas de amiloide^{42,81,82}, y ya que el ion cinc es capaz de suprimir parcialmente la formación de H_2O_2 formado por el β A⁸³, se ha sugerido que las placas seniles podrían corresponder a un sistema de defensa celular, donde el ion cinc precipita el péptido β A inhibiendo su actividad oxidasa⁸³ (fig. 2). Esto podría explicar la existencia de una correlación inversa entre el tamaño de las PS y el daño oxidativo mediado por H_2O_2 , presente en el cerebro de pacientes con EA⁸³. Sin embargo, se ha encontrado que agregados del péptido β A purificado desde PS coordinan una cantidad de ion cinc insu-

ficiente para inhibir su actividad oxidasa³⁰. De hecho, a pesar de la correlación inversa entre el daño oxidativo y el tamaño de la PS, son justamente las PS de mayor tamaño las que presentan mayor concentración de productos oxidados⁸³. La precipitación del péptido β A por el ion cinc podría también inhibir la eliminación y el catabolismo del β A en el cerebro⁸² y de esta forma favorecer la neurotoxicidad de los agregados del β A.

Por lo tanto, y a la luz de los elementos expuestos en esta revisión, la interacción del péptido β A con los metales de transición podrían ser parte del mecanismo responsable del deterioro cognitivo que presentan los enfermos con EA^{44,45}.

BIBLIOGRAFÍA

- Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*. 2001;81:741-66.
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, et al. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol*. 1991;30:572-80.
- Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002;297:353-6.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*. 1987;325:733-6.
- Selkoe DJ, Podlisny MB, Joachim CL, Vickers EA, Lee G, Fritz LC, et al. β -amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85:7341-5.
- Sandbrink R, Masters CL, Beyreuther K. β A4-amyloid protein precursor mRNA isoforms without exon 15 are ubiquitously expressed in rat tissues including brain, but not in neurons. *J Biol Chem*. 1994;269:1510-7.
- Tanzi RE, McClatchey AJ, Lamperti ED, Villa-Komaroff L, Gusella JF, Neve RL. Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature*. 1988;331:528-30.
- Koo EH, Sisodia SS, Cork LC, Unterbeck A, Bayney RM, Price DL. Differential expression of amyloid precursor protein mRNAs in cases of Alzheimer's disease and in aged nonhuman primates. *Neuron*. 1990;4:97-104.
- Wolfe MS, Selkoe DJ. Biochemistry. Intramembrane proteases—mixing oil and water. *Science*. 2002;296:2156-7.
- Schubert D, Jin LW, Saitoh T, Cole G. The regulation of amyloid β protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion. *Neuron*. 1989;3:689-94.
- Salviati N, Cattaneo E, Govoni S, Racchi M. Changes in β amyloid precursor protein secretion associated with the proliferative status of CNS derived progenitor cells. *Neurosci Lett*. 1996;212:199-203.
- Milward EA, Papadopoulos R, Fuller SJ, Moir RD, Small D, Beyreuther K, et al. The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth. *Neuron*. 1992;9:129-37.
- Kamal A, Almenar-Queralt A, LeBlanc JF, Roberts EA, Goldstein LS. Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing β -secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature*. 2001;414:643-8.
- Goodman Y, Mattson MP. Secreted forms of β -amyloid precursor protein protect hippocampal neurons against amyloid β -peptide-induced oxidative injury. *Exp Neurol*. 1994;128:1-12.
- Mucke L, Abraham CR, Masliah E. Neurotrophic and neuroprotective effects of hAPP in transgenic mice. *Ann N Y Acad Sci*. 1996;777:82-8.
- Mattson MP. Cellular actions of β -amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev*. 1997;77:1081-132.
- Schubert D, Behl C. The expression of amyloid β protein precursor protects nerve cells from β -amyloid and glutamate toxicity and alters their interaction with the extracellular matrix. *Brain Res*. 1993;629:275-82.
- Harrison MD, Jones CE, Solioz M, Dameron CT. Intracellular copper routing: the role of copper chaperones. *Trends Biochem Sci*. 2000;25:29-32.
- Cerpa WF, Barria MI, Chacón MA, Suazo M, González M, Opazo C, et al. The N-terminal copper-binding domain of the amyloid precursor protein protects against Cu^{2+} neurotoxicity in vivo. *FASEB J*. 2004;18:1701-3.
- Multhaup G, Schlicksupp A, Hesse L, Behr D, Ruppert T, Masters CL, et al. The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper(II) to copper(I). *Science*. 1996;271:1406-9.
- Opazo C, Barria MI, Ruiz FH, Inestrosa NC. Copper reduction by copper binding proteins and its relation to neurodegenerative diseases. *Biomaterials*. 2003;16:91-8.
- Ruiz FH, Gonzalez M, Bodini M, Opazo C, Inestrosa NC. Cysteine 144 is a key residue in the copper reduction by the β -amyloid precursor protein. *J Neurochem*. 1999;73:1288-92.
- Hesse L, Behr D, Masters CL, Multhaup G. The β A4 amyloid precursor protein binding to copper. *FEBS Lett*. 1994;349:109-16.
- Atwood CS, Scarpa RC, Huang X, Moir RD, Jones WD, Fairlie DP, et al. Characterization of copper interactions with Alzheimer amyloid β peptides: identification of an attomolar-affinity copper binding site on amyloid β 1-42. *J Neurochem*. 2000;75:1219-33.
- Opazo C, Ruiz FH, Inestrosa NC. Amyloid- β -peptide reduces copper(II) to copper(I) independent of its aggregation state. *Biol Res*. 2000;33:125-31.
- Huang X, Cuajungco MP, Atwood CS, Hartshorn MA, Tyndall JD, Hanson GR, et al. Cu(II) potentiation of Alzheimer A β neurotoxicity. Correlation with cell-free hydrogen peroxide production and metal reduction. *J Biol Chem*. 1999;274:37111-6.
- Multhaup G, Ruppert T, Schlicksupp A, Hesse L, Bill E, Pipkorn R, et al. Copper-binding amyloid precursor protein undergoes a site-specific fragmentation in the reduction of hydrogen peroxide. *Biochemistry*. 1998;37:7224-30.
- Bush AI. Metals and neuroscience. *Curr Opin Chem Biol*. 2000;4:184-91.
- Huang X, Atwood CS, Hartshorn MA, Multhaup G, Goldstein LE, Scarpa RC, et al. The A β peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry*. 1999;38:7609-16.
- Opazo C, Huang X, Cherny RA, Moir RD, Roher AE, White AR, et al. Metalloenzyme-like activity of Alzheimer's disease β -amyloid. Cu -dependent catalytic conversion of dopamine, cholesterol, and biological reducing agents to neurotoxic H_2O_2 . *J Biol Chem*. 2002;277:40302-8.
- Miranda S, Opazo C, Larrondo LF, Munoz FJ, Ruiz F, Leighton F, et al. The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid β -peptide in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*. 2000;62:633-48.
- Vigo-Pelfrey C, Lee D, Keim P, Lieberburg I, Schenk DB. Characterization of β -amyloid peptide from human cerebrospinal fluid. *J Neurochem*. 1993;61:1965-8.
- Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984;120:885-90.
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985;82:4245-9.
- Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, et al. Secreted amyloid β -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med*. 1996;2:864-70.
- Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Ohts L, Jr, Eckman C, et al. An increased percentage of long amyloid β protein secreted by familial amyloid β protein precursor (β APP717) mutants. *Science*. 1994;264:1336-40.
- Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid β protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science*. 1990;250:279-82.
- Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D. Hydrogen peroxide mediates amyloid β protein toxicity. *Cell*. 1994;77:817-27.
- Curtain CC, Ali F, Volitakis I, Cherny RA, Norton RS, Beyreuther K, et al. Alzheimer's disease amyloid- β binds copper and zinc to generate an allosterically ordered membrane-penetrating structure containing superoxide dismutase-like subunits. *J Biol Chem*. 2001;276:20466-73.
- Sayre LM, Zelasko DA, Harris PL, Perry G, Salomon RG, Smith MA. 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 1997;68:2092-7.
- Smith MA, Sayre LM, Anderson VE, Harris PL, Beal MF, Kowall N, et al. Cytochemical demonstration of oxidative damage in Alzheimer disease by immunochemical enhancement of the carbonyl reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *J Histochem Cytochem*. 1998;46:731-5.

42. Suh SW, Jensen KB, Jensen MS, Silva DS, Kesslak PJ, Danscher G, et al. Histochemically-reactive zinc in amyloid plaques, angiopathy, and degenerating neurons of Alzheimer's diseased brains. *Brain Res.* 2000;852:274-8.
43. Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL, Markesbery WR. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci.* 1998;158:47-52.
44. Cherny RA, Atwood CS, Xilinas ME, Gray DN, Jones WD, McLean CA, et al. Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits β -amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neuron.* 2001;30:665-76.
45. Ritchie CW, Bush AI, Mackinnon A, Macfarlane S, Mastwyk M, MacGregor L, et al. Metal-protein attenuation with iodocholehydroxyquin (clioquinol) targeting A β amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease: a pilot phase 2 clinical trial. *Arch Neurol.* 2003;60:1685-91.
46. Soto C, Branes MC, Álvarez J, Inestrosa NC. Structural determinants of the Alzheimer's amyloid β -peptide. *J Neurochem.* 1994;63:1191-8.
47. Soto C, Castano EM, Frangione B, Inestrosa NC. The α -helical to β -strand transition in the amino-terminal fragment of the amyloid β -peptide modulates amyloid formation. *J Biol Chem.* 1995;270:3063-7.
48. Barrow CJ, Zagorski MG. Solution structures of β peptide and its constituent fragments: relation to amyloid deposition. *Science.* 1991;253:179-82.
49. Barrow CJ, Yasuda A, Kenny PT, Zagorski MG. Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid β -peptides of Alzheimer's disease. Analysis of circular dichroism spectra. *J Mol Biol.* 1992;225:1075-93.
50. Fraser PE, Nguyen JT, Surewicz WK, Kirschner DA. pH-dependent structural transitions of Alzheimer amyloid peptides. *Biophys J.* 1991;60:1190-201.
51. Fraser PE, McLachlan DR, Surewicz WK, Mizzen CA, Snow AD, Nguyen JT, et al. Conformation and fibrillogenesis of Alzheimer A β peptides with selected substitution of charged residues. *J Mol Biol.* 1994;244:64-73.
52. Hilbich C, Kisters-Woike B, Reed J, Masters CL, Beyreuther K. Aggregation and secondary structure of synthetic amyloid β A4 peptides of Alzheimer's disease. *J Mol Biol.* 1991;218:149-63.
53. Hilbich C, Kisters-Woike B, Reed J, Masters CL, Beyreuther K. Substitutions of hydrophobic amino acids reduce the amyloidogenicity of Alzheimer's disease β A4 peptides. *J Mol Biol.* 1992;228:460-73.
54. Yankner BA. Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron.* 1996;16:921-32.
55. Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, et al. RAGE and amyloid- β peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature.* 1996;382:685-91.
56. Arispe N, Rojas E, Pollard HB. Alzheimer disease amyloid β protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:567-71.
57. McLaurin J, Chakrabarty A. Membrane disruption by Alzheimer β -amyloid peptides mediated through specific binding to either phospholipids or gangliosides. Implications for neurotoxicity. *J Biol Chem.* 1996;271:26482-9.
58. El Khoury J, Hickman SE, Thomas CA, Cao L, Silverstein SC, Loike JD. Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to β -amyloid fibrils. *Nature.* 1996;382:716-9.
59. Avdulov NA, Chochina SV, Igbavboa U, Warden CS, Vassiliev AV, Wood WG. Lipid binding to amyloid β -peptide aggregates: preferential binding of cholesterol as compared with phosphatidylcholine and fatty acids. *J Neurochem.* 1997;69:1746-52.
60. Hensley K, Carney JM, Mattson MP, Aksenova M, Harris M, Wu JF, et al. A model for β -amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:3270-4.
61. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 1984;219:1-14.
62. Davies KJ, Delsignore ME, Lin SW. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *J Biol Chem.* 1987;262:9902-7.
63. Dyrks T, Dyrks E, Hartmann T, Masters C, Beyreuther K. Amyloidogenicity of β A4 and β A4-bearing amyloid protein precursor fragments by metal-catalyzed oxidation. *J Biol Chem.* 1992;267:18210-7.
64. Atwood CS, Moir RD, Huang X, Scarpa RC, Bacarra NM, Romano DM, et al. Dramatic aggregation of Alzheimer A β by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis. *J Biol Chem.* 1998;273:12817-26.
65. Sparks DL, Schreurs BG. Trace amounts of copper in water induce β -amyloid plaques and learning deficits in a rabbit model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:11065-9.
66. Miura T, Suzuki K, Kohata N, Takeuchi H. Metal binding modes of Alzheimer's amyloid β -peptide in insoluble aggregates and soluble complexes. *Biochemistry.* 2000;39:7024-31.
67. Yoshiike Y, Tanemura K, Murayama O, Akagi T, Murayama M, Sato S, et al. New insights on how metals disrupt amyloid β -aggregation and their effects on amyloid- β cytotoxicity. *J Biol Chem.* 2001;276:32293-9.
68. Huang X, Atwood CS, Moir RD, Hartshorn MA, Vonsattel JP, Tanzi RE, et al. Zinc-induced Alzheimer's β 1-40 aggregation is mediated by conformational factors. *J Biol Chem.* 1997;272:26464-70.
69. Smith MA, Harris PL, Sayre LM, Perry G. Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:9866-8.
70. Squitti R, Lupoi D, Pasqualetti P, Dal Forno G, Vernieri F, Chiofenda P, et al. Elevation of serum copper levels in Alzheimer's disease. *Neurology.* 2002;59:1153-61.
71. Squitti R, Cassetta E, Dal Forno G, Lupoi D, Lippolis G, Pauri F, et al. Copper perturbation in 2 monozygotic twins discordant for degree of cognitive impairment. *Arch Neurol.* 2004;61:738-43.
72. Squitti R, Pasqualetti P, Dal Forno G, Moffa F, Cassetta E, Lupoi D, et al. Excess of serum copper not related to ceruloplasmin in Alzheimer disease. *Neurology.* 2005;64:1040-6.
73. Hensley K, Hall N, Subramaniam R, Cole P, Harris M, Aksenov M, et al. Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *J Neurochem.* 1995;65:2146-56.
74. Nunomura A, Perry G, Pappolla MA, Wade R, Hirai K, Chiba S, et al. RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 1999;19:1959-64.
75. Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Stadtman ER, Floyd RA, et al. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:10540-3.
76. Smith MA, Perry G, Richey PL, Sayre LM, Anderson VE, Beal MF, et al. Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature.* 1996;382:120-1.
77. Maynard CJ, Cappai R, Volitakis I, Cherny RA, White AR, Beyreuther K, et al. Overexpression of Alzheimer's disease amyloid- β opposes the age-dependent elevations of brain copper and iron. *J Biol Chem.* 2002;277:44670-6.
78. Bayer TA, Schafer S, Simons A, Kemmling A, Kamer T, Tepest R, et al. Dietary Cu stabilizes brain superoxide dismutase 1 activity and reduces amyloid A β production in APP23 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:14187-92.
79. Phinney AL, Drisaldi B, Schmidt SD, Lugowski S, Coronado V, Liang Y, et al. In vivo reduction of amyloid- β by a mutant copper transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:14193-8.
80. Russell RL, Siedlak SL, Raina AK, Bautista JM, Smith MA, Perry G. Increased neuronal glucose-6-phosphate dehydrogenase and sulfhydryl levels indicate reductive compensation to oxidative stress in Alzheimer disease. *Arch Biochem Biophys.* 1999;370:236-9.
81. Lee JY, Cole TB, Palmiter RD, Suh SW, Koh JY. Contribution by synaptic zinc to the gender-disparate plaque formation in human Swedish mutant APP transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:7705-10.
82. Bush AI, Pettingell WH, Multhaup G, De Paradis M, Vonsattel JP, Gusella JF, et al. Rapid induction of Alzheimer A β amyloid formation by zinc. *Science.* 1994;265:1464-7.
83. Cuajungco MP, Goldstein LE, Nunomura A, Smith MA, Lim JT, Atwood CS, et al. Evidence that the β -amyloid plaques of Alzheimer's disease represent the redox-silencing and entombment of A β by zinc. *J Biol Chem.* 2000;275:19439-42.