



Universidade de
Aveiro
2005

Departamento de Biologia

J00466



**António Miguel de
Jesus Domingues**

**Receptores N-metil-D-aspartato e toxicidade do
peptídeo β -amilóide**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Molecular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Ana Cristina Carvalho Rego, Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, e co-orientação do Professor Doutor Edgar Figueiredo da Cruz e Silva, Professor Associado do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

UA-SD



253538

O corpo purifica-se pelo saber, eleva-se com o esforço inteligente: todos os instintos do que pensa e conhece se santificam; a alma do que se eleva alvoroça-se.

Médico, ajuda-te a ti mesmo; assim, ajudas também o teu doente. Seja essa a melhor assistência do doente: ver com os seus próprios olhos o que se cura a si mesmo.

"Assim Falou Zaratustra", Friedrich Nietzsche

o júri

presidente

Professor Doutor José Abrunheiro da Silva Cavaleiro
Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Catarina Isabel Neno Resende de Oliveira
Professora Catedrática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Professor Doutor Edgar Figueiredo da Cruz e Silva
Professor Associado do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Ana Cristina Carvalho Rego
Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Professora Doutora Cecília Maria Pereira Rodrigues
Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

agradecimentos

À Professora Doutora Cristina Rego pela orientação científica desta Tese de Mestrado, por todas as oportunidades que me deu e que me ajudaram a melhorar cientificamente e como pessoa, pela paciência com que respondeu a todas as minhas “perguntas rápidas”, pelo espírito crítico e pelo entusiasmo que colocou neste trabalho e sobretudo pela sua amizade. Obrigado!

Ao Professor Doutor Edgar da Cruz e Silva por me ter introduzido no fascinante mundo da biologia molecular ao aceitar-me no seu grupo durante licenciatura e me ter permitido continuar aí durante este tempo. Agradeço também as oportunidades que me deu, contribuindo para a minha valorização pessoal e profissional.

À Professora Doutora Catarina Resende de Oliveira, por me ter dado a possibilidade de realizar o meu trabalho de Mestrado no Instituto de Bioquímica da Faculdade de Medicina e pela disponibilidade e simpatia com que sempre partilhou os seus conhecimentos científicos.

À Margarida Fardilha por ter sido a minha tutora e amiga nos meus primeiros passos num laboratório. À Professora Doutora Odete da Cruz Silva, e a todo o seu grupo de investigação, Sandra Rebelo, Fátima, Gábi, pela boa disposição e pela ajuda que sempre me prestaram no laboratório e fora dele. À Sandra Vieira pela amizade, boa disposição e discussões científicas sempre interessantes.

À Doutora Maria Sancha Santos e à Paula Moreira, agradeço a disponibilidade e boa disposição que tiveram para me ajudar na determinação dos níveis de ATP. Muito obrigado Penacho pelas minhas primeiras aulas de cultura de células, pelo blog, pelo humor, o desafio intelectual e o “Nietzsche”. Aos meus companheiros da “Disfunção Mitocondrial e Morte Celular”, Mário, Jorge Oliveira, Ana Duarte, Teresa, Ana, Rita, agradeço a alegria e a entejada sempre presente no laboratório.

Não posso deixar de agradecer à minha segunda família: O Canas. Para o Tó, Pedro, Cristina e Nanda o meu sentido obrigado.

O meu agradecimento à Sandra Almeida não se estende apenas às imagens que cedeu para esta tese, ou à ajuda quotidiana, é também um agradecimento especial pelo apoio emocional, paciência, discussões acaloradas e tudo o mais que não pode ser expresso por palavras... obrigado Sandra!

Um agradecimento muito especial aos meus Pais, a quem no fundo devo a possibilidade de realizar este trabalho, e à minha irmã por ter suportado a minha ocupação hostil do computador durante estes últimos meses – esta tese também é vossa!

palavras-chave

Doença de Alzheimer, excitotoxicidade, homeostase do cálcio, peptídeo β -amilóide, receptores *N*-metil-D-aspartato.

resumo

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa resultado da perda irreversível de neurónios, principalmente no hipocampo e córtex cerebral. Esta doença manifesta-se clinicamente pela perda progressiva de memória, perturbações das funções cognitivas e alterações de comportamento. Estas alterações são o A DA caracteriza-se histopatologicamente pela presença de placas senis, devido à acumulação extracelular do peptídeo β -amilóide ($A\beta$), e por tranças neurofibrilares, resultantes da hiperfosforilação da proteína tau. A toxicidade induzida pelo peptídeo $A\beta$ está associada à excitotoxicidade, que consiste na libertação excessiva de glutamato e sobreactivação dos receptores *N*-metil-D-aspartato (NMDA), conduzindo ao aumento da concentração intracelular de cálcio e, consequentemente, à morte neuronal. Os receptores NMDA são compostos pelas subunidades NR1, NR2A-D e NR3A-B que se associam em vários subtipos com diferentes características funcionais e farmacológicas, e distribuem-se de forma heterogénea pelo sistema nervoso central. Neste trabalho, avaliou-se a influência de diferentes subtipos de receptores NMDA na toxicidade do peptídeo $A\beta_{1-40}$. Para tal, expressaram-se os subtipos NR1/NR2A ou NR1/NR2B em células HEK293. A exposição ao peptídeo $A\beta_{1-40}$ diminuiu a capacidade redutora em células que expressavam NR1/NR2A ou NR1/NR2B. Porém, o peptídeo $A\beta_{1-40}$ induziu um aumento da permeabilidade membranar, traduzida pelo aumento da libertação de lactato desidrogenase (LDH), e uma diminuição do conteúdo intracelular de ATP somente em células que expressavam o subtipo NR1/NR2A. A presença de MK-801, um antagonista dos receptores NMDA, preveniu parcialmente a alteração da permeabilidade membranar e dos níveis energéticos celulares. Não se encontraram evidências de morte celular por apoptose após exposição ao $A\beta_{1-40}$, uma vez que não se observou a activação de caspases-2, 3, 8 e 9 ou a fragmentação de ADN. A estimulação com NMDA e glicina em células que expressavam receptores do subtipo NR1/NR2A resultou num aumento dos níveis intracelulares de cálcio após a exposição ao peptídeo $A\beta_{1-40}$. Nestas condições, não se observou a activação de calpaínas, dependentes de cálcio. Pelo contrário, a exposição a $A\beta_{1-40}$ diminuiu os níveis intracelulares de cálcio resultantes da estimulação dos receptores do subtipo NR1/NR2B. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que os receptores NMDA compostos pelas subunidades NR1 e NR2A medeiam preferencialmente a toxicidade induzida pelo peptídeo $A\beta$ (1-40) por um processo de morte celular por necrose, devido à alteração da permeabilidade ao cálcio.

keywords

Alzheimer's disease, excitotoxicity, calcium homeostasis, β -amyloid peptide, *N*-methyl-D-aspartate receptors

abstract

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurological disease that results in the irreversible loss of neurons, particularly in the hippocampus and cortex. The clinical hallmarks are progressive impairment in memory, judgment, orientation to physical surroundings and language. The histopathological hallmarks are extracellular senile plaques that contain the β -amyloid peptide ($A\beta$), and intracellular neurofibrillary tangles, composed of a hyperphosphorylated form of the microtubular protein tau. Neurotoxicity induced by $A\beta$ has been documented to involve glutamate toxicity, resulting from the activation of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, elevation of intracellular Ca^{2+} levels and cell death (excitotoxicity). Glutamatergic NMDA receptors are composed by the subunits NR1, NR2A-D and NR3A-B that assemble in order to form different receptor subtypes. These subtypes are distributed heterogeneously throughout the brain and have different physiological and pharmacological properties. Few studies have taken into account the structural heterogeneity of the NMDA receptors. Thus, in the present study, we have examined the contribution of NR1/NR2A and NR1/NR2B subtypes in $A\beta$ toxicity. We have used transiently transfected HEK293 cells expressing NR1/NR2A and NR1/NR2B subunits and analysed the cytotoxicity induced by $A\beta_{1-40}$. Cells expressing both receptor subtypes showed a decrease in cell reducing capacity upon exposure to $A\beta_{1-40}$. Analysis of lactate dehydrogenase (LDH) release revealed that $A\beta_{1-40}$ enhanced the toxicity induced by expression of NR1/NR2A, compared to NR1/NR2B, indicating loss of plasma membrane integrity. Furthermore, in cells expressing NR1/NR2A, exposure to $A\beta_{1-40}$ decreased intracellular ATP content. MK-801, a NMDA receptor antagonist, partially prevented both the decrease in cell viability and the energy impairment. These differences could not be accounted for the activation of caspases-2, 3, 8 and 9 or the fragmentation of DNA, excluding the hypothesis of apoptosis. We have also evaluated intracellular calcium levels upon stimulation with NMDA plus glycine. Stimulation of the NR1/NR2A receptor subtype revealed an increase in intracellular calcium in cells pre-exposed to $A\beta_{1-40}$, as compared to non-exposed cells. Under these conditions, calcium-dependent calpains were not activated. Opposite effects were observed upon activation of NR1/NR2B receptors, since a decrease in intracellular calcium was observed upon exposure to $A\beta_{1-40}$. These data suggest that NR1/NR2A-composed NMDA receptors specifically mediate necrotic cell death in the presence of $A\beta$, through the alteration of intracellular calcium homeostasis.

ÍNDICE

Índice	1
Abreviaturas	3
I. Introdução	7
1. Doença de Alzheimer	9
1.1 Descrição geral	9
1.2 Formas familiares e esporádica da doença de Alzheimer.....	13
1.3 Hipótese da “cascata de amilóide” – efeitos neurotóxicos do peptídeo β -amilóide	14
1.3.1 Toxicidade induzida pelo $A\beta$ – formas fibrilares e não-fibrilares.....	17
1.3.2 Resposta inflamatória	18
1.3.3 Stress oxidativo e disfunção mitocondrial.....	19
1.3.4 Alteração da homeostasia iónica	22
2. Receptores NMDA	24
2.1 Descrição geral	24
2.2 Heterogeneidade dos receptores NMDA.....	29
3. Vias de morte celular – necrose e apoptose.....	31
3.1 Características gerais	31
3.2 Vias de morte celular na excitotoxicidade mediada pelos receptores NMDA	34
3.2.1 Excitotoxicidade em modelos não neuronais	36
3.3 Vias de morte neuronal na doença de Alzheimer	38
4. Envolvimento dos receptores NMDA na doença de Alzheimer.....	39
II. Objectivos	43
III. Material e Métodos.....	47
1. Material.....	49
2. Amplificação de plasmídeos.....	50
2.1 Transformação em <i>E.coli</i>	50
2.2 <i>Minipreps</i>	50
2.3 Digestão do ADN com enzimas de restrição e electroforese	51
2.4 <i>Megaprep</i>	52
3. Cultura de células	53

4. Transfecção	53
5. Imunocitoquímica.....	54
6. Avaliação da viabilidade celular	55
6.1 Redução de MTT.....	55
6.2 Libertação de LDH.....	55
6.3 Contagem de células com azul de tripano.....	56
6.4 Morfologia nuclear.....	56
7. Determinação dos níveis intracelulares de ATP	57
8. Avaliação da actividade das caspases	57
9. Western Blotting	58
10. Imagiologia de cálcio intracelular em célula única.....	59
11. Quantificação da proteína.....	61
12. Análise estatística.....	61
IV. Resultados	63
1. Expressão de receptores do tipo NR1/NR2A e NR1/NR2B em células HEK293	66
2. Efeito do peptídeo A β na viabilidade celular de células transfectadas com subunidades dos receptores NMDA.....	68
2.1 Análise da capacidade redutora.....	68
2.2 Análise da integridade da membrana plasmática	70
2.3 Alteração dos níveis energéticos celulares.....	73
3. Envolvimento do processo apoptótico	74
3.1 Activação de caspases	75
3.2 Activação de calpaínas	77
3.3 Análise da morfologia nuclear	78
4. Alterações funcionais dos receptores NMDA.....	79
V. Discussão.....	83
VI. Referências.....	93

ABREVIATURAS

Aβ	β -amilóide
Ac-DEVD-pNA	<i>N</i> -Acetil-Asp-Glu-Val-Asp- <i>p</i> -nitroanilida
Ac-IEPD-pNA	<i>N</i> -acetil-Ile-Glu-Pro-Asp- <i>p</i> -nitroanilida
Ac-LEHD-pNA	<i>N</i> -acetil-Leu-Glu-His-Asp- <i>p</i> -nitroanilida
Ac-VDVAD-pNA	<i>N</i> -acetil-Val-Asp-Val-Ala-Asp- <i>p</i> -nitroanilida
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADP	do inglês, <i>adenosine diphosphate</i>
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
AICD	do inglês, <i>APP intracellular domain</i>
Apaf-1	do inglês, <i>apoptotic protease-activating factor-1</i>
Aph1	do inglês, <i>anterior pharynx-defective phenotype 1</i>
APP	do inglês, <i>amyloid precursor protein</i>
AMP	do inglês, <i>adenosine monophosphate</i>
ARN	ácido ribonucleico
ARNi	ARN de interferência
ATP	do inglês, <i>adenosine triphosphate</i>
BACE1	do inglês, <i>β-amyloid cleaving enzyme 1</i>
Bax	do inglês, <i>Bcl-2-associated X protein</i>
BDNF	do inglês, <i>brain derived neurotrophic factor</i>
Bid	do inglês, <i>BH3 interacting domain death agonist</i>
CAD	do inglês, <i>caspase-activated DNase</i>
cAMP	do inglês, <i>cyclic adenosine monophosphate</i>
cADN	ADN complementar
caspases	do inglês, <i>cysteiny aspartate-specific proteinases</i>
Cdk5	do inglês, <i>cyclin dependent kinase 5</i>
CHAPS	3-[(3-colamidopropil) dimetilamónio] - 1 - propanosulfonato
CRADD	do inglês, <i>caspase and RIP adaptor with death domain</i>

CREB	do inglês, <i>cAMP response element binding protein</i>
DA	doença de Alzheimer
dATP	desoxi-ATP
DFF	do inglês, <i>DNA fragmentation factor</i>
DMEM	do inglês, <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
ECF	do inglês, <i>enhanced chemifluorescence</i>
EGFP	do inglês, <i>enhanced green fluorescent protein</i>
FADD	do inglês, <i>Fas-associated protein with death domain</i>
Fas	do inglês, <i>fibroblast associated</i>
FTDP-17	do inglês, <i>frontotemporal degeneration with parkinsonism</i>
GAPDH	do inglês, <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GSK-3β	do inglês, <i>glycogen synthase kinase-3β</i>
HEK293	do inglês, <i>human embryonic kidney 293</i>
ICAD	do inglês, <i>inhibitor of CAD - caspase-activated DNase</i>
IL-6	interleucina-6
iNOS	do inglês, <i>inducible nitric oxide synthase</i>
IP₃	inositol-1,4,5-trisfosfato
LB	Luria-Bertoni
LDH	lactato desidrogenase
LTD	do inglês <i>long-term depression</i>
LTP	do inglês, <i>long-term potentiation</i>
mGluR	receptores metabotrópicos de glutamato
MTT	brometo de metil-tiazolil-difenil-tetrazólio

β-NADH	β -nicotinamida adenina dinucleótido
NF-L	do inglês, <i>neurofilament-L</i>
NGF	do inglês, <i>neuronal growth factor</i>
NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS	do inglês, <i>neuronal nitric oxide synthase</i>
NO	do inglês, <i>nitric oxide</i>
NOS	do inglês, <i>neuronal nitric oxide synthase</i>
PBS	do inglês <i>phosphate-buffered saline</i>
Pen2	do inglês, <i>PS enhancer 2</i>
PKC	do inglês, <i>protein kinase C</i>
PS	presenilina
PSD-95	do inglês, <i>post-synaptic density 95</i>
PTP	do inglês, <i>permeability transition pore</i>
RE	retículo endoplasmático
ROS	do inglês, <i>reactive oxygen species</i>
SDS	dodecilsulfato de sódio
SNC	sistema nervoso central
SOD	superóxido dismutase
TNF	do inglês, <i>tumour necrosis factor</i>

I. INTRODUÇÃO

1. Doença de Alzheimer

1.1 Descrição geral

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurológica progressiva. É a doença neurodegenerativa mais comum, constituindo cerca de 2/3 de todos os casos de demência. Actualmente, a DA afecta cerca de 2% da população dos países industrializados e estima-se que em Portugal existam cerca de 70 mil pacientes. A DA tem uma prevalência de aproximadamente 1% entre os 65-69 anos e aumenta com a idade, atingindo 40-50% após os 95 anos. A probabilidade de ocorrência desta doença aumenta em indivíduos com mais de 70 anos e prevê-se que aumente 3 vezes nos próximos 50 anos (Fontes: Alzheimer's Association, EUA e Associação Portuguesa de Familiares e Amigos de Doentes de Alzheimer, Portugal). Do ponto de vista clínico, as principais características são a redução progressiva da memória e das capacidades cognitivas, a diminuição da capacidade de tomar decisões, a dificuldade progressiva da orientação em espaços físicos e dificuldade de expressão. Na fase final da doença, os pacientes perdem o controlo sobre as funções fisiológicas. Histopatologicamente, a DA é caracterizada pela diminuição do volume cerebral resultante da perda de neurónios e sinapses (Fig. 1), pela presença de placas senis (extracelulares) (Fig. 2A) e tranças neurofibrilares (intracelulares) (Fig. 2B). São particularmente afectadas na DA as regiões cerebrais envolvidas nos processos de memória e aprendizagem, como o hipocampo e o córtex. Uma vez que muitos sintomas apresentados pelos pacientes de Alzheimer, nomeadamente a perda de memória, são comuns a outras formas de demência, o diagnóstico definitivo da DA é feito somente após a análise *post-mortem* do cérebro, que deve conter placas senis e tranças neurofibrilares em número suficiente para ser considerado como afectado pela DA (Mattson, 2004; Nussbaum & Ellis, 2003).

As placas senis (Fig. 2A) são depósitos fibrilares e agregados amorfos extracelulares do peptídeo β -amilóide ($A\beta$), organizados em fibrilhas de 7-10 nm de diâmetro e associados a formas não-fibrilares do peptídeo (Arai *et al.*, 1990; Bowen *et al.*, 1977; Selkoe, 1989). O peptídeo $A\beta$ resulta da clivagem proteolítica de uma proteína transmembranar, a proteína precursora de amilóide (APP, do inglês, *amyloid precursor*

protein) (Fig. 3). As tranças neurofibrilares são agregados fibrilares intracelulares da proteína tau hiperfosforilada, que consistem em filamentos helicoidais emparelhados com 10 nm de espessura (Fig. 2B) (Ihara *et al.*, 1986; Kosik *et al.*, 1986; Wood *et al.*, 1986). Os principais responsáveis pela hiperfosforilação da proteína tau são as cinases GSK-3 β (do inglês, *glycogen synthase kinase-3 β*) (Takashima *et al.*, 1993) e Cdk5 (do inglês, *cyclin dependent kinase 5*) (Alvarez *et al.*, 1999; Patrick *et al.*, 1999).



Figura 1: A DA tem como consequência a diminuição do volume de regiões do cérebro envolvidas na memória e aprendizagem. Comparativamente ao cérebro de um indivíduo saudável, o cérebro de um doente de Alzheimer exhibe uma diminuição marcada do volume dos lobos temporais e frontal (adaptado de, Mattson, 2004).

As placas senis e as tranças neurofibrilares encontram-se sobretudo nas regiões do cérebro envolvidas na memória, aprendizagem e comportamentos emocionais, tais como o hipocampo (Ball *et al.*, 1985), o córtex (Hyman *et al.*, 1986) e a amígdala (Scott *et al.*, 1992). Os neurónios colinérgicos e glutamatérgicos parecem ser particularmente afectados na DA (Bartus *et al.*, 1982; Greenamyre *et al.*, 1985) e as neurites associadas às placas senis estão geralmente danificadas, sugerindo que o A β danifica as sinapses e as neurites (Mattson, 2004; Nussbaum & Ellis, 2003).

Os depósitos de amilóide que se encontram nos pacientes de Alzheimer são constituídos por diferentes formas do peptídeo A β , nomeadamente A β_{1-39} , A β_{1-40} , A β_{1-42} e A β_{1-43} (Glenner & Wong, 1984; Masters *et al.*, 1985). Destes peptídeos, o A β_{1-40} é a forma solúvel mais abundante em fluídos biológicos, representando cerca de 90% do total de peptídeos A β secretados (Vigo-Pelfrey *et al.*, 1993). Embora o A β_{1-42} seja minoritário, este peptídeo é mais fibrillogénico do que a forma A β_{1-40} (Masters *et al.*, 1985; Roher *et al.*, 1993). No entanto, e apesar de mais solúvel, os níveis de A β_{1-40} parecem correlacionar-se com a gravidade da doença (McLean *et al.*, 1999), podendo servir como indicador precoce de alterações sinápticas que ocorrem na DA (Funato *et al.*, 1998; Lue *et al.*, 1999).

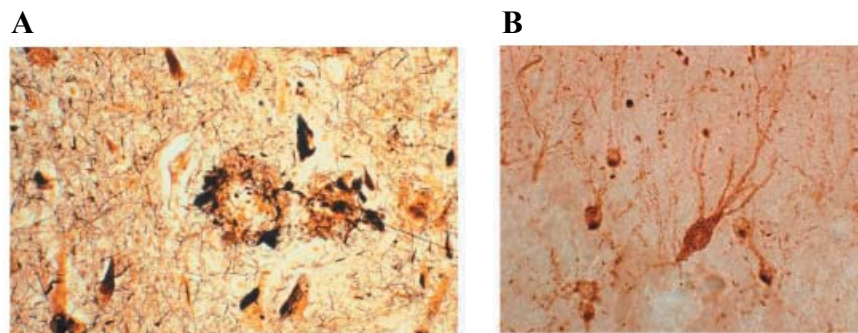


Figura 2: Análise histológica de estruturas proteicas relacionadas com a DA. (A) Placas de amilóide marcadas com prata e (B) tau hiperfosforilada detectada por imunocitoquímica de secções de cérebros de doentes de Alzheimer (adaptado de, Bossy-Wetzel *et al.*, 2004a).

In vivo, o peptídeo A β começa por se acumular na forma de monómeros, produzidos fisiologicamente no cérebro. Estes monómeros poderão agregar formando oligómeros (formas solúveis) e finalmente fibrilhas de amilóide com 7-10 nm (formas insolúveis) (Pitschke *et al.*, 1998; Podlisny *et al.*, 1995; Podlisny *et al.*, 1998). Os peptídeos A β assumem estruturas variáveis e parcialmente helicoidais, dependendo da ligação a membranas, da quelação de metais e da interacção com outros peptídeos. A ligação do peptídeo A β aos iões Cu $^{2+}$, Fe $^{2+}$ e Zn $^{2+}$ é coordenada por três histidinas (His677, His684, His685) e uma tirosina (Tyr681). A ligação do peptídeo a iões induz uma alteração de conformação do peptídeo A β para uma estrutura semelhante a folha β , que favorece a sua agregação proteica (Curtain *et al.*, 2001; Watson *et al.*, 1998).

A APP é uma proteína membranar, que possui uma região extracelular extensa, uma hélice transmembranar e uma região citoplasmática curta. O terminal-N da APP contém um domínio de ligação à heparina, um domínio de ligação ao cobre e um domínio inibidor de proteases. A estrutura do terminal-N da APP indicia que a APP poderá pertencer à super família dos factores de crescimento ricos em cisteína, da qual fazem parte o NGF (do inglês, *neuronal growth factor*) e o TNF (do inglês, *tumour necrosis factor*) (Rossjohn *et al.*, 1999). A estrutura do local de ligação ao cobre é homóloga aos *chaperones* de cobre e poderá regular a dimerização ou o processamento proteolítico da APP (Barnham *et al.*, 2003).

A APP pode ser processada em duas vias: a via da α -secretase, também designada por via não-amiloidogénica, e pela via da β -secretase ou via amiloidogénica, no final da qual

são formados os peptídeos A β (Fig. 3). Na via não-amiloidogénica, a α -secretase cliva a APP no meio da região A β , libertando um fragmento solúvel (α -sAPP). O peptídeo terminal-C C83 é posteriormente clivado pela γ -secretase dando origem ao fragmento p3. Na via amiloidogénica, a primeira clivagem da APP é realizada pela β -secretase libertando um fragmento solúvel (β -sAPP). O terminal-C C99 é posteriormente clivado pela γ -secretase, em vários locais, ao nível dos aminoácidos 711, 713 e 714 produzindo, respectivamente, os peptídeos A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₂ e A β ₁₋₄₃. A clivagem pela γ -secretase também liberta o domínio intracelular da APP (AICD, do inglês, *APP intracellular domain*) que parece ter um papel na regulação da transcrição (De Strooper, 2003). Nas formas familiares da DA ocorrem mutações na APP nos locais de clivagem da β -secretase. Estas mutações induzem um aumento da produção de A β e, conseqüentemente, da formação de agregados fibrilares (Singleton *et al.*, 2004).

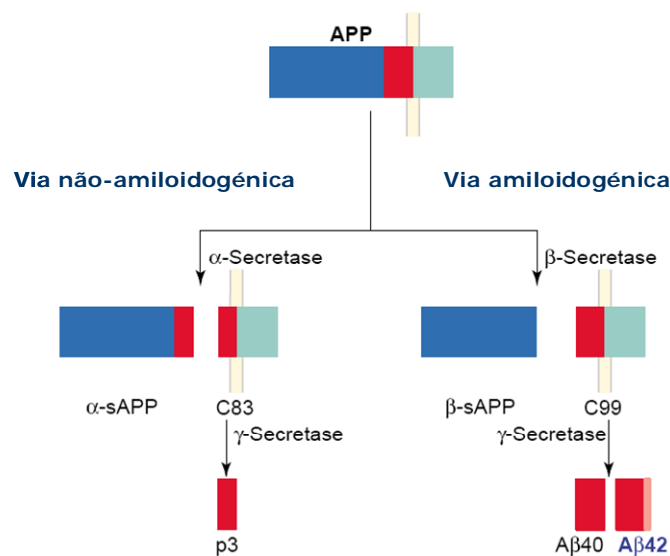


Figura 3: Representação esquemática da APP e dos seus metabolitos. A proteína transmembranar APP (a membrana plasmática está representada a amarelo) pode ser processada em duas vias alternativas: a via não-amiloidogénica e a via amiloidogénica. A descrição pormenorizada destas vias é feita no texto (adaptado de, Citron, 2004a).

A enzima β -secretase é a protease aspártica transmembranar BACE1 (do inglês, *β -amyloid cleaving enzyme 1*) (Hussain *et al.*, 1999; Sinha *et al.*, 1999; Vassar *et al.*, 1999) que, em conjunto com a sua homóloga BACE2 (Farzan *et al.*, 2000), formam um novo

ramo da família das pepsinas. A γ -secretase é um complexo multiproteico com actividade de protease constituído por 4 proteínas transmembranares: presenilina (PS) 1 ou 2, nicastrina, Aph1 (do inglês, *anterior pharynx-defective phenotype 1*) e Pen2 (do inglês, *PS enhancer 2*). No seu conjunto, estas proteínas catalizam a clivagem intermembranar da APP nos locais da γ -secretase anteriormente descritos (De Strooper, 2003; Edbauer *et al.*, 2003; Haass & Steiner, 2002; Sisodia & St George-Hyslop, 2002). A PS1 (e PS2) parece ser o núcleo enzimático deste complexo, constituindo o domínio transmembranar com actividade aspartil-protease responsável pela produção dos fragmentos A β (De Strooper *et al.*, 1998; De Strooper, 2003; Naruse *et al.*, 1998). Foram também identificadas mutações nas PS que têm como resultado o aumento da produção de A β ₁₋₄₂ em detrimento de A β ₁₋₄₀ (Borchelt *et al.*, 1997; Citron *et al.*, 1997; Scheuner *et al.*, 1996).

1.2 Formas familiares e esporádica da doença de Alzheimer

A DA pode ter origem genética (formas familiares) ou ter uma causa “acidental”, desconhecida (forma esporádica). Embora a idade média para o aparecimento da DA seja aproximadamente aos 80 anos, as formas familiares da doença, mais precoces, podem ocorrer antes dos 65 anos. Estas formas familiares da DA representam menos de 5% de todos os casos e apresentam um padrão hereditário de dominância autossómica (Bird *et al.*, 1989). Apesar das formas familiares de DA serem raras, o seu estudo assume grande importância, pois facilitou a identificação dos mecanismos de degenerescência comuns às formas esporádicas (Nussbaum & Ellis, 2003).

Foram já encontradas mais de 100 mutações *missense* (pontuais) em 3 genes responsáveis pelas formas familiares da DA (Hutton *et al.*, 1998b). Estas mutações foram identificadas no gene que codifica para a APP, no cromossoma 21 (Chartier-Harlin *et al.*, 1991; Eckman *et al.*, 1997; Goate *et al.*, 1991; Murrell *et al.*, 1991), bem como em dois genes com bastantes similaridades que codificam as proteínas PS1, no cromossoma 14, e PS2, no cromossoma 1 (Levy-Lahad *et al.*, 1995; Rogaev *et al.*, 1995; Sherrington *et al.*, 1995). As mutações na APP causam alterações de aminoácidos no interior ou imediatamente adjacentes ao fragmento A β e têm como resultado o aumento da clivagem da APP pela via da β -secretase e, conseqüentemente, da produção de A β (Cai *et al.*, 1993; Citron *et al.*, 1992; Haass *et al.*, 1994). As mutações nas presenilinas alteram a actividade

da γ -secretase, aumentando sobretudo a produção da forma $A\beta_{1-42}$ (Borchelt *et al.*, 1997; Citron *et al.*, 1997; Scheuner *et al.*, 1996). Portanto, o processamento anormal da APP e o aumento da formação de $A\beta$ parecem ser acontecimentos centrais na patogênese das formas hereditárias da DA.

Contrariamente ao verificado para os genes da APP e das presenilinas, não foram encontradas no gene que codifica para a proteína tau mutações associadas à ocorrência de DA (Lee & Trojanowski, 1999). As mutações no gene da tau têm sido associadas com a demência fronto-temporal com parkinsonismo (FTDP-17, do inglês, *frontotemporal degeneration with parkinsonism*) (Hutton *et al.*, 1998a; Lynch *et al.*, 1994). Esta doença é caracterizada pela presença generalizada de tranças neurofibrilares e pela ausência de placas de amilóide (Hutton *et al.*, 1998a; Spillantini & Goedert, 1998). É também interessante notar que o padrão de deposição de $A\beta$ e de patologia neuronal em indivíduos com o síndrome de Down (trissomia 21), uma doença resultante da duplicação do cromossoma 21 (no qual se encontra o gene para a APP), é no essencial idêntica à que ocorre na DA (Mann & Esiri, 1989; Masters *et al.*, 1985), confirmando o papel preponderante do processamento da APP na patologia da DA.

As causas da alteração do metabolismo da APP e deposição de $A\beta$ nos casos esporádicos da DA (formas não hereditárias) ainda não são conhecidas. No entanto, poderão incluir o aumento do stress oxidativo, relacionado com o envelhecimento, alterações no metabolismo energético e/ou alterações na homeostasia iônica celular (Mattson, 2004). Uma vez que as lesões que ocorrem na forma não-familiar da doença são semelhantes às encontradas nas formas hereditárias é lógico assumir que o processamento anormal da APP, a deposição excessiva e/ou o déficit de remoção do peptídeo $A\beta$ têm um papel importante nos casos mais frequentes da DA, associados à forma esporádica (De Strooper & Annaert, 2000).

1.3 Hipótese da "cascata de amilóide" – efeitos neurotóxicos do peptídeo β -amilóide

O aumento da produção e acumulação do peptídeo tóxico $A\beta$ é comum às formas esporádica e familiares de DA. Uma das evidências que implicam o $A\beta$ na patogênese da DA provém da observação de que este peptídeo causa toxicidade em diversos modelos

celulares neuronais tais como neurónios em cultura (Iversen *et al.*, 1995; Mattson *et al.*, 1993; Takadera *et al.*, 1993; Yankner *et al.*, 1990; Yankner, 1996), culturas organotípicas (Allen *et al.*, 1995; Bruce *et al.*, 1996) e linhas celulares (Behl *et al.*, 1994b; Lambert *et al.*, 1994). Por outro lado, as diversas mutações que ocorrem nas formas familiares da DA causam um aumento da produção de $A\beta_{1-40}$ e $A\beta_{1-42}$ ou da razão $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ em pacientes de Alzheimer, ratinhos transgênicos ou modelos celulares (Borchelt *et al.*, 1997; Haass *et al.*, 1995; Scheuner *et al.*, 1996). Reciprocamente, ratos deficientes para a PS1 possuem níveis diminuídos de $A\beta_{1-40}$ e $A\beta_{1-42}$ (De Strooper *et al.*, 1998; Naruse *et al.*, 1998). Estas observações levaram à formulação da “hipótese da cascata de amilóide” que enuncia a produção excessiva de $A\beta$, ou a sua deficiente remoção, como a causa primária da DA (Fig. 4) (Hardy, 1997; Hardy & Selkoe, 2002, para revisão).

A cascata inicia-se com a formação de oligómeros de $A\beta$. Estes oligómeros podem causar directamente danos nas sinapses e neurites, para além de activarem células da microglia e astrócitos. Os peptídeos $A\beta$ também dão início à formação de tranças neurofibrilares que contribuem substancialmente para a neurodegenerescência na DA (Hardy & Allsop, 1991; Hardy & Selkoe, 2002). Embora as vias de formação e acumulação do peptídeo $A\beta$ estejam caracterizadas, as vias pelas quais o peptídeo causa distrofia neuronal e toxicidade ainda não estão definidas. Um dos factores que contribui para esta falha no conhecimento é a ausência de um modelo animal que recapitule as características mais importantes da DA, como a formação de tranças neurofibrilares, a formação de $A\beta$ e a morte neuronal selectiva (Golde, 2003). Recentemente foi criado um modelo animal no qual foi observado a formação de tranças neurofibrilares após a deposição do peptídeo $A\beta$ em placas senis, no entanto, não foi comunicada a ocorrência de morte neuronal (Oddo *et al.*, 2003). Por outro lado, ainda é desconhecido o mecanismo pelo qual o peptídeo $A\beta$ induz a hiperfosforilação da tau e a formação das tranças neurofibrilares.

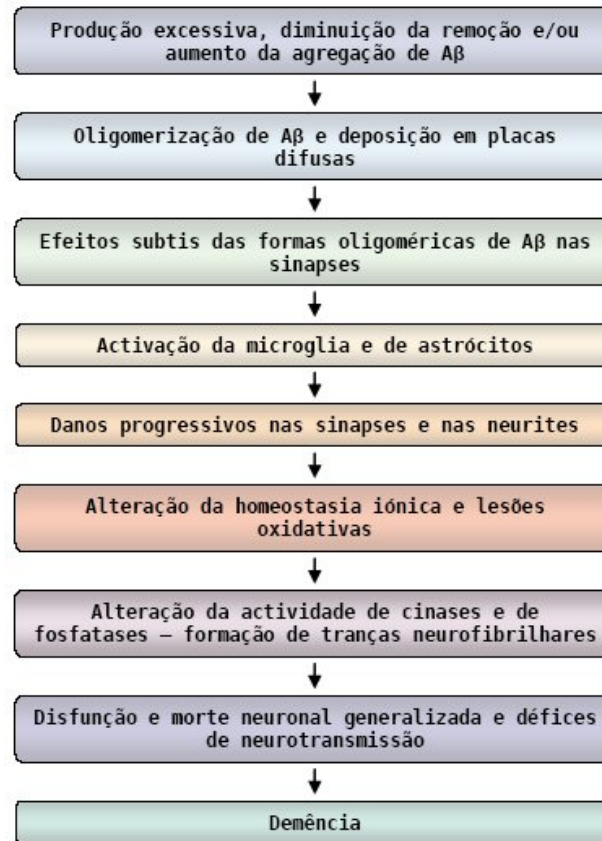


Figura 4: Hipótese da “Cascata de Amilóide”. A sequência de eventos patogênicos que se julga culminarem em demência associada à DA é aqui representada (adaptado de, Citron, 2004b).

As falhas no estudo detalhado da DA, devido à limitação dos modelos animais e celulares, tem também restringido um conhecimento aprofundado da cronologia dos acontecimentos esquematizados na figura 4 e que ocorrem como consequência da oligomerização do peptídeo A β . Apesar disso, os estudos nestes modelos têm contribuído para a clarificação das vias patológicas iniciadas pelo A β . O A β pode ser tóxico para os neurónios por exposição directa. No entanto, a sua neurotoxicidade pode também resultar do aumento da vulnerabilidade neuronal ao stress oxidativo e/ou metabólico, e ao processo de excitotoxicidade. Desta forma, as terapias baseadas na imunização do A β têm como efeito uma melhoria das funções sinápticas em modelos animais da doença. Esta melhoria é provavelmente resultante da remoção do peptídeo A β , coerente com o papel central do A β na patogenia da DA, e evidenciando a possibilidade de reversão de alguns dos efeitos tóxicos induzidos pelo A β (Hardy & Allsop, 1991; Morgan *et al.*, 2000; Wilcock *et al.*,

2003; Wilcock *et al.*, 2004). Nas próximas secções serão descritos com maior pormenor alguns dos eventos patogénicos da “cascata de amilóide” identificados na figura 4.

1.3.1 Toxicidade induzida pelo A β – formas fibrilhares e não-fibrilhares

Embora os estudos das formas familiares de DA, nomeadamente em ratinhos transgénicos, tenham providenciado fortes evidências que a alteração do processamento ou da função da APP é a causa principal da DA, estes estudos não provaram directamente que o peptídeo A β é o agente causador da degenerescência neuronal. Assim, apesar de nem sempre existir uma correlação directa entre a densidade de placas neuríticas e a disfunção cognitiva (Dickson *et al.*, 1992; Katzman *et al.*, 1988), a marcação *post-mortem* de secções do cérebro de pacientes de Alzheimer com anticorpos para o peptídeo A β permitiu observar que este se acumula em placas senis de grandes dimensões, assim como em microdepósitos de dimensões variáveis localizados em regiões cerebrais nas quais ocorre uma perda sináptica (Cummings & Cotman, 1995; Uchihara *et al.*, 1995).

In vitro, a toxicidade induzida pelo A β está fortemente correlacionada com a propensão do peptídeo para formar agregados fibrilhares (Busciglio *et al.*, 1992; Mattson, 1995; Pike *et al.*, 1991; Pike *et al.*, 1993). De facto, observou-se que a toxicidade é maior na presença de peptídeos “envelhecidos”, ou seja, incubados durante horas ou dias a 37°C, um procedimento que promove a formação de fibrilhas de amilóide (Hilbich *et al.*, 1991; Pike *et al.*, 1991; Pike *et al.*, 1993). Contudo, estas soluções de A β “envelhecido” são compostas por diversas formas (ou espécies) do peptídeo A β , solúveis (monómeros e oligómeros não-fibrilhares) e insolúveis (espécies fibrilhares), não sendo possível identificar quais as formas tóxicas do peptídeo A β .

A hipótese de que são os agregados fibrilhares insolúveis de A β os responsáveis pela patologia da DA tem sido colocada (Hardy & Allsop, 1991; Lorenzo & Yankner, 1994). No entanto, mais recentemente, uma nova hipótese começou a emergir. Segundo esta, as formas solúveis, nomeadamente os oligómeros, estarão na base da disfunção sináptica e morte neuronal que ocorre na DA (McLean *et al.*, 1999; Selkoe, 2002). Assim, os oligómeros de A β poderão danificar as neurites e as sinapses, causando disfunção neuronal, que precede a formação de placas senis (Selkoe, 2002). De forma concordante com esta hipótese, verificou-se que o A β é mais tóxico na forma de oligómeros solúveis presentes

nas fases iniciais do processo de agregação (Kayed *et al.*, 2003; Lambert *et al.*, 1998), podendo provocar distúrbios cognitivos (Cleary *et al.*, 2005).

As sinapses parecem ser particularmente susceptíveis aos efeitos adversos das formas solúveis do peptídeo A β , tal como é sugerido pela capacidade de alteração do transporte sináptico de íões e de glucose e por estudos electrofisiológicos que mostram que o A β compromete a plasticidade sináptica (ver secção I.1.3.4 e I.4; (Chapman *et al.*, 1999)). Por outro lado, em ratinhos transgénicos que sobreexpressam a APP humana, os défices de memória tornam-se aparentes relativamente cedo no processo de deposição de A β , consistente com a ocorrência de efeitos neutóxicos do A β durante a formação dos oligómeros (Koistinaho *et al.*, 2001). Coerentemente, verificou-se que a inibição da γ -secretase diminuiu a quantidade de oligómeros de A β e os défices da potenciação a longo termo (LTP, do inglês, *long-term potentiation*) (Walsh *et al.*, 2002). Na ausência de placas senis, os níveis elevados de A β têm como resultado a diminuição da imunoreactividade para a sinaptofisina, um indicador do número de sinapses (Mucke *et al.*, 2000), sugerindo que a perda de conectividade entre sinapses e os défices de transmissão sináptica precedem a formação de placas e poderão explicar as alterações iniciais de memória na DA.

1.3.2 Resposta inflamatória

O peptídeo A β pode causar danos indirectos aos neurónios através da indução da resposta inflamatória nos cérebros de pacientes de Alzheimer. As protofibrilhas de A β activam a microglia, incitando uma resposta inflamatória e a libertação de citocinas neurotóxicas (El Khoury *et al.*, 1996; Meda *et al.*, 1995). Por outro lado, as placas senis contêm citocinas e outros mediadores inflamatórios, tais como a interleucina-6 (IL-6) e o TNF, que são componentes da cascata do complemento (Abraham *et al.*, 1988; Rogers *et al.*, 1992). Estas citocinas medeiam a expressão da forma indutível da sintetase do monóxido de azoto (iNOS, do inglês, *inducible nitric oxide synthase*), associada a processos inflamatórios (Akama & Van Eldik, 2000). Em culturas de astrócitos o peptídeo A β induziu a activação destas células e o conseqüente aumento de IL-1 β e da expressão de iNOS, sugerindo que o A β tem um papel relevante na activação das células gliais. Para além disso, a activação da microglia induzida pelo A β causa neurotoxicidade pela produção de concentrações tóxicas de monóxido de azoto (NO, do inglês, *nitric oxide*) (Hu

et al., 1998). De facto, anti-inflamatórios não-esteróides, que incluem o ibuprofeno, reduzem a produção de $A\beta_{1-42}$ (Weggen *et al.*, 2001) e parecem retardar o aparecimento da DA (Stewart *et al.*, 1997). Embora o mecanismo de acção destes compostos não seja ainda claro (Gasparini *et al.*, 2004), este poderá envolver a modulação da actividade da γ -secretase (Weggen *et al.*, 2003).

1.3.3 Stress oxidativo e disfunção mitocondrial

Muitos processos de morte celular envolvem a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS, do inglês, *reactive oxygen species*) (Chandra *et al.*, 2000; Sastry & Rao, 2000). Estas são espécies químicas instáveis que, quando radicalares, possuem um electrão desemparelhado associado ao átomo de oxigénio, e desempenham um importante papel na degradação dos vários componentes celulares através do processo de stress oxidativo. O stress oxidativo surge como resultado de um desequilíbrio entre a produção de ROS e as defesas antioxidantes celulares e caracteriza-se pela oxidação e resultante inactivação de proteínas celulares, pela oxidação e consequente fragmentação do ADN (ácido desoxirribonucleico) e pela peroxidação lipídica das membranas biológicas (Chandra *et al.*, 2000). Por outro lado, muitas das biomoléculas que são oxidadas pelas ROS, para além de perderem a sua função, podem propagar as reacções de oxidação, atingindo desta forma outros alvos intracelulares (Castagne *et al.*, 1999). Genericamente, as ROS incluem o anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxilo (HO^{\cdot}), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o NO e o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$). A produção de ROS é uma consequência natural do metabolismo aeróbio, o qual origina níveis basais na ordem dos μM para o H_2O_2 e na ordem dos nM para o $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} e NO (Dawson & Dawson, 1996).

É ainda importante referir que o stress oxidativo determina muitas vezes o tipo de morte celular, podendo ser responsável pela alteração de um mecanismo inicialmente com características apoptóticas para um processo de morte celular por necrose. Assim, a inactivação das caspases (do inglês, *cysteiny* *aspartate-specific proteinases*) por S-nitrosilação ou por oxidação do grupo tiólico presente no seu local activo e indispensável para a sua função catalítica, pode resultar na necrose das células. Por outro lado, a disfunção mitocondrial resultante do stress oxidativo leva a um decréscimo dos níveis

intracelulares de ATP (do inglês, *adenosine triphosphate*), o que pode desencadear um mecanismo necrótico (Chandra *et al.*, 2000, para revisão).

O $O_2^{\cdot-}$, apesar de ser um radical pouco reactivo e com uma capacidade de difusão reduzida, pode constituir o ponto de partida das cascatas de stress oxidativo. A principal fonte intracelular deste radical é a mitocôndria (Cadenas & Davies, 2000; Dawson & Dawson, 1996; Lee & Wei, 2000). Grande parte do $O_2^{\cdot-}$ gerado na célula é convertido em H_2O_2 por acção da enzima superóxido dismutase (SOD) (Dawson & Dawson, 1996). Apesar de ser um agente oxidante fraco, o H_2O_2 pode actuar como indutor apoptótico em diversas condições. Assim, o H_2O_2 pode actuar na mitocôndria, causando a perda do potencial de membrana mitocondrial e a libertação de citocromo *c* (Dawson & Dawson, 1996; Kirkinetzos & Moraes, 2001). O radical HO^{\cdot} forma-se a partir de $O_2^{\cdot-}$ e de H_2O_2 , na presença de iões metálicos como o Fe^{2+} e o Cu^{2+} , segundo a reacção de Fenton/Haber-Weiss. Deste modo, a citotoxicidade do $O_2^{\cdot-}$ e do H_2O_2 *in vivo* deve-se, em parte, à sua conversão em HO^{\cdot} (Castilho *et al.*, 1995). Esta é uma espécie radicalar extremamente reactiva, já que pode reagir com a maioria das moléculas celulares, lesando proteínas, lípidos, glúcidos e ADN (Kirkinetzos & Moraes, 2001). O NO é produzido por acção da NOS, a partir da L-arginina (Chandra *et al.*, 2000; Dawson & Dawson, 1996, para revisão). O NO é uma espécie química bastante reactiva, instável, e difusível, pelo que pode atravessar facilmente as membranas biológicas. Quando presente em concentrações elevadas o NO pode ser neurotóxico pois reage com enzimas que possuem centros de ferro/enxofre (como por exemplo a aconitase), originando complexos de ferro-nitrosilo, o que pode causar a disfunção das mitocôndrias e a consequente depleção dos níveis energéticos. O NO pode ainda inactivar várias enzimas antioxidantes, como a catalase, a glutatíon peroxidase e a SOD. O NO actua também como indutor apoptótico, levando à activação dos receptores membranares do tipo Fas (do inglês, *fibroblast associated*) e à activação da caspase-3 (Chandra *et al.*, 2000; Dawson & Dawson, 1996).

O NO reage espontaneamente com o $O_2^{\cdot-}$, originando $ONOO^-$ que interage rapidamente com lípidos, proteínas e ADN (Chandra *et al.*, 2000; Dawson & Dawson, 1996). O $ONOO^-$ pode modificar proteínas por nitrosilação de resíduos de tirosina, bem como por oxidação dos aminoácidos triptofano e cisteína. Os principais alvos mitocondriais do $ONOO^-$ incluem os complexos I, II e IV da cadeia respiratória mitocondrial, o ADN mitocondrial e os lípidos das membranas mitocondriais. A alteração destas moléculas por acção do

ONOO⁻ pode induzir o intumescimento mitocondrial, despolarização da mitocôndria, libertação de cálcio e abertura do PTP (do inglês, *permeability transition pore*) (Kirkinetzos & Moraes, 2001).

Assim, do mesmo modo que a mitocôndria é central nos processos de stress oxidativo também é um elemento chave na morte celular induzida pelo A β . Células desprovidas de mitocôndrias funcionais (células ρ^0) não apresentam susceptibilidade ao tratamento com A β . Em contraste, em células cujas mitocôndrias estão funcionais, o peptídeo A β induz toxicidade associada à diminuição da actividade dos complexos da cadeia mitocondrial e à redução do potencial de membrana mitocondrial (Cardoso *et al.*, 2001). O stress oxidativo resultante da disfunção mitocondrial ocorre inicialmente na DA, muito provavelmente como consequência do facto do A β danificar as mitocôndrias, directa ou indirectamente (Anandatheerthavarada *et al.*, 2003; Hirai *et al.*, 2001; Mecocci *et al.*, 1994). O peptídeo A β bloqueia o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, resultando num declínio dos níveis de ATP (Casley *et al.*, 2002a) e em mitocôndrias isoladas inibe a respiração e a actividade enzimática da α -cetoglutarato desidrogenase e da piruvato desidrogenase (Casley *et al.*, 2002b). O peptídeo A β também induz a formação do O₂⁻ pelas mitocôndrias (Mark *et al.*, 1997). Em pacientes de Alzheimer, a actividade da enzima citocromo *c* oxidase, complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial, está diminuída (Cardoso *et al.*, 2004). Coerentemente, em mitocôndrias isoladas do cérebro de rato incubadas com o fragmento A β_{25-35} observou-se um decréscimo da actividade do complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial, sem que tenha ocorrido uma alteração significativa da actividade dos complexos I, II-III ou da citrato sintetase (Canevari *et al.*, 1999). Contudo, noutros estudos, observou-se que o A β altera a actividade de outros complexos da cadeia mitocondrial, nomeadamente o complexo I e II-III (Pereira *et al.*, 1998), sugerindo que o A β altera a função mitocondrial pela inibição não selectiva de enzimas da cadeia respiratória mitocondrial.

O peptídeo A β poderá também mediar efeitos nocivos ligando-se a iões metálicos com capacidade de oxidação/redução, que entram na reacção de Fenton/Harber-Weiss e contribuem para a formação de radicais livres, com grande capacidade oxidativa (Bush *et al.*, 1993; Bush *et al.*, 1994; Dong *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 1999). Foi descrito que a produção de ONOO⁻ induzida por *N*-metil-D-aspartato (NMDA) ou por NO, mobiliza o zinco dos locais de armazenamento intracelulares. Por sua vez, o zinco livre induz o

bloqueio da cadeia respiratória mitocondrial, a libertação de citocromo *c* e a formação de ROS, resultando em morte celular (Bossy-Wetzel *et al.*, 2004b). Em concentrações elevadas (1 mM), o zinco potencia a peroxidação lipídica, a oxidação de proteínas e o decréscimo de ATP intracelular induzidos por A β (Moreira *et al.*, 2000). Desta forma, a quelação do zinco e do cobre tem efeitos neuroprotectores (Bush, 2002). Por exemplo, o clioquinol, um antibiótico que quelata zinco e cobre, e que atravessa a barreira hematoencefálica, causa um decréscimo da deposição de A β no cérebro e melhorias na aprendizagem num ratinho transgénico para a APP (Cherny *et al.*, 2001). Assim, ensaios clínicos de fase II para o clioquinol poderão trazer novos dados para o tratamento da DA (Ritchie *et al.*, 2003).

O peptídeo A β conduz ao stress oxidativo através da acumulação de ROS, causando a perda de homeostasia iónica e neurotoxicidade. O peptídeo A β conduz à acumulação de H₂O₂ e à peroxidação de lípidos membranares em culturas primárias de neurónios corticais, de hipocampo e em células de neuroblastoma (Behl *et al.*, 1994b; Goodman *et al.*, 1994; Goodman *et al.*, 1996; Goodman & Mattson, 1994a; Goodman & Mattson, 1994b; Manelli & Puttfarcken, 1995). De facto, em culturas primárias de córtex o A β induziu a produção de ROS e peroxidação lipídica, sem que ocorresse morte celular generalizada. Nestas condições ocorreu a libertação de citocromo *c*, sugerindo a interferência do A β na permeabilidade da mitocôndria (Agostinho & Oliveira, 2003). Coerentemente, em células PC12, uma linha celular com características neuronais, o A β induziu um decréscimo da viabilidade celular, correlacionado com o aumento da produção de ROS e com a diminuição do conteúdo intracelular de ATP (Pereira *et al.*, 1999). Estes dados sugerem que o A β induz a formação de ROS e que estes tem um papel importante na diminuição da produção energética que ocorre na DA.

1.3.4 Alteração da homeostasia iónica

São várias as evidências que apontam para uma alteração da homeostasia do cálcio na patogénese da DA (LaFerla, 2002; Mattson & Chan, 2001, para revisão). Por exemplo, em pacientes de Alzheimer foi observado um aumento nos níveis de cálcio em compartimentos intracelulares junto às tranças neurofibrilares (Murray *et al.*, 1992). Foi também observado um aumento da actividade de calpaínas, cuja actividade é dependente de cálcio

(Grynspan *et al.*, 1997; Nixon *et al.*, 1994). Por outro lado, o peptídeo A β torna os neurónios mais vulneráveis ao processo de excitotoxicidade (Koh *et al.*, 1990; Mattson *et al.*, 1992; Mattson *et al.*, 1993). Este processo é definido pela toxicidade mediada pelo aminoácido excitatório glutamato após a sua libertação em excesso para a fenda sináptica e consequente activação de receptores ionotrópicos pós-sinápticos permeáveis a cálcio e sódio. A capacidade do peptídeo A β induzir o influxo de cálcio e conduzir à elevação dos níveis de cálcio intracelular tem sido largamente documentada (Fukuyama *et al.*, 1994; Goodman *et al.*, 1994; Gray & Patel, 1995; Mattson *et al.*, 1992). Para além disso, o A β aumenta a resposta ao glutamato e à despolarização membranar (Mattson *et al.*, 1992; Mattson *et al.*, 1993). Verificou-se também que a supressão do influxo de cálcio protege os neurónios da toxicidade induzida pelo peptídeo A β , sugerindo o envolvimento do cálcio nos processos de toxicidade induzidos pelo A β (Mattson *et al.*, 1992; Mattson *et al.*, 1993; Weiss *et al.*, 1994). No entanto, noutro estudo não se observou protecção recorrendo a bloqueadores dos canais de cálcio (Whitson & Appel, 1995) indiciando que existem outras vias de aumento da concentração intracelular de cálcio, para além daquelas que são mediadas por canais iónicos. De facto, os péptídeos A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₂ e o fragmento A β ₂₅₋₃₅ poderão formar poros na membrana citoplasmática que permitem a passagem de iões, tais como o cálcio, o sódio e/ou o potássio (Kagan *et al.*, 2004, para revisão).

Na DA também ocorrem alterações no armazenamento de cálcio no retículo endoplasmático (RE). Quase todas as alterações genéticas (mutações ou deleções) na PS1 ou PS2 têm como resultado a alteração da homeostasia do cálcio, resultante do RE (LaFerla, 2002, para revisão). Em regra, a expressão da PS1 mutante tem como resultado o aumento da libertação de cálcio do RE, induzida pela activação de canais de cálcio dependentes de voltagem e pelo receptor do IP₃ (inositol-1,4,5-trisfosfato). Pelo contrário, a deleção da PS1 resulta na diminuição da libertação de cálcio armazenado no RE (Chan *et al.*, 2000; Leissring *et al.*, 2000b; Leissring *et al.*, 2000a). Estes resultados parecem sugerir que a PS1 regula os níveis de cálcio no RE, e que este organelo estará envolvido na patogénese da DA familiar. As mutações nas PS podem ter outros efeitos na alteração da homeostasia iónica, para além da modulação do RE. Culturas neuronais de animais transgénicos que expressam uma forma mutante da PS1 são mais sensíveis à morte celular induzida por glutamato. Esta vulnerabilidade parece estar correlacionada com o aumento da concentração intracelular de cálcio após estimulação dos receptores de glutamato,

aumento da produção de ROS e da peroxidação lipídica (Guo *et al.*, 1999). Por outro lado, o A β induz um aumento dos níveis basais de cálcio intracelular dependente da libertação de cálcio do RE, levando à morte celular por apoptose. Desta forma é possível que o RE tenha um papel importante não só na alteração da homeostasia iónica nas formas familiares, como também nas formas esporádicas da DA (Ferreiro *et al.*, 2004).

As ROS geradas pela presença do A β induzem a peroxidação de lípidos membranares, podendo alterar a actividade das bombas iónicas de sódio/potássio e de cálcio dependentes de ATP (Na⁺/K⁺- e Ca²⁺-ATPase). Verificou-se anteriormente que a exposição de culturas de hipocampo ao peptídeo A β causa uma redução da actividade da Na⁺/K⁺-ATPase sem, contudo, alterar a actividade do trocador de sódio/cálcio ou de outras ATPases dependentes de magnésio. Resultados semelhantes foram obtidos em sinaptossomas humanos, nos quais o A β induziu a diminuição da actividade da Ca²⁺-ATPase. A diminuição da actividade deste trocador foi parcialmente prevenida na presença de vitamina E, um antioxidante lipofílico, sugerindo que a formação de ROS está envolvida neste efeito do A β (Mark *et al.*, 1995; Mark *et al.*, 1997).

2. Receptores NMDA

2.1 Descrição geral

O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais comum e com maior distribuição no sistema nervoso central (SNC) de mamíferos. A transmissão glutamatérgica desempenha um papel fisiológico na sinaptogénese que ocorre durante o desenvolvimento (Constantine-Paton, 1990) e tem uma importância central nos mecanismos sinápticos subjacentes à memória e aprendizagem, nomeadamente na LTP (Bliss & Collingridge, 1993) e na depressão a longo termo (LTD, do inglês *long-term depression*) (Zhuo & Hawkins, 1995). Quando libertado em excesso, o glutamato activa receptores pós-sinápticos que desencadeiam mecanismos excitotóxicos, culminando na morte neuronal associada a várias doenças neurodegenerativas (Beal, 1992; Meldrum, 1990).

As funções fisiológicas ou neuropatológicas do glutamato são mediadas por duas classes distintas de receptores, classificados como receptores do tipo metabotrópico e

ionotrópico. Os receptores metabotrópicos (mGluR) estão acoplados a proteínas G e exercem a sua acção através de segundos mensageiros enquanto que os receptores ionotrópicos estão associados a canais iónicos. Existem oito subunidades dos receptores mGluR (mGluR1-8) divididas em três grupos, em função da sua homologia, ligação a segundos mensageiros e propriedades farmacológicas. Assim, os receptores do grupo I (mGluR1 e mGluR5) associa-se ao IP₃ (inositol-1,4,5-trisfosfato) e os do grupo II (mGluR2 e mGluR3) e III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8) encontram-se ligados ao cAMP (do inglês, *cyclic adenosine monophosphate*) (Lee *et al.*, 2004). Existem 3 classes de receptores de glutamato ionotrópicos, designados por receptores AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico), cainato ou NMDA (Fig. 5), em função do seu agonista selectivo. Destes receptores, o canal iónico associado aos receptores do tipo NMDA é o mais permeável a Ca²⁺. Os receptores NMDA desempenham um papel preponderante em diversas funções fisiológicas (LTP) e patológicas (excitotoxicidade) do glutamato (Michaelis, 1998, para revisão).

A activação dos receptores NMDA nativos é complexa, pois é necessária a presença simultânea de dois agonistas, o glutamato e a glicina, para a abertura do canal (Dingledine *et al.*, 1999). Para além disso, para que ocorra a passagem de iões, é também necessária a despolarização da membrana, pois o magnésio bloqueia directamente o canal iónico de forma dependente da voltagem (McBain & Mayer, 1994). Os receptores NMDA também são modulados por poliaminas, como a espermina e a espermidina. Em concentrações baixas (micromolar), as poliaminas promovem a abertura do canal aumentando a afinidade do receptor à glicina e removendo a inibição tónica por protões (Dingledine *et al.*, 1999; Lynch *et al.*, 1997). Em concentrações elevadas, as poliaminas bloqueiam o canal de forma dependente da voltagem. Outros moduladores endógenos como o zinco, o NO e moduladores redox, bloqueiam os receptores NMDA alostericamente em diferentes locais (Fig. 5) (Lynch & Guttman, 2001).

Os receptores NMDA (Fig. 5) são constituídos por diferentes subunidades: NR1, cuja presença é estritamente necessária para a formação de canais funcionais, e as subunidades NR2A-D, que conferem aos receptores propriedades fisiológicas e farmacológicas distintas (Meguro *et al.*, 1992; Monyer *et al.*, 1992; Moriyoshi *et al.*, 1991). As subunidades NR3A (também designada NMDAR-L ou χ_1) (Ciabarra *et al.*, 1995; Sucher *et al.*, 1995) e NR3B (Matsuda *et al.*, 2002; Nishi *et al.*, 2001) poderão também fazer parte do receptor NMDA,

embora com menor frequência relativamente às subunidades NR2. O co-agonista glicina liga-se à subunidade NR1, enquanto o glutamato liga-se às subunidades NR2 (Anson *et al.*, 1998; Hirai *et al.*, 1996; Laube *et al.*, 1997).

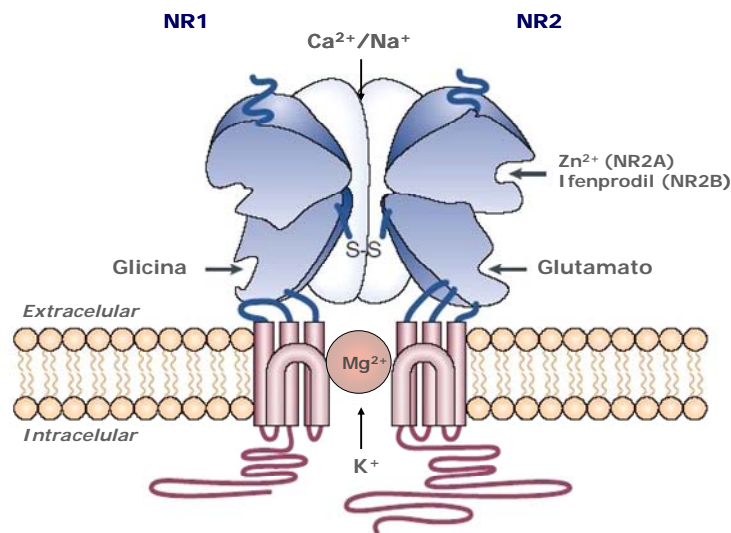


Figura 5: Representação esquemática dos receptores NMDA. As subunidades NR1 e NR2 são necessárias à formação de receptores funcionais e possuem vários locais de modulação (adaptado de, Kemp & McKernan, 2002).

Quando expressa em oócitos de xenopus, a subunidade NR1 reproduz muitas características dos receptores NMDA nativos. Isto deve-se, provavelmente, à presença de subunidades complementares exógenas nos oócitos de xenopus (Moriyoshi *et al.*, 1991). É, no entanto, necessária a co-expressão de outras subunidades com a NR1 para a formação de receptores NMDA completamente funcionais em células de mamífero. As subunidades NR2 não possuem actividade electrofisiológica em qualquer dos sistemas de expressão usados, mas quando combinadas com as subunidades NR1 produzem receptores completamente funcionais, quer em oócitos de xenopus quer em células de mamífero (Lynch *et al.*, 1997, para revisão). Por outro lado, as subunidades NR3 só produzem receptores funcionais quando são expressas em conjunto com as subunidades NR1 e NR2. Julga-se que a função fisiológica das subunidades NR3 seja a modulação da actividade dos receptores constituídos pelas subunidades NR1 e NR2, através da diminuição da sensibilidade ao bloqueio por Mg^{2+} e da diminuição da permeabilidade ao cálcio (Ciabarra

et al., 1995; Das *et al.*, 1998; Matsuda *et al.*, 2002; Matsuda *et al.*, 2003; Sasaki *et al.*, 2002). Os receptores NMDA funcionais são provavelmente tetrâmeros, compostos por duas subunidades NR1 e duas subunidades NR2 (Behe *et al.*, 1995; Rosenmund *et al.*, 1998). Alguns autores referem ainda a possibilidade dos receptores NMDA serem pentâmeros (Hawkins *et al.*, 1999; Premkumar & Auerbach, 1997). É também provável que alguns dos receptores NMDA nativos sejam compostos por diferentes subunidades NR2 (Chazot & Stephenson, 1997; Luo *et al.*, 1997; Sheng *et al.*, 1994).

As subunidades dos receptores NMDA são expressas diferencialmente nas várias regiões do cérebro e o padrão de expressão altera-se durante o desenvolvimento. A subunidade NR1 é aquela cuja expressão está mais disseminada no SNC de mamíferos, apresentando uma distribuição ubíqua. Embora a subunidade NR1 seja expressa durante o desenvolvimento embionário, os níveis de expressão desta subunidade aumentam no período pós-natal. Durante o desenvolvimento embrionário as subunidades NR2A e NR2C não são expressas e, portanto, predominam as subunidades NR2B e NR2D. Após o nascimento, inicia-se a expressão das subunidades NR2A e NR2C, ocorrendo quase em simultâneo uma diminuição dos níveis de NR2B e NR2D. Durante o desenvolvimento embrionário, a subunidade NR2B é expressa sobretudo no córtex, tálamo e espinha dorsal embora também ocorra no hipocampo e hipotálamo. A expressão da subunidade NR2D está restrita ao diencéfalo, mesencéfalo e espinha dorsal (Monyer *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1992; Wenzel *et al.*, 1995; Wenzel *et al.*, 1997). A subunidade NR3A é expressa em níveis elevados na espinha dorsal, tronco cerebral, hipotálamo e tálamo durante o desenvolvimento embrionário, decrescendo no período pós-natal. A expressão da subunidade NR3B encontra-se restrita aos neurónios motores somáticos da espinal medula, protuberância e bolbo raquidiano. Embora nos adultos a expressão da subunidade NR3B se mantenha nestas áreas cerebrais, os níveis de expressão decrescem no período pós-natal (Chatterton *et al.*, 2002; Matsuda *et al.*, 2003; Nishi *et al.*, 2001). Nos adultos, a subunidade NR2A (a mais expressa das subunidades NR2) é expressa ao nível do córtex, hipocampo, estriado e no bolbo e tubérculo olfactivo. A subunidade NR2B é expressa predominantemente no telencéfalo, diencéfalo, córtex, cerebelo e tronco cerebral. A expressão da subunidade NR2C ocorre no cerebelo, tálamo e bolbo olfactivo. A subunidade NR2D é expressa sobretudo no diencéfalo e tronco cerebral (Ishii *et al.*, 1993;

Monyer *et al.*, 1992; Moriyoshi *et al.*, 1991). Nos adultos a subunidade NR3A é expressa sobretudo no tálamo e amígdala (Ciabarra *et al.*, 1995; Sucher *et al.*, 1995).

Tanto as subunidades NR1 como as NR2 (Fig. 5) são proteínas com três regiões transmembranares completas e uma volta intramembranar entre a primeira e a segunda região transmembranar. Esta estrutura foi prevista com base no mapeamento de epítomos e na homologia com a estrutura cristalográfica dos receptores AMPA (Dingledine *et al.*, 1999). O terminal-N de cada uma das subunidades é extracelular e contém regiões putativas para ligandos e múltiplos locais de glicosilação. O terminal-C é intracelular e poderá controlar a regulação da actividade do receptor por segundos mensageiros, nomeadamente através dos múltiplos locais de fosforilação (Fig. 6) (Ali & Salter, 2001; Salter & Kalia, 2004, para revisão). Estes domínios intracelulares "ancoram" os receptores NMDA em locais celulares específicos e fazem a ligação dos receptores com sistemas de segundos mensageiros (Grant & O'Dell, 2001; Niethammer *et al.*, 1996). Os resíduos de aminoácidos do terminal-C permitem a interacção do receptor com proteínas pós-sinápticas como a PSD-95 (do inglês, *post-synaptic density 95*) e a Yotiao (Niethammer *et al.*, 1996).

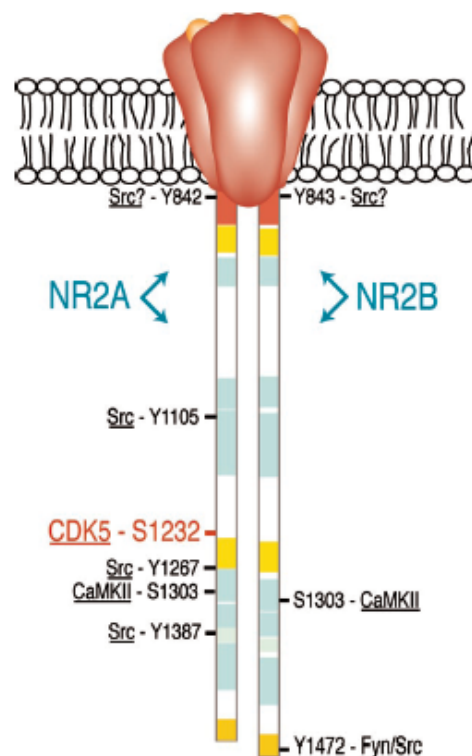


Figura 6: Locais de fosforilação e cinases responsáveis pela fosforilação das subunidades NR2A e NR2B (adaptado de, Kennedy & Manzerra, 2001).

As subunidades NR1 e NR2 diferem estruturalmente. A subunidade NR1 é 300 aminoácidos mais curta que as subunidades NR2C e NR2D, e 500 aminoácidos mais curta do que as subunidades NR2A e NR2B. Estas sequências peptídicas extra das subunidades NR2 estão situadas intracelularmente, no terminal-C, uma região com pouca homologia entre as diferentes subunidades NR2. Como a função deste domínio parece estar relacionada com a localização e activação dos receptores, poder-se-á deduzir que diferentes subunidades estarão associadas a diferentes respostas de mensageiros intracelulares (Lynch & Guttman, 2002).

2.2 Heterogeneidade dos receptores NMDA

A heterogeneidade dos receptores NMDA reflecte-se a vários níveis. Por exemplo, cada subunidade NR2 confere ao receptor diferentes propriedades funcionais e, *in vivo*, existem receptores com várias subunidades NR2, resultando canais com propriedades híbridas das subunidades que os compõem (Chazot *et al.*, 1994; Luo *et al.*, 1997; Wafford *et al.*, 1993). Também as subunidades NR1 contribuem para a variabilidade dos receptores NMDA. A subunidade NR1 pode ocorrer em 8 variantes de *splice* diferentes (NR1a-h), contribuindo para a diversidade das propriedades farmacológicas do receptor (Anantharam *et al.*, 1992; Durand *et al.*, 1992; Durand *et al.*, 1993; Hollmann *et al.*, 1993; Nakanishi *et al.*, 1992; Sugihara *et al.*, 1992). Para além disso, e tal como referido anteriormente, as subunidades dos receptores NMDA possuem longos terminais-C que interagem com várias moléculas de sinalização celular (Husi *et al.*, 2000; Kennedy, 2000; Kennedy & Manzerra, 2001).

As variantes de *splicing* da subunidade NR1, geradas por três exões, produzem alterações na sensibilidade do receptor a agonistas, antagonistas, fosforilação pela PKC (do inglês, *protein kinase C*) e à modulação por zinco e poliaminas (Anantharam *et al.*, 1992; Durand *et al.*, 1992; Durand *et al.*, 1993; Hollmann *et al.*, 1993; Koltchine *et al.*, 1996; Nakanishi *et al.*, 1992; Sugihara *et al.*, 1992). As variantes de *splicing* também são responsáveis por algumas das interacções com proteínas do citoesqueleto como a NF-L (do inglês, *neurofilament-L*) (Ehlers *et al.*, 1998) e Yotiao (Lin *et al.*, 1998). Desta forma, a ocorrência de determinada variante de *splicing* num receptor poderá determinar a localização e/ou a interacção com outras proteínas associadas aos receptores NMDA.

A expressão de receptores NMDA em sistemas heterólogos permitiu a compreensão das bases da heterogeneidade farmacológica dos receptores NMDA. Combinações de diferentes subunidades dão origem a receptores com diferentes propriedades. Por exemplo, a subunidade NR2A possui afinidade elevada para antagonistas glutamatérgicos, enquanto os receptores compostos pela subunidade NR2C possuem baixa afinidade para este tipo de antagonistas (Dingledine *et al.*, 1999; Lynch *et al.*, 1997, para revisão). Por outro lado, o antagonista ifenprodil e os seus derivados têm alta afinidade para os receptores que contêm a subunidade NR2B, consistente com a elevada afinidade dos receptores neonatais para o ifenprodil, uma vez que neste período do desenvolvimento esta é a subunidade predominante (Williams *et al.*, 1993). É interessante notar que apesar do local de ligação para a glicina estar localizado na subunidade NR1 (Fig. 5) (Wafford *et al.*, 1995), um antagonista para este local, o CGP 61594, é mais selectivo para os receptores compostos pelas subunidades NR1 e NR2B (Benke *et al.*, 1999), sugerindo que a interacção entre as subunidades NR1 e NR2 podem regular a afinidade do co-agonista glicina. Adicionalmente, alguns receptores NMDA nativos contêm mais do que uma subunidade NR2 num receptor heteromérico (Chazot & Stephenson, 1997; Luo *et al.*, 1997; Sheng *et al.*, 1994). Embora a relevância fisiológica destes subtipos de receptores esteja por esclarecer, a formação destes receptores híbridos aumenta ainda mais a heterogeneidade dos receptores NMDA.

Alguma da complexidade dos mecanismos de morte induzidos por glutamato poderá reflectir diferenças específicas da composição de subtipos dos receptores NMDA. Em lesões isquémicas, por exemplo, os neurónios do cérebro anterior são mais susceptíveis à isquémia do que os neurónios granulares do cerebelo, apesar dos níveis totais de receptores NMDA serem semelhantes nestes dois tipos de células. No entanto, os receptores NMDA do cerebelo têm uma condutância menor e são menos sensíveis aos antagonistas competitivos para o local de ligação do glutamato comparativamente aos receptores do cérebro anterior, o que parece estar de acordo com a elevada expressão das subunidades NR2C nesta região (Lynch *et al.*, 1997). Esta observação sugere que a presença de subtipos específicos de receptores NMDA poderá alterar a susceptibilidade neuronal ao processo de excitotoxicidade.

3. Vias de morte celular – necrose e apoptose

3.1 Características gerais

De modo geral, a morte celular pode ocorrer por dois processos principais: necrose e/ou apoptose. A apoptose é um processo de morte celular caracterizado pela condensação e fragmentação do ADN nuclear e diminuição do volume celular (Wang, 2000). A apoptose pode ocorrer de forma programada durante o desenvolvimento embrionário, ou em situações patológicas como resposta a estímulos tóxicos, à ausência de suporte trófico, radiação UV e compostos que danifiquem o ADN. A necrose é um processo de morte celular que resulta de uma disfunção celular aguda que ocorre como resposta a condições de stress intenso ou associada a processos inflamatórios. O processo de morte por necrose é caracterizado por um grande influxo de iões, entumescimento das mitocôndrias, aumento do volume celular, clivagem não-específica do ADN e ruptura da membrana plasmática com a subsequente libertação do conteúdo celular (Wang, 2000). Uma das características primordiais da necrose é a diminuição da produção de ATP. Contrariamente os processos de morte por apoptose são dependentes de energia (Nicotera & Melino, 2004; Yuan *et al.*, 2003).

A apoptose é um tipo de morte celular executado por uma maquinaria celular especializada, da qual faz parte uma família de proteases cisteínicas, denominadas por caspases, responsáveis pela clivagem de substratos no terminal-C de um resíduo de aspartato. Quando as caspases são activadas, clivam uma grande variedade de proteínas, incluindo substratos chave para a célula (Cohen, 1997). Existem duas vias relativamente bem caracterizadas pelas quais as caspases podem ser activadas (Fig. 7). A primeira via é mediada por receptores de morte como o Fas ou o TNF. A ligação de proteínas adaptadoras específicas como FADD (do inglês, *Fas-associated protein with death domain*) ou CRADD (do inglês, *caspase and RIP adaptor with death domain*) causam o recrutamento de pró-caspases iniciadoras, tais como as caspases-8 e 10, tornando-as activas. As caspases iniciadoras activas vão por sua vez clivar e activar caspases efectoras tais como as caspases-3, 6 e 7, induzindo desta forma a activação de uma cascata de caspases. A

segunda via, designada por via mitocondrial, é activada em resposta a vários insultos como a radiação UV, ausência de factores de crescimento, agentes químicos e fármacos que lesam o ADN. Nesta via, a libertação de citocromo *c* para o citosol pode ser iniciada pela caspase-2. Pensa-se que esta caspase é iniciadora da via mitocondrial (Lassus *et al.*, 2002), no entanto, também já foi descrita a sua ligação com a via dos receptores de morte (Guo *et al.*, 2002).

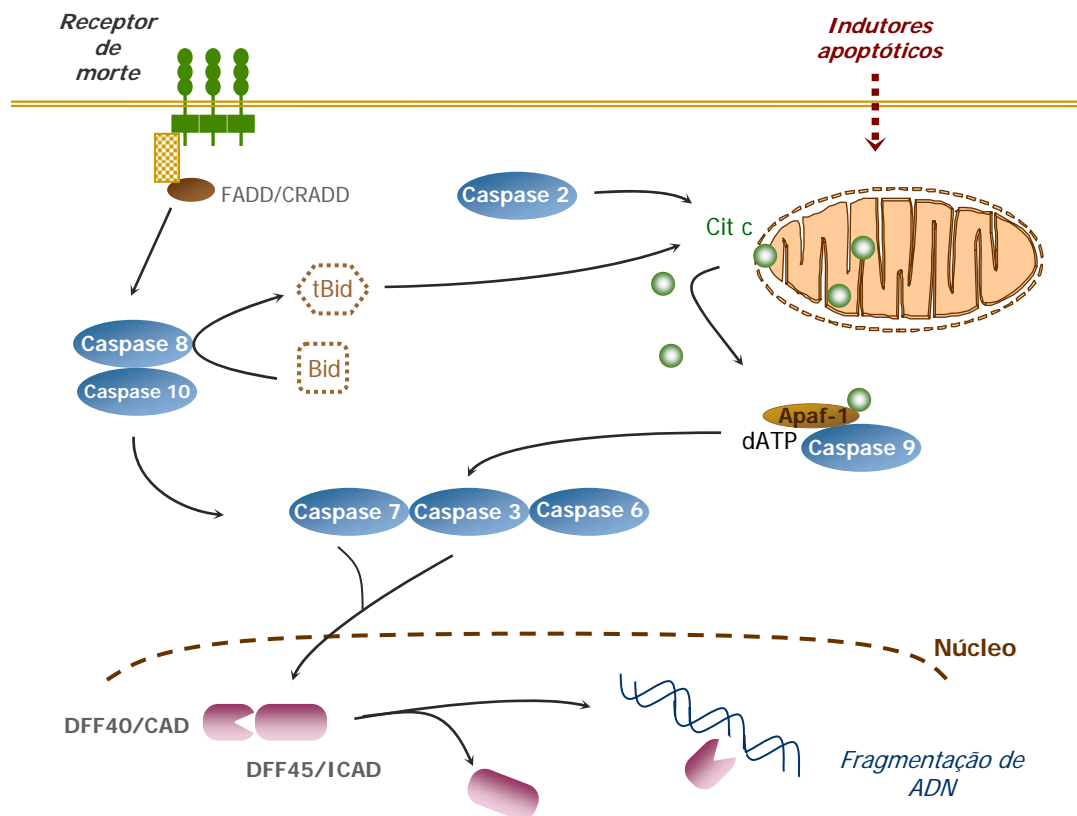


Figura 7: Representação esquemática das duas vias apoptóticas. Na via representada à esquerda, quando os receptores de morte são activados, recrutam e activam várias caspases iniciadoras: caspases-8 e 10. Estas vão clivar e activar as caspases efectoras: caspases 3, 6 e 7. Na via mitocondrial (representada à direita), iniciada pela caspase-2, o citocromo *c* libertado da mitocôndria liga-se à Apaf-1 e, na presença de dATP, activa a caspase 9. Esta caspase é responsável pela clivagem e activação da caspase-3. A caspase-8 pode fazer a ligação entre as duas vias através da clivagem da proteína Bid. No passo seguinte, as caspases-3 e 7 vão activar o complexo DFF, composto por duas subunidades, DFF40/CAD e DFF45/ICAD. A subunidade DFF40/CAD tem actividade de nuclease e é responsável pela fragmentação do ADN e condensação da cromatina (esquema gentilmente cedido por Sandra Almeida).

No citosol, o holocitocromo *c* associa-se com a Apaf-1 (do inglês, *apoptotic protease-activating factor-1*) após hidrólise de dATP (desoxi-ATP) formando o apoptossoma. Este interage com a procaspase-9 conduzindo à activação da caspase-9. Por sua vez, esta activa

a caspase-3 (Zou *et al.*, 1999). Estas duas vias não são totalmente independentes, uma vez que a caspase-8 (activada pelos receptores de morte) pode clivar caspases efectoras. Em alternativa, esta pode activar a cascata de caspases indirectamente clivando a proteína pró-apoptótica Bid (do inglês, *BH3 interacting domain death agonist*) (Li *et al.*, 1998). O fragmento clivado da proteína Bid desloca-se do citosol para a membrana mitocondrial externa, onde induz a libertação de citocromo *c*, possivelmente através da interacção com a Bax (do inglês, *Bcl-2-associated X protein*). O processo apoptótico culmina com a condensação da cromatina e a fragmentação do ADN.

A fragmentação e condensação da cromatina é mediada pela activação do DFF (do inglês, *DNA fragmentation factor*), um complexo proteico heterodimérico composto por duas subunidades, DFF40/CAD (do inglês, *caspase-activated DNase*) e DFF45/ICAD (do inglês, *inhibitor of CAD - caspase-activated DNase*) (Liu *et al.*, 1997). A subunidade DFF45/ICAD desempenha o papel de *chaperone* que medeia o *folding* correcto da subunidade DFF40 e também de inibidor desta subunidade quando se encontram ligados no complexo DFF. Quando o DFF45/ICAD é clivado pelas caspases-3 e -7 dissocia-se da subunidade DFF40/CAD e permite, assim, a activação desta (Liu *et al.*, 1999). Consequentemente, o DFF40/CAD oligomeriza formando um complexo funcional que cliva o ADN (Liu *et al.*, 1998).

Têm sido também descritos mecanismos de morte celular mediados por calpaínas, envolvidas na morte neuronal por necrose que ocorre, por exemplo, em situações de isquémia e lesões excitotóxicas (Bizat *et al.*, 2003a; Brorson *et al.*, 1995; Hayes *et al.*, 1998; Lankiewicz *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 1991; Minger *et al.*, 1998). Existem duas calpaínas ubíquas, a m-calpaína e a μ -calpaína, que ocorrem como pró-enzimas heterodiméricas. Estas enzimas são activadas por um processo auto-catalítico dependente de cálcio. A actividade das calpaínas aumenta excessivamente quando ocorre uma elevação prolongada da concentração intracelular de cálcio, originando a clivagem de diversas proteínas do citoesqueleto, proteínas localizadas na membrana plasmática e factores de transcrição (Wang, 2000). As caspases-3 e 9 também poderão ser clivadas por calpaínas, inactivando-as (Bizat *et al.*, 2003b; Lankiewicz *et al.*, 2000). Desta forma, a inactivação de caspases por calpaínas poderá direccionar um processo de morte celular por apoptose para necrose (Pang *et al.*, 2003).

3.2 Vias de morte celular na excitotoxicidade mediada pelos receptores NMDA

O processo de excitotoxicidade, isto é, a morte celular resultante da activação em excesso dos receptores do glutamato, tem sido associado com diversas patologias do sistema nervoso, como a isquémia, anóxia, inflamações associadas a infecções virais, doença de Huntington e DA (Le & Lipton, 2001; Lipton, 1994; Lynch & Guttman, 2002; Meldrum, 1992; Parsons *et al.*, 1999). Estas patologias neurodegenerativas são causadas por mecanismos diferentes, no entanto, poderão partilhar uma via final de morte neuronal devido à sobrestimulação dos receptores de glutamato, particularmente os receptores NMDA (Lipton, 2004).

Em condições normais de transmissão sináptica, o canal dos receptores NMDA está bloqueado pelo Mg^{2+} e só é activado por breves períodos de tempo. Contudo, em situações patológicas, a sobreactivação do receptor causa um influxo excessivo de cálcio para o interior dos neurónios, que inicia uma variedade de processos que levarão à apoptose e/ou necrose. Este processo de morte celular inclui a captação excessiva de cálcio pela mitocôndria, resultando na formação de ROS, activação de caspases e/ou calpaínas, e activação da isoforma neuronal da NOS (nNOS, do inglês, do inglês, *neuronal nitric oxide synthase*), levando ao aumento da produção de NO e de $ONOO^-$ (Lipton, 2004, para revisão).

A estimulação excessiva dos receptores NMDA resulta num grande influxo de cálcio (≥ 500 nM) activando várias enzimas. O cálcio em excesso é armazenado no núcleo, no RE e na mitocôndria. O aumento da captação de cálcio pela mitocôndria pode resultar na despolarização da membrana mitocondrial interna e potenciar a “fuga” de electrões da cadeia respiratória mitocondrial, com o conseqüente aumento da produção de ROS (Sastry & Rao, 2000, para revisão). A ligação do cálcio à membrana mitocondrial interna pode ainda induzir alterações conformacionais em proteínas que fazem parte do PTP levando à sua abertura (Castilho *et al.*, 1995). A permeabilização da membrana mitocondrial conduz à libertação de citocromo *c* e à conseqüente interrupção do fluxo de electrões através da cadeia respiratória mitocondrial, potenciando a produção de ROS (Cai *et al.*, 2000; Cai & Jones, 1998; Lee & Wei, 2000). Por outro lado, o aumento da concentração mitocondrial

de cálcio leva à activação da fosfolipase A₂ (PLA₂) mitocondrial (Nakamura *et al.*, 1991), a qual pode ser responsável pela desorganização da membrana mitocondrial interna, e pela consequente disfunção dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória. Nestas condições, a transferência de electrões para o O₂ é favorecida, o que leva a um aumento da produção de O₂⁻ (Castilho *et al.*, 1995).

As ROS podem impedir a manutenção da homeostasia intracelular do cálcio através da inibição das bombas de cálcio (Ca²⁺-ATPases) da membrana plasmática e do RE ou reversão dos trocadores de Na⁺/Ca²⁺, que são muito sensíveis à peroxidação lipídica e à alteração do ambiente lipídico (Ermak & Davies, 2002; Pereira *et al.*, 1996). A incapacidade dos neurónios manterem a homeostasia iónica conduz à sua despolarização, e à consequente libertação do magnésio que normalmente bloqueia o canal associado aos receptores NMDA. Por outro lado, ocorre uma diminuição rápida dos níveis de ATP devido à actividade de Ca²⁺-ATPases que tentam extrair o cálcio em excesso (Budd, 1998). Assim, a activação excessiva dos receptores NMDA e a consequente entrada de cálcio leva à produção de radicais livres, disfunção mitocondrial e diminuição dos níveis energéticos celulares, num ciclo vicioso que termina na morte celular.

A complexidade do processo excitotóxico está também patente nas vias pelas quais ocorre morte celular, através da necrose, apoptose, ou formas intermédias (Nicotera & Melino, 2004, para revisão). A exposição a glutamato por períodos de tempo curtos, causou morte celular caracterizada pela presença de núcleos com morfologia apoptótica (Bonfoco *et al.*, 1995). Coerentemente, a activação prolongada dos receptores NMDA induz a despolarização mitocondrial e libertação de citocromo *c*, seguida da activação da caspase-3 (Budd *et al.*, 2000; Luetjens *et al.*, 2000). No entanto, outros autores referem que após a activação dos receptores NMDA ocorre despolarização da mitocôndria e libertação do citocromo *c*, sem que ocorra activação da caspase-3. Nestas condições foi detectada a activação de calpaínas, associadas à morte neuronal por necrose que ocorre após insultos neurológicos agudos (Artal-Sanz & Tavernarakis, 2005; Lankiewicz *et al.*, 2000). Além disso, a neurotoxicidade que ocorre após exposição de neurónios a concentrações elevadas de glutamato leva ao aumento do volume celular e lise membranar com libertação da enzima lactato desidrogenase (LDH), características de um processo de morte por necrose (Bonfoco *et al.*, 1995). Assim, é possível que em função da intensidade do estímulo excitotóxico inicial, a célula possa morrer por um processo apoptótico ou necrótico.

3.2.1 Excitotoxicidade em modelos não neuronais

Um passo importante para a confirmação e compreensão do papel dos receptores NMDA na excitotoxicidade foi dado com a clonagem e expressão destes receptores em linhas celulares. Ao passo que a expressão e a activação de receptores ionotrópicos de glutamato do tipo AMPA não causa citotoxicidade, a expressão de receptores NMDA é tóxica em várias linhas celulares, nomeadamente em células HEK293, HEK293t, CHO e COS-7. Esta toxicidade ocorre independentemente do método de transfecção e poderá ser observada recorrendo a métodos de contagem de células, ensaios enzimáticos de morte celular ou ensaios citotóxicos fluorescentes (Anegawa *et al.*, 1995; Anegawa *et al.*, 2000; Boeckman & Aizenman, 1996; Chazot *et al.*, 1994; Cik *et al.*, 1994; Raymond *et al.*, 1996). Presumivelmente, a morte celular depende da activação de receptores NMDA por glutamato e por glicina, presentes no meio de cultura, que contém níveis suficientes destes aminoácidos para a activação dos receptores (Anegawa *et al.*, 1995). O processo de morte celular é bloqueado por antagonistas para o local da glicina, do glutamato e para o canal dos receptores NMDA (Lynch & Guttman, 2002, para revisão).

Tal como ocorre em neurónios, a morte celular em células transfectadas correlaciona-se com o aumento da concentração intracelular de cálcio após estimulação dos receptores NMDA. Para que ocorra toxicidade em células não-neuronais (que não expressam receptores NMDA nativos) são necessários receptores NMDA de constituição apropriada. Receptores NMDA não funcionais como os receptores homoméricos constituídos pelas subunidades NR1 ou NR2 (A-D) não induzem toxicidade, ao passo que os subtipos compostos por NR1/NR2A e NR1/NR2B causam morte celular correlacionada com o aumento da concentração intracelular de cálcio (Anegawa *et al.*, 1995; Boeckman & Aizenman, 1996; Grant *et al.*, 1997; Grant *et al.*, 1998). Para além disso, a expressão da calbindina-D28k, uma proteína que se liga ao cálcio livre, em conjunto com o subtipo NR1/NR2A diminui a amplitude das respostas intracelulares de cálcio após estimulação do receptor e, conseqüentemente, a morte celular causada pela expressão deste subtipo de receptores NMDA (Rintoul *et al.*, 2001). Adicionalmente, a expressão de receptores funcionais compostos por mutantes da subunidade NR1 menos permeáveis a cálcio, resultam numa diminuição da morte celular (Anegawa *et al.*, 1995; Boeckman &

Aizenman, 1996; Cik *et al.*, 1994; Raymond *et al.*, 1996). Assim, quanto maior for a permeabilidade ao cálcio de determinado subtipo de receptores, maior a toxicidade resultante da sua activação.

A remoção dos 400 aminoácidos finais da subunidade NR2A diminui a morte celular de células transfectadas, sem alterar a concentração intracelular de cálcio em resposta a agonistas (Anegawa *et al.*, 2000). Por outro lado, a alteração das variantes de *splicing* do domínio do terminal-C das subunidades NR1 modula a morte celular, provavelmente devido à alteração do mecanismo de inactivação do receptor dependente de cálcio/calmodulina (Lu *et al.*, 2000; Rameau *et al.*, 2000). Estas observações permitem estabelecer uma relação entre os processos de excitotoxicidade e os acontecimentos intracelulares que ocorrem selectivamente através do terminal-C (Tymianski *et al.*, 1993).

A toxicidade resultante da expressão do subtipo NR1/NR2C é inferior à dos subtipos NR1/NR2A e NR1/NR2B, o que está de acordo com a menor permeabilidade ao cálcio da subunidade NR2C (Anegawa *et al.*, 1995; Boeckman & Aizenman, 1996; Grant *et al.*, 1997; Grant *et al.*, 1998). Uma possível explicação poderá dever-se ao facto das respostas intracelulares de cálcio mediadas pelos receptores NR1/NR2C serem fundamentalmente resultado da libertação de cálcio dos depósitos intracelulares, uma fonte de cálcio usualmente não associada com a excitotoxicidade (Grant *et al.*, 1997; Grant *et al.*, 1998). Estes dados estão em concordância com resultados obtidos em células neuronais, pois os neurónios do cerebelo e do cérebro anterior, que possuem elevados níveis de NR2C e NR2D, são poupados na isquémia focal e noutros modelos de excitotoxicidade (Standaert *et al.*, 1996). Deste modo, a expressão de determinadas subunidades poderá ser um marcador de células com maior susceptibilidade aos danos decorrentes de processos excitotóxicos.

Como referido anteriormente, a formação de NO nomeadamente pela nNOS, e de radicais livres são importantes na morte celular por excitotoxicidade. As linhas celulares usadas para a expressão heteróloga dos receptores NMDA não expressam a enzima nNOS. Apesar desse facto, o aumento da concentração intracelular de cálcio após a activação de receptores NMDA poderá mesmo assim induzir toxicidade através da formação de radicais livres, de forma semelhante ao que ocorre na toxicidade neuronal (Anegawa *et al.*, 2000).

Desta forma, os modelos de transfecção celular recapitulam algumas propriedades da excitotoxicidade observadas *in vivo*.

Estudos recentes mostraram que a expressão da huntingtina mutante em conjunto com os receptores NMDA em células HEK293 reproduziam algumas características da doença de Huntington, frequentemente vista como uma versão lenta do processo excitotóxico. A transfecção da huntingtina mutante com o subtipo NR1/NR2B potenciou a morte celular, bem como as correntes mediadas pela estimulação deste subtipo de receptores NMDA (Chen *et al.*, 1999; Zeron *et al.*, 2001). É interessante notar que a subunidade NR2B dos receptores NMDA é a subunidade NR2 predominante no estriado, a área cerebral selectivamente afectada na doença de Huntington (Landwehrmeyer *et al.*, 1995). Assim, os modelos de transfecção dos receptores NMDA também permitem elucidar alguns mecanismos associados a patologias neurodegenerativas.

3.3 Vias de morte neuronal na doença de Alzheimer

Tanto a apoptose com a necrose poderão ocorrer na DA. Em cérebros de pacientes de Alzheimer verificou-se um aumento de neurónios apoptóticos comparativamente a controlos (Cotman & Anderson, 1995; Li *et al.*, 1997b; Yang *et al.*, 1998). A caspase-2 parece ser uma caspase essencial no processo de morte neuronal induzida por A β , pois os neurónios de um ratinho *knockout* para a caspase-2 são completamente resistentes à toxicidade induzida por este peptídeo (Troy *et al.*, 2000). Foi também descrito que o peptídeo A β pode induzir apoptose em neurónios em cultura (Loo *et al.*, 1993; Watt *et al.*, 1994) ou em linhas celulares (Gschwind & Huber, 1995). A cascata excitotóxica que envolve stress oxidativo e a alteração da homeostasia iónica induzida pelo A β parece mediar o processo apoptótico pois os antioxidantes possuem um efeito neuroprotector (Kruman *et al.*, 1997). É de notar que o peptídeo A β , tal como outros estímulos tóxicos, pode induzir apoptose ou necrose de forma dependente da concentração (Behl *et al.*, 1994a; Kruman *et al.*, 1997). Existem também evidências da ocorrência de morte necrótica em cérebros de pacientes de Alzheimer (Lucassen *et al.*, 1997; Velez-Pardo *et al.*, 2001) e que o peptídeo A β induz necrose em linhas celulares neuronais (Behl *et al.*, 1994a; Suzuki, 1997).

Tendo em conta estes dados, é concebível que a morte neuronal que ocorre na DA envolva vias de morte apoptótica e necrótica (Kusiak *et al.*, 1996). Inicialmente, o peptídeo A β agregado pode causar morte por necrose num grupo de neurónios mais susceptíveis. A lise celular que ocorre durante a necrose liberta os conteúdos intracelulares destas células, conduzindo à elevação da concentração de glutamato extracelular e à indução de apoptose nos neurónios circundantes. Para além disso, a discriminação entre apoptose e necrose nem sempre é possível, pois ambos os mecanismos podem ocorrer simultaneamente (Bonfoco *et al.*, 1995).

4. Envolvimento dos receptores NMDA na doença de Alzheimer

Há quase duas décadas atrás, Greenamyre sugeriu que o glutamato poderia estar envolvido no mecanismo patogénico de doenças neurodegenerativas, tais como a DA (Greenamyre, 1986). Embora o glutamato possa ser neurotóxico através da activação dos receptores NMDA, AMPA, KA ou mGluR1, a morte neuronal que ocorre na DA parece depender principalmente da activação dos receptores do tipo NMDA (Greenamyre & Young, 1989).

As primeiras observações de que os receptores NMDA poderiam estar envolvidos na patogenia da DA provieram de estudos *post-mortem*, em que se verificou a co-localização entre neurónios glutamatérgicos e tranças neurofibrilares ou placas senis nos cérebros de pacientes de Alzheimer (Braak *et al.*, 1993; Francis *et al.*, 1993; Pearson *et al.*, 1985; Rogers & Morrison, 1985). Foi também observado em cérebros de pacientes de Alzheimer uma diminuição acentuada da transmissão glutamatérgica no neocortex e hipocampo (Greenamyre, 1986; Palmer & Gershon, 1990) e uma diminuição do número dos receptores NMDA (Greenamyre, 1986). Mais recentemente, verificou-se que no giro dentado e na região CA3 do hipocampo de pacientes com DA grave existem placas com marcação para subunidade NR1 e um aumento da imunoreactividade da subunidade NR1a (Ikonomic *et al.*, 1999), ao contrário das subunidades NR2A e NR2B cuja expressão está diminuída na DA. A diminuição da expressão destas subunidades ocorre no hipocampo, giro cingulado

anterior e córtex temporal superior, regiões cerebrais consideradas susceptíveis na DA. Como a expressão das subunidades NR2C e NR2D se encontra inalterada, é possível que a composição em subunidades NR2 possa modular a excitotoxicidade mediada pelos receptores NMDA e que a disfunção destes receptores possa originar o padrão regional de morte celular que é característico da DA (Hynd *et al.*, 2004).

São já várias as evidências de que o peptídeo A β potencia a toxicidade do glutamato (Mattson, 1997, para revisão). Por exemplo, a incubação de células de hipocampo com concentrações não-tóxicas de A β potencia a toxicidade decorrente da exposição ao glutamato (Mattson *et al.*, 1992). Adicionalmente, culturas de neurónios de hipocampo de ratinhos *knock-in* para a PS1 demonstraram uma maior vulnerabilidade à excitotoxicidade induzida por glutamato (Grilli *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 1999). Ratinhos transgénicos para a APP mutante também demonstraram ser mais sensíveis a agonistas glutamatérgicos como o cainato e o NMDA (Moechars *et al.*, 1996; Moechars *et al.*, 1999). Também a injeção de A β em ratos provocou a morte de neurónios colinérgicos e uma diminuição das capacidades cognitivas. Estes efeitos neutóxicos do A β foram prevenidos na presença de um antagonista dos receptores NMDA (Harkany *et al.*, 1999), sugerindo que a activação desta classe de receptores ionotrópicos de glutamato é importante na morte neuronal induzida pelo A β .

Os neurónios glutamatérgicos podem ser simultaneamente “executores” e “vítimas” do processo excitotóxico (Francis *et al.*, 1993). Os neurónios que morrem pela acção directa ou indirecta do peptídeo A β libertam o glutamato intracelular. Como não existem na fenda sináptica enzimas para degradar o glutamato, este neurotransmissor tem que ser removido por transportadores gliais de alta afinidade (Attwell *et al.*, 1993). O A β interfere com os processos de captação do glutamato, de que resulta a acumulação extracelular de glutamato, a activação dos receptores NMDA e o aumento da concentração intracelular de cálcio, levando à morte celular (Harkany *et al.*, 2000). Em culturas de glia verificou-se que o peptídeo A β inibe a recaptação de glutamato, provavelmente devido ao aumento da produção de radicais livres (Harris *et al.*, 1995; Harris *et al.*, 1996). Para além disso, o A β induz a produção de concentrações elevadas de glutamato e de ROS por macrófagos e o aumento da libertação de glutamato pela microglia (Klegeris & McGeer, 1997; Noda *et al.*, 1999). Por outro lado, o peptídeo A β poderá potenciar a libertação de glutamato induzida por despolarização em fatias de hipocampo, de forma dependente da idade (Arias *et al.*,

1995). Ao promover a despolarização membranar e a libertação de glutamato, e ao inibir a captação deste aminoácido excitatório, o peptídeo A β poderá assim promover a cascata excitotóxica.

Estudos *in vivo* revelaram que o transporte de glutamato se encontra alterado nos cérebros de pacientes de Alzheimer, consistente com o efeito do A β na diminuição da recaptação de glutamato da fenda sináptica (Mattson, 1997). No córtex de pacientes de Alzheimer foi observada uma diminuição da actividade do transportador de glutamato do tipo GLT-1 (Masliah *et al.*, 1996) e da densidade do transportador astroglial EAA2 (Li *et al.*, 1997a). Existem também evidências da correlação entre o decréscimo de transportadores de glutamato e a patologia neuronal em doentes de Alzheimer (Masliah *et al.*, 1998). Assim, as protofibrilhas de A β poderão estimular a libertação excessiva de glutamato das células da glia por inversão do transportador do glutamato, o que poderá causar danos excitotóxicos aos neurónios circundantes. A sobreactivação do subtipo de receptores de glutamato NMDA tem como consequência o aumento da concentração intracelular de cálcio, que promove a activação da NOS e, consequentemente, a formação de NO. Tal como referido anteriormente, quando em excesso, o NO reage com o anião O $_2^{\cdot-}$ formando o ONOO $^-$, uma espécie muito reactiva e neurotóxica que conduz ao stress oxidativo e lesão à mitocondrial (Bonfoco *et al.*, 1995; Dawson *et al.*, 1991; Lipton *et al.*, 1993; Mody & MacDonald, 1995).

O peptídeo A β pode ainda potenciar a excitotoxicidade mediada pelos receptores NMDA através da interacção directa com estes, funcionando como um agonista ou co-agonista. Estudos usando radioligandos demonstraram que o fragmento A β_{25-35} do peptídeo A β inibe a ligação do glutamato e da glicina aos receptores NMDA, sugerindo que o peptídeo A β_{25-35} possui afinidade para os locais de ligação do glutamato e da glicina nos receptores NMDA (Calligaro *et al.*, 1993; Cowburn *et al.*, 1994; Cowburn *et al.*, 1997). Consistentemente, a adição de A β em linhas celulares que expressam receptores NMDA nativos induziu o aumento transitório da concentração intracelular de cálcio, que foi bloqueado por MK-801, um inibidor dos receptores NMDA (Le *et al.*, 1995). A aplicação de A β em fatias de hipocampo também resultou num aumento das correntes sinápticas mediadas por NMDA, enquanto as correntes basais de AMPA e o potencial de membrana em repouso se mantiveram inalteradas, sugerindo que o A β interage especificamente com os receptores NMDA presentes na membrana pós-sináptica (Wu *et al.*, 1995).

Os receptores NMDA também poderão ter um papel nas fases iniciais da DA, não pela sua activação excessiva mas pela diminuição da sua actividade. Esta diminuição poderá ter efeitos na LTP e poderá explicar a diminuição subtil de memória nas fases iniciais da doença, antes da ocorrência de morte neuronal generalizada. Alguns estudos recentes têm sugerido que a activação dos receptores NMDA leva ao processamento amiloidogénico da APP e à produção de A β (Gordon-Krajcer *et al.*, 2002). A actividade neuronal modula a formação e secreção de A β em fatias de hipocampo que sobreexpressam a APP e o peptídeo A β secretado diminui selectivamente a transmissão sináptica excitatória neuronal dependente da actividade dos receptores NMDA (Kamenetz *et al.*, 2003). Também a injeção intracerebroventricular de A β resulta numa diminuição prolongada dos potenciais excitatórios pós-sinápticos dependentes dos receptores NMDA no hipocampo (Cullen *et al.*, 1996). Foi, no entanto, sugerida a possibilidade desta diminuição da LTP resultar, não de um efeito directo nos receptores NMDA, mas da interferência do A β em vias de sinalização mediadas pela activação dos receptores (Raymond *et al.*, 2003).

A actividade dos receptores de glutamato também pode ser modulada pela APP endógena, para além dos seus produtos de clivagem, pois a sobreexpressão da APP aumenta as respostas do glutamato (Tominaga *et al.*, 1997). Para além disso, a sobreexpressão da APP tem efeitos opostos em relação às respostas mediadas pelo glutamato, nomeadamente através da redução da concentração de glutamato necessária à sobrevivência neuronal e de um aumento da vulnerabilidade à excitotoxicidade mediada pelos receptores NMDA (Tominaga-Yoshino *et al.*, 2001). Depreende-se destes estudos que a modulação dos receptores NMDA pela APP é bidireccional, pois poderá levar à sobrevida dos neurónios ou à excitotoxicidade dependente da activação dos receptores NMDA.

II. OBJETIVOS

A morte celular associada ao processo excitotóxico envolve a activação dos receptores NMDA, tendo sido associada a várias condições neurológicas, nomeadamente à DA (Lipton & Rosenberg, 1994). Este facto sugeriu o desenvolvimento de fármacos que actuassem como antagonistas dos receptores NMDA, tendo sido aprovado a memantina, um antagonista de baixa afinidade, para o tratamento desta doença (Butterfield & Pocernich, 2003; Miguel-Hidalgo *et al.*, 2002).

Na DA o peptídeo $A\beta_{1-40}$ representa 90% do total de $A\beta$ acumulado nos depósitos de amiloide (Funato *et al.*, 1998; Lue *et al.*, 1999; Masters *et al.*, 1985; Roher *et al.*, 1993; Vigo-Pelfrey *et al.*, 1993). Verificou-se anteriormente que o peptídeo $A\beta_{1-40}$ potencia a activação de receptores NMDA induzida por glicina de forma dependente da concentração, sugerindo que este peptídeo poderá estimular directamente os receptores NMDA (Calligaro *et al.*, 1993; Cowburn *et al.*, 1994; Cowburn *et al.*, 1997). Existem também evidências de que a expressão das subunidades NR2A e NR2B dos receptores NMDA se encontra diminuída no hipocampo e no córtex de pacientes de Alzheimer, duas regiões cerebrais particularmente afectadas na DA (Hynd *et al.*, 2004).

De facto, recentemente tem sido dada grande importância ao papel das subunidades NR2A e NR2B na patogenia de algumas condições neurológicas, nomeadamente na doença de Huntington e na isquémia cerebral. Zeron e colaboradores (Zeron *et al.*, 2001; Zeron *et al.*, 2002) verificaram que a subunidade NR2B é importante na excitotoxicidade associada à doença de Huntington, uma doença hereditária neurodegenerativa que afecta selectivamente os neurónios do estriado, os quais possuem níveis elevados de expressão da subunidade NR2B. Por outro lado, demonstrou-se que ratinhos *knockout* para a subunidade NR2A são mais resistentes à isquémia cerebral (Morikawa *et al.*, 1998). Porém, não são conhecidos até ao momento estudos que permitam elucidar o envolvimento dos subtipos dos receptores NMDA compostos pelas subunidades NR2A e NR2B na neurodegenerescência que ocorre na DA e, nomeadamente, a relação com a toxicidade do peptídeo $A\beta_{1-40}$.

Com base nas evidências descritas, este trabalho teve como objectivo investigar as diferenças na toxicidade do peptídeo $A\beta_{1-40}$ quando mediada por diferentes subtipos de receptores NMDA compostos pelas subunidades NR1/NR2A ou NR1/NR2B. Pretendeu-se também caracterizar o tipo de morte celular associado à activação destes receptores, bem

como relacionar a diferença de toxicidade induzida pelo $A\beta_{1-40}$, na presença de diferentes subtipos de receptores NMDA com as alterações dos níveis intracelulares de cálcio após a estimulação selectiva dos receptores. Desta forma, pretendeu-se definir a importância das subunidades NR2A e NR2B dos receptores NMDA na DA, abrindo novas perspectivas para a identificação de novos alvos terapêuticos para o tratamento desta doença.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Material

O meio DMEM (do inglês, *Dulbecco's modified Eagle's medium*), os antibióticos penicilina/estreptomicina, β -nicotinamida adenina dinucleótido (β -NADH), quimostatina, leupeptina, antipaína, pepstatina A, *N*-acetil-Ile-Glu-Pro-Asp-*p*-nitroanilida (Ac-IEPD-pNA) e brometo de metil-tiazolil-difenil-tetrazólio (MTT) foram adquiridos à empresa Sigma Chemical Co (St Louis, MO, EUA). *N*-Acetil-Asp-Glu-Val-Asp-*p*-nitroanilida (Ac-DEVD-pNA) foi adquirido à Calbiochem (Darmstadt, Alemanha). O reagente *Bio-Rad protein assay* foi adquirido à Bio-Rad (Hercules, CA, USA), o reagente de transfeção Superfect foi adquirido à Qiagen (Hilden, Alemanha) e o soro fetal de bovino foi adquirido à Biochrom AG (Berlim, Alemanha). Os anticorpos anti-NR2A, anti- α -espectrina e anti-GAPDH (do inglês, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) foram adquiridos à Chemicon (Temecula, CA, EUA); o anticorpo anti-NR2B foi obtido da BD Biosciences (San Jose, CA, USA); o reagente ECF (do inglês, *enhanced chemifluorescence*), membranas de PVDF e os anticorpos anti-IgG de coelho e anti-IgG de ratinho ligados à fosfatase alcalina foram obtidos da Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, EUA), os anticorpos anti-IgG de ratinho Alexa 594, anti-IgG de coelho Alexa 594, *Hoechst* 33342 e Fura-2 AM foram obtidos da Molecular Probes (Eugene, OR, EUA). *N*-acetil-Val-Asp-Val-Ala-Asp-*p*-nitroanilida (Ac-VDVAD-pNA) e *N*-acetil-Leu-Glu-His-Asp-*p*-nitroanilida (Ac-LEHD-pNA) foram adquiridos à BioSource International, Inc. (Nivelles, Bélgica). O meio de montagem Dako Glycergel foi proveniente da Dako Corporation (Carpinteria, CA, EUA). As enzimas Hind III e BamH I são provenientes da New England Biolabs (Beverly, MA, EUA) e o *kit* Wizard™ Plus Megapreps foi adquirido à Promega (Madison, WI, USA). As células HEK293 (do inglês, *human embryonic kidney* 293; ATCC CRL-1573) foram obtidas da ATCC (Manassas, VA, EUA). Os restantes reagentes são de uso comum no laboratório. O peptídeo sintético A β ₁₋₄₀ foi obtido da Bachem (Bubendorf, Suíça), reconstituído em água desionizada e diluído a 230 μ M em PBS, antes de ser incubado a 37°C durante 7 dias.

Os vectores plasmídicos, para expressão em células de mamífero, contendo o cADN das subunidades NR1a fundida com a EGFP (do inglês, *enhanced green fluorescent protein*; NR1-GFP), NR2A e NR2B dos receptores NMDA receptores (*Rattus norvegicus* sp.)

foram uma generosa oferta do Dr. John Woodward (Medical University of South Carolina, Charleston, USA). A subunidade NR1 foi inserida no vector plasmídico de expressão em mamífero pGFP-N3 (Clontech), modificado por mutagénese dirigida para intensificar o sinal fluorescente da GFP. A subunidade NR2A foi inserida em pcDNA1 (Invitrogen) e NR2B em pDP3 (construído por Dolan Pritchett e não disponível comercialmente). Todos estes vectores possuem o promotor viral do citomegalovirus (CMV).

2. Amplificação de plasmídeos

2.1 Transformação em *E. coli*

Para obter os vectores que codificam para as subunidades dos receptores NMDA em quantidade e qualidade para transfecção, procedeu-se à sua amplificação e purificação usando protocolos rotineiros de biologia molecular (Sambrook *et al.*, 1989). Células competentes de *E. coli* XL-1 blue foram transformadas com 1 µl de ADN (0,1-50 ng de ADN) usando método do choque térmico. As células foram gentilmente misturadas com o ADN, incubadas durante 20 minutos em gelo e sujeitas a um choque térmico durante 90 segundos a 42°C. Os tubos foram novamente incubados em gelo durante 2 minutos, e foi-lhes adicionado meio SOC (Bacto-triptona 20 g/l, Bacto-extracto de levedura 5 g/l, NaCl 10 mM, KCl 2,5mM, MgCl₂ 10mM, MgSO₄ 20mM, glicose 20mM, pH 7). Os tubos foram incubados durante 30 minutos (37°C) com agitação a 220 rpm. As células foram então semeadas em placas de LB/agar (Bacto-triptona 10 g/l, Bacto-extracto de levedura 5 g/l, NaCl 0,2 M, pH 7, agar 15 g/l) suplementado com o antibiótico apropriado, canamicina (30 µg/ml) para as células transformadas com pEGP-N3 e ampicilina (100 µg/ml) nas restantes placas, e incubadas 16 horas a 37°C para selecção das células transformadas.

2.2 Minipreps

Algumas (5-20) colónias individuais presentes nas placas de LB/agar foram amplicados em meio líquido LB, suplementado com os antibióticos canamicina (30 µg/ml) ou ampicilina (100 µg/ml). As colónias foram incubadas durante 16 horas (37°C) com agitação a 220 rpm e posteriormente centrifugadas a 20800 g, 4°C. O sobrenadante foi

retirado por aspiração e ressuspendeu-se o pellet com solução I (glucose 50 mM, Tris-HCl 25 mM [pH 8,0], EDTA 10mM, pH 8,0). Em seguida foi adicionado solução II (NaOH 0,2 N, SDS 1%) preparada imediatamente antes do procedimento. Ao sobrenadante foi adicionada solução III (acetato de potássio 3 M, ácido acético glacial 11,5%) e foi de seguida homogeneizado recorrendo a um vortex. Após homogeneização, a solução foi incubada em gelo durante 25 minutos e centrifugado a 20800 g durante 10 minutos, 4°C. Em seguida, foram adicionados 2 volumes de etanol 100% para precipitar o ADN plasmídico. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, centrifugou-se durante 5 minutos a 20800 g, 4°C. O sobrenadante foi retirado e deixou-se secar o *pellet* (ADN) que foi dissolvido em água contendo ARNase (20 µg/ml). O ADN foi então guardado a –20°C para posterior análise por restrição enzimática para confirmar a identidade dos plasmídeo extraídos das colónias bacterianas.

2.3 Digestão do ADN com enzimas de restrição e electroforese

Para confirmar identidade dos ADN plasmídico extraídos das colónias, este cortado com enzimas de restrição e os fragmentos resultantes foram comparados com uma previsão baseada na análise da sequência de nucleótidos dos plasmídeos. Para realizar as reações enzimáticas foram seguidas as condições indicadas pelos fabricantes das enzimas. Para identificação do plasmídeo pEGFP-NR1 e pcDNA1-NR2A foi usada a enzima Hind III, a enzima BamH I foi usada para identificação do vector pDP3-NR2B. A seguinte reacção de enzimática foi preparada: ADN 100 µg/ml, 1x tampão de restrição (específico para cada enzima), enzima de restrição (1U/µg da ADN) e água desionizada até perfazer um volume total de 10 µl. Esta mistura foi incubada à temperatura e por um período de tempo indicados pelo fabricante da enzima.

Após o tempo de incubação foi adicionado tampão de carregamento 6X (bromofenol azul 0,25%, glicerol 30%) às amostras. Os fragmentos resultantes da reacção foram separados por electroforese num gel de agarose 1% preparado em TAE 1X (TAE 50X: Tris 2 M, ácido acético glacial 0,0057%, EDTA 0,05 M, pH 8,0) e brometo de etídio 0,5 µg/ml. Foi também separado ADN marcador (1 Kb ladder) com fragmento de tamanho conhecido para posterior comparação com os fragmentos resultantes das reacções enzimáticas. As

amostras foram separadas durante 30 minutos a uma voltagem constante de 100 V. O gel foi observado com o auxílio de um digitalizador Molecular Imager (Biorad).

2.4 Megaprep

Após a seleção das colónias que continham os plasmídeos desejados, procedeu-se à extração de ADN para a transfecção. Para este efeito foi usado o kit Wizard™ Plus Megapreps. As instruções do fabricante foram seguidas na sua generalidade. As colónias bacterianas seleccionadas foram cultivadas durante 16 horas a 37°C com agitação a 250 rpm em meio LB suplementado com os antibióticos de selecção. A cultura bacteriana foi então centrifugada a 1500 g durante 20 minutos à temperatura ambiente e o pellet foi ressuspensionado com uma solução de ressuspensão (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNAase A). Em seguida foi adicionada solução de lise (0,2 M de NaOH, 1% SDS) e os tubos foram gentilmente invertidos até a solução se tornar clara e viscosa adicionando-se em seguida a solução de neutralização (acetato de potássio 1,32 M). Após centrifugação a 14000 g durante 30 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi filtrado com gaze esterilizada e adicionaram-se 0,5 volumes de isopropanol. Esta solução foi centrifugada a 14000 g durante 15 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante eliminado e o pellet resultante (ADN) foi ressuspensionado em TE (Tris-HCl 10 mM [pH 7,5], EDTA 1 mM [pH 8,0], pH 7,5). Em seguida, adicionou-se Wizard™ ADN purification Resin ao ADN e esta mistura foi transferida para uma coluna Wizard™ Megacolumn previamente inserida numa bomba de vácuo. Logo que a solução a solução atravessou a coluna, ficando apenas a resina, esta foi lavada com solução de lavagem (acetato de potássio 80 mM, Tris-HCl 8,3 mM, EDTA 40 µM, etanol 55%) e posteriormente com etanol 80%. Colocou-se a coluna num tubo de 50 ml e centrifugou-se a 1125 g durante 5 minutos. Em seguida, a coluna foi transferida para um novo tubo, foi-lhe adicionada água a 70°C e centrifugou-se a 1125 g durante 5 minutos numa centrifuga de rotor não angular, para eluir o ADN. O ADN foi então guardado a -20°C. Com este método pode-se obter até 1 mg de ADN plasmídico com qualidade óptima para transfecção, partindo de 1 litro de cultura bacteriana.

3. Cultura de células

A linha celular HEK293 epitelial, aderente, derivada de tecido humano, foi cultivada a 37°C em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal de bovino inativado, 100 µg/ml de estreptomicina e 100 unidades/ml de penicilina (Sigma), numa atmosfera humidificada contendo 5% CO₂ e 95% Ar, a 37°C. As células foram propagadas, após dissociação com uma solução de dissociação (em mM: 137 NaCl, 2,7 KCl, 4,3 NaH₂PO₄, 1,47 KH₂PO₄, 0,4 EDTA, pH 7,4). A suspensão celular foi diluída 1/10 em meio DMEM suplementado a cada 2-3 dias. Para a realização de ensaios experimentais as células foram divididas na fase exponencial de crescimento (70-80% de confluência) e semeadas em placas revestidas com poli-L-lisina.

4. Transfecção

Designa-se “transfecção” ao processo de introdução de ADN ou ARN em células eucarióticas por processos não virais. De forma geral consideram-se dois processos de transfecção, estável e transitória. Na transfecção estável só podem ser usadas moléculas de ADN. Estas moléculas podem ser integradas no ADN cromossomal ou manter-se como um epissoma. Neste tipo de transfecção o gene é expresso em níveis relativamente baixos, mas durante mais tempo, comparativamente à transfecção transitória. Na transfecção transitória são várias as cópias de ADN ou ARN presentes nas células, mas estas não são integradas nos cromossomas.

Neste trabalho procedeu-se a uma transfecção transitória dos plasmídeos contendo NR1-GFP, NR2A e NR2B em células HEK293. A transfecção foi realizada usando o reagente Superfect, de acordo com o protocolo sugerido pela companhia. Este reagente incorpora o ADN em estruturas compactas, carregadas positivamente, para melhor ligação à superfície das células eucarióticas (Tang *et al.*, 1996). Misturaram-se 1,7 µg de ADN e 4,5 µl de Superfect na razão 1:2,6 (ADN:Superfect) em DMEM sem soro e sem antibióticos. Esta mistura foi incubada durante 5-10 minutos à temperatura ambiente e após

este período foi adicionado meio de cultura DMEM suplementado. Esta mistura foi adicionada às células, cultivadas em placas de 12 poços, às quais se retirou previamente o meio de cultura, e estas foram incubadas durante 4 horas a 37°C. A razão de ADN plasmídico NR1-GFP/NR2 utilizado para as co-transfecções foi de 1:4. Os valores da razão ADN:Superfect foram reformulados em função da área por poço das *multiwells* utilizadas.

No final do período de incubação, o meio de transfecção contendo a mistura ADN/Superfect foi substituído por meio de cultura DMEM suplementado, e as células HEK293 foram expostas ao peptídeo A β ₁₋₄₀ 1 μ M durante 24 ou 48 horas. Em algumas condições foram também adicionados ao meio de cultura os antagonistas dos receptores NMDA (MK-801 10 μ M ou quinurenato 1 mM) durante o período de incubação com A β ₁₋₄₀.

5. Imunocitoquímica

Para visualizar a expressão dos receptores NMDA recorreu-se à marcação das células transfectadas com anticorpos contra as subunidades NR2A e NR2B. As células (cultivadas em lamelas de vidro de 16 mm revestidas com poli-L-lisina) foram fixadas com metanol/acetona (1:1) durante 10 minutos, no gelo, e permeabilizadas com Triton-X100 0,2% durante 2 minutos. De seguida, as células foram incubadas com uma solução de BSA 5% em PBS (do inglês *phosphate-buffered saline*, em mM: 137 NaCl, 2,7 KCl, 4,3 NaH₂PO₄, 1,47 KH₂PO₄, pH 7,4) durante 2 horas para evitar marcações inespecíficas. As células foram posteriormente incubadas com os anticorpos primários anti-NR2A ou anti-NR2B, previamente diluídos (1:100) em BSA 5%/PBS, durante a noite, a 4°C. Após este período, as células foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com os anticorpos secundários anti-IgG de rato ou de coelho (1:200, em BSA 5%/PBS), ambos conjugados com a sonda fluorescente Alexa Fluor 594, durante 2 horas. As lamelas foram ainda marcadas com um marcador fluorescente de ADN *Hoechst* 33342 (5 μ g/ml em PBS) para visualização dos núcleos (ver secção III.5.4). A visualização das células e a aquisição das imagens foi realizada num microscópio de epifluorescência Zeiss Axiovert 200.

6. Avaliação da viabilidade celular

6.1 Redução de MTT

O MTT é reduzido por desidrogenases formando cristais de formazan. Estes cristais são solúveis em isopropanol/HCl e tem um máximo de absorvência a 570 nm. Uma maior absorvência a 570 nm revela de uma maior capacidade redutora celular, e consequentemente, um maior número de células viáveis em cultura (Mosmann, 1983).

As células foram incubadas com uma solução de MTT (0,5 mg /ml) em meio salino (em mM: 140 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 1 NaH₂PO₄, 5,6 glicose, 20 HEPES, 1,5 CaCl₂, pH 7,4) durante 2 horas, no escuro, a 37°C. Os cristais de formazan formados foram dissolvidos com 0,04 M HCl em isopropanol, e a absorvência foi lida a 570 nm num leitor de ELISA Spectra SLT. Os resultados foram expressos em percentagem de redução do MTT relativamente às células transfectadas com NR1-GFP.

6.2 Libertação de LDH

A integridade da membrana plasmática foi determinada pela análise da libertação de LDH, uma enzima citosólica que catalisa a conversão reversível de piruvato em lactato segundo a reacção 1:



A presença desta proteína no espaço extracelular é um indicador da perda de integridade da membrana plasmática. A actividade da LDH foi determinada segundo o método de Bergmeyer e Bernt (1974), que permite seguir a oxidação do NADH, através da medição do decréscimo de absorvência a 340 nm.

O meio extracelular foi recolhido e as células aderentes foram “lisadas” com uma solução hipotónica de HEPES 10 mM (pH 7,4) com Triton-X100 (0,02%) e sujeitas a dois ciclos de congelação/descongelação a -80°C, após o qual foram recolhidas e centrifugadas durante 10 minutos a 20800 g. Ao sobrenadante, adicionou-se piruvato (concentração final: 1,6 mM), numa *cuvette*. A reacção foi iniciada pela adição de NADH (concentração final:

0,2 mM) e a absorvência foi lida a 340 nm, durante 2 minutos, num espectrofotómetro Perkin Elmer I2, tendo sido registado o declive da recta. As soluções de piruvato e NADH foram preparadas em tampão Tris/NaCl (em mM: 81,3 Tris, 203,3 NaCl, pH 7,2) imediatamente antes da determinação.

A libertação da enzima para o meio extracelular foi expressa em percentagem do total de enzima presente na amostra (intracelular + extracelular).

6.3 Contagem de células com azul de tripano

A análise da perda de viabilidade celular foi também determinada de acordo com a determinação do número de células que se destacavam do substrato de crescimento, poli-L-lisina. Para esse efeito, o meio de cultura das células foi recolhido e centrifugado a 110 g durante 5 minutos para sedimentar as células em suspensão. O sedimento obtido foi ressuspendido em azul de tripano (0,2% em DMEM suplementado) e as células foram contadas num hemocítómetro, sendo determinado o número total de células.

6.4 Morfologia nuclear

De modo a determinar a presença de núcleos apoptóticos que apresentavam ADN fragmentado ou condensado, procedeu-se à análise da morfologia nuclear utilizando o marcador fluorescente de ADN *Hoechst* 33342. Este marcador é permeável à membrana plasmática e liga-se preferencialmente ao par de nucleótidos A-T, tornando-a selectiva para ADN de cadeia dupla.

Após fixação com metanol:acetona (secção III.4), as células foram incubadas com a sonda *Hoechst* 33342 (5 µg/ml em PBS) para marcação do ADN e colocadas em lâminas de microscópio, utilizando o meio de montagem Dako Glycergel (Dako Corporation). As lamelas foram guardadas a -20°C até serem visualizadas e as imagens serem adquiridas num microscópio de epifluorescência Zeiss Axiovert 200.

7. Determinação dos níveis intracelulares de ATP

Os níveis intracelulares do nucleótido de adenina ATP foram determinados após extração das células com ácido perclórico 0,3 M (0-4°C). As células foram centrifugadas a 20800 g durante 10 minutos, e o sedimento foi solubilizado com NaOH 1 M para posterior quantificação da proteína total (secção III.10). O pH do sobrenadante foi ajustado a aproximadamente 7 com uma solução de KOH 5 M e Tris 2,5 M e as amostras foram centrifugadas a 15800 g durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram armazenados a -80°C, e testados para a determinação dos níveis de ATP, através de separação por HPLC de fase reversa, segundo o método de Stocci e colaboradores (1985). O aparelho cromatográfico usado foi um *Beckman System Gold*, constituído por uma bomba *126 Binary Pump Model* e um detector *UV 166 Variable*, controlado por computador. A coluna usada foi uma *Lichrospher 100 RP-18* (5 µM) da Merck. A eluição foi feita com uma fase móvel constituída por KH₂PO₄ 100 mM e metanol 1%, a pH 7,4, com um fluxo de 1,2 ml/minuto. Os nucleótidos de adenina foram detectados a 254 nm, durante 6 minutos.

A identificação dos picos correspondentes aos nucleótidos foi feita por comparação com os picos correspondentes a padrões, tendo em conta o tempo de retenção na coluna. A quantificação foi feita pela determinação do valor da área do pico normalizado em nmol/mg proteína. Os nucleótidos ADP (do inglês, *adenosine diphosphate*) ou AMP (do inglês, *adenosine monophosphate*) não foram detectados em níveis quantificáveis.

8. Avaliação da actividade das caspases

As caspases clivam ligações peptídicas em resíduos de aspartato (Wang, 2000). Os substratos usados para determinação da actividade de caspases consistem em peptídeos com uma sequência de aminoácidos reconhecida por cada uma das caspases, que difere nos aminoácidos que rodeiam o resíduo de aspartato clivado. Este peptídeo encontra-se ligado a uma molécula de *p*-nitroanilida (pNA) que é libertada após a clivagem do peptídeo pela caspase, e que, quando livre, absorve a um comprimento de onda de 405 nm. Uma maior

absorvência a 405 nm corresponde a um maior número de moléculas de substrato clivadas e traduz uma maior actividade da caspase em estudo (Gurtu *et al.*, 1997).

Após incubação, as células foram “lisadas” com um tampão de lise (em mM: 25 HEPES, 2 MgCl₂, 1 EDTA, 1 EGTA, 2 DTT, 0,1 PMSF e 1:1000 de uma mistura inibidores de proteases [quimostatina, leupeptina, antipaína e pepstatina A] 1 mg/ml, pH 7,4). Os extractos resultantes foram sujeitos a três ciclos de congelamento/descongelamento em azoto líquido, centrifugados a 20800 g durante 10 minutos (4°C) e o sobrenadante recolhido. A quantidade de proteína presente no sobrenadante foi determinada pelo método descrito na secção III.10. A actividade das caspases-2, 3, 8, ou 9 foi medida através da reacção com os substratos Ac-VDAVD-pNA, Ac-DEVD-pNA, Ac-IEPD-pNA ou Ac-LEHD-pNA (100 µM), respectivamente, em tampão CHAPS (HEPES 25 mM, sacarose 10% (m/v), 3-[(3-colamidopropil) dimetilamónio] - 1 - propanosulfonato [CHAPS] 0.1% (m/v)), durante 2 horas no escuro, a 37°C. A cada uma das reacções foi adicionada igual quantidade de proteína (25-40 µg). Paralelamente, realizaram-se ensaios sem adição de amostra para cada um dos substratos testados, de modo a servirem como brancos. A absorvência foi lida a 405 nm num leitor de ELISA Spectra SLT, e os resultados foram expressos em relação ao valor do controlo, após subtracção dos valores do branco.

9. Western Blotting

Para a detecção da expressão das subunidades dos receptores NMDA as células foram “lisadas” com um tampão de lise (em mM: 20 Tris pH 7, 100 NaCl, 2 EDTA, 2 EGTA, 0,1 PMSF, 1:1000 de uma mistura de inibidores de proteases [quimostatina, leupeptina, antipaína e pepstatina A] 1 mg/ml e Triton-X100 1%) e sonicadas durante 30 segundos. Após centrifugação a 20800 g, durante 10 minutos (4°C), o sobrenadante foi recolhido e a concentração de proteína foi quantificada (secção III.10). As amostras para determinação da clivagem da α -espectrina foram preparadas usando o protocolo de extracção de proteínas descrito na secção III.7.

As amostras foram desnaturadas com tampão de amostra (concentração final: Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, dodecilsulfato de sódio [SDS] 2%, glicerol 5%, bromofenol azul 0,01%, DTT 100 mM), durante 5 minutos, a 95°C (Block Heater, Stuart Scientific, BIBBY). Quantidades equivalentes de proteína foram separadas por SDS-PAGE num gel de poliacrilamida 6,5% ou 7,5% e transferidas para uma membrana de PVDF, num sistema de transferência líquido (BIO-RAD). Após a incubação com leite magro a 5% em TBS (Tris-HCl 25 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM)/Tween 0,1%, durante 2 horas, à temperatura ambiente, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários anti-NR2A (1:1000), anti-NR2B (1:1000) ou anti- α -espectrina (1:2500), durante a noite, a 4°C. Os anticorpos foram diluídos em TBS/Tween 0,1%/leite magro 1%. Após 3 lavagens de 15 minutos em TBS/Tween 0,1%/leite magro 0,5% as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-ratinho (1:20000) ou anti-coelho (1:20000) ligado à fosfatase alcalina, durante 2 horas, à temperatura ambiente. De seguida, as membranas foram lavadas novamente 3 vezes e a actividade da fosfatase alcalina foi revelada com o substrato ECF. Para a marcação da proteína GAPDH, as membranas foram submetidas a 3 lavagens de 15 minutos em TBS/Tween 0,1%/leite magro 0,5% e incubadas com o anticorpo anti-GAPDH (1:2500) durante a noite, a 4°C. Em seguida procedeu-se à marcação com o anticorpo secundário anti-ratinho (1:20000) e revelação conforme o procedimento descrito anteriormente. As bandas foram visualizadas utilizando o aparelho VERSA DOC 300 (BIO-RAD) e as imagens foram tratadas com o programa *Quantity One* da BIO-RAD.

10. Imagiologia de cálcio intracelular em célula única

O composto Fura-2 acetoximetil ester (Fura-2/AM) é uma sonda de cálcio racionométrica, de alta afinidade ($K_d=145$ nM, *in vitro*) que emite fluorescência quando exposta à luz ultravioleta. Quando esta sonda se encontra ligada a iões cálcio emite fluorescência se for excitada a 340 nm e a 380 nm caso se encontre livre. O fura-2/AM atravessa a membrana plasmática e o grupo AM é clivado por esterases intracelulares, ficando retido no citosol. Desta forma, podem-se medir as alterações dos níveis intracelulares de cálcio após um determinado estímulo (Takahashi *et al.*, 1999).

As células (cultivadas em lamelas de vidro de 16 mm revestidas com poli-L-lisina) foram incubadas com fura-2 AM 5 μM e ácido plurónico 0,025% preparado numa solução de Ringer modificada (em mM: 135 NaCl, 5,4 KCl, 1,8 CaCl_2 , 10 glucose, 5 HEPES, 10 NaHCO_3 , pH 7,2) com BSA 1 mg/ml, durante 45 minutos, a 37°C. Após este período as células foram incubadas em solução de Ringer/BSA, durante 10 minutos, a 37°C, para permitir a hidrólise do grupo AM. Em seguida, as lamelas foram montadas numa plataforma (Model PH-3, Warner Instrument Corporation) e colocadas num microscópio de epifluorescência Zeiss Axiovert 200.

Durante as experiências, as células foram incubadas com solução de Ringer modificada, utilizando um fluxo de 1,5 ml/minuto. Os campos para aquisição de imagens foram escolhidos com base na fluorescência da GFP ligada à subunidade NR1, detectada com um filtro FITC, assumindo que a maioria das células transfectadas com NR1-GFP também expressam as subunidades NR2A ou NR2B. Após a selecção do campo, as células foram estimuladas com NMDA 100 μM e glicina 10 μM , durante 30 segundos, em solução de Ringer modificada. Esta estimulação foi repetida duas vezes, com um intervalo de 5 minutos entre cada estímulo. O sistema de perfusão utilizado foi um valveBank8II (AutoMate Scientific).

Durante a experiência, as células foram expostas alternadamente a 340 e 380 nm, usando um *shutter* Lambda DG-4 e as imagens foram adquiridas com uma câmara de vídeo CoolSnap HQ Photometrics (ROPER Scientific). As imagens foram adquiridas com um intervalo de tempo zero durante 2 minutos após cada estímulo e intervaladas 10 segundos nos restantes períodos. A análise das imagens obtidas foi realizada utilizando o programa METAFLUOR 5.02 (Universal Imaging Corporation) para obter os valores da intensidade de emissão de fluorescência após excitação a 340 nm e 380 nm e calcular a razão 340/380. Para análise foram apenas seleccionadas as células que emitiam fluorescência resultante da expressão da subunidade NR1-GFP. Os valores da razão 340/380 foram posteriormente normalizados relativamente ao valor da linha basal, para cada célula. Considerou-se como valor basal o valor obtido no segundo 100 após o início da aquisição. Para o cálculo da amplitude da resposta ao estímulo, subtraiu-se ao valor máximo após o estímulo, o valor obtido imediatamente antes da estimulação das células.

11. Quantificação da proteína

A concentração de proteína nas amostras foi determinada usando ao reagente *Bio-Rad Protein Assay Dye*. Este ensaio colorimétrico é uma modificação do ensaio de Lowry e baseia-se na reacção das proteínas com uma solução alcalina de tartarato de cobre e o reagente de Folin. O aumento da absorvência, a 595 nm, correlaciona-se com a quantidade de proteína, sendo possível quantificar este valor por interpolação com uma curva padrão.

As reacções seguintes foram preparadas num placa de 96 poços para leitura num aparelho de ELISA. Às amostras adicionou-se água miliQ até perfazer 80 µl e reagente *Bio-Rad Protein Assay Dye* (120 µl). Paralelamente, foi preparada uma curva padrão com 5 concentrações de BSA (1, 2, 3, 4 e 5 µg/µl) a partir duma solução *stock* a 0,1%, bem como um branco, na ausência de BSA. Às reacções da curva padrão e do branco foi adicionado o tampão com o qual a amostra proteica foi obtida (um volume equivalente) e o reagente *Bio-Rad Protein Assay Dye*. Após 15 minutos, foi lida a absorvência a 595 nm num leitor de ELISA Spectra SLT. A concentração de proteína foi calculada por interpolação dos valores de absorvência na curva padrão.

12. Análise estatística

Os dados apresentados são a média \pm SEM de pelo menos 3 experiências independentes, realizadas em duplicado ou triplicado. A análise estatística foi realizada pelo teste t de Student, usando o programa GraphPad Prism. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

IV. RESULTADOS

A expressão heteróloga dos receptores NMDA em células não-neuronais tem sido frequentemente usada para estudar a função destes receptores. Este modelo é conveniente devido à ausência de expressão nativa dos receptores NMDA nestas células, permitindo a expressão de receptores de composição definida. Quando expressos nestas células, os receptores apresentam características fisiológicas e farmacológicas semelhantes às dos receptores nativos. Para além disso, verificou-se que a expressão dos receptores em células não-neuronais causa toxicidade, reproduzindo algumas características da excitotoxicidade neuronal (Lynch & Guttman, 2001; Lynch & Guttman, 2002).

Tal como descrito anteriormente, o processo de excitotoxicidade é um dos mecanismos pelos quais ocorre morte neuronal na DA, cuja patologia tem sido associada à deposição extracelular do peptídeo $A\beta_{1-40}$. Este peptídeo surge do processamento da APP pela via amiloidogénica e, apesar de mais solúvel do que o péptido $A\beta_{1-42}$, representa 90% do total de $A\beta$, está presente nos depósitos de amiloide e poderá ser um indicador das alterações sinápticas que ocorrem na DA (Funato *et al.*, 1998; Lue *et al.*, 1999; Masters *et al.*, 1985; Roher *et al.*, 1993; Vigo-Pelfrey *et al.*, 1993). Apesar das evidências do envolvimento dos receptores NMDA na DA, ainda não são conhecidos estudos que permitam elucidar o papel dos vários subtipos dos receptores NMDA. Neste trabalho, avaliou-se a importância da composição dos receptores NMDA na toxicidade induzida pelo peptídeo $A\beta_{1-40}$. Desta forma, expressaram-se subtipos de receptores NMDA, compostos pelas subunidades NR1 e NR2A ou NR2B, em células HEK293.

O cADN que codifica para a subunidade NR1 foi previamente inserido no plasmídeo de expressão em mamífero pEGFP (gentilmente cedido pelo Dr. John Woodward, *Medical University of South Carolina, Charleston*, Estados Unidos da América) que tem a particularidade de codificar a variante mutada S65T da GFP. A inserção do cADN da subunidade NR1 neste plasmídeo resulta na expressão de uma proteína de fusão entre a subunidade NR1 e a GFP. Esta proteína, por nós designada NR1-GFP, mantém todas as propriedades fisiológicas da NR1 (Marshall *et al.*, 1995) e permite uma fácil visualização das células transfectadas, sem o recurso à imunocitoquímica. Neste estudo foi usada a variante de *splicing* NR1a da subunidade NR1, pois é a variante predominante em várias regiões cerebrais, tal como o córtex e o hipocampo, duas áreas afectadas na DA (Laurie *et al.*, 1995).

1. Expressão de receptores do tipo NR1/NR2A e NR1/NR2B em células HEK293

A expressão transitória das subunidades dos receptores NMDA em células HEK293 foi confirmada por *western-blotting* (Fig. 8A e B) e por imunocitoquímica (Fig. 8C e D). Vinte e quatro horas após transfecção, a expressão das subunidades NR2A (Fig. 8A e C) e NR2B (Fig. 8B e D) foi semelhante, ocorrendo juntamente com a expressão da subunidade NR1, detectável pela fluorescência da GFP. Como esperado, as células HEK293 não transfectadas (HEK, Fig. 8A e B) não apresentaram qualquer expressão das subunidades NR2A ou NR2B.

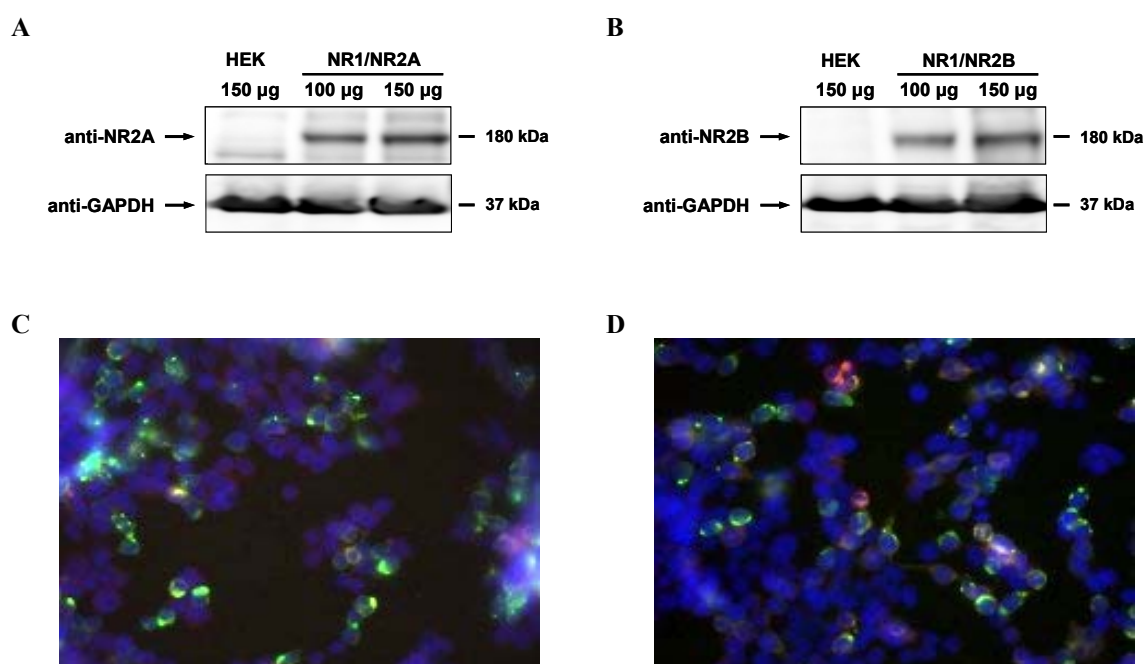


Figura 8: Expressão de receptores NMDA após transfecção em células HEK293. A expressão dos receptores NMDA foi confirmada por *western-blotting* (A, B) e por imunocitoquímica (C, D) 24 horas após a transfecção. (A, B) Foram preparados extractos totais das células HEK293 transfectadas com NR1 e NR2A (A) ou NR1 e NR2B (B), as proteínas foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de PVDF, incubada com os anticorpos contra as subunidades NR2A (A) ou NR2B (B). Como controlo foram preparados extractos de células HEK293 não-transfectadas (HEK). (C, D) A expressão dos receptores NMDA foi também detectada por microscopia de fluorescência. Após fixação, as células foram incubadas com anticorpos anti-NR2A (C) e anti-NR2B (D) (vermelho). A subunidade NR1 foi detectada pela fluorescência da GFP (verde). As zonas onde ocorre co-localização entre as duas sondas aparecem a amarelo. A fluorescência azul resulta da marcação do ADN com o marcador fluorescente *Hoechst* 33342. Os resultados são representativos de duas experiências independentes (em duplicado).

Com base em imagens obtidas por imunocitoquímica (Fig. 8C e D) quantificou-se a percentagem de células que expressavam as subunidades NR1-GFP e NR2A ou NR1-GFP e NR2B (Fig. 9A). A percentagem de co-transfecção foi de $18,5 \pm 3,1\%$ ou $17,7 \pm 2,7\%$ para as células que expressavam as subunidades NR1/NR2A ou NR1/NR2B, respectivamente. Estes resultados permitiram verificar que a expressão destas subunidades é muito semelhante, possibilitando um estudo comparativo entre as duas linhas celulares que expressam NR1/NR2A e NR1/NR2B.

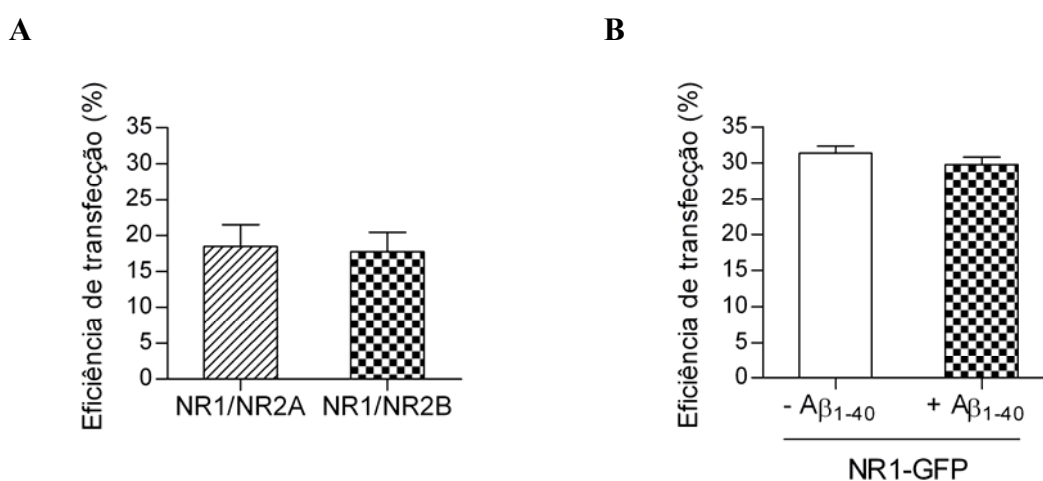


Figura 9: Eficiência de transfecção de subunidades dos receptores NMDA em células HEK293. (A) A eficiência de co-transfecção das subunidades NR1 e NR2A ou NR2B foi avaliada com base em imagens de imunocitoquímica semelhantes à representada na Fig. 8C e D. Determinou-se o número de células com marcação para NR1 e NR2A ou NR2B relativamente ao número total de células após contagem dos núcleos marcados com *Hoechst* 33342. (B) As células HEK293 foram transfectadas com NR1-GFP e incubadas na ausência ou presença de Aβ₁₋₄₀ 1 μM durante 24 horas e foi determinada a percentagem de células que expressavam NR1-GFP em relação ao número total de células. Os resultados apresentados são a média ± SEM de duas experiências independentes (em duplicado).

Para excluir a possibilidade de interferência do peptídeo Aβ na expressão dos receptores NMDA, foi determinada a eficiência de transfecção da subunidade NR1-GFP após incubação com o peptídeo Aβ₁₋₄₀ (Fig. 9B). Não se verificou uma alteração significativa da eficiência de transfecção na ausência ($30,1 \pm 1,0\%$) ou na presença ($29,8 \pm 1,1\%$) de Aβ₁₋₄₀ 1 μM durante 24 horas (Fig. 9B).

De modo a facilitar a descrição, as células HEK293 transfectadas com os subtipos NR1-GFP, NR1/NR2A e NR1/NR2B, foram designadas por HEK^{NR1-GFP}, HEK^{NR1/NR2A} e HEK^{NR1/NR2B}, respectivamente.

2. Efeito do peptídeo A β na viabilidade celular de células transfectadas com subunidades dos receptores NMDA

2.1 Análise da capacidade redutora

Vários estudos têm demonstrado que a expressão dos subtipos NR1/NR2A e NR1/NR2B dos receptores NMDA, funcionais, em células não-neuronais leva à morte celular (Lynch & Guttman, 2002, para revisão). Por outro lado, a exposição ao peptídeo A β ₁₋₄₀ também causa toxicidade em diversos tipos de células (Mattson, 1997, para revisão). Assim, nesta parte do trabalho avaliou-se o efeito da expressão de receptores NMDA com composição definida na viabilidade celular após exposição ao peptídeo A β ₁₋₄₀.

O ensaio de redução de MTT foi usado para avaliar a capacidade redutora (uma medida da viabilidade celular) das células transfectadas com as subunidades dos receptores NMDA na ausência ou na presença de A β ₁₋₄₀ 1 μ M durante 48 horas. Usou-se como controlo a expressão da subunidade NR1-GFP, uma vez que a expressão de uma proteína com características semelhantes às das outras subunidades poderia mimetizar melhor os efeitos mediados pela expressão das proteínas de interesse, sem as consequências da formação de um receptor funcional.

A expressão de receptores NMDA funcionais durante 48 horas, *per se*, induziu uma perda estatisticamente significativa da viabilidade celular. A expressão do subtipo NR1/NR2A levou a uma diminuição da viabilidade celular de 34 \pm 3,5%, um valor superior ao obtido após a expressão de NR1/NR2B que conduziu a uma diminuição da viabilidade celular de 17 \pm 2,0% em relação ao controlo (Fig. 10). Esta diferença de viabilidade após a expressão de diferentes subtipos de receptores NMDA foi anteriormente descrita por outros autores (Anegawa *et al.*, 1995; Anegawa *et al.*, 2000; Boeckman & Aizenman, 1996; Raymond *et al.*, 1996; Varney *et al.*, 1996). A exposição a MK-801 10 μ M, um

bloqueador do canal iônico dos receptores NMDA, preveniu a diminuição da viabilidade celular decorrente da expressão das subunidades NR1/NR2A ($80,9 \pm 3,3\%$, $p < 0,01$ comparativamente à condição sem MK-801) e NR1/NR2B ($90,9 \pm 2,3\%$, $p < 0,001$ comparativamente à condição sem MK-801). Estes dados demonstraram que o nosso sistema reproduzia algumas das características de toxicidade decorrentes da expressão de receptores NMDA funcionais em linhas celulares não-neuronais, de forma semelhante ao descrito anteriormente.

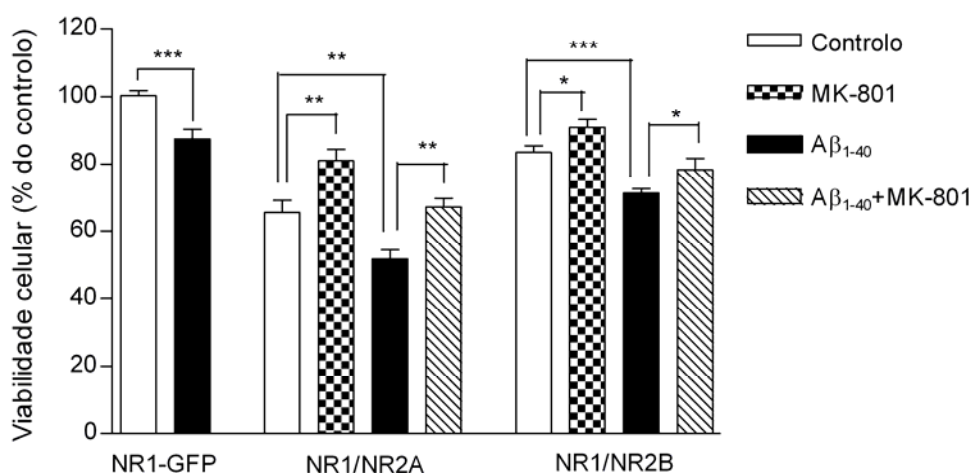


Figura 10: Viabilidade celular de células HEK293 após expressão de receptores NMDA e exposição ao peptídeo Aβ₁₋₄₀. As células foram transfectadas e incubadas com Aβ₁₋₄₀ 1 μM e/ou MK-801 10 μM, conforme indicado, durante 48 h. Após este período, as células foram expostas a MTT 0,5 mg/ml durante 2 horas. Os cristais de *formazan* foram solubilizados com HCl 0,04 M em isopropanol e a absorvência foi lida a 570 nm. Os resultados foram expressos em % relativamente aos valores de absorvência observados no controlo (NR1-GFP). Os resultados apresentados são a média ± SEM de pelo menos três experiências independentes (em triplicado). Análise estatística: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

A exposição de Aβ₁₋₄₀ 1 μM durante 48 horas em células HEK^{NR1-GFP} conduziu a um decréscimo da capacidade redutora de $13 \pm 3,0\%$ ($p < 0,001$ comparativamente a HEK^{NR1-GFP}, Fig. 10). A concentração de 1 μM de Aβ₁₋₄₀ foi definida com base em estudos anteriores realizados em células COS-7 (dados não publicados), nos quais se verificou que a exposição a esta concentração do peptídeo Aβ₁₋₄₀ induzia uma ligeira diminuição da viabilidade celular, permitindo avaliar o possível efeito potenciador da toxicidade após a expressão de receptores NMDA funcionais.

A incubação de $A\beta_{1-40}$ 1 μ M, durante 48 horas, induziu uma diminuição de aproximadamente 14% da viabilidade celular em células HEK^{NR1/NR2A} ($51,7\pm 2,7\%$, $p<0,01$ comparativamente a HEK^{NR1/NR2A} na ausência de $A\beta_{1-40}$) e de aproximadamente 12% em células HEK^{NR1/NR2B} ($71,3\pm 1,3\%$, $p<0,001$ comparativamente a HEK^{NR1/NR2B} na ausência de $A\beta_{1-40}$) (Fig. 10). A incubação de células transfectadas com $A\beta_{1-40}$ 1 μ M na presença de MK-801 10 μ M aumentou a capacidade redutora em aproximadamente 15% nas células HEK^{NR1/NR2A} ($p<0,01$ comparativamente a HEK^{NR1/NR2A} na presença de $A\beta_{1-40}$) e aproximadamente 7% nas células HEK^{NR1/NR2B} ($p<0,05$ comparativamente a HEK^{NR1/NR2B} na presença de $A\beta_{1-40}$). Estes dados sugeriram que o peptídeo $A\beta_{1-40}$ potencia a perda de viabilidade celular associada à expressão de receptores NMDA funcionais. De acordo com o efeito do antagonista, este efeito potenciador do peptídeo $A\beta_{1-40}$ parece ser mais pronunciado nas células que expressam as subunidades NR1/NR2A.

2.2 Análise da integridade da membrana plasmática

Tal como detectado pela capacidade de redução de MTT, o peptídeo $A\beta_{1-40}$ leva à diminuição da viabilidade celular após expressão de receptores NMDA funcionais. Assim, determinou-se seguidamente o envolvimento do processo de morte celular por necrose. Uma das características da morte por necrose é a perda de integridade membranar e consequente libertação de proteínas citosólicas, tal como a enzima LDH, para o meio extracelular. Como esta enzima se mantém estável no meio durante vários dias, a presença de LDH no meio de cultura correlaciona-se com o número de células irreversivelmente lesadas, em cultura (Gray & Patel, 1995).

Para determinar a integridade da membrana plasmática realizámos o ensaio da actividade da LDH (Fig. 11). A expressão da subunidade NR1-GFP levou à libertação de $4,7\pm 1,0\%$ de LDH, tendo-se observado um ligeiro aumento, não significativo ($1,5\pm 1\%$), da libertação desta enzima após exposição a $A\beta$ 1 μ M durante 48 horas. No entanto, a expressão de receptores NMDA funcionais, constituídos pelas subunidades NR1/NR2A ou NR1/NR2B, levou a uma libertação significativa de LDH (Fig. 11). A expressão, *per se*, de NR1/NR2A durante 48 horas induziu a libertação de $32,4\pm 1,1\%$ do conteúdo total de LDH. A expressão de NR1/NR2B também levou à libertação de LDH ($23,4\pm 1,5\%$), embora em menor percentagem relativamente à expressão de NR1/NR2A. Estes resultados foram

concordantes com os observados pelo ensaio de viabilidade celular baseado na redução de MTT (Fig. 10), no qual se observou uma diminuição da viabilidade celular após a expressão das subunidades NR1/NR2A ou NR1/NR2B, sendo este efeito superior para as subunidades NR1/NR2A.

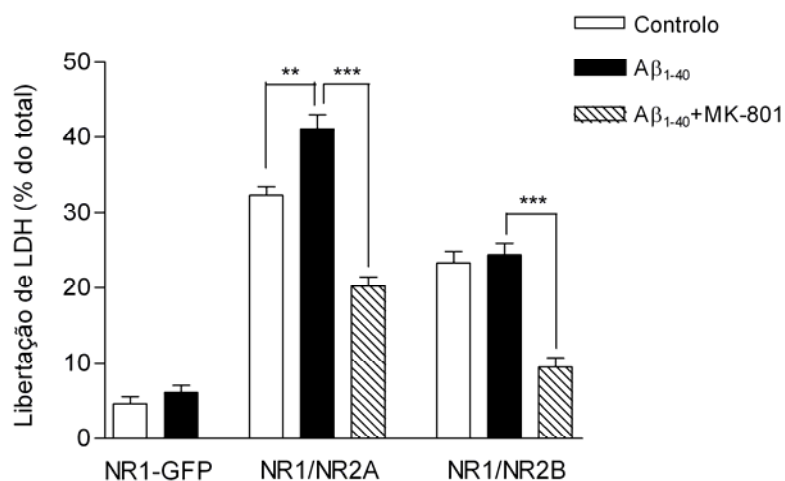


Figura 11: Efeito do peptídeo Aβ e de subtipos dos receptores NMDA na integridade da membrana plasmática das células HEK293. As células HEK293 transfectadas com diferentes subunidades dos receptores NMDA foram incubadas com Aβ₁₋₄₀ 1 μM e/ou MK-801 10 μM, durante 48 horas. A fracção extracelular foi recolhida e a fracção intracelular foi obtida por lise das células com uma solução hipotónica de HEPES 10 mM (pH 7,4) com Triton-X100 (0,02%). A actividade da LDH foi determinada a 340 nm através da oxidação do NADH. Os resultados foram expressos em percentagem de libertação de LDH em relação ao total, usando a expressão % LDH libertada = 100 x LDH extracelular/ LDH total (intracelular + extracelular). Os resultados apresentados são a média ± SEM de pelo menos três experiências independentes realizadas em triplicado. Análise estatística: ***p*<0,01, ****p*< 0,001.

A exposição de células HEK^{NR1/NR2A} ao peptídeo Aβ₁₋₄₀ 1 μM induziu um aumento significativo de aproximadamente 9% (*p*<0,001) da libertação de LDH (Fig. 11). A presença do antagonista dos receptores NMDA, MK-801 (10 μM), diminuiu em cerca de 20% (*p*<0,001 em relação à condição HEK^{NR1/NR2A} na presença de Aβ₁₋₄₀) a libertação de LDH nas células HEK^{NR1/NR2A} expostas a Aβ₁₋₄₀. Pelo contrário, a incubação de células HEK^{NR1/NR2B} com o peptídeo Aβ₁₋₄₀ não induziu uma alteração significativa da libertação de LDH (Fig. 11). No entanto, o tratamento de células HEK^{NR1/NR2B} com MK-801, na presença de Aβ₁₋₄₀, decresceu largamente a libertação de LDH (aproximadamente 15%), sugerindo que os efeitos observados se deviam à abertura do canal iónico associado a subtipos funcionais dos receptores NMDA. Estes resultados apontaram para uma

selectividade dos efeitos tóxicos do peptídeo $A\beta_{1-40}$ relativamente ao subtipo NR1/NR2A dos receptores NMDA.

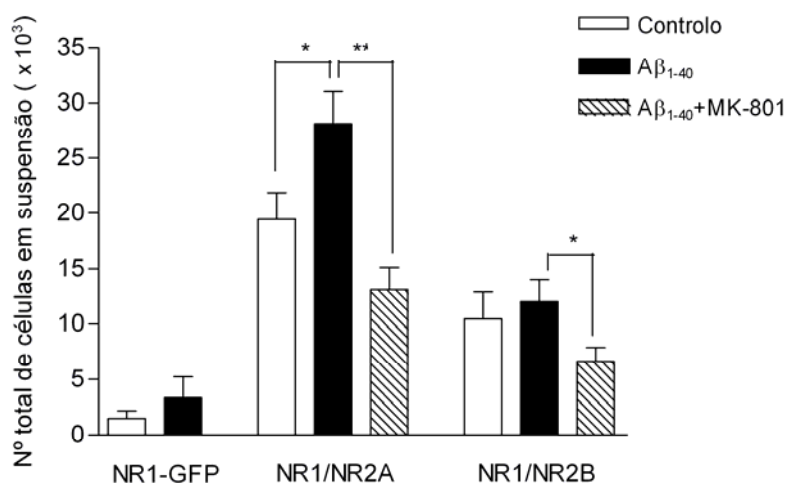


Figura 12: Quantificação do número de células em suspensão após expressão de receptores NMDA e exposição ao peptídeo $A\beta$. As células HEK293 foram transfectadas usando o reagente Superfect e incubadas durante 48 horas com $A\beta_{1-40}$ 1 μ M e/ou MK-801 10 μ M, nas condições indicadas. Durante a preparação das amostras para o ensaio de LDH (Fig. 11) a fracção extracelular foi centrifugada a 110 g. durante 5 minutos e o sedimento resultante foi ressuspensão em DMEM contendo azul de tripano. As células foram contadas num hemocítmetro num microscópio de contraste de fase. Os resultados apresentados são a média \pm SEM de pelo menos 3 experiências independentes. Análise estatística: * p <0,05, ** p <0,01.

No decurso das experiências, a observação das células transfectadas denotou que a transfecção e exposição ao peptídeo $A\beta_{1-40}$ resultava num aumento do número de células em suspensão, indicador de morte celular, pois as células HEK293 viáveis proliferam aderentes ao substrato (poli-L-lisina). Desta forma, as células em suspensão foram quantificadas recorrendo ao azul de tripano (Fig. 12). Nas células HEK^{NR1-GFP} o número de células em suspensão foi de $1,5 \times 10^3 \pm 0,7 \times 10^3$ e a presença de $A\beta_{1-40}$ não induziu um aumento significativo deste número ($3,4 \times 10^3 \pm 1,9 \times 10^3$) (Fig. 12), de forma semelhante ao que foi observado na figura 11. No entanto, após expressão das subunidades NR1/NR2A ou NR1/NR2B o número de células em suspensão foi bastante expressivo. No meio de cultura das células HEK^{NR1/NR2A} foram contadas $19,5 \times 10^3 \pm 2,4 \times 10^3$ células e esse aumento foi superior após incubação com $A\beta_{1-40}$ 1 μ M ($28,1 \times 10^3 \pm 2,9 \times 10^3$, p <0,05 comparativamente a HEK^{NR1/NR2A} na ausência do peptídeo $A\beta_{1-40}$). De modo consistente

com os resultados verificados na figura 11, a toxicidade observada após a expressão das subunidades NR1/NR2B ($10,5 \times 10^3 \pm 2,4 \times 10^3$) não foi potenciada significativamente pela exposição ao peptídeo A β_{1-40} ($12,0 \times 10^3 \pm 2,0 \times 10^3$) (Fig. 12).

Também de acordo com os resultados anteriores, na presença do antagonista MK-801 (10 μ M) o número de células não-aderentes diminuiu para $13,0 \times 10^3 \pm 2,0 \times 10^3$ ($p < 0,01$ comparativamente a HEK^{NR1/NR2A} na presença de A β_{1-40}) ou para $6,6 \times 10^3 \pm 1,2 \times 10^3$ ($p < 0,05$ comparativamente a HEK^{NR1/NR2B} na presença de A β_{1-40}) após expressão dos subtipos NR1/NR2A ou NR1/NR2B, respectivamente (Fig. 12). Estes dados reforçaram os resultados obtidos através da libertação de LDH, indicando que o peptídeo A β_{1-40} induz um aumento de toxicidade especificamente em células HEK^{NR1/NR2A}, através de um mecanismo de morte celular que envolve a perda de integridade membranar.

2.3 Alteração dos níveis energéticos celulares

A manutenção dos processos de produção de ATP pela célula ao nível da glicólise e da cadeia respiratória mitocondrial são essenciais para a sobrevivência das células, estando afectados durante os processos excitotóxicos e na DA (Rego & Oliveira, 2003, para revisão). Em situações associadas à morte por necrose existe uma falência energética da célula devido à perda de função mitocondrial. Por outro lado, nos processos de morte por apoptose os níveis energéticos são geralmente preservados, pois a activação de caspases depende da ligação de ATP ao apoptossoma (Nicotera & Melino, 2004). Determinou-se assim de que forma a expressão dos diferentes subtipos dos receptores NMDA e a exposição ao peptídeo A β_{1-40} afectavam os níveis intracelulares de ATP.

A exposição de células HEK^{NR1-GFP} durante 48 horas ao peptídeo A β 1 μ M não alterou significativamente os níveis intracelulares de ATP (Fig. 13). No entanto, a expressão de receptores NR1/NR2A e NR1/NR2B levou à diminuição do conteúdo intracelular de ATP de $19 \pm 5,2\%$ ou $17 \pm 8,8\%$, respectivamente. Na presença de A β_{1-40} 1 μ M, ocorreu uma diminuição significativa do conteúdo de ATP nas células HEK^{NR1/NR2A} de aproximadamente 14% ($p < 0,05$ comparativamente a HEK^{NR1/NR2A} na ausência do A β_{1-40}). O bloqueio dos receptores NR1/NR2A com MK-801 10 μ M permitiu recuperar quase totalmente os níveis intracelulares de ATP em células HEK^{NR1/NR2A} expostas ao peptídeo A β_{1-40} (Fig. 13). Nestas condições o antagonista MK-801 não exerceu qualquer efeito,

sugerindo que o decréscimo de ATP em células HEK^{NR1/NR2B} não se correlaciona com a abertura de um canal iónico. De acordo com os resultados obtidos anteriormente, o peptídeo A β ₁₋₄₀ não causou qualquer alteração no conteúdo de ATP em células HEK^{NR1/NR2B}, comparativamente às condições sem A β ₁₋₄₀. A diminuição dos níveis energéticos celulares induzida pelo peptídeo A β ₁₋₄₀ após expressão das subunidades NR1/NR2A mostrou que o processo de morte celular nestas condições envolvia a alteração do metabolismo energético, essencial para a manutenção da viabilidade celular.

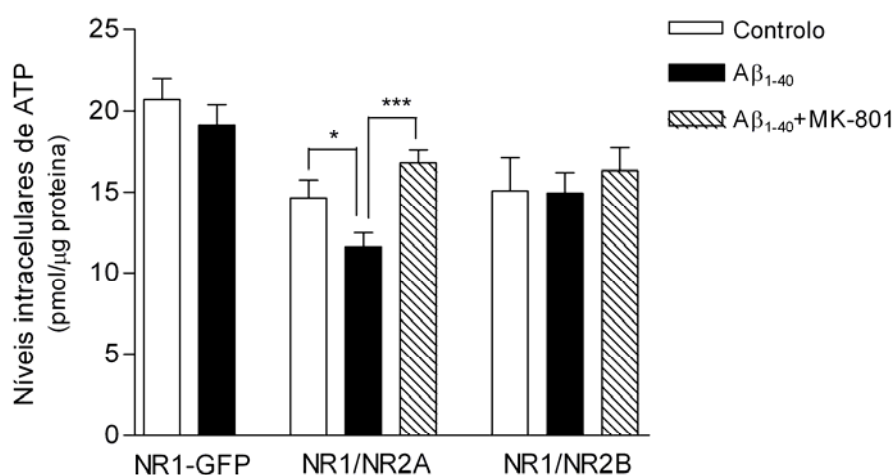


Figura 13: Níveis intracelulares de ATP após exposição a A β ₁₋₄₀ em células que expressam diferentes subtipos de receptores NMDA. As células HEK293, transfetadas com as subunidades indicadas no gráfico, foram incubadas durante 48 horas com A β ₁₋₄₀ 1 μ M, e/ou MK-801 10 μ M. A fracção intracelular foi obtida por lise das células com ácido perclórico 0,3 M, e o pH foi neutralizado com KOH 5 M em Tris 2,5 M. As amostras foram aplicadas num aparelho de HPLC e os níveis de ATP foram determinados pela área do pico correspondente, identificado pelo tempo de retenção na coluna após comparação com amostras de concentrações conhecidas de ATP. Os resultados apresentados são a média \pm SEM de 3 experiências independentes (em triplicado). Análise estatística: * p <0,05, *** p < 0,001.

3. Envolvimento do processo apoptótico

As caspases e as calpaínas são famílias de proteases que desempenham papéis importantes nos processos de morte celular. Várias evidências apontam para uma colaboração entre estas enzimas na regulação do processo degenerativo (Orrenius *et al.*, 2003, para revisão). As calpaínas são uma família de proteases dependentes de cálcio cuja

actividade é estimulada pelo aumento da concentração intracelular de cálcio livre e inibida pela proteína endógena calpstatina ou pelo decréscimo de cálcio intracelular livre (Wang, 2000). As caspases são uma família de proteases cisteínicas cuja activação resulta de diversos estímulos intracelulares ou extracelulares (Fig. 7). A morte celular induzida pela sobreactivação dos receptores NMDA pode envolver a activação de calpaínas (Brorson *et al.*, 1995; Lankiewicz *et al.*, 2000) e/ou de caspases (Budd *et al.*, 2000; Tenneti & Lipton, 2000; Volbracht *et al.*, 2001). Por outro lado, a exposição de culturas neuronais ao peptídeo A β ₁₋₄₀ pode induzir a activação de apoptose (secção I.3.3). Nesta parte do trabalho pretendemos verificar a existência de características de morte por apoptose e as vias envolvidas neste processo.

3.1 Activação de caspases

De acordo com Pierluigi Nicotera (Nicotera & Melino, 2004), os processos de morte celular não são completamente definidos, pelo que um processo inicialmente apoptótico poderá ser interrompido caso não exista ATP suficiente para a activação de caspases, prosseguindo para necrose. Assim, a “decisão” da célula em morrer por apoptose ou por necrose dependerá não só da intensidade e duração do estímulo inicial como das alterações celulares que ocorrem posteriormente. Uma vez que a exposição durante 48 horas ao peptídeo A β ₁₋₄₀ em células que expressavam subtipos dos receptores NMDA induziu morte celular com características necróticas, pretendemos avaliar se após uma exposição de menor duração ao peptídeo A β ₁₋₄₀ poderia ocorrer morte com características apoptóticas, de que se salientam a activação de caspases e a fragmentação/condensação da cromatina.

A avaliação da actividade de caspases foi realizada recorrendo a sequências peptídicas consenso para os locais de clivagem de cada uma das caspases. Estes peptídeos estão ligados a um cromóforo, *p*-nitroanilida (pNA), que é libertado após clivagem. Foram obtidos extractos citosólicos de células transfectadas com NR1-GFP, NR1/NR2A ou NR1/NR2B, expostas a A β ₁₋₄₀ e /ou MK-801 durante 24 horas. Tal como observado na figura 14, nas condições testadas não foi possível detectar a activação significativa de caspases iniciadoras (2, 8, 9) da via extrínseca e intrínseca, ou da caspase efectora (3). Estes dados indicaram que a morte por expressão dos subtipos de receptores NMDA e/ou exposição ao peptídeo A β ₁₋₄₀ ocorria fundamentalmente por necrose, ou por uma via

apoptótica independente de caspases. Uma das vias de morte celular independentes de caspases envolve a activação de proteases do tipo das calpaínas.

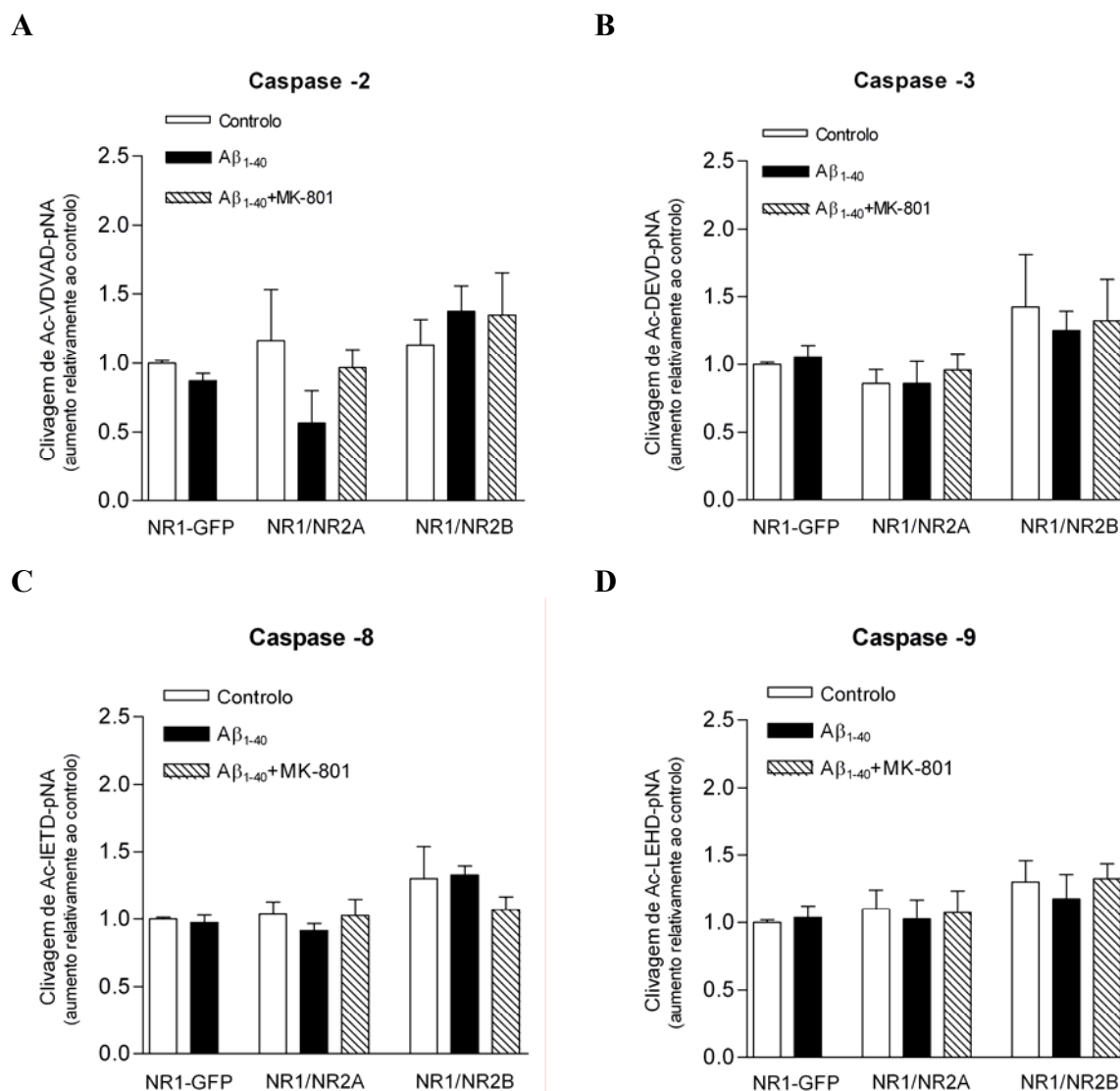


Figura 14: Avaliação da actividade de caspases após expressão de receptores NMDA e exposição ao peptídeo A β_{1-40} . As células HEK293 foram transfectadas e incubadas durante 24 horas com A β_{1-40} 1 μ M e/ou MK-801 10 μ M, nas condições indicadas. A actividade das caspases-2 (A), 3 (B), 8 (C) ou 9 (D) foi determinada pela medição da clivagem dos substratos colorimétricos Ac-VDVAD-pNA, Ac-DEVD-pNA, Ac-IETD-pNA ou Ac-LEHD-pNA, respectivamente. Os resultados apresentados são a média \pm SEM de 3 experiências independentes, realizados em triplicado.

3.2 Activação de calpaínas

As calpaínas estão geralmente envolvidas na morte celular mediada pela activação dos receptores NMDA, pois os processos de excitotoxicidade associados a estes receptores são geralmente mediados por um aumento anormal dos níveis intracelulares de cálcio (Brorson *et al.*, 1995; Volbracht *et al.*, 2001). Desta forma, nesta parte do trabalho avaliámos a activação de calpaínas após a expressão das subunidades NR1-GFP ou NR1/NR2A e exposição ao peptídeo A β ₁₋₄₀, durante 24 horas (Fig. 15).

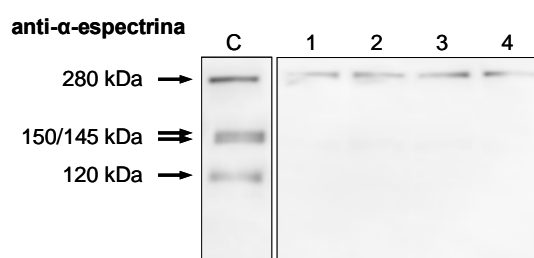


Figura 15: Análise da clivagem da α -espectrina em células que expressam NR1/NR2A após exposição ao peptídeo A β ₁₋₄₀. As proteínas da fracção citoplasmática de células transfectadas foram separadas por SDS-PAGE num gel de poliacrilamida a 6,5% e, após transferência para uma membrana de PDVF, foram marcadas com um anticorpo dirigido para a α -espectrina. A clivagem da α -espectrina por calpaínas dá origem a 2 fragmentos de 150 e 145 kDa, enquanto que a clivagem pela caspase-3 resulta em fragmentos de 150 e 120 kDa. Legenda: **c**, controlo positivo para a clivagem pela caspase-3 (150 e 120 kDa) e calpaínas (150 e 145 kDa) obtido de culturas primárias de células corticais tratadas com ácido 3-nitropropiónico 10 mM durante 24 horas (gentilmente cedido por Sandra Almeida); **1**, HEK^{NR1-GFP} incubadas com A β ₁₋₄₀ 1 μ M durante 24 h; **2**, HEK^{NR1/NR2A}; **3**, HEK^{NR1/NR2A} incubadas com A β ₁₋₄₀ 1 μ M durante 24 h; **4**, HEK^{NR1/NR2A} incubadas com A β ₁₋₄₀ 1 μ M e MK-801 10 μ M durante 24 horas. A imagem é representativa de 3 experiências independentes.

A α -espectrina, ou fodrina, é uma proteína do citosqueleto clivada por calpaínas e pela caspase-3 em locais específicos. Os produtos de clivagem são uma medida da actividade destas enzimas e podem ser detectados por *western-blotting*. A clivagem por calpaínas resulta em 2 fragmentos de 150 e 145 kDa e a clivagem pela caspase-3 dá origem a dois fragmentos, de 150 e 120 kDa (Fig. 15) (Almeida *et al.*, 2004).

Após detecção por *western-blotting* (Fig. 15) verificámos que quer a exposição ao peptídeo A β ₁₋₄₀, quer a expressão dos receptores NMDA, não induziu a activação de calpaínas ou da caspase-3 uma vez que não foram observados quaisquer fragmentos resultantes da clivagem da α -espectrina. Estes resultados sugeriram que o processo de

morte associado à exposição de $A\beta_{1-40}$ em células $HEK^{NR1/NR2A}$ não envolvia a activação de enzimas proteolíticas.

3.3 Análise da morfologia nuclear

Nos processos de morte celular dependentes ou independentes de caspases ocorre a clivagem do ADN nuclear (Dawson & Dawson, 2004; Leist & Jaattela, 2001). Apesar de nas nossas condições experimentais não se ter observado a activação de caspases, verificámos a possibilidade de ocorrência de fragmentação e/ou condensação do ADN.

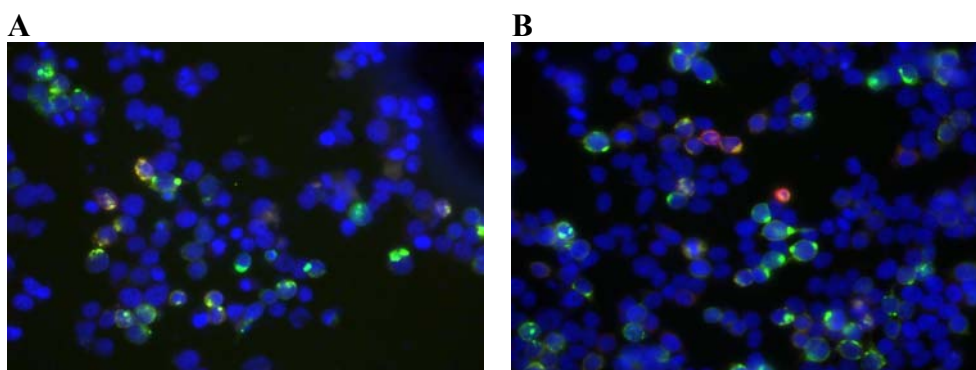


Figura 16: Análise da morfologia nuclear de células $HEK^{NR1/NR2A}$ expostas ao peptídeo $A\beta_{1-40}$. Células transfectadas com as subunidades NR1/NR2A e incubadas na ausência (A) ou presença (B) de $A\beta_{1-40}$ 1 μ M, durante 24 h, foram fixadas e incubadas com um anticorpo anti-NR2A (vermelho). Os núcleos foram marcados com a sonda fluorescente *Hoechst* 33342 para a análise da fragmentação e/ou condensação do ADN. As imagens são representativas de 3 experiências independentes.

As células $HEK^{NR1/NR2A}$ foram incubadas com $A\beta_{1-40}$ 1 μ M durante 24 horas e a morfologia nuclear foi detectada por microscopia de fluorescência (Fig. 16). A expressão de NR1/NR2A e exposição ao peptídeo $A\beta_{1-40}$ não alterou a morfologia nuclear das células HEK293 (Fig. 16A e B), de forma coerente com os resultados verificados nas figuras 14 e 15. Estes dados indicaram que a morte observada após a expressão dos subtipos NR1/NR2A e exposição ao peptídeo $A\beta_{1-40}$ era do tipo necrótico.

4. Alterações funcionais dos receptores NMDA

São conhecidos vários moduladores da actividade do canal associado aos receptores NMDA. Estes moduladores podem ser iões como o zinco ou o magnésio, poliaminas ou o monóxido de azoto (Lynch & Guttman, 2002). Foi também sugerido anteriormente que o fragmento tóxico do peptídeo A β (A β ₂₅₋₃₅) poderá actuar como agonista ou co-agonista dos receptores NMDA (Calligaro *et al.*, 1993; Cowburn *et al.*, 1994; Cowburn *et al.*, 1997).

Nesta parte do trabalho averiguou-se se a incubação com o peptídeo A β ₁₋₄₀ induzia alterações na permeabilidade ao cálcio do canal associado aos receptores NMDA. Nestas experiências, a incubação com A β ₁₋₄₀ foi efectuada durante 24 horas, ao invés das 48 horas dos estudos de toxicidade (secção IV.2), pois pretendíamos aferir a ocorrência de alterações que justificassem a morte celular generalizada.

Os níveis intracelulares de cálcio em célula única foram analisados em células HEK^{NR1/NR2A} e HEK^{NR1/NR2B} previamente incubadas na ausência ou na presença de A β ₁₋₄₀ durante 24 horas, na ausência de antagonistas dos receptores NMDA (Fig. 17A-D). Para tal, usou-se um protocolo de estimulação em que as células foram expostas a três estímulos consecutivos de NMDA (100 μ M) e glicina (10 μ M) durante 30 segundos (Blevins *et al.*, 1995). Apenas as células transfectadas, identificadas pela fluorescência da GFP, foram consideradas para a análise do níveis intracelulares de cálcio. O perfil das respostas obtido nos três estímulos consecutivos de NMDA/glicina foi semelhante (Fig. 17A e B). Após quantificação da razão 340/380 para cada condição experimental (normalizado relativamente ao valor basal), verificou-se que os níveis de cálcio das células HEK^{NR1/NR2A} incubadas com A β ₁₋₄₀ foram superiores aos valores obtidos em células não expostas a A β ₁₋₄₀, após os 2 primeiros estímulos (Fig. 17C). No entanto, este aumento da permeabilidade ao cálcio não ocorreu em células HEK^{NR1/NR2B} incubadas com A β ₁₋₄₀ (Fig. 17D). De facto, em células HEK^{NR1/NR2B} observou-se um decréscimo dos níveis de cálcio intracelular após o primeiro estímulo de NMDA/glicina, em células expostas a A β ₁₋₄₀ (Fig. 17D). O aumento dos níveis intracelulares de cálcio após estimulação dos receptores NMDA do

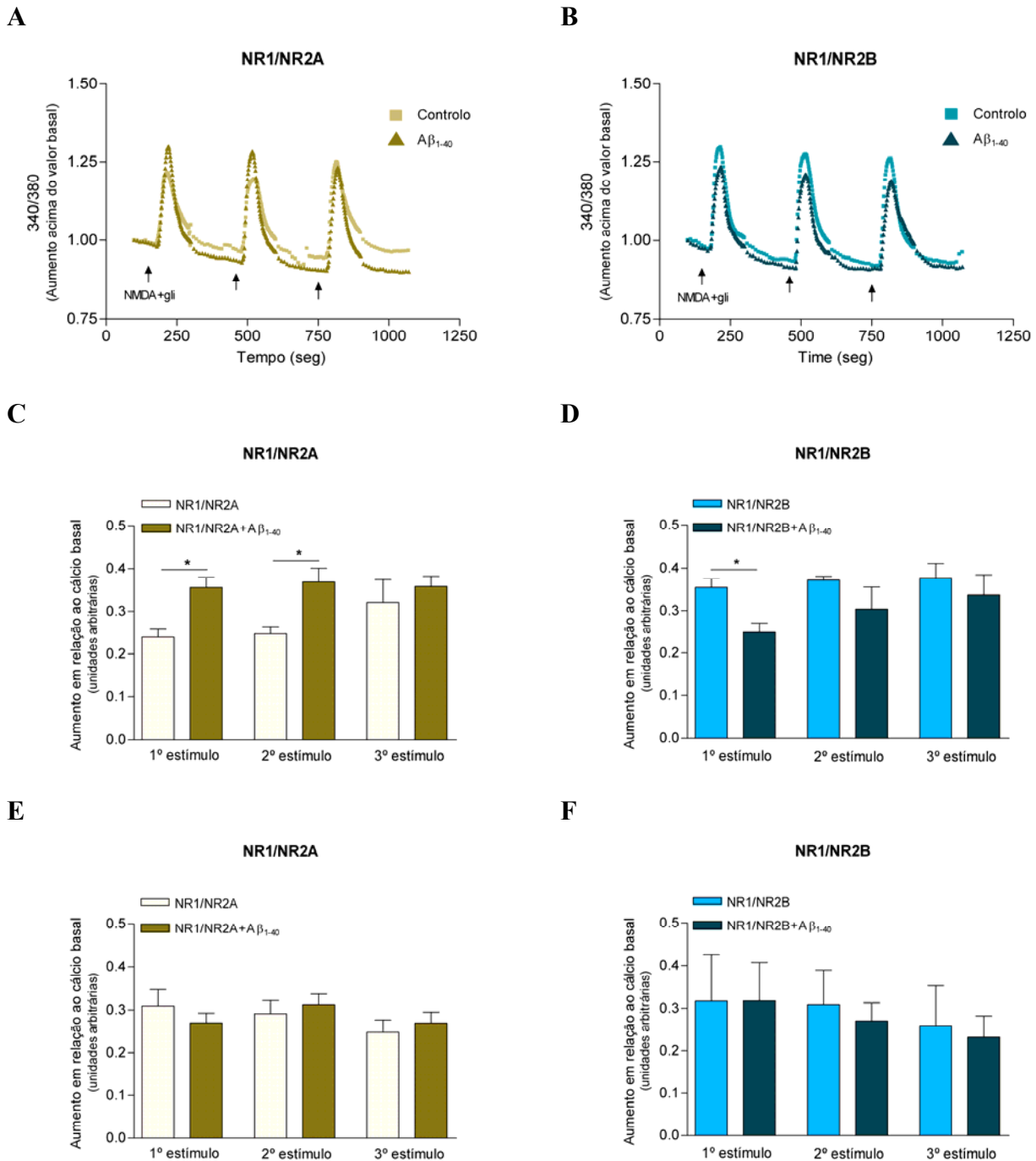


Figura 17: Influxo de cálcio em célula única após estímulos consecutivos de NMDA/glicina em células HEK293 transfectadas. As células HEK293 foram transfectadas e incubadas com $A\beta_{1-40}$ 1 μ M durante 24 horas, na ausência (A-D) ou na presença (E,F) do antagonista dos receptores NMDA quinurenato (1 mM). Após este, as células período foram incubadas com a sonda fura-2 AM e estimuladas três vezes (\uparrow) com NMDA 100 μ M e glicina 10 μ M (NMDA+gli) durante 30 segundos. (A, B) As variações dos níveis intracelulares de cálcio estão representadas como a razão de fluorescência 340/380 nm, normalizadas para a fluorescência basal. Cada traçado representa a média de todas as células transfectadas (entre 15 a 78 células por condição). Nas células não transfectadas não se verificaram aumentos dos níveis intracelulares de cálcio após o estímulo com NMDA+glicina. Nos gráficos C, D, E e F está representada a quantificação do aumento da razão 340/380 em células incubadas na ausência (C, D) ou na presença (E, F) de quinurenato 1 mM os valores representados são média \pm SEM de 3 experiências independentes. Análise estatística: * $p < 0,05$.

subtipo NR1/NR2A e exposição a $A\beta_{1-40}$ parece ser coerente com o padrão de morte celular do tipo necrótico evidenciado pelos resultados anteriores.

As células $HEK^{NR1/NR2A}$ e $HEK^{NR1/NR2B}$ foram também incubadas com $A\beta_{1-40}$ (1 μ M) na presença do ácido quinurénico, um antagonista reversível dos receptores NMDA, competitivo para o local de ligação da glicina (Fig. 17E e F). Nestas condições, verificou-se que a pré-incubação com o peptídeo $A\beta_{1-40}$ não induziu qualquer alteração dos níveis intracelulares de cálcio após estimulação com NMDA e glicina. Estes dados sugeriram que a alteração dos níveis intracelulares de cálcio verificada após estimulação dos receptores do subtipo NR1/NR2A ou NR1/NR2B e exposição a $A\beta$, requer que os receptores estejam activos durante a exposição prolongada ao peptídeo $A\beta_{1-40}$.

V. DISCUSSÃO

Neste trabalho demonstrou-se que diferentes subtipos de receptores NMDA estão envolvidos de forma distinta na excitotoxicidade associada à exposição ao peptídeo A β ₁₋₄₀. De facto, o peptídeo A β ₁₋₄₀ potenciou especificamente a toxicidade induzida pela expressão do subtipo NR1/NR2A, através de uma diminuição dos níveis energéticos. A diminuição da integridade membranar, associada à ausência de características de morte celular por apoptose, sugere que nestas condições a excitotoxicidade ocorreu por um processo necrótico. Para além disso, a exposição ao peptídeo A β ₁₋₄₀ em células que expressavam as subunidades NR1/NR2A conduziu a um aumento dos níveis intracelulares de cálcio após a activação transitória dos receptores NMDA. No entanto, a expressão do subtipo NR1/NR2B não induziu toxicidade ou o aumento do influxo de cálcio. Estes resultados evidenciam uma relação entre a morte celular e os níveis intracelulares de cálcio no modelo celular utilizado e, particularmente, a relevância da subunidade NR2A nos processos de excitotoxicidade após exposição ao peptídeo A β .

Uma dificuldade inerente ao estudo dos efeitos de cada um dos subtipos dos receptores NMDA tem sido a ausência de fármacos selectivos para cada uma das subunidades NR2, com a excepção das subunidades NR2B. O uso de antagonistas selectivos para subtipos de receptores NMDA compostos pela subunidade NR2B tem sido importante para determinar a importância desta subunidade em algumas patologias como a doença de Huntington, a doença de Parkinson ou a isquémia cerebral (Loftis & Janowsky, 2003, para revisão). Uma opção alternativa para este tipo de estudos seria o recurso a modelos animais modificados geneticamente. No entanto, devido ao importante papel fisiológico das subunidades NR2A e NR2B, os ratinhos *knockout* para estas subunidades não se desenvolvem normalmente (Sprengel & Single, 1999). Apesar disso, um estudo realizado num ratinho *knockout* para a NR2A mostrou que a ausência de expressão desta subunidade conferia protecção numa situação de isquémia focal (Morikawa *et al.*, 1998).

A expressão heteróloga dos receptores NMDA em células não neuronais, que não expressam nativamente qualquer subunidade dos receptores NMDA, permite responder a questões específicas relacionadas com os subtipos dos receptores NMDA, uma vez que é possível expressar receptores NMDA de composição definida. Quando expressos nestas células, os receptores apresentam características fisiológicas e farmacológicas semelhantes às dos receptores nativos. Para além disso, a sua expressão causa toxicidade, reproduzindo

algumas características da excitotoxicidade neuronal (Lynch & Guttman, 2001; Lynch & Guttman, 2002, para revisão).

Uma possibilidade experimental alternativa para distinguir a actuação de diferentes subtipos de receptores NMDA poderá ser a utilização de ARN de interferência (ARNi), de forma a bloquear selectivamente a expressão de cada uma das subunidades dos receptores NMDA. No entanto, esta abordagem também acarreta alguns problemas. No único estudo que até ao momento usou ARNi para bloquear a expressão das subunidades dos receptores NMDA (Kim *et al.*, 2005) verificou-se que a ausência de expressão da subunidade NR2B conduziu à diminuição acentuada da expressão da subunidade NR2A. Para além disso, a localização sináptica da subunidade NR1 também diminuiu após o bloqueio da expressão da subunidade NR2B. Contrariamente, a diminuição selectiva da expressão da subunidade NR2A recorrendo ao ARNi não teve efeitos ao nível da expressão ou localização subcelular das subunidades NR1 ou NR2B, abrindo novas perspectivas para o bloqueio selectivo da expressão da subunidade NR2A (Kim *et al.*, 2005). O efeito inesperado relativo ao uso de ARNi para a subunidade NR2B causa dificuldades na interpretação dos dados resultantes do bloqueio da sua expressão, sugerindo que a abordagem farmacológica continua a ser a melhor estratégia para bloquear selectivamente esta subunidade.

Após a transfecção de receptores NMDA em células HEK293 avaliou-se a eficiência de transfecção de cada um dos subtipos NR1/NR2A e NR1/NR2B (Fig. 8 e 9). Verificou-se que, nas nossas condições, estes subtipos de receptores eram expressos com igual eficiência, permitindo um estudo comparativo entre as duas linhas celulares. Quarenta e oito horas após a expressão dos subtipos dos receptores NMDA observou-se uma diminuição significativa da viabilidade em células HEK293 que expressavam o subtipo NR1/NR2A, comparativamente ao subtipo NR1/NR2B. Esta perda de viabilidade foi parcialmente prevenida pelo MK-801, um antagonista dos receptores NMDA (Fig. 10 e 11), reproduzindo resultados anteriores de outros grupos (Anegawa *et al.*, 1995; Anegawa *et al.*, 2000; Boeckman & Aizenman, 1996; Cik *et al.*, 1993; Cik *et al.*, 1994; Raymond *et al.*, 1996; Varney *et al.*, 1996). Como este antagonista apenas bloqueia os receptores NMDA quando o canal associado aos receptores se encontra aberto, pode-se inferir do efeito protector do MK-801 que os receptores NMDA expressos nestas células se encontravam activos. Adicionalmente, a exposição a NMDA e glicina induziu um aumento dos níveis intracelulares de cálcio apenas em células HEK293 transfectadas (Fig. 17),

permitindo verificar que a expressão em linhas celulares não neuronais reproduzia também algumas das propriedades fisiológicas dos subtipos NR1/NR2A e NR1/NR2B.

Os efeitos resultantes da exposição de $A\beta_{1-40}$ variaram de acordo com o método usado para a determinação de viabilidade celular, redução de MTT (Fig. 10) ou libertação de LDH (Fig. 11), uma vez que estes testes avaliam diferentes parâmetros celulares. O peptídeo $A\beta_{1-40}$, *per se*, induziu uma diminuição estatisticamente significativa da capacidade de redução de MTT, baseado principalmente na redução deste composto por desidrogenases citosólicas e mitocondriais das células HEK293 (Fig. 10) (Mosmann, 1983). No entanto, nas mesmas condições experimentais, o peptídeo $A\beta_{1-40}$ não alterou significativamente a permeabilidade membranar (Fig. 11), os níveis intracelulares de ATP (Fig. 13) ou a activação de caspases ou calpaínas (Fig. 14 e 15). É possível que a diminuição da capacidade redutora das células após exposição ao peptídeo $A\beta_{1-40}$ se tenha devido a um efeito directo do peptídeo nestes processos enzimáticos ou a um aumento da exocitose dos cristais de formazan (Abe & Saito, 1998; Liu & Schubert, 1997).

Pela análise dos resultados de viabilidade obtidos através da redução de MTT (Fig. 10) verificou-se que a toxicidade induzida por $A\beta_{1-40}$ era semelhante em células que expressavam NR1/NR2A ou NR1/NR2B. Esta toxicidade parece ser a soma dos estímulos tóxicos da expressão dos receptores e o efeito do $A\beta_{1-40}$ nas células controlo, não indicando uma clara potenciação da excitotoxicidade pelo peptídeo $A\beta_{1-40}$. No entanto, o antagonista MK-801 preveniu de forma mais pronunciada a perda da capacidade redutora em células que expressavam o subtipo NR1/NR2A (Fig. 10). Por outro lado, embora o peptídeo $A\beta_{1-40}$ não tenha induzido danos na membrana plasmática em células que expressavam NR1-GFP, um receptor não-funcional, ou em células HEK^{NR1/NR2B}, o peptídeo induziu um aumento da permeabilidade membranar em células HEK^{NR1/NR2A} (Fig. 11). Estes resultados foram confirmados pela detecção de um maior número de células em suspensão após exposição a $A\beta_{1-40}$ em células HEK^{NR1/NR2A} (Fig. 12). A exposição ao peptídeo $A\beta_{1-40}$ também teve como consequência uma diminuição dos níveis energéticos das células que expressavam o subtipo NR1/NR2A (Fig. 13). Estes dados indicam que, nas nossas condições experimentais, a toxicidade associada aos receptores NMDA após a exposição ao peptídeo $A\beta_{1-40}$ ocorre selectivamente pelo subtipo NR1/NR2A.

Diferentes vias de entrada de cálcio, tais como os receptores NMDA, receptores AMPA/KA permeáveis a cálcio e canais de cálcio dependentes de voltagem estão implicados na morte celular excitotóxica. O influxo excessivo de cálcio após a estimulação prolongada dos receptores NMDA resulta na incapacidade das células manterem a homeostasia intracelular de cálcio, através de uma deficiente extrusão de cálcio pelo trocador sódio/cálcio (Andreeva *et al.*, 1991; Mattson *et al.*, 1989; White & Reynolds, 1995) ou pela Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática ou do RE (Carafoli, 1991) e/ou pela incapacidade de sequestração de cálcio pela mitocôndria (Gunter *et al.*, 1994; Pozzan *et al.*, 1994). Nas nossas condições, a exposição ao peptídeo $\text{A}\beta_{1-40}$ induziu um aumento dos níveis intracelulares de cálcio após a estimulação dos receptores NR1/NR2A (Fig. 17), indiciando que a morte celular poderá ser devida à desregulação da homeostasia intracelular do cálcio nestas células. Curiosamente, nas células que expressavam NR1/NR2B expostas ao peptídeo $\text{A}\beta_{1-40}$ observou-se uma diminuição dos níveis intracelulares de cálcio após estimulação dos receptores. Estes dados parecem sugerir uma dualidade de actuação do $\text{A}\beta_{1-40}$ na modulação dos receptores NMDA, potenciando a actividade do subtipo NR1/NR2A e diminuindo a actividade do subtipo NR1/NR2B.

Várias enzimas intracelulares são activadas pelo aumento dos níveis intracelulares de cálcio, pelo que vários mecanismos têm sido implicados no processo de excitotoxicidade. De entre as várias proteases activadas por cálcio, tem sido dada grande importância às calpaínas, cuja actividade aumenta após a activação dos receptores de glutamato (Lankiewicz *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 1991; Minger *et al.*, 1998). A activação de calpaínas tem como resultado a clivagem de proteínas estruturais e a degradação do citosqueleto dos neurónios (Siman & Noszek, 1988). Para além disso, as calpaínas poderão direccionar a forma de morte para necrose através da prevenção da activação de caspases (Bizat *et al.*, 2003b; Lankiewicz *et al.*, 2000). O aumento dos níveis intracelulares de cálcio observado após a estimulação do subtipo NR1/NR2A em células pré-expostas ao peptídeo $\text{A}\beta_{1-40}$ (Fig. 17) indiciou uma possível activação das calpaínas pois estudos de outros autores demonstraram que a entrada de cálcio pelo canal associado ao subtipo NR1/NR2A era mais eficiente na activação de calpaínas do que o influxo de cálcio pelo subtipo NR1/NR2B (Simpkins *et al.*, 2003). No entanto, não detectamos actividade proteolítica das calpaínas após exposição a $\text{A}\beta$ em células HEK^{NR1/NR2A} (Fig. 15), sugerindo que nestas condições a morte celular não envolve a activação de calpaínas.

Embora haja evidências da ocorrência de morte celular por apoptose na DA (Cotman & Anderson, 1995; Li *et al.*, 1997b; Yang *et al.*, 1998), no nosso modelo tal não foi observado. A ausência de morte celular com características apoptóticas (Fig. 14 e 16), associada à perda de integridade membranar (Fig. 11), demonstra que, nas nossas condições, o peptídeo A β ₁₋₄₀ potenciou a morte celular com características necróticas, associada a um déficit do metabolismo energético (Fig. 13). Este resultado reproduz o paradigma excitotóxico clássico que se supõe que ocorra na DA. É no entanto pouco provável que a explicação para este facto seja a ausência de mecanismos apoptóticos na linha celular HEK293, uma vez que outros autores verificaram a activação de componentes da via apoptótica nestas células (Arden & Betenbaugh, 2004; Zeron *et al.*, 2001). De facto, num estudo anterior foram observadas características apoptóticas após a expressão do subtipo NR1/NR2B e de huntingtina mutante com uma expansão de 138 glutaminas, responsável pela neurodegenerescência que ocorre na doença de Huntington (Zeron *et al.*, 2001). No referido estudo, embora a expressão de huntingtina mutante tivesse potenciado ligeiramente a morte celular após a expressão do subtipo NR1/NR2A, não foram observadas evidências de apoptose (Zeron *et al.*, 2001). No seu conjunto, estes dados parecem sugerir que a activação excessiva de NR1/NR2B poderá induzir processos de morte por apoptose, enquanto que a activação do subtipo NR1/NR2A mediará preferencialmente o processo de morte por necrose.

Em culturas primárias de hipocampo, verificou-se que o influxo de cálcio através dos receptores NMDA com localização sináptica, compostos pelas subunidades NR1 e NR2B, promovia a morte neuronal necrótica, envolvendo a perda do potencial de membrana mitocondrial e a alteração da permeabilidade membranar. Contrariamente, o influxo de cálcio através de receptores NMDA localizados nas sinapses, compostos predominantemente pelas subunidades NR1 e NR2A, teve efeitos anti-apoptóticos através da indução da expressão de BDNF (do inglês, *brain derived neurotrophic factor*) mediada pelo CREB (do inglês, *cAMP response element binding protein*) (Hardingham *et al.*, 2002). Desta forma, enquanto a activação da subunidade NR2B parece ter um papel definido na indução de morte celular, por apoptose ou necrose, a activação da subunidade NR2A possui efeitos opostos, podendo induzir processos de morte celular necrótica ou promover a viabilidade celular.

Uma via envolvida na morte neuronal excitotóxica decorrente do aumento dos níveis intracelulares de cálcio é a activação da NOS, mais concretamente a isoforma neuronal (nNOS). Esta enzima é activada por cálcio através dos receptores de glutamato (Garthwaite *et al.*, 1989; Gunasekar *et al.*, 1995). O papel citotóxico do NO, o produto da actividade da nNOS, na excitotoxicidade está relacionado com a formação de ONOO⁻, que resulta da reacção espontânea entre NO e O₂⁻ (Lipton *et al.*, 1993). De facto, *in vivo*, o peptídeo Aβ₁₋₄₀ induz neurotoxicidade por um mecanismo dependente da activação de receptores NMDA e que envolveu a produção de NO (Parks *et al.*, 2001). A activação da nNOS também potenciou a morte neuronal induzida por activação de receptores TrkB e esta toxicidade foi mediada pela subunidade NR2A (Choi *et al.*, 2004). Neste estudo, os autores observaram um aumento da fosforilação de resíduos de Tyr das subunidades NR2A e NR2B, sugerindo um aumento da actividade dos receptores NMDA. Assim, estes resultados indicam que, apesar de haver um aumento da actividade de receptores compostos pelas subunidades NR2A e NR2B, a morte celular pode ser mediada apenas pela subunidade NR2A. Curiosamente, a morte celular que ocorreu no estudo referido (Choi *et al.*, 2004) teve características necróticas, como a alteração da integridade membranar, o que está de acordo com os resultados obtidos no nosso estudo, evidenciando o processo de morte por necrose na toxicidade mediada pela subunidade NR2A.

Tendo em conta os resultados publicados por Choi e colaboradores (2004) poder-se-á considerar que o peptídeo Aβ₁₋₄₀ induziu a alteração da fosforilação da subunidade NR2A potenciando a sua toxicidade. De facto, as subunidades NR2A e NR2B dos receptores NMDA são fosforiladas por cinases de Ser/Thr e por cinases de Tyr (Fig. 6), podendo ter como resultado o aumento da actividade dos receptores (Ali & Salter, 2001; Salter & Kalia, 2004). Por exemplo, verificou-se anteriormente que a Cdk5 aumentava as correntes electrofisiológicas de receptores NMDA recombinantes através da fosforilação da subunidade NR2A no resíduo Ser1232. Contrariamente, a inibição da Cdk5 endógena, ou a interrupção da interacção entre a Cdk5 e a subunidade NR2A, abolia a fosforilação no resíduo Ser1232 protegendo os neurónios piramidais da região CA1 do hipocampo dum insulto isquémico (Wang *et al.*, 2003). Esta associação entre a Cdk5 e a subunidade NR2A na mediação de morte celular é muito interessante pois esta enzima desempenha um papel importante na patogenia da DA (Lee & Tsai, 2003, para revisão). A Cdk5 é a principal cinase responsável pela hiperfosforilação da proteína tau, conduzindo à formação das

tranças neurofibrilares, uma das características histopatológicas da DA (Alvarez *et al.*, 1999; Patrick *et al.*, 1999). Apesar da fosforilação da subunidade NR2A pela Cdk5 não ter sido demonstrada nas nossas condições, não podemos excluir esta possibilidade, pois a Cdk5 é expressa nativamente em células HEK293 (Zheng *et al.*, 2002).

O aumento da concentração intracelular de cálcio também poderá levar à activação da Cdk5 de forma indirecta. Tal como outras enzimas dependentes de ciclina, a activação da Cdk5 está dependente da ligação a um co-factor, que no caso da Cdk5 é o p35 ou o p39. O p35 pode ser clivado num fragmento menor, o p25, que activa de forma mais prolongada a Cdk5. Ao contrário do p35, o p25 induz neurotoxicidade e encontra-se em níveis elevados nos cérebros de pacientes de Alzheimer (Patrick *et al.*, 1999). Curiosamente, as calpaínas são as enzimas responsáveis pela clivagem do p35 em p25 e a sua actividade também se encontra aumentada na DA, principalmente junto às tranças neurofibrilares (Adamec *et al.*, 2002; Grynspan *et al.*, 1997; Iwamoto *et al.*, 1991; Lee & Tsai, 2003). É interessante notar que em neurónios expostos a glutamato e A β ₂₅₋₃₅ foi observado um aumento da marcação de tranças neurofibrilares (Mattson *et al.*, 1992), indiciando um aumento da fosforilação da tau nestas condições. Poder-se-á então colocar a hipótese de que o peptídeo A β induz um aumento da concentração intracelular de cálcio devido à sobreactivação dos receptores NMDA, nomeadamente os compostos pela subunidade NR2A, conduzindo à activação de calpaínas. Estas por sua vez clivam o p35 em p25, levando à activação sustentada da Cdk5. O resultado da activação excessiva da Cdk5 é a hiperfosforilação da tau e o aumento da fosforilação e actividade dos receptores NMDA compostos pela subunidade NR2A, num ciclo que terminará, eventualmente, na morte neuronal. Embora neste estudo não tenha sido observada a activação de calpaínas, é possível que esta via ocorra na DA tendo em conta os dados descritos anteriormente.

A expressão dos receptores NMDA é regulada durante o desenvolvimento, ocorrendo um aumento da expressão da subunidade NR2A e uma diminuição de NR2B nas primeiras semanas de vida (Kutsuwada *et al.*, 1992; Monyer *et al.*, 1994; Portera-Cailliau *et al.*, 1996; Sheng *et al.*, 1994). No cérebro adulto coexistem receptores NMDA compostos por mais do que uma subunidade NR2, nomeadamente NR2A e NR2B (Chazot & Stephenson, 1997; Luo *et al.*, 1997; Sheng *et al.*, 1994). Estes dados sugerem que a subunidade NR2A é incorporada em subtipos de receptores compostos por NR1/NR2A/NR2B, enquanto que durante o desenvolvimento embrionário predomina o subtipo NR1/NR2B. Os subtipos de

receptores NR1/NR2A/NR2B têm propriedades farmacológicas únicas híbridas dos receptores NR1/NR2A e NR1/NR2B (Vicini *et al.*, 1998). Tendo em conta os nossos resultados, é possível que a subunidade NR2A confira a estes subtipos de receptores propriedades excitotóxicas que poderão ser importantes na DA, mediando a morte selectiva dos neurónios ricos em subtipos NR1/NR2A ou NR1/NR2A/NR2B. No entanto, existem na literatura dados relativamente opostos no que diz respeito à expressão das subunidades NR2A e NR2B na DA. Foi descrito anteriormente uma diminuição da expressão de receptores NR2B no hipocampo de doentes de Alzheimer, enquanto a expressão de NR2A se mantinha inalterada (Mishizen-Eberz *et al.*, 2004), indicando a morte selectiva dos neurónios que expressavam a subunidade NR2B no hipocampo. No entanto, outro estudo refere que, em regiões cerebrais susceptíveis na DA, ocorre uma diminuição da expressão de NR2A e de NR2B (Hynd *et al.*, 2004). Por outro lado, Sze e colaboradores (Sze *et al.*, 2001) relataram que no hipocampo ocorre um decréscimo da subunidade NR2B e no córtex ocorre um decréscimo das subunidades NR2A e NR2B. Deste modo, é possível que diferentes áreas cerebrais afectadas na DA possam ser diferencialmente susceptíveis, de acordo com a composição e/ou distribuição de subtipos de receptores NMDA.

Neste trabalho, os dados obtidos em células HEK293 transfectadas sugerem que diferentes subtipos dos receptores NMDA poderão ter um papel diferencial na toxicidade celular que ocorre na DA. Estas evidências deverão ser aprofundadas no futuro através da utilização de modelos neuronais. É também fundamental que sejam desenvolvidos antagonistas selectivos para a subunidade NR2A. Este facto, por si só, iria impulsionar o estudo nesta área, permitindo avaliar o efeito neuroprotector do bloqueio deste subtipo específico em várias doenças neurodegenerativas, incluindo a DA.

VI. REFERÊNCIAS

- Abe K, Saito H (1998) Amyloid beta protein inhibits cellular MTT reduction not by suppression of mitochondrial succinate dehydrogenase but by acceleration of MTT formazan exocytosis in cultured rat cortical astrocytes. *Neurosci Res* 31:295-305.
- Abraham CR, Selkoe DJ, Potter H (1988) Immunochemical identification of the serine protease inhibitor alpha 1-antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Cell* 52:487-501.
- Adamec E, Mohan P, Vonsattel JP, Nixon RA (2002) Calpain activation in neurodegenerative diseases: confocal immunofluorescence study with antibodies specifically recognizing the active form of calpain 2. *Acta Neuropathol (Berl)* 104:92-104.
- Agostinho P, Oliveira CR (2003) Involvement of calcineurin in the neurotoxic effects induced by amyloid-beta and prion peptides. *Eur J Neurosci* 17:1189-1196.
- Akama KT, Van Eldik LJ (2000) Beta-amyloid stimulation of inducible nitric-oxide synthase in astrocytes is interleukin-1beta- and tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha)-dependent, and involves a TNFalpha receptor-associated factor- and NFkappaB-inducing kinase-dependent signaling mechanism. *J Biol Chem* 275:7918-7924.
- Ali DW, Salter MW (2001) NMDA receptor regulation by Src kinase signalling in excitatory synaptic transmission and plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 11:336-342.
- Allen YS, Devanathan PH, Owen GP (1995) Neurotoxicity of beta-amyloid protein: cytochemical changes and apoptotic cell death investigated in organotypic cultures. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 22:370-371.
- Almeida S, Domingues A, Rodrigues L, Oliveira CR, Rego AC (2004) FK506 prevents mitochondrial-dependent apoptotic cell death induced by 3-nitropropionic acid in rat primary cortical cultures. *Neurobiol Dis* 17:435-444.
- Alvarez A, Toro R, Caceres A, Maccioni RB (1999) Inhibition of tau phosphorylating protein kinase cdk5 prevents beta-amyloid-induced neuronal death. *FEBS Lett* 459:421-6.
- Anandatheerthavarada HK, Biswas G, Robin MA, Avadhani NG (2003) Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. *J Cell Biol* 161:41-54.
- Anantharam V, Panchal RG, Wilson A, Kolchine VV, Treistman SN, Bayley H (1992) Combinatorial RNA splicing alters the surface charge on the NMDA receptor. *FEBS Lett* 305:27-30.
- Andreeva N, Khodorov B, Stelmashook E, Cragoe E Jr, Victorov I (1991) Inhibition of Na⁺/Ca²⁺ exchange enhances delayed neuronal death elicited by glutamate in cerebellar granule cell cultures. *Brain Res* 548:322-325.
- Anegawa NJ, Guttman RP, Grant ER, Anand R, Lindstrom J, Lynch DR (2000) N-Methyl-D-aspartate receptor mediated toxicity in nonneuronal cell lines: characterization using fluorescent measures of cell viability and reactive oxygen species production. *Brain Res Mol Brain Res* 77:163-75.
- Anegawa NJ, Lynch DR, Verdoorn TA, Pritchett DB (1995) Transfection of N-methyl-D-aspartate receptors in a nonneuronal cell line leads to cell death. *J Neurochem* 64:2004-12.
- Anson LC, Chen PE, Wyllie DJ, Colquhoun D, Schoepfer R (1998) Identification of amino acid residues of the NR2A subunit that control glutamate potency in recombinant NR1/NR2A NMDA receptors. *J Neurosci* 18:581-589.

- Arai H, Lee VM, Otvos L, Jr., Greenberg BD, Lowery DE, Sharma SK, Schmidt ML, Trojanowski JQ (1990) Defined neurofilament, tau, and beta-amyloid precursor protein epitopes distinguish Alzheimer from non-Alzheimer senile plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2249-2253.
- Arden N, Betenbaugh MJ (2004) Life and death in mammalian cell culture: strategies for apoptosis inhibition. *Trends Biotechnol* 22:174-180.
- Arias C, Arrieta I, Tapia R (1995) beta-Amyloid peptide fragment 25-35 potentiates the calcium-dependent release of excitatory amino acids from depolarized hippocampal slices. *J Neurosci Res* 41:561-566.
- Artal-Sanz M, Tavernarakis N (2005) Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration. *FEBS Lett* 579:3287-3296.
- Attwell D, Barbour B, Szatkowski M (1993) Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron* 11:401-407.
- Ball MJ, Fisman M, Hachinski V, Blume W, Fox A, Kral VA, Kirshen AJ, Fox H, Merskey H (1985) A new definition of Alzheimer's disease: a hippocampal dementia. *Lancet* 1:14-16.
- Barnham KJ, McKinstry WJ, Multhaup G, Galatis D, Morton CJ, Curtain CC, Williamson NA, White AR, Hinds MG, Norton RS, Beyreuther K, Masters CL, Parker MW, Cappai R (2003) Structure of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein copper binding domain. A regulator of neuronal copper homeostasis. *J Biol Chem* 278:17401-17407.
- Bartus RT, Dean RL, III, Beer B, Lippa AS (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217:408-414.
- Beal MF (1992) Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *FASEB J* 6:3338-3344.
- Behr P, Stern P, Wyllie DJ, Nassar M, Schoepfer R, Colquhoun D (1995) Determination of NMDA NR1 subunit copy number in recombinant NMDA receptors. *Proc Biol Sci* 262:205-213.
- Behl C, Davis JB, Klier FG, Schubert D (1994a) Amyloid beta peptide induces necrosis rather than apoptosis. *Brain Res* 645:253-264.
- Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D (1994b) Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 77:817-827.
- Benke D, Honer M, Heckendorn R, Pozza MF, Allgeier H, Angst C, Mohler H (1999) [3H]CGP 61594, the first photoaffinity ligand for the glycine site of NMDA receptors. *Neuropharmacology* 38:233-242.
- Bird TD, Sumi SM, Nemens EJ, Nochlin D, Schellenberg G, Lampe TH, Sadovnick A, Chui H, Miner GW, Tinklenberg J (1989) Phenotypic heterogeneity in familial Alzheimer's disease: a study of 24 kindreds. *Ann Neurol* 25:12-25.
- Bizat N, Hermel JM, Boyer F, Jacquard C, Creminon C, Ouary S, Escartin C, Hantraye P, Kajewski S, Brouillet E (2003a) Calpain is a major cell death effector in selective striatal degeneration induced in vivo by 3-nitropropionate: implications for Huntington's disease. *J Neurosci* 23:5020-5030.
- Bizat N, Hermel JM, Humbert S, Jacquard C, Creminon C, Escartin C, Saudou F, Krajewski S, Hantraye P, Brouillet E (2003b) In vivo calpain/caspase cross-talk during 3-nitropropionic acid-induced striatal degeneration: implication of a calpain-mediated cleavage of active caspase-3. *J Biol Chem* 278:43245-43253.
- Blevins T, Mirshahi T, Woodward JJ (1995) Increased agonist and antagonist sensitivity of N-methyl-D-aspartate stimulated calcium flux in cultured neurons following chronic ethanol exposure. *Neurosci Lett* 200:214-218.

- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.
- Boeckman FA, Aizenman E (1996) Pharmacological properties of acquired excitotoxicity in Chinese hamster ovary cells transfected with N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J Pharmacol Exp Ther* 279:515-523.
- Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA (1995) Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7162-7166.
- Borchelt DR, Ratovitski T, van LJ, Lee MK, Gonzales V, Jenkins NA, Copeland NG, Price DL, Sisodia SS (1997) Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* 19:939-945.
- Bossy-Wetzel E, Schwarzenbacher R, Lipton SA (2004a) Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med* 10 Suppl:S2-S9.
- Bossy-Wetzel E, Talantova MV, Lee WD, Scholzke MN, Harrop A, Mathews E, Gotz T, Han J, Ellisman MH, Perkins GA, Lipton SA (2004b) Crosstalk between nitric oxide and zinc pathways to neuronal cell death involving mitochondrial dysfunction and p38-activated K⁺ channels. *Neuron* 41:351-365.
- Bowen DM, Smith CB, White P, Flack RH, Carrasco LH, Gedye JL, Davison AN (1977) Chemical pathology of this organic dementias. II. Quantitative estimation of cellular changes in post-mortem brains. *Brain* 100:427-453.
- Braak H, Braak E, Bohl J (1993) Staging of Alzheimer-related cortical destruction. *Eur Neurol* 33:403-408.
- Brorson JR, Marcuccilli CJ, Miller RJ (1995) Delayed antagonism of calpain reduces excitotoxicity in cultured neurons. *Stroke* 26:1259-1266.
- Bruce AJ, Malfroy B, Baudry M (1996) beta-Amyloid toxicity in organotypic hippocampal cultures: protection by EUK-8, a synthetic catalytic free radical scavenger. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2312-2316.
- Budd SL (1998) Mechanisms of neuronal damage in brain hypoxia/ischemia: focus on the role of mitochondrial calcium accumulation. *Pharmacol Ther* 80:203-229.
- Budd SL, Tenneti L, Lishnak T, Lipton SA (2000) Mitochondrial and extramitochondrial apoptotic signaling pathways in cerebrocortical neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6161-6166.
- Busciglio J, Lorenzo A, Yankner BA (1992) Methodological variables in the assessment of beta amyloid neurotoxicity. *Neurobiol Aging* 13:609-612.
- Bush AI (2002) Metal complexing agents as therapies for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 23:1031-1038.
- Bush AI, Multhaup G, Moir RD, Williamson TG, Small DH, Rumble B, Pollwein P, Beyreuther K, Masters CL (1993) 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.
- Bush AI, Pettingell WH, Multhaup G, Paradis M, Vonsattel JP, Gusella JF, Beyreuther K, Masters CL, Tanzi RE (1994) Rapid induction of Alzheimer A beta amyloid formation by zinc. *Science* 265:1464-1467.
- Butterfield DA, Pocernich CB (2003) The glutamatergic system and Alzheimer's disease: therapeutic implications. *CNS Drugs* 17:641-652.

- Cadenas E, Davies KJ (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 29:222-230.
- Cai J, Jones DP (1998) Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J Biol Chem* 273:11401-11404.
- Cai J, Wallace DC, Zhivotovsky B, Jones DP (2000) Separation of cytochrome c-dependent caspase activation from thiol-disulfide redox change in cells lacking mitochondrial DNA. *Free Radic Biol Med* 29:334-342.
- Cai XD, Golde TE, Younkin SG (1993) Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor. *Science* 259:514-516.
- Calligaro DO, O'Malley PJ, Monn JA (1993) beta-Amyloid (25-35) or substance P stimulates [³H]MK-801 binding to rat cortical membranes in the presence of glutamate and glycine. *J Neurochem* 60:2297-2303.
- Canevari L, Clark JB, Bates TE (1999) beta-Amyloid fragment 25-35 selectively decreases complex IV activity in isolated mitochondria. *FEBS Lett* 457:131-134.
- Carafoli E (1991) Calcium pump of the plasma membrane. *Physiol Rev* 71:129-153.
- Cardoso SM, Proenca MT, Santos S, Santana I, Oliveira CR (2004) Cytochrome c oxidase is decreased in Alzheimer's disease platelets. *Neurobiol Aging* 25:105-110.
- Cardoso SM, Santos S, Swerdlow RH, Oliveira CR (2001) Functional mitochondria are required for amyloid beta-mediated neurotoxicity. *FASEB J* 15:1439-1441.
- Casley CS, Canevari L, Land JM, Clark JB, Sharpe MA (2002a) Beta-amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities. *J Neurochem* 80:91-100.
- Casley CS, Land JM, Sharpe MA, Clark JB, Duchen MR, Canevari L (2002b) Beta-amyloid fragment 25-35 causes mitochondrial dysfunction in primary cortical neurons. *Neurobiol Dis* 10:258-267.
- Castagne V, Gautschi M, Lefevre K, Posada A, Clarke PG (1999) Relationships between neuronal death and the cellular redox status. Focus on the developing nervous system. *Prog Neurobiol* 59:397-423.
- Castilho RF, Kowaltowski AJ, Meinicke AR, Bechara EJ, Vercesi AE (1995) Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca²⁺ ions is stimulated by t-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. *Free Radic Biol Med* 18:479-486.
- Chan SL, Mayne M, Holden CP, Geiger JD, Mattson MP (2000) Presenilin-1 mutations increase levels of ryanodine receptors and calcium release in PC12 cells and cortical neurons. *J Biol Chem* 275:18195-18200.
- Chandra J, Samali A, Orrenius S (2000) Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 29:323-333.
- Chapman PF, White GL, Jones MW, Cooper-Blacketer D, Marshall VJ, Irizarry M, Younkin L, Good MA, Bliss TV, Hyman BT, Younkin SG, Hsiao KK (1999) Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci* 2:271-276.
- Chartier-Harlin MC, Crawford F, Hamandi K, Mullan M, Goate A, Hardy J, Backhovens H, Martin JJ, Broeckhoven CV (1991) Screening for the beta-amyloid precursor protein mutation (APP717: Val---Ile) in extended pedigrees with early onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 129:134-135.

- Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, Cui J, Tu S, Sevarino KA, Nakanishi N, Tong G, Lipton SA, Zhang D (2002) Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 415:793-8.
- Chazot PL, Coleman SK, Cik M, Stephenson FA (1994) Molecular characterization of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in mammalian cells yields evidence for the coexistence of three subunit types within a discrete receptor molecule. *J Biol Chem* 269:24403-24409.
- Chazot PL, Stephenson FA (1997) Molecular dissection of native mammalian forebrain NMDA receptors containing the NR1 C2 exon: direct demonstration of NMDA receptors comprising NR1, NR2A, and NR2B subunits within the same complex. *J Neurochem* 69:2138-44.
- Chen N, Luo T, Wellington C, Metzler M, McCutcheon K, Hayden MR, Raymond LA (1999) Subtype-specific enhancement of NMDA receptor currents by mutant huntingtin. *J Neurochem* 72:1890-1898.
- Cherny RA, Atwood CS, Xilinas ME, Gray DN, Jones WD, McLean CA, Barnham KJ, Volitakis I, Fraser FW, Kim Y, Huang X, Goldstein LE, Moir RD, Lim JT, Beyreuther K, Zheng H, Tanzi RE, Masters CL, Bush AI (2001) Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits beta-amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neuron* 30:665-676.
- Choi SY, Hwang JJ, Koh JY (2004) NR2A induction and NMDA receptor-dependent neuronal death by neurotrophin-4/5 in cortical cell culture. *J Neurochem* 88:708-716.
- Ciabarra AM, Sullivan JM, Gahn LG, Pecht G, Heinemann S, Sevarino KA (1995) Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. *J Neurosci* 15:6498-6508.
- Cik M, Chazot PL, Stephenson FA (1993) Optimal expression of cloned NMDAR1/NMDAR2A heteromeric glutamate receptors: a biochemical characterization. *Biochem J* 296 (Pt 3):877-883.
- Cik M, Chazot PL, Stephenson FA (1994) Expression of NMDAR1-1a (N598Q)/NMDAR2A receptors results in decreased cell mortality. *Eur J Pharmacol* 266:R1-R3.
- Citron M (2004a) Beta-secretase inhibition for the treatment of Alzheimer's disease--promise and challenge. *Trends Pharmacol Sci* 25:92-97.
- Citron M (2004b) Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 5:677-685.
- Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ (1992) Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360:672-674.
- Citron M, et al. (1997) Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med* 3:67-72.
- Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, Ashe KH (2005) Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* 8:79-84.
- Cohen GM (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326 (Pt 1):1-16.
- Constantine-Paton M (1990) NMDA receptor as a mediator of activity-dependent synaptogenesis in the developing brain. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 55:431-443.
- Cotman CW, Anderson AJ (1995) A potential role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 10:19-45.

- Cowburn RF, Messamore E, Li ML, Winblad B, Sundstrom E (1994) beta-Amyloid related peptides exert differential effects on [3H]MK-801 binding to rat cortical membranes. *Neuroreport* 5:405-408.
- Cowburn RF, Wiehager B, Trief E, Li-Li M, Sundstrom E (1997) Effects of beta-amyloid-(25-35) peptides on radioligand binding to excitatory amino acid receptors and voltage-dependent calcium channels: evidence for a selective affinity for the glutamate and glycine recognition sites of the NMDA receptor. *Neurochem Res* 22:1437-1442.
- Cullen WK, Wu J, Anwyl R, Rowan MJ (1996) beta-Amyloid produces a delayed NMDA receptor-dependent reduction in synaptic transmission in rat hippocampus. *Neuroreport* 8:87-92.
- Cummings BJ, Cotman CW (1995) Image analysis of beta-amyloid load in Alzheimer's disease and relation to dementia severity. *Lancet* 346:1524-1528.
- Curtain CC, Ali F, Volitakis I, Cherny RA, Norton RS, Beyreuther K, Barrow CJ, Masters CL, Bush AI, Barnham KJ (2001) 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.
- Das S, Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Takasu M, Crandall JE, Dikkes P, Conner DA, Rayudu PV, Cheung W, Chen HS, Lipton SA, Nakanishi N (1998) Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature* 393:377-381.
- Dawson TM, Dawson VL (1996) Free radicals and neuronal cell death. *Cell Death Differ* 3:71-78.
- Dawson VL, Dawson TM (2004) Deadly conversations: nuclear-mitochondrial cross-talk. *J Bioenerg Biomembr* 36:287-294.
- Dawson VL, Dawson TM, London ED, Brecht DS, Snyder SH (1991) Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:6368-6371.
- De Strooper B (2003) Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* 38:9-12.
- De Strooper B, Annaert W (2000) Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci* 113 (Pt 11):1857-1870.
- De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, Von FK, Van LF (1998) Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391:387-390.
- Dickson DW, Crystal HA, Mattiace LA, Masur DM, Blau AD, Davies P, Yen SH, Aronson MK (1992) Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiol Aging* 13:179-189.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7-61.
- Dong J, Atwood CS, Anderson VE, Siedlak SL, Smith MA, Perry G, Carey PR (2003) Metal binding and oxidation of amyloid-beta within isolated senile plaque cores: Raman microscopic evidence. *Biochemistry* 42:2768-2773.
- Durand GM, Bennett MV, Zukin RS (1993) Splice variants of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 identify domains involved in regulation by polyamines and protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6731-6735.

- Durand GM, Gregor P, Zheng X, Bennett MV, Uhl GR, Zukin RS (1992) Cloning of an apparent splice variant of the rat N-methyl-D-aspartate receptor NMDAR1 with altered sensitivity to polyamines and activators of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:9359-9363.
- Eckman CB, Mehta ND, Crook R, Perez-Tur J, Prihar G, Pfeiffer E, Graff-Radford N, Hinder P, Yager D, Zenk B, Refolo LM, Prada CM, Younkin SG, Hutton M, Hardy J (1997) A new pathogenic mutation in the APP gene (I716V) increases the relative proportion of A beta 42(43). *Hum Mol Genet* 6:2087-2089.
- Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesold B, Steiner H, Haass C (2003) Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol* 5:486-488.
- Ehlers MD, Fung ET, O'Brien RJ, Huganir RL (1998) Splice variant-specific interaction of the NMDA receptor subunit NR1 with neuronal intermediate filaments. *J Neurosci* 18:720-730.
- El Khoury J, Hickman SE, Thomas CA, Cao L, Silverstein SC, Loike JD (1996) Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. *Nature* 382:716-719.
- Ermak G, Davies KJ (2002) Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol Immunol* 38:713-721.
- Farzan M, Schnitzler CE, Vasilieva N, Leung D, Choe H (2000) 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.
- Ferreiro E, Oliveira CR, Pereira C (2004) Involvement of endoplasmic reticulum Ca²⁺ release through ryanodine and inositol 1,4,5-triphosphate receptors in the neurotoxic effects induced by the amyloid-beta peptide. *J Neurosci Res* 76:872-880.
- Francis PT, Sims NR, Procter AW, Bowen DM (1993) Cortical pyramidal neurone loss may cause glutamatergic hypoactivity and cognitive impairment in Alzheimer's disease: investigative and therapeutic perspectives. *J Neurochem* 60:1589-1604.
- Fukuyama R, Wadhvani KC, Galdzicki Z, Rapoport SI, Ehrenstein G (1994) beta-Amyloid polypeptide increases calcium-uptake in PC12 cells: a possible mechanism for its cellular toxicity in Alzheimer's disease. *Brain Res* 667:269-272.
- Funato H, Yoshimura M, Kusui K, Tamaoka A, Ishikawa K, Ohkoshi N, Namekata K, Okeda R, Ihara Y (1998) Quantitation of amyloid beta-protein (A beta) in the cortex during aging and in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 152:1633-1640.
- Garthwaite J, Garthwaite G, Palmer RM, Moncada S (1989) NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur J Pharmacol* 172:413-416.
- Gasparini L, Ongini E, Wenk G (2004) Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in Alzheimer's disease: old and new mechanisms of action. *J Neurochem* 91:521-536.
- Glenner GG, Wong CW (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120:885-890.
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, . (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349:704-706.
- Golde TE (2003) Alzheimer disease therapy: can the amyloid cascade be halted? *J Clin Invest* 111:11-8.

- Goodman Y, Bruce AJ, Cheng B, Mattson MP (1996) Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid beta-peptide toxicity in hippocampal neurons. *J Neurochem* 66:1836-1844.
- Goodman Y, Mattson MP (1994a) Secreted forms of beta-amyloid precursor protein protect hippocampal neurons against amyloid beta-peptide-induced oxidative injury. *Exp Neurol* 128:1-12.
- Goodman Y, Mattson MP (1994b) Staurosporine and K-252 compounds protect hippocampal neurons against amyloid beta-peptide toxicity and oxidative injury. *Brain Res* 650:170-174.
- Goodman Y, Steiner MR, Steiner SM, Mattson MP (1994) Nordihydroguaiaretic acid protects hippocampal neurons against amyloid beta-peptide toxicity, and attenuates free radical and calcium accumulation. *Brain Res* 654:171-176.
- Gordon-Krajcer W, Salinska E, Lazarewicz JW (2002) N-methyl-d-aspartate receptor-mediated processing of beta-amyloid precursor protein in rat hippocampal slices: in vitro--superfusion study. *Folia Neuropathol* 40:13-17.
- Grant ER, Bacskai BJ, Anegawa NJ, Pleasure DE, Lynch DR (1998) Opposing contributions of NR1 and NR2 to protein kinase C modulation of NMDA receptors. *J Neurochem* 71:1471-1481.
- Grant ER, Bacskai BJ, Pleasure DE, Pritchett DB, Gallagher MJ, Kendrick SJ, Kricka LJ, Lynch DR (1997) N-methyl-D-aspartate receptors expressed in a nonneuronal cell line mediate subunit-specific increases in free intracellular calcium. *J Biol Chem* 272:647-56.
- Grant SG, O'Dell TJ (2001) Multiprotein complex signaling and the plasticity problem. *Curr Opin Neurobiol* 11:363-8.
- Gray CW, Patel AJ (1995) Neurodegeneration mediated by glutamate and beta-amyloid peptide: a comparison and possible interaction. *Brain Res* 691:169-179.
- Greenamyre JT (1986) The role of glutamate in neurotransmission and in neurologic disease. *Arch Neurol* 43:1058-1063.
- Greenamyre JT, Penney JB, Young AB, D'Amato CJ, Hicks SP, Shoulson I (1985) Alterations in L-glutamate binding in Alzheimer's and Huntington's diseases. *Science* 227:1496-1499.
- Greenamyre JT, Young AB (1989) Excitatory amino acids and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 10:593-602.
- Grilli M, Diodato E, Lozza G, Brusa R, Casarini M, Uberti D, Rozmahel R, Westaway D, St George-Hyslop P, Memo M, Ongini E (2000) Presenilin-1 regulates the neuronal threshold to excitotoxicity both physiologically and pathologically. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12822-12827.
- Grynspan F, Griffin WR, Cataldo A, Katayama S, Nixon RA (1997) Active site-directed antibodies identify calpain II as an early-appearing and pervasive component of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain Res* 763:145-158.
- Gschwind M, Huber G (1995) Apoptotic cell death induced by beta-amyloid 1-42 peptide is cell type dependent. *J Neurochem* 65:292-300.
- Gunasekar PG, Kanthasamy AG, Borowitz JL, Isom GE (1995) NMDA receptor activation produces concurrent generation of nitric oxide and reactive oxygen species: implication for cell death. *J Neurochem* 65:2016-2021.
- Gunter TE, Gunter KK, Sheu SS, Gavin CE (1994) Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *Am J Physiol* 267:C313-C339.

- Guo Q, Fu W, Sopher BL, Miller MW, Ware CB, Martin GM, Mattson MP (1999) Increased vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic necrosis in presenilin-1 mutant knock-in mice. *Nat Med* 5:101-106.
- Guo Y, Srinivasula SM, Druilhe A, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (2002) Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J Biol Chem* 277:13430-13437.
- Gurtu V, Kain SR, Zhang G (1997) Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Anal Biochem* 251:98-102.
- Haass C, Hung AY, Selkoe DJ, Teplow DB (1994) Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid beta-protein precursor. *J Biol Chem* 269:17741-17748.
- Haass C, Lemere CA, Capell A, Citron M, Seubert P, Schenk D, Lannfelt L, Selkoe DJ (1995) The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat Med* 1:1291-1296.
- Haass C, Steiner H (2002) Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases. *Trends Cell Biol* 12:556-562.
- Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H (2002) Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 5:405-14.
- Hardy J (1997) Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 20:154-159.
- Hardy J, Allsop D (1991) Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 12:383-388.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353-356.
- Harkany T, Abraham I, Timmerman W, Laskay G, Toth B, Sasvari M, Konya C, Sebens JB, Korf J, Nyakas C, Zarandi M, Soos K, Penke B, Luiten PG (2000) beta-amyloid neurotoxicity is mediated by a glutamate-triggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis. *Eur J Neurosci* 12:2735-2745.
- Harkany T, Mulder J, Sasvari M, Abraham I, Konya C, Zarandi M, Penke B, Luiten PG, Nyakas C (1999) N-Methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 and radical scavengers protect cholinergic nucleus basalis neurons against beta-amyloid neurotoxicity. *Neurobiol Dis* 6:109-121.
- Harris ME, Carney JM, Cole PS, Hensley K, Howard BJ, Martin L, Bummer P, Wang Y, Pedigo NW, Jr., Butterfield DA (1995) beta-Amyloid peptide-derived, oxygen-dependent free radicals inhibit glutamate uptake in cultured astrocytes: implications for Alzheimer's disease. *Neuroreport* 6:1875-1879.
- Harris ME, Wang Y, Pedigo NW, Jr., Hensley K, Butterfield DA, Carney JM (1996) Amyloid beta peptide (25-35) inhibits Na⁺-dependent glutamate uptake in rat hippocampal astrocyte cultures. *J Neurochem* 67:277-286.
- Hawkins LM, Chazot PL, Stephenson FA (1999) Biochemical evidence for the co-association of three N-methyl-D-aspartate (NMDA) R2 subunits in recombinant NMDA receptors. *J Biol Chem* 274:27211-27218.
- Hayes RL, Wang KK, Kampfl A, Posmantur RM, Newcomb JK, Clifton GL (1998) Potential contribution of proteases to neuronal damage. *Drug News Perspect* 11:215-222.

- Hilbich C, Kisters-Woike B, Reed J, Masters CL, Beyreuther K (1991) Aggregation and secondary structure of synthetic amyloid beta A4 peptides of Alzheimer's disease. *J Mol Biol* 218:149-163.
- Hirai H, Kirsch J, Laube B, Betz H, Kuhse J (1996) The glycine binding site of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1: identification of novel determinants of co-agonist potentiation in the extracellular M3-M4 loop region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6031-6036.
- Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS, Johnson AB, Kress Y, Vinters HV, Tabaton M, Shimohama S, Cash AD, Siedlak SL, Harris PL, Jones PK, Petersen RB, Perry G, Smith MA (2001) Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21:3017-3023.
- Hollmann M, Boulter J, Maron C, Beasley L, Sullivan J, Pecht G, Heinemann S (1993) Zinc potentiates agonist-induced currents at certain splice variants of the NMDA receptor. *Neuron* 10:943-954.
- Hu J, Akama KT, Krafft GA, Chromy BA, Van Eldik LJ (1998) Amyloid-beta peptide activates cultured astrocytes: morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release. *Brain Res* 785:195-206.
- Huang X, Cuajungco MP, Atwood CS, Hartshorn MA, Tyndall JD, Hanson GR, Stokes KC, Leopold M, Multhaup G, Goldstein LE, Scarpa RC, Saunders AJ, Lim J, Moir RD, Glabe C, Bowden EF, Masters CL, Fairlie DP, Tanzi RE, Bush AI (1999) Cu(II) potentiation of alzheimer abeta neurotoxicity. Correlation with cell-free hydrogen peroxide production and metal reduction. *J Biol Chem* 274:37111-37116.
- Husi H, Ward MA, Choudhary JS, Blackstock WP, Grant SG (2000) Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. *Nat Neurosci* 3:661-9.
- Hussain I, Powell D, Howlett DR, Tew DG, Meek TD, Chapman C, Gloger IS, Murphy KE, Southan CD, Ryan DM, Smith TS, Simmons DL, Walsh FS, Dingwall C, Christie G (1999) Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci* 14:419-427.
- Hutton M, et al. (1998a) Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393:702-705.
- Hutton M, Perez-Tur J, Hardy J (1998b) Genetics of Alzheimer's disease. *Essays Biochem* 33:117-131.
- Hyman BT, Van Hoesen GW, Kromer LJ, Damasio AR (1986) Perforant pathway changes and the memory impairment of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 20:472-481.
- Hynd MR, Scott HL, Dodd PR (2004) Differential expression of N-methyl-D-aspartate receptor NR2 isoforms in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 90:913-919.
- Ihara Y, Nukina N, Miura R, Ogawara M (1986) Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J Biochem (Tokyo)* 99:1807-1810.
- Ikonomovic MD, Mizukami K, Warde D, Sheffield R, Hamilton R, Wenthold RJ, Armstrong DM (1999) Distribution of glutamate receptor subunit NMDAR1 in the hippocampus of normal elderly and patients with Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 160:194-204.
- Ishii T, Moriyoshi K, Sugihara H, Sakurada K, Kadotani H, Yokoi M, Akazawa C, Shigemoto R, Mizuno N, Masu M, . (1993) Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J Biol Chem* 268:2836-2843.
- Iversen LL, Mortishire-Smith RJ, Pollack SJ, Shearman MS (1995) The toxicity in vitro of beta-amyloid protein. *Biochem J* 311 (Pt 1):1-16.

- Iwamoto N, Thangnipon W, Crawford C, Emson PC (1991) Localization of calpain immunoreactivity in senile plaques and in neurones undergoing neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *Brain Res* 561:177-180.
- Kagan BL, Azimov R, Azimova R (2004) Amyloid peptide channels. *J Membr Biol* 202:1-10.
- Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S, Malinow R (2003) APP processing and synaptic function. *Neuron* 37:925-37.
- Katzman R, Terry R, DeTeresa R, Brown T, Davies P, Fuld P, Renbing X, Peck A (1988) Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. *Ann Neurol* 23:138-144.
- Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG (2003) Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300:486-489.
- Kemp JA, McKernan RM (2002) NMDA receptor pathways as drug targets. *Nat Neurosci* 5 Suppl:1039-1042.
- Kennedy MB (2000) Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science* 290:750-754.
- Kennedy MB, Manzerra P (2001) Telling tails. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12323-12324.
- Kim MJ, Dunah AW, Wang YT, Sheng M (2005) Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in Ras-ERK signaling and AMPA receptor trafficking. *Neuron* 46:745-760.
- Kirkinetzos IG, Moraes CT (2001) Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Semin Cell Dev Biol* 12:449-457.
- Klegeris A, McGeer PL (1997) beta-amyloid protein enhances macrophage production of oxygen free radicals and glutamate. *J Neurosci Res* 49:229-235.
- Koh JY, Yang LL, Cotman CW (1990) Beta-amyloid protein increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage. *Brain Res* 533:315-320.
- Koistinaho M, Ort M, Cimadevilla JM, Vondrous R, Cordell B, Koistinaho J, Bures J, Higgins LS (2001) Specific spatial learning deficits become severe with age in beta -amyloid precursor protein transgenic mice that harbor diffuse beta -amyloid deposits but do not form plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14675-14680.
- Koltchine VV, Anantharam V, Bayley H, Treistman SN (1996) Alternative splicing of the NMDAR1 subunit affects modulation by calcium. *Brain Res Mol Brain Res* 39:99-108.
- Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ (1986) Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4044-4048.
- Kruman I, Bruce-Keller AJ, Bredesen D, Waeg G, Mattson MP (1997) Evidence that 4-hydroxynonenal mediates oxidative stress-induced neuronal apoptosis. *J Neurosci* 17:5089-5100.
- Kusiak JW, Izzo JA, Zhao B (1996) Neurodegeneration in Alzheimer disease. Is apoptosis involved? *Mol Chem Neuropathol* 28:153-162.
- Kutsuwada T, Kashiwabuchi N, Mori H, Sakimura K, Kushiya E, Araki K, Meguro H, Masaki H, Kumanishi T, Arakawa M, . (1992) Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature* 358:36-41.

- LaFerla FM (2002) Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 3:862-72.
- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6448-6453.
- Lambert MP, Stevens G, Sabo S, Barber K, Wang G, Wade W, Krafft G, Snyder S, Holzman TF, Klein WL (1994) Beta/A4-evoked degeneration of differentiated SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Neurosci Res* 39:377-385.
- Landwehrmeyer GB, Standaert DG, Testa CM, Penney JB, Jr., Young AB (1995) NMDA receptor subunit mRNA expression by projection neurons and interneurons in rat striatum. *J Neurosci* 15:5297-5307.
- Lankiewicz S, Marc LC, Truc BN, Krohn AJ, Poppe M, Cole GM, Saido TC, Prehn JH (2000) Activation of calpain I converts excitotoxic neuron death into a caspase-independent cell death. *J Biol Chem* 275:17064-17071.
- Lassus P, Opitz-Araya X, Lazebnik Y (2002) Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science* 297:1352-1354.
- Laube B, Hirai H, Sturgess M, Betz H, Kuhse J (1997) Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron* 18:493-503.
- Laurie DJ, Putzke J, Zieglansberger W, Seeburg PH, Tolle TR (1995) The distribution of splice variants of the NMDAR1 subunit mRNA in adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 32:94-108.
- Le DA, Lipton SA (2001) Potential and current use of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonists in diseases of aging. *Drugs Aging* 18:717-724.
- Le WD, Colom LV, Xie WJ, Smith RG, Alexianu M, Appel SH (1995) Cell death induced by beta-amyloid 1-40 in MES 23.5 hybrid clone: the role of nitric oxide and NMDA-gated channel activation leading to apoptosis. *Brain Res* 686:49-60.
- Lee HC, Wei YH (2000) Mitochondrial role in life and death of the cell. *J Biomed Sci* 7:2-15.
- Lee HG, Zhu X, O'Neill MJ, Webber K, Casadesus G, Marlatt M, Raina AK, Perry G, Smith MA (2004) The role of metabotropic glutamate receptors in Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 64:89-98.
- Lee KS, Frank S, Vanderklish P, Arai A, Lynch G (1991) Inhibition of proteolysis protects hippocampal neurons from ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7233-7237.
- Lee MS, Tsai LH (2003) Cdk5: one of the links between senile plaques and neurofibrillary tangles? *J Alzheimers Dis* 5:127-137.
- Lee VM, Trojanowski JQ (1999) Neurodegenerative tauopathies: human disease and transgenic mouse models. *Neuron* 24:507-510.
- Leissring MA, Akbari Y, Fanger CM, Cahalan MD, Mattson MP, LaFerla FM (2000a) Capacitative calcium entry deficits and elevated luminal calcium content in mutant presenilin-1 knockin mice. *J Cell Biol* 149:793-798.
- Leissring MA, Yamasaki TR, Wasco W, Buxbaum JD, Parker I, Laferla FM (2000b) Calsenilin reverses presenilin-mediated enhancement of calcium signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8590-8593.

- Leist M, Jaattela M (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:589-598.
- Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, . (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269:973-977.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94:491-501.
- Li S, Mallory M, Alford M, Tanaka S, Masliah E (1997a) Glutamate transporter alterations in Alzheimer disease are possibly associated with abnormal APP expression. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:901-911.
- Li WP, Chan WY, Lai HW, Yew DT (1997b) Terminal dUTP nick end labeling (TUNEL) positive cells in the different regions of the brain in normal aging and Alzheimer patients. *J Mol Neurosci* 8:75-82.
- Lin JW, Wyszynski M, Madhavan R, Sealock R, Kim JU, Sheng M (1998) Yotiao, a novel protein of neuromuscular junction and brain that interacts with specific splice variants of NMDA receptor subunit NR1. *J Neurosci* 18:2017-2027.
- Lipton SA (1994) HIV-related neuronal injury. Potential therapeutic intervention with calcium channel antagonists and NMDA antagonists. *Mol Neurobiol* 8:181-196.
- Lipton SA (2004) Failures and Successes of NMDA Receptor Antagonists: Molecular Basis for the Use of Open-Channel Blockers like Memantine in the Treatment of Acute and Chronic Neurologic Insults. *NeuroRx* 1:101-110.
- Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS (1993) A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364:626-632.
- Lipton SA, Rosenberg PA (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330:613-622.
- Liu X, Li P, Widlak P, Zou H, Luo X, Garrard WT, Wang X (1998) The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8461-8466.
- Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89:175-184.
- Liu X, Zou H, Widlak P, Garrard W, Wang X (1999) Activation of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease). Oligomerization and direct interaction with histone H1. *J Biol Chem* 274:13836-13840.
- Liu Y, Schubert D (1997) Cytotoxic amyloid peptides inhibit cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction by enhancing MTT formazan exocytosis. *J Neurochem* 69:2285-2293.
- Loftis JM, Janowsky A (2003) The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications. *Pharmacol Ther* 97:55-85.
- Loo DT, Copani A, Pike CJ, Whittemore ER, Walencewicz AJ, Cotman CW (1993) Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7951-7955.
- Lorenzo A, Yankner BA (1994) Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12243-12247.

- Lu WY, Jackson MF, Bai D, Orser BA, MacDonald JF (2000) In CA1 pyramidal neurons of the hippocampus protein kinase C regulates calcium-dependent inactivation of NMDA receptors. *J Neurosci* 20:4452-4461.
- Lucassen PJ, Chung WC, Kamphorst W, Swaab DF (1997) DNA damage distribution in the human brain as shown by in situ end labeling; area-specific differences in aging and Alzheimer disease in the absence of apoptotic morphology. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:887-900.
- Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, Rogers J (1999) Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 155:853-862.
- Luetjens CM, Bui NT, Sengpiel B, Munstermann G, Poppe M, Krohn AJ, Bauerbach E, Krieglstein J, Prehn JH (2000) Delayed mitochondrial dysfunction in excitotoxic neuron death: cytochrome c release and a secondary increase in superoxide production. *J Neurosci* 20:5715-5723.
- Luo J, Wang Y, Yasuda RP, Dunah AW, Wolfe BB (1997) The majority of N-methyl-D-aspartate receptor complexes in adult rat cerebral cortex contain at least three different subunits (NR1/NR2A/NR2B). *Mol Pharmacol* 51:79-86.
- Lynch DR, Gallagher MJ, Lenz S, Aneqawa NJ, Grant EL (1997) Pharmacology of Recombinant NMDA Receptors: Possible Mechanisms for NMDA Receptor Heterogeneity. In: *The Ionotropic Glutamate Receptors* (Monaghan D, Wenthold RJ, eds), pp 325-348. Totowa, 6 NJ: Humana Press Inc.
- Lynch DR, Guttman RP (2001) NMDA receptor pharmacology: perspectives from molecular biology. *Curr Drug Targets* 2:215-231.
- Lynch DR, Guttman RP (2002) Excitotoxicity: perspectives based on N-methyl-D-aspartate receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 300:717-723.
- Lynch T, Sano M, Marder KS, Bell KL, Foster NL, Defendini RF, Sima AA, Keohane C, Nygaard TG, Fahn S, . (1994) Clinical characteristics of a family with chromosome 17-linked disinhibition-dementia-parkinsonism-amyotrophy complex. *Neurology* 44:1878-1884.
- Manelli AM, Puttfarcken PS (1995) beta-Amyloid-induced toxicity in rat hippocampal cells: in vitro evidence for the involvement of free radicals. *Brain Res Bull* 38:569-576.
- Mann DM, Esiri MM (1989) The pattern of acquisition of plaques and tangles in the brains of patients under 50 years of age with Down's syndrome. *J Neurol Sci* 89:169-179.
- Mark RJ, Hensley K, Butterfield DA, Mattson MP (1995) Amyloid beta-peptide impairs ion-motive ATPase activities: evidence for a role in loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis and cell death. *J Neurosci* 15:6239-6249.
- Mark RJ, Keller JN, Kruman I, Mattson MP (1997) Basic FGF attenuates amyloid beta-peptide-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and impairment of Na⁺/K⁺-ATPase activity in hippocampal neurons. *Brain Res* 756:205-214.
- Marshall J, Molloy R, Moss GW, Howe JR, Hughes TE (1995) The jellyfish green fluorescent protein: a new tool for studying ion channel expression and function. *Neuron* 14:211-5.
- Masliah E, Alford M, DeTeresa R, Mallory M, Hansen L (1996) Deficient glutamate transport is associated with neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 40:759-766.
- Masliah E, Mallory M, Alford M, Tanaka S, Hansen LA (1998) Caspase dependent DNA fragmentation might be associated with excitotoxicity in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:1041-1052.

- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:4245-4249.
- Matsuda K, Fletcher M, Kamiya Y, Yuzaki M (2003) Specific assembly with the NMDA receptor 3B subunit controls surface expression and calcium permeability of NMDA receptors. *J Neurosci* 23:10064-10073.
- Matsuda K, Kamiya Y, Matsuda S, Yuzaki M (2002) Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B: a dominant subunit that reduces calcium permeability. *Brain Res Mol Brain Res* 100:43-52.
- Mattson MP (1995) Untangling the pathophysiochemistry of beta-amyloid. *Nat Struct Biol* 2:926-928.
- Mattson MP (1997) Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev* 77:1081-1132.
- Mattson MP (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430:631-639.
- Mattson MP, Chan SL (2001) Dysregulation of cellular calcium homeostasis in Alzheimer's disease: bad genes and bad habits. *J Mol Neurosci* 17:205-224.
- Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE (1992) beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci* 12:376-89.
- Mattson MP, Guthrie PB, Kater SB (1989) A role for Na⁺-dependent Ca²⁺ extrusion in protection against neuronal excitotoxicity. *FASEB J* 3:2519-2526.
- Mattson MP, Tomaselli KJ, Rydel RE (1993) Calcium-destabilizing and neurodegenerative effects of aggregated beta-amyloid peptide are attenuated by basic FGF. *Brain Res* 621:35-49.
- McBain CJ, Mayer ML (1994) N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol Rev* 74:723-760.
- McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL (1999) Soluble pool of Aβ amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 46:860-866.
- Mecocci P, MacGarvey U, Beal MF (1994) Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 36:747-751.
- Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otvos L, Jr., Baron P, Villalba M, Ferrari D, Rossi F (1995) Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature* 374:647-650.
- Meguro H, Mori H, Araki K, Kushiya E, Kutsuwada T, Yamazaki M, Kumanishi T, Arakawa M, Sakimura K, Mishina M (1992) Functional characterization of a heteromeric NMDA receptor channel expressed from cloned cDNAs. *Nature* 357:70-74.
- Meldrum B (1990) Protection against ischaemic neuronal damage by drugs acting on excitatory neurotransmission. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 2:27-57.
- Meldrum BS (1992) Excitatory amino acid receptors and disease. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 5:508-513.
- Michaelis EK (1998) Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol* 54:369-415.

- Miguel-Hidalgo JJ, Alvarez XA, Cacabelos R, Quack G (2002) Neuroprotection by memantine against neurodegeneration induced by beta-amyloid(1-40). *Brain Res* 958:210-221.
- Minger SL, Geddes JW, Holtz ML, Craddock SD, Whiteheart SW, Siman RG, Pettigrew LC (1998) Glutamate receptor antagonists inhibit calpain-mediated cytoskeletal proteolysis in focal cerebral ischemia. *Brain Res* 810:181-199.
- Mishizen-Eberz AJ, Rissman RA, Carter TL, Ikonovic MD, Wolfe BB, Armstrong DM (2004) Biochemical and molecular studies of NMDA receptor subunits NR1/2A/2B in hippocampal subregions throughout progression of Alzheimer's disease pathology. *Neurobiol Dis* 15:80-92.
- Mody I, MacDonald JF (1995) NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca²⁺ release. *Trends Pharmacol Sci* 16:356-359.
- Moechars D, Dewachter I, Lorent K, Reverse D, Baekelandt V, Naidu A, Tesseur I, Spittaels K, Haute CV, Checler F, Godaux E, Cordell B, Van LF (1999) Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J Biol Chem* 274:6483-6492.
- Moechars D, Lorent K, De SB, Dewachter I, Van LF (1996) Expression in brain of amyloid precursor protein mutated in the alpha-secretase site causes disturbed behavior, neuronal degeneration and premature death in transgenic mice. *EMBO J* 15:1265-1274.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529-40.
- Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH (1992) Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256:1217-1221.
- Moreira P, Pereira C, Santos MS, Oliveira C (2000) Effect of zinc ions on the cytotoxicity induced by the amyloid beta-peptide. *Antioxid Redox Signal* 2:317-325.
- Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen P, DiCarlo G, Wilcock D, Connor K, Hatcher J, Hope C, Gordon M, Arendash GW (2000) A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 408:982-985.
- Morikawa E, Mori H, Kiyama Y, Mishina M, Asano T, Kirino T (1998) Attenuation of focal ischemic brain injury in mice deficient in the epsilon1 (NR2A) subunit of NMDA receptor. *J Neurosci* 18:9727-9732.
- Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S (1991) Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 354:31-37.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63.
- Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L (2000) High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* 20:4050-4058.
- Murray FE, Landsberg JP, Williams RJ, Esiri MM, Watt F (1992) Elemental analysis of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease using proton-induced X-ray analysis. *Ciba Found Symp* 169:201-210.
- Murrell J, Farlow M, Ghetti B, Benson MD (1991) A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science* 254:97-99.

- Nakamura H, Nemenoff RA, Gronich JH, Bonventre JV (1991) Subcellular characteristics of phospholipase A2 activity in the rat kidney. Enhanced cytosolic, mitochondrial, and microsomal phospholipase A2 enzymatic activity after renal ischemia and reperfusion. *J Clin Invest* 87:1810-1818.
- Nakanishi N, Axel R, Shneider NA (1992) Alternative splicing generates functionally distinct N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8552-8556.
- Naruse S, Thinakaran G, Luo JJ, Kusiak JW, Tomita T, Iwatsubo T, Qian X, Ginty DD, Price DL, Borchelt DR, Wong PC, Sisodia SS (1998) Effects of PS1 deficiency on membrane protein trafficking in neurons. *Neuron* 21:1213-1221.
- Nicotera P, Melino G (2004) Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene* 23:2757-2765.
- Niethammer M, Kim E, Sheng M (1996) Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J Neurosci* 16:2157-2163.
- Nishi M, Hinds H, Lu HP, Kawata M, Hayashi Y (2001) Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner. *J Neurosci* 21:RC185.
- Nixon RA, Saito KI, Grynspan F, Griffin WR, Katayama S, Honda T, Mohan PS, Shea TB, Beermann M (1994) Calcium-activated neutral proteinase (calpain) system in aging and Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 747:77-91.
- Noda M, Nakanishi H, Akaike N (1999) Glutamate release from microglia via glutamate transporter is enhanced by amyloid-beta peptide. *Neuroscience* 92:1465-1474.
- Nussbaum RL, Ellis CE (2003) Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med* 348:1356-1364.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron* 39:409-421.
- Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P (2003) Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:552-565.
- Palmer AM, Gershon S (1990) Is the neuronal basis of Alzheimer's disease cholinergic or glutamatergic? *FASEB J* 4:2745-2752.
- Pang Z, Bondada V, Sengoku T, Siman R, Geddes JW (2003) Calpain facilitates the neuron death induced by 3-nitropropionic acid and contributes to the necrotic morphology. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:633-643.
- Parks JK, Smith TS, Trimmer PA, Bennett JP, Jr., Parker WD, Jr. (2001) Neurotoxic A β peptides increase oxidative stress in vivo through NMDA-receptor and nitric-oxide-synthase mechanisms, and inhibit complex IV activity and induce a mitochondrial permeability transition in vitro. *J Neurochem* 76:1050-1056.
- Parsons CG, Danysz W, Quack G (1999) Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist--a review of preclinical data. *Neuropharmacology* 38:735-767.
- Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la MS, Dikkes P, Tsai LH (1999) Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402:615-622.

- Pearson RC, Esiri MM, Hiorns RW, Wilcock GK, Powell TP (1985) Anatomical correlates of the distribution of the pathological changes in the neocortex in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:4531-4534.
- Pereira C, Ferreira C, Carvalho C, Oliveira C (1996) Contribution of plasma membrane and endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPases to the synaptosomal [Ca²⁺]_i increase during oxidative stress. *Brain Res* 713:269-277.
- Pereira C, Santos MS, Oliveira C (1998) Mitochondrial function impairment induced by amyloid beta-peptide on PC12 cells. *Neuroreport* 9:1749-55.
- Pereira C, Santos MS, Oliveira C (1999) Involvement of oxidative stress on the impairment of energy metabolism induced by A beta peptides on PC12 cells: protection by antioxidants. *Neurobiol Dis* 6:209-219.
- Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW (1993) Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J Neurosci* 13:1676-1687.
- Pike CJ, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW (1991) In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res* 563:311-314.
- Pitschke M, Prior R, Haupt M, Riesner D (1998) Detection of single amyloid beta-protein aggregates in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's patients by fluorescence correlation spectroscopy. *Nat Med* 4:832-834.
- Podlisny MB, Ostaszewski BL, Squazzo SL, Koo EH, Rydell RE, Teplow DB, Selkoe DJ (1995) Aggregation of secreted amyloid beta-protein into sodium dodecyl sulfate-stable oligomers in cell culture. *J Biol Chem* 270:9564-9570.
- Podlisny MB, Walsh DM, Amarante P, Ostaszewski BL, Stimson ER, Maggio JE, Teplow DB, Selkoe DJ (1998) Oligomerization of endogenous and synthetic amyloid beta-protein at nanomolar levels in cell culture and stabilization of monomer by Congo red. *Biochemistry* 37:3602-3611.
- Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ (1996) N-methyl-D-aspartate receptor proteins NR2A and NR2B are differentially distributed in the developing rat central nervous system as revealed by subunit-specific antibodies. *J Neurochem* 66:692-700.
- Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, Meldolesi J (1994) Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev* 74:595-636.
- Premkumar LS, Auerbach A (1997) Stoichiometry of recombinant N-methyl-D-aspartate receptor channels inferred from single-channel current patterns. *J Gen Physiol* 110:485-502.
- Rameau GA, Akaneya Y, Chiu L, Ziff EB (2000) Role of NMDA receptor functional domains in excitatory cell death. *Neuropharmacology* 39:2255-66.
- Raymond CR, Ireland DR, Abraham WC (2003) NMDA receptor regulation by amyloid-beta does not account for its inhibition of LTP in rat hippocampus. *Brain Res* 968:263-272.
- Raymond LA, Moshaver A, Tingley WG, Haganir RL (1996) Glutamate receptor ion channel properties predict vulnerability to cytotoxicity in a transfected nonneuronal cell line. *Mol Cell Neurosci* 7:102-115.
- Rego AC, Oliveira CR (2003) Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochem Res* 28:1563-1574.

- Rintoul GL, Raymond LA, Baimbridge KG (2001) Calcium buffering and protection from excitotoxic cell death by exogenous calbindin-D28k in HEK 293 cells. *Cell Calcium* 29:277-287.
- Ritchie CW, Bush AI, Mackinnon A, Macfarlane S, Mastwyk M, MacGregor L, Kiers L, Cherny R, Li QX, Tammer A, Carrington D, Mavros C, Volitakis I, Xilinas M, Ames D, Davis S, Beyreuther K, Tanzi RE, Masters CL (2003) Metal-protein attenuation with iodochlorhydroxyquin (clioquinol) targeting Abeta amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease: a pilot phase 2 clinical trial. *Arch Neurol* 60:1685-1691.
- Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T, . (1995) Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376:775-778.
- Rogers J, Cooper NR, Webster S, Schultz J, McGeer PL, Styren SD, Civin WH, Brachova L, Bradt B, Ward P, . (1992) Complement activation by beta-amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10016-10020.
- Rogers J, Morrison JH (1985) Quantitative morphology and regional and laminar distributions of senile plaques in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 5:2801-2808.
- Roher AE, Lowenson JD, Clarke S, Woods AS, Cotter RJ, Gowing E, Ball MJ (1993) beta-Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10836-10840.
- Rosenmund C, Stern-Bach Y, Stevens CF (1998) The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science* 280:1596-1599.
- Rossjohn J, Cappai R, Feil SC, Henry A, McKinstry WJ, Galatis D, Hesse L, Multhaup G, Beyreuther K, Masters CL, Parker MW (1999) Crystal structure of the N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein. *Nat Struct Biol* 6:327-331.
- Salter MW, Kalia LV (2004) Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. *Nat Rev Neurosci* 5:317-328.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Das S, Cui J, Talantova MV, Wong HK, Gong X, Chan SF, Zhang D, Nakanishi N, Sucher NJ, Lipton SA (2002) Characterization and comparison of the NR3A subunit of the NMDA receptor in recombinant systems and primary cortical neurons. *J Neurophysiol* 87:2052-2063.
- Sastry PS, Rao KS (2000) Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem* 74:1-20.
- Scheuner D, et al. (1996) Secreted amyloid beta-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* 2:864-870.
- Scott SA, Dekosky ST, Sparks DL, Knox CA, Scheff SW (1992) Amygdala cell loss and atrophy in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 32:555-563.
- Selkoe DJ (1989) Biochemistry of altered brain proteins in Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci* 12:463-490.
- Selkoe DJ (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298:789-791.
- Sheng M, Cummings J, Roldan LA, Jan YN, Jan LY (1994) Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* 368:144-147.

- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, . (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375:754-760.
- Siman R, Noszek JC (1988) Excitatory amino acids activate calpain I and induce structural protein breakdown in vivo. *Neuron* 1:279-287.
- Simpkins KL, Guttman RP, Dong Y, Chen Z, Sokol S, Neumar RW, Lynch DR (2003) Selective activation induced cleavage of the NR2B subunit by calpain. *J Neurosci* 23:11322-11331.
- Singleton A, Myers A, Hardy J (2004) The law of mass action applied to neurodegenerative disease: a hypothesis concerning the etiology and pathogenesis of complex diseases. *Hum Mol Genet* 13 Spec No 1:R123-R126.
- Sinha S, et al. (1999) Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402:537-540.
- Sisodia SS, St George-Hyslop PH (2002) gamma-Secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in? *Nat Rev Neurosci* 3:281-290.
- Spillantini MG, Goedert M (1998) Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 21:428-433.
- Sprengel R, Single FN (1999) Mice with genetically modified NMDA and AMPA receptors. *Ann N Y Acad Sci* 868:494-501.
- Standaert DG, Landwehrmeyer GB, Kerner JA, Penney JB, Jr., Young AB (1996) Expression of NMDAR2D glutamate receptor subunit mRNA in neurochemically identified interneurons in the rat neostriatum, neocortex and hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 42:89-102.
- Stewart WF, Kawas C, Corrada M, Metter EJ (1997) Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use. *Neurology* 48:626-632.
- Sucher NJ, Akbarian S, Chi CL, Leclerc CL, Awobuluyi M, Deitcher DL, Wu MK, Yuan JP, Jones EG, Lipton SA (1995) Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain. *J Neurosci* 15:6509-6520.
- Sugihara H, Moriyoshi K, Ishii T, Masu M, Nakanishi S (1992) Structures and properties of seven isoforms of the NMDA receptor generated by alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* 185:826-832.
- Suzuki A (1997) Amyloid beta-protein induces necrotic cell death mediated by ICE cascade in PC12 cells. *Exp Cell Res* 234:507-511.
- Sze C, Bi H, Kleinschmidt-DeMasters BK, Filley CM, Martin LJ (2001) N-Methyl-D-aspartate receptor subunit proteins and their phosphorylation status are altered selectively in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 182:151-159.
- Takadera T, Sakura N, Mohri T, Hashimoto T (1993) Toxic effect of a beta-amyloid peptide (beta 22-35) on the hippocampal neuron and its prevention. *Neurosci Lett* 161:41-44.
- Takahashi A, Camacho P, Lechleiter JD, Herman B (1999) Measurement of intracellular calcium. *Physiol Rev* 79:1089-1125.
- Takashima A, Noguchi K, Sato K, Hoshino T, Imahori K (1993) Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7789-7793.

- Tang MX, Redemann CT, Szoka FC, Jr. (1996) In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjug Chem* 7:703-714.
- Tenneti L, Lipton SA (2000) Involvement of activated caspase-3-like proteases in N-methyl-D-aspartate-induced apoptosis in cerebrocortical neurons. *J Neurochem* 74:134-142.
- Tominaga K, Uetsuki T, Ogura A, Yoshikawa K (1997) Glutamate responsiveness enhanced in neurones expressing amyloid precursor protein. *Neuroreport* 8:2067-72.
- Tominaga-Yoshino K, Uetsuki T, Yoshikawa K, Ogura A (2001) Neurotoxic and neuroprotective effects of glutamate are enhanced by introduction of amyloid precursor protein cDNA. *Brain Res* 918:121-30.
- Troy CM, Rabacchi SA, Friedman WJ, Frappier TF, Brown K, Shelanski ML (2000) Caspase-2 mediates neuronal cell death induced by beta-amyloid. *J Neurosci* 20:1386-1392.
- Tymianski M, Charlton MP, Carlen PL, Tator CH (1993) Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. *J Neurosci* 13:2085-2104.
- Uchihara T, Kondo H, Akiyama H, Ikeda K (1995) White matter amyloid in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol (Berl)* 90:51-56.
- Varney MA, Jachec C, Deal C, Hess SD, Daggett LP, Skvoretz R, Urcan M, Morrison JH, Moran T, Johnson EC, Velicelebi G (1996) Stable expression and characterization of recombinant human heteromeric N-methyl-D-aspartate receptor subtypes NMDAR1A/2A and NMDAR1A/2B in mammalian cells. *J Pharmacol Exp Ther* 279:367-378.
- Vassar R, et al. (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286:735-741.
- Velez-Pardo C, Arroyave ST, Lopera F, Castano AD, Jimenez Del RM (2001) Ultrastructure evidence of necrotic neural cell death in familial Alzheimer's disease brains bearing presenilin-1 E280A mutation. *J Alzheimers Dis* 3:409-415.
- Vicini S, Wang JF, Li JH, Zhu WJ, Wang YH, Luo JH, Wolfe BB, Grayson DR (1998) Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *J Neurophysiol* 79:555-66.
- Vigo-Pelfrey C, Lee D, Keim P, Lieberburg I, Schenk DB (1993) Characterization of beta-amyloid peptide from human cerebrospinal fluid. *J Neurochem* 61:1965-1968.
- Volbracht C, Fava E, Leist M, Nicotera P (2001) Calpain inhibitors prevent nitric oxide-triggered excitotoxic apoptosis. *Neuroreport* 12:3645-3648.
- Wafford KA, Bain CJ, Le BB, Whiting PJ, Kemp JA (1993) Preferential co-assembly of recombinant NMDA receptors composed of three different subunits. *Neuroreport* 4:1347-1349.
- Wafford KA, Kathoria M, Bain CJ, Marshall G, Le BB, Kemp JA, Whiting PJ (1995) Identification of amino acids in the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit that contribute to the glycine binding site. *Mol Pharmacol* 47:374-380.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416:535-539.
- Wang J, Liu S, Fu Y, Wang JH, Lu Y (2003) Cdk5 activation induces hippocampal CA1 cell death by directly phosphorylating NMDA receptors. *Nat Neurosci* 6:1039-47.

- Wang KK (2000) Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci* 23:20-26.
- Watanabe M, Inoue Y, Sakimura K, Mishina M (1992) Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport* 3:1138-1140.
- Watson AA, Fairlie DP, Craik DJ (1998) Solution structure of methionine-oxidized amyloid beta-peptide (1-40). Does oxidation affect conformational switching? *Biochemistry* 37:12700-12706.
- Watt JA, Pike CJ, Walencewicz-Wasserman AJ, Cotman CW (1994) Ultrastructural analysis of beta-amyloid-induced apoptosis in cultured hippocampal neurons. *Brain Res* 661:147-156.
- Weggen S, Eriksen JL, Das P, Sagi SA, Wang R, Pietrzik CU, Findlay KA, Smith TE, Murphy MP, Bulter T, Kang DE, Marquez-Sterling N, Golde TE, Koo EH (2001) A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature* 414:212-216.
- Weggen S, Eriksen JL, Sagi SA, Pietrzik CU, Ozols V, Fauq A, Golde TE, Koo EH (2003) Evidence that nonsteroidal anti-inflammatory drugs decrease amyloid beta 42 production by direct modulation of gamma-secretase activity. *J Biol Chem* 278:31831-31837.
- Weiss JH, Pike CJ, Cotman CW (1994) Ca²⁺ channel blockers attenuate beta-amyloid peptide toxicity to cortical neurons in culture. *J Neurochem* 62:372-375.
- Wenzel A, Fritschy JM, Mohler H, Benke D (1997) NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins. *J Neurochem* 68:469-478.
- Wenzel A, Scheurer L, Kunzi R, Fritschy JM, Mohler H, Benke D (1995) Distribution of NMDA receptor subunit proteins NR2A, 2B, 2C and 2D in rat brain. *Neuroreport* 7:45-48.
- White RJ, Reynolds IJ (1995) Mitochondria and Na⁺/Ca²⁺ exchange buffer glutamate-induced calcium loads in cultured cortical neurons. *J Neurosci* 15:1318-1328.
- Whitson JS, Appel SH (1995) Neurotoxicity of A beta amyloid protein in vitro is not altered by calcium channel blockade. *Neurobiol Aging* 16:5-10.
- Wilcock DM, DiCarlo G, Henderson D, Jackson J, Clarke K, Ugen KE, Gordon MN, Morgan D (2003) Intracranially administered anti-Abeta antibodies reduce beta-amyloid deposition by mechanisms both independent of and associated with microglial activation. *J Neurosci* 23:3745-3751.
- Wilcock DM, Munireddy SK, Rosenthal A, Ugen KE, Gordon MN, Morgan D (2004) Microglial activation facilitates Abeta plaque removal following intracranial anti-Abeta antibody administration. *Neurobiol Dis* 15:11-20.
- Williams K, Russell SL, Shen YM, Molinoff PB (1993) Developmental switch in the expression of NMDA receptors occurs in vivo and in vitro. *Neuron* 10:267-278.
- Wood JG, Mirra SS, Pollock NJ, Binder LI (1986) Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau). *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4040-4043.
- Wu J, Anwyl R, Rowan MJ (1995) beta-Amyloid selectively augments NMDA receptor-mediated synaptic transmission in rat hippocampus. *Neuroreport* 6:2409-2413.
- Yang F, Sun X, Beech W, Teter B, Wu S, Sigel J, Vinters HV, Frautschy SA, Cole GM (1998) Antibody to caspase-cleaved actin detects apoptosis in differentiated neuroblastoma and plaque-associated neurons and microglia in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 152:379-389.

- Yankner BA (1996) Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron* 16:921-932.
- Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA (1990) Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 250:279-282.
- Yuan J, Lipinski M, Degterev A (2003) Diversity in the mechanisms of neuronal cell death. *Neuron* 40:401-413.
- Zeron MM, Chen N, Moshaver A, Lee AT, Wellington CL, Hayden MR, Raymond LA (2001) Mutant huntingtin enhances excitotoxic cell death. *Mol Cell Neurosci* 17:41-53.
- Zeron MM, Hansson O, Chen N, Wellington CL, Leavitt BR, Brundin P, Hayden MR, Raymond LA (2002) Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron* 33:849-60.
- Zheng YL, Li BS, Amin ND, Albers W, Pant HC (2002) A peptide derived from cyclin-dependent kinase activator (p35) specifically inhibits Cdk5 activity and phosphorylation of tau protein in transfected cells. *Eur J Biochem* 269:4427-4434.
- Zhuo M, Hawkins RD (1995) Long-term depression: a learning-related type of synaptic plasticity in the mammalian central nervous system. *Rev Neurosci* 6:259-277.
- Zou H, Li Y, Liu X, Wang X (1999) An APAF-1/cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274:11549-11556.