

# En astrocitos humanos, el estrés hipoglicémico facilita la inserción de amiloide beta (AβP [1-40]) que forma un canal de calcio no regulado.

<sup>(1)</sup>Julio Brito, <sup>(2)</sup>Juan M Alarcón, <sup>(1)</sup>Carlos Sciaraffia, <sup>(2)</sup>Eduardo Rojas.

## Resumen

Los hallazgos patológicos de la enfermedad de Alzheimer (EDA) incluyen pérdida selectiva de neuronas, numerosos depósitos extra-celulares denominados placas seniles y ovillos neurofibrilares en el cerebro de los pacientes. El principal componente de las placas seniles es un péptido de 39 a 43 aminoácidos denominado proteína beta-amiloide (AβP). Un creciente número de reportes sugiere que los elevados niveles de beta amiloide extracelular en la enfermedad de Alzheimer altera la homeostasis del calcio libre intracelular. En concordancia con resultados previos, nosotros hemos mostrado anteriormente que en las neuronas hipotalámicas expuesta al AβP [1-40], se produce la formación espontánea de canales catiónicos selectivos a través de la membrana plasmática. Esta entrada desregulada de Ca<sup>2+</sup> y Na<sup>+</sup> conduce a la apoptosis neuronal. En este estudio, cul-

tivamos astrocitos humanos (línea celular 132 1N1) con un medio de cultivo libre de Calcio y procedimos a exponer las células 132 1N1 al AβP [1-40], luego de pre-incubar en ausencia de D-glucosa o en su nivel fisiológico (5.5 mM). Encontramos y reportamos aquí que, una exposición de 15 min de los astrocitos a un medio privado de D-glucosa ocasiona una rápida entrada de Ca<sup>2+</sup>. En contraste, la utilización de la misma dosis de AβP [1-40] a las células 132 1N1 que fueron expuestas a niveles fisiológicos de D-glucosa (5.5 mM), muestra que la entrada de Ca<sup>2+</sup> y Na<sup>+</sup> se redujo sustancialmente. Ya que la hipoglicemia deteriora la síntesis de ATP, el nivel de ATP debería caer y por tanto todas las ATPasas de la membrana plasmática, tales como las bombas catiónicas, se tornarían incapaces de mantener el equilibrio del Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup>.

## Summary

The pathological hallmarks of Alzheimer's disease (AD) include selective neuronal loss, numerous extra-cellular deposits termed senile plaques, and neuro-fibril tangles in the patients brain. The major component of senile plaques is a 39- to 43-amino acid peptide termed β-amyloid protein (AβP). A growing number of reports suggest that elevated levels of extra cellular Alzheimer's β-amyloid alters the homeostasis of intracellular free calcium. In line with previous results, we have previously shown that Hypothalamic neurons exposed to AβP [1-40] leads to the spontaneous formation of cation selective channels across the plasma membrane. The unregulated Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> entry leads in to neuronal apoptosis. In this study, we loaded human astrocytes (cell line 132 1N1) with a free Calcium reporter dye and

<sup>(1)</sup>Hospital Clínico  
de la Universidad de  
Chile.

<sup>(2)</sup>Facultad de Medicina  
Universidad de Chile

*proceeded to expose the 132 1N1 cells to AβP [1-40], after pre-incubation in the absence of D-glucose or in its physiological level (5.5 mM). We found and report here that, a 15 min exposure of the astrocytes to a medium devoid of D-glucose causes a fast entry of Ca<sup>2+</sup>. By contrast, application of the same dose of AβP [1-40] to the 132 1N1 cells which were exposed to physiological levels of D-glucose (5.5 mM), Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> entry was substantially reduced. Since, hypoglycemia impairs ATP synthesis, the ATP level will drop and, therefore, all plasma membrane ATP-ases, such as cation pumps, would be unable to maintain Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> homeostasis.*

## Introducción

La Enfermedad de Alzheimer (EDA) se caracteriza por la pérdida selectiva de núcleos colinérgicos vinculados con procesos de memoria, tales como hipocampo, partes adyacentes al lóbulo temporal y núcleo basal de Meynert <sup>(1)</sup>. Característicamente, en dichas zonas existen depósitos peptídicos (ovillos neurofibrilares intracelulares y placas seniles intercelulares), en cuya composición participa invariablemente un péptido de entre 39 y 43 aminoácidos (Aas), denominado amiloide beta (AβP). Existe correlación entre el daño anatómico, el progreso del déficit colinérgico-muscarínico, y la severidad del cuadro clínico <sup>(2)</sup>.

La evidencia acumulada indica que AβP es neurotóxico, apareciendo involucrado en la mayoría de los modelos de EDA <sup>(3,4,5,6,7,8,9)</sup>. Sin embargo, y a pesar de la extensa investigación en este campo, no se conoce el mecanismo exacto que da cuenta de la capacidad tóxica del AβP <sup>(10)</sup>, pero aparentemente representa una vía final común, mediante la cual se expresan otras alteraciones asociadas a la EDA.

A partir de estudios realizados en sistemas artificiales, se ha propuesto un mecanismo molecular que explicaría la toxicidad del péptido AβP <sup>(11 a y b,8)</sup>. En estos estudios, se muestra que el péptido sintético AβP [1-40], idéntico al amiloide encontrado en los depósitos in vivo, se incorpora en bicapas planas de fosfolípidos. También se determinó que una vez incorporado en la membrana, el AβP [1-40] se agregaría formando un canal selectivo a cationes (Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> entre ellos), con conductancias de canal único

entre 10 y 5000 pS <sup>(11 a y b)</sup>. En conjunto estos resultados proporcionan una base experimental para la hipótesis de la neurotoxicidad del AβP[1-40] en la EDA <sup>(8)</sup>.

Este trabajo se basa en ese modelo; se miden las relaciones entre la presencia de AβP, el stress hipoglicémico, y la concentración citosólica de calcio.

## Materiales y Métodos

### Cultivo celular

Se cultivaron células de astrocitoma humano (línea 132 1N1) (Center for Applied Microbiology & Research), a 36,5°C, en atmósfera regulada, en el medio de cultivo: 10 % Suero fetal de bovino (Gibco), 1% Penicilina/Estreptomina (Biofluids), 2.5 mg/ml fungizona (Biofluids), todo en DMEM (Dulbecco's modified Eagles medium, Gibco). Para cada corrida experimental se utilizaron dos frascos de células crecidas hasta la semiconfluencia (aproximadamente 70% de confluencia, 4 x 10<sup>6</sup> células por frasco). En ese momento, los frascos de cultivo eran retirados de la incubadora y las células lavadas varias veces con solución Krebs normal para retirar el medio de cultivo, siendo posteriormente sometidas al protocolo de carga.

### Carga de la sonda fluorescente indo-1 AM a células 132 1N1

Se utilizó la sonda fluorescente Indo-1 AM (Molecular Probes Inc. Eugene, OR) que al unirse a calcio cambia su emisión de fluorescencia, en concentración de 5 mg/ml en solución Krebs normal de la siguiente composición (en mM): 140 NaCl, 5 KCl, 2,6 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 0.1 EGTA y 1 HEPES, el pH fue ajustado a 7.4 con NaOH (Sigma). A 5 ml de esta solución (solución de carga) se le agregó glucosa 1 g/l, mientras que a los otros 5 ml una cantidad equimolar de sacarosa (la osmolaridad de la solución con glucosa fue de 340 mOsm/l). En un frasco se cargó la sonda disuelta en una solución con glucosa y en el otro se cargó la sonda disuelta en una solución sin glucosa. Las células de ambos frascos se incuba-

ron con las soluciones respectivas durante 90 min. a temperatura ambiente (20-22 °C) en total oscuridad. La carga con el colorante fluorescente expresada en unidades arbitrarias de fluorescencia, en las células incubadas en presencia o ausencia de glucosa no fue estadísticamente diferente, respectivamente;  $1,124 \pm 0,03609$  y  $1,32485 \pm 0,09706$  ( $p < 0.05$ ).

#### Medición de calcio citosólico

El registro de fluorescencia se realizó en 1 ml de células en suspensión (aproximadamente 800 mil células 132 1N1 en solución Krebs normal), en una cubeta de cuarzo (Fisherbrand, 10 mm lado). Los valores de fluorescencia medidos fueron estandarizados por la fluorescencia máxima obtenida al fin de cada experimento por exposición de las células a TritónX100 0,1%.

Las medidas de fluorescencia se realizaron usando un fluorímetro de alta sensibilidad provisto de dos fotomultiplicadores de bajo ruido (Products For Research Inc.). Las células cargadas con la sonda indo-1, fueron excitadas a una longitud de onda de 340 nm con lámpara de Xenón (500 W), y su emisión captada a 405 nm. Durante cada experimento, la señal de voltaje del fotomultiplicador fue primero detectada por una unidad VCR y PCM (Pulse Code Modulator, Unitrade, Toshiba), y simultáneamente monitoreada y grabada en un PC. Para este propósito la señal fue digitalizada usando una interfaz DMA TL-1 (Axon Instruments) controlada por el programa de adquisición Axotape (Axon Instruments) desde el PC. El análisis de los registros almacenados en el PC se hizo usando el programa Origin 5.0 (Microcal Origin).

#### Medición de ATP

Para determinar la concentración de ATP citosólico en células incubadas en presencia o ausencia de glucosa 1 g/l, se registró en forma continua la luminiscencia emitida producto de la reacción luciferina-luciferasa en presencia de ATP (kit comercial lucife-

rina-luciferasa de Sigma). Células crecidas hasta la semiconfluencia fueron resuspendidas en una solución Krebs normal y se incubaron durante 90 min en presencia o ausencia de glucosa. Posteriormente, 100 ml de la suspensión de células incubadas (150.000 células) con o sin glucosa se agregaron a un tubo de plástico hidrofóbico (de punta redonda y 3 mm de ancho), se añadió 50 ml de la solución comercial de luciferina-luciferasa (1 mg/ml). La reacción luciferina-luciferasa más ATP fue obtenida mediante la permeabilización de las membranas celulares con 10 ml de la solución comercial del detergente suave extralight (Analytical Luminiscence Labs). Esto permitió determinar los niveles de ATP citosólico en células incubadas con o sin glucosa. Para determinar el nivel de ATP total, las muestras fueron sonicadas por 30 segundos. La luminiscencia basal y la observada tras la adición de extralight fue registrada en un equipo homólogo al descrito para el registro de la amplitud de la emisión de fluorescencia del indo-1. Al igual que los registros de fluorescencia, los registros de luminiscencia fueron visualizados y almacenados simultáneamente en un PC 486 usando el programa Axotape. El análisis de los datos y la confección de las figuras se realizó usando el programa Origin 4.1.

#### Drogas y péptidos

Se utilizaron: A $\beta$ P[1-40] y A $\beta$ P[40-1] (ambos Bachem).

#### Análisis Cinético

El cálculo de la constante de tiempo de la respuesta de incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  evocada por el A $\beta$ P[1-40] fue obtenida a partir del ajuste exponencial a los registros nativos. La ecuación utilizada se definió como:

$$[Ca^{2+}]_i = [Ca^{2+}]_{max} (1 - e^{-t/\tau})$$

En donde  $[Ca^{2+}]_i$  representa la concentración de  $Ca^{2+}$  citosólico;  $[Ca^{2+}]_{max}$  representa el valor máximo de la concentración de  $Ca^{2+}$  citosólico;  $t$  representa el tiempo; y  $\tau$  la constante de tiempo.

### Procesamiento estadístico

Para determinar si existe o no diferencias significativas entre las respuestas, los promedios de las amplitudes máximas de cada respuesta o de cada valor de  $t$  (constante de tiempo), fueron sometidos a un test-t-student (datos no pareados), se considerará significativa la diferencia a un  $p < 0.05$ .

### Resultados

Las células incubadas sin glucosa presentan niveles significativamente menores de ATP.

La figura 1 muestra la amplitud de la luminiscencia emitida por la reacción de luciferina-luciferasa en presencia de ATP, determinada en células 132 1N1 incubadas por 90 min en Krebs normal sin (primera columna) y con glucosa (segunda columna). Las columnas representan el valor promedio  $\pm$  la desviación estándar ( $n=5$ ). Se observa claramente que en células incubadas sin glucosa el nivel de ATP citosólico ( $280 \pm 20$  pM) es significativamente menor que el nivel de ATP citosólico determinado en células incubadas con glucosa ( $700 \pm 25$  pM).

El A $\beta$ P[1-40] induce incrementos del  $Ca^{2+}$  citosólico, y este es mayor en las células incubadas sin glucosa.

La figura 2 muestra los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducidos por la adición del A $\beta$ P[1-40] medido en células 132 1N1 cargadas con la sonda fluorescente sensible a  $Ca^{2+}$ , indo-1. La adición de 5 mM A $\beta$ P[1-40] evocó un incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  en células 132 1N1, como se ha descrito previamente<sup>(12)</sup>.

El incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  observado tras la adición del péptido en células incubadas sin glucosa fue de mayor amplitud y de cinética más rápida en comparación al incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  evocado por el A $\beta$ P[1-40] en células incubadas con glucosa (Figura 3). En la figura 3A se observa que la amplitud de la fase meseta del incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  evocado por el A $\beta$ P[1-40] en células 132 1N1 incubadas con glucosa (normalizado a 1) es la mitad de la respuesta registrada en células incubadas sin glucosa. Además, la constante de tiempo ( $t$ ) del ascenso, calculada del

### Figura 1

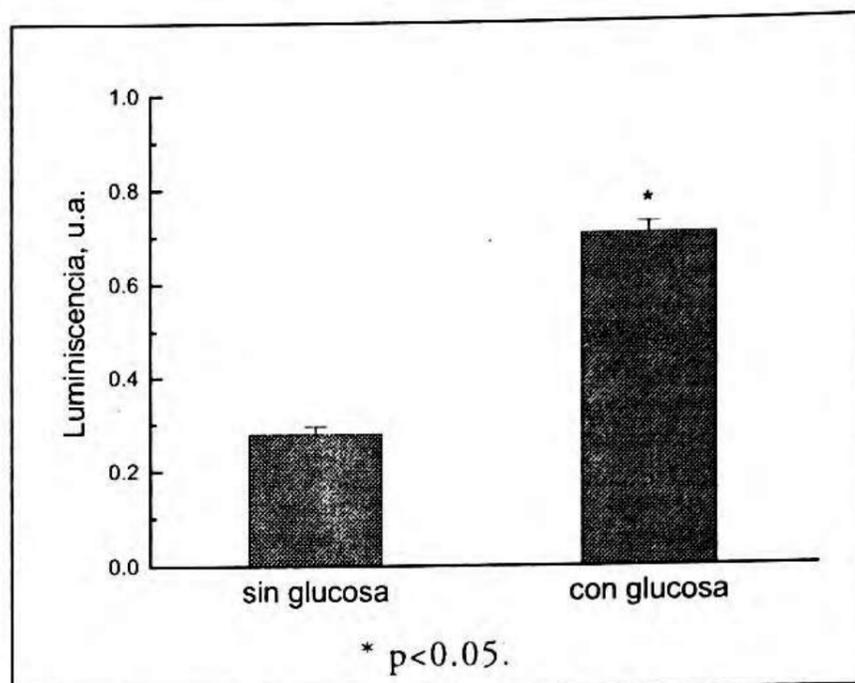


Figura 1: Nivel de ATP citosólico en células 132 1N1.

### Figura 2

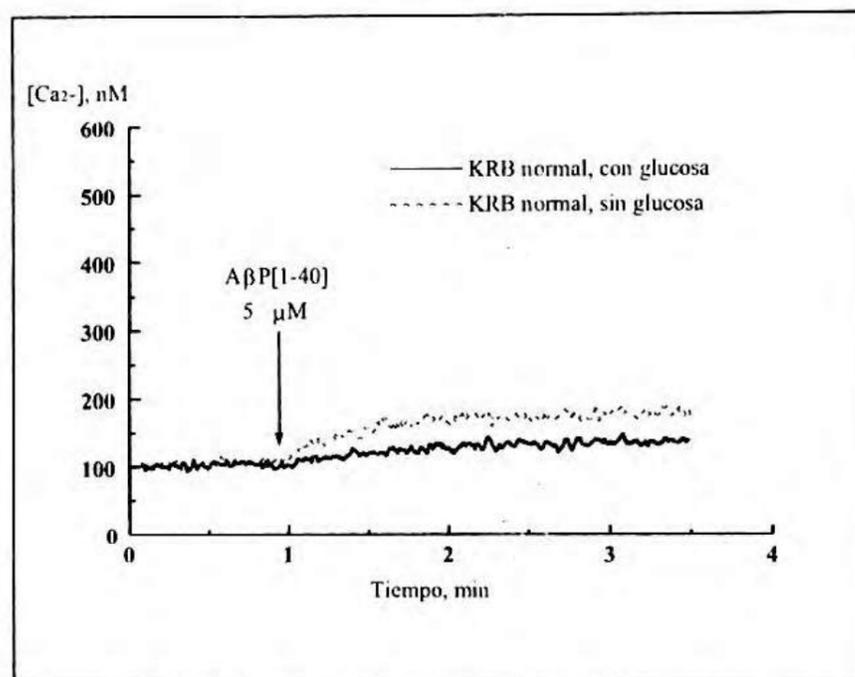


Figura 2: Cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducidos por la adición del A $\beta$ P[1-40].

ajuste a los datos experimentales (ver métodos) para el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  observada en células incubadas sin glucosa fue cerca de un 20% menor (Figura 3B). De esta forma el menor valor numérico de la  $t$  calculada para la respuesta evocada por el A $\beta$ P[1-40] observada en células incubadas sin glucosa indica que esta respuesta es más rápida que la observada en células incubadas con glucosa.

En la figura 3 A, representa amplitud máxima normalizada de la fase meseta del incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  evocado por el A $\beta$ P[1-40] en células 132 1N1 incubadas con (primera columna) y sin (segunda columna) glucosa. B, indica la constante de tiempo (t) normalizada calculada para la respuesta al A $\beta$ P[1-40] en células incubadas con (primera columna) y sin (segunda columna) glucosa. Las columnas representan el valor promedio  $\pm$  la desviación estándar (n=6). Los valores de amplitud máxima y constante de tiempo para cada respuesta al A $\beta$ P[1-40] fueron normalizados por el valor de la amplitud máxima y constante de tiempo de respuesta al A $\beta$ P[1-40] determinado en células 132 1N1 incubadas con glucosa. La  $[Ca^{2+}]_i$  máxima para la respuesta al A $\beta$ P[1-40] en células incubadas con y sin glucosa fue de  $134 \pm 6$  nM y  $278 \pm 10$  nM, respectivamente. La  $[Ca^{2+}]_i$  basal para células incubadas con y sin glucosa fue de  $104 \pm 6$  nM y  $107 \pm 5$  nM, respectivamente. La t para la respuesta al A $\beta$ P[1-40] en células incubadas con y sin glucosa fue de  $0.21 \pm 0.01$  min. y  $0.17 \pm 0.02$  min. respectivamente.

Figura 3

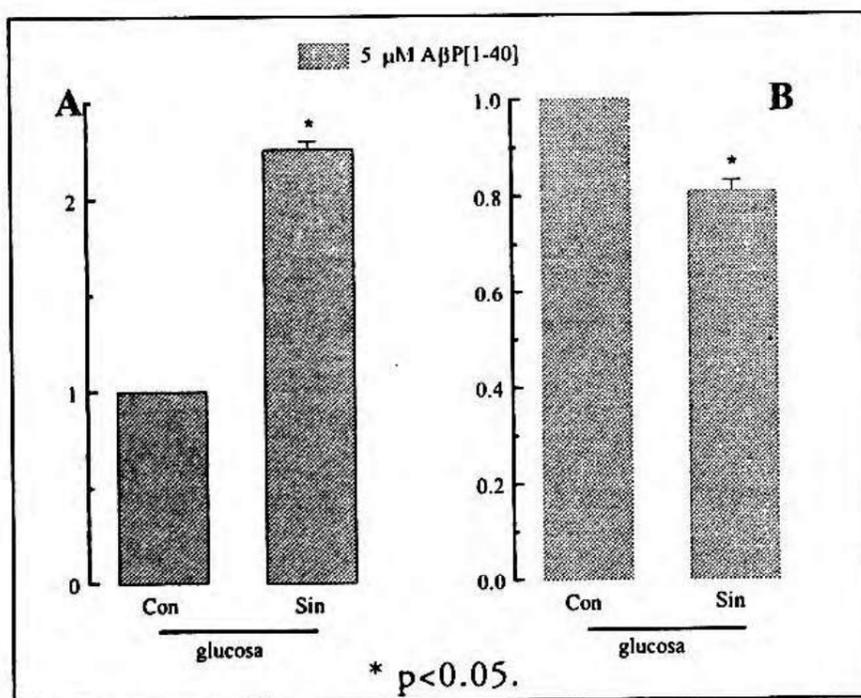


Figura 3: Figura 3. Análisis de la respuesta al A $\beta$ P[1-40] en células 132 1N1.

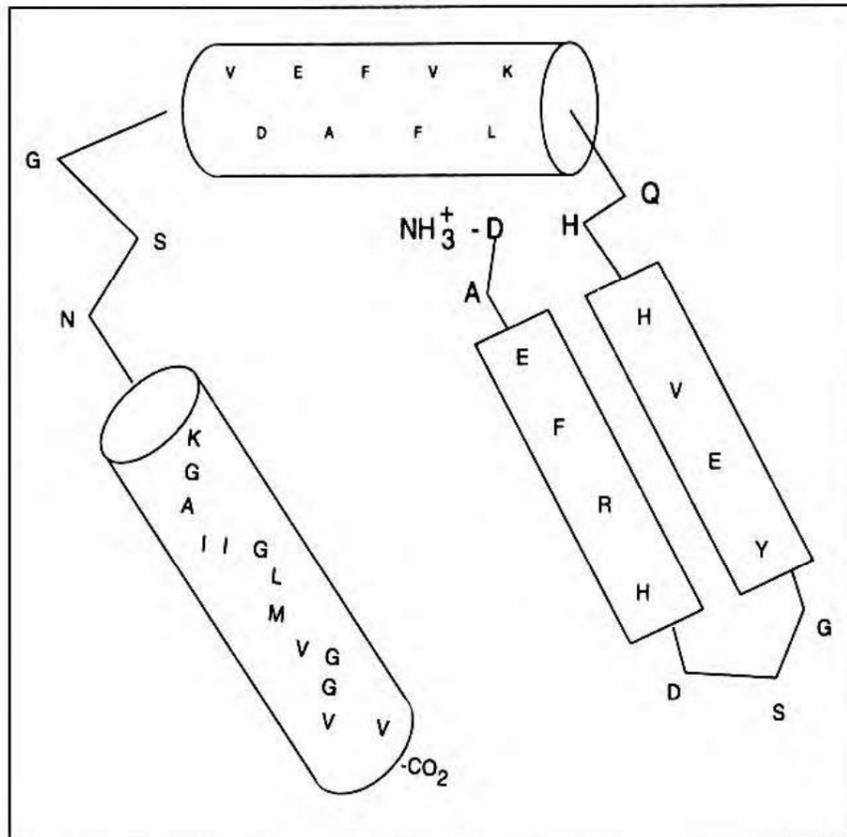
### Discusión

El A $\beta$ P[1-40] evoca el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  en células 132 1N1.

Los resultados indican que la adición del A $\beta$ P[1-40] induce un incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  de células 132 1N1. Estos resultados, en concordancia con otros anteriores <sup>(11 a y b)</sup>, son consistentes con la idea de que el A $\beta$ P[1-40] se incorpora a las membranas y forma un canal permeable a cationes. El estudio de las propiedades de agregación e hidrofobicidad del péptido <sup>(8)</sup> concuerdan con el hecho de que el A $\beta$ P[1-40] a pH fisiológico presenta una estructura ideal para incorporarse en la membrana y formar un canal <sup>(13)</sup>. Esta información, fue respaldada por el análisis por difracción de rayos X del péptido-canal en bicapas planas <sup>(14,15)</sup>, sentando de esta manera las bases estructurales para entender la conducta del A $\beta$ P como un canal. Además, basándose en tablas de hidrofobicidad/hidrofilicidad de los residuos aminoacídicos, muy usadas en modelos predictivos, se ha propuesto una estructura para el péptido A $\beta$ P[1-40] en la membrana lipídica que es totalmente consistente con los hallazgos cristalográficos antes mencionados. En el análisis, el segmento  $NH_3^+$ -D-A-E-F-R-H-D-S-G-Y-E-V-H, en el amino terminal, forma una estructura de hoja  $\beta$  plegada, mientras que los segmentos, hacia el terminal carboxilo, K-L-V-F-F-A-E-D-V y K-G-A<sub>30</sub>-I-I-G-L-M<sub>35</sub>-V-G-G-V-V<sub>40</sub>-COO<sup>-</sup> separados por un pliegue en el segmento -N-S-G<sub>25</sub>, adquieren una estructura de hélice  $\alpha$ . Con posterioridad Durell y col. <sup>(16)</sup> desarrollaron un modelo molecular de las estructuras cuaternarias del canal catiónico formado por el péptido A $\beta$ P[1-40] (Figura 4) y los posibles estados de polimerización en la bicapa, el cual fue consistente con el análisis hidropático.

En la figura 1 se observa que el nivel de ATP citosólico disminuye a menos del 50% cuando las células han sido incubadas por 90 minutos en solución Krebs sin glucosa. La condición de estrés energético en células de cultivo inducida por la incubación en

Figura 4



Esquema Secuencia aminoácida del AβP[1-40]. Los residuos aminoácidos están señalados por el código de una letra. Cargados positivos: K=lisina, H=histidina, R=arginina. Cargados negativos: D=ácido aspártico, E=ácido glutámico. Polares neutros: M=metionina, N=asparagina, S=serina, Y=tirosina, Q=glutamina. Hidrófobos: A=alanina, F=fenilalanina, G=glicina, V=valina, L=leucina, I=isoleucina. (Tomado de Durell et al. 1994).

ausencia de glucosa, es un fenómeno descrito en la literatura <sup>(17)</sup>. Por otro lado existen reportes de un efecto parcialmente protector de la toxicidad del AβP[25-35] sobre neuronas en cultivo, cuando aumentaban los niveles de ATP, mediante la suplementación con creatina en el medio de cultivo <sup>(18)</sup>. Por otro lado, en pacientes con EDA, se ha descrito una alteración de la función mitocondrial con disminución de la fosforilación oxidativa, cuyo papel patogénico está por definirse <sup>(19)</sup>. La hipótesis de este trabajo propone la idea que las células estresadas son más susceptibles al efecto de AβP[1-40], lo que concuerda con los hallazgos. Una explicación de este efecto diferencial, puede estar dada por un cambio en

las propiedades de la membrana citoplasmática de las células afectadas. La formación de canales de AβP[1-40] a su vez, acentuaría la descompensación metabólica de estas células, causada por la pérdida del K<sup>+</sup>, y la ganancia de Na<sup>+</sup> y posiblemente Ca<sup>2+</sup>. Las constantes de tiempo calculadas para las respuestas al AβP[1-40] en células incubadas con y sin glucosa presentan una diferencia de sólo un 20%; esto implica, con mayor probabilidad, un aumento en el número de unidades conductoras más que un mejoramiento en la conducción de Ca<sup>2+</sup> por parte del canal.

#### Conclusiones

Los resultados permiten concluir que la amplitud máxima del incremento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> evocado por el AβP[1-40] es mayor en células 132 1N1 sometidas a stress hipoglicémico. Este déficit energético puede actuar por múltiples mecanismos que se podrían resumir como cambios en las propiedades e membrana determinantes de susceptibilidad al depósito peptídico.

## Referencias

1. Kadar T, Silbermann M, Weissman BA, Levy A. Age-related changes in the cholinergic components within the central nervous system. II. Working memory impairment and its relation to hippocampal muscarinic receptors. *Mech Ageing Dev* 1990; 55: 139-49.
2. Taylor L, Griffith WH. Age-related decline in cholinergic synaptic transmission in hippocampus. *Neurobiol Aging* 1993; 14: 509-15.
3. Buxbaum JD, Ruefli AA, Parker CA, Cypess AM, & Greengard P. Calcium regulates processing of the Alzheimer amyloid protein precursor in a protein kinase C-independent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4489-93.
4. Forloni G, Chiesa R, Smioldo S, Verga L. Apoptosis mediated neurotoxicity induced by chronic application of beta amyloid fragment 25-35. *Neuroreport* 1993; 4: 523-6.
5. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. *Science* 1992; 256: 184-6.
6. Loo DT, Copani A, Pike CJ, Whittemore ER, Walencewicz AJ, Cotman CW. Apoptosis is induced by  $\beta$ -amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7951-55.
7. Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW. Neurodegeneration induced by  $\beta$ -amyloid peptides in vitro: The role of peptide assembly state. *J Neurosci* 1993; 13: 1676-87.
8. Pollard HB, Arispe N, Rojas E. A new hypothesis for the mechanism of amyloid toxicity, based on the calcium channel activity of amyloid  $\beta$  protein ( $A\beta$ ) in phospholipid bilayer membranes. *Ann NY Acad Sci* 1993; 65: 165-8.
9. Selkoe DJ. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 1991; 6: 487-98.
10. Cummings BJ, Su JH, Cotman CW, White R, Russell MJ.  $\beta$ -Amyloid accumulation in aged canine brain: A model of early plaque formation in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1993; 14: 547-60.
- 11a. Arispe N, Rojas E, Pollard HB. Alzheimer disease amyloid  $\beta$  protein forms calcium channels in bilayer membranes: Blockade by tromethamine and aluminum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993(a); 90: 567-71.
- 11b. Arispe N, Pollard HB y Rojas E. Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid  $\beta$ -protein [ $A\beta$ -(1-40)] in bilayer membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993(b); 90: 10573-7.
12. Alarcón JM. Estudio de las interacciones péptido amiloide [1-40] - bicapa lipídica en membranas artificiales y celulares: Implicancias con la neurotoxicidad de péptidos de tipo amiloide  $\beta$  en la enfermedad de Alzheimer. 1999; Trabajo de tesis para optar al grado de doctor en ciencias biomédicas, Facultad de Medicina Universidad de Chile.
13. Barrow CJ, Yasuda A, Kenny PTM, Zagorski M. Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid  $\beta$ -peptides of Alzheimer's disease. Analysis of circular dichroism spectra. *J Mol Biol.* 1992; 225: 1075-93.
14. Inouye, Fraser PE, Kirchner DA. Structure of  $\beta$ -crystallin assemblies formed by Alzheimer  $\beta$ -amyloid protein analogues: analysis by X-diffraction. *Biophys J* 1993; 64: 502-19.
15. Mason RP, Shoemaker WJ, Shajenko L, Herbert LG. X-ray diffraction analysis of brain lipid membrane structure in Alzheimer disease and  $\beta$ -amyloid peptide interactions. *Ann NY Acad Sci* 1993; 695: 54-58.
16. Durrell SR, Guy HR, Arispe N, Rojas E, Pollard HB. Theoretical models on the ion channel structure of amyloid  $\beta$  protein. *Biophysical Journal* 1994; 67: 2137-45.
17. Culic O, Decking U, Schrader J. Metabolic adaptation of endothelial cells to substrate deprivation. *Am J Physiol* 1999; 276: C1061-C1068.
18. Brewer GJ, Walliman T, W. Protective effect of the energy precursor creatina against toxicity of glutamate and beta-amyloid in rat hippocampal neurons. *J Neurochem* 2000; 74: 1968-78.
19. Ojaimi J, Byrne E. Mitochondrial function and Alzheimer's disease. *Biol Signals Recept* 2001; 10: 254-62.