

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR E BIOAGENTES
PATOGÊNICOS

YUNAN COSTA JANUÁRIO

Caracterização funcional de AP-1 e Arc/Arg3.1 no
transporte e processamento de APP na via secretória tardia

RIBEIRÃO PRETO

2021

YUNAN COSTA JANUÁRIO

Caracterização funcional de AP-1 e Arc/Arg3.1 no
transporte e processamento de APP na via secretória tardia

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do Título de Doutor em
Ciências

Área de Concentração: Biologia Celular e
Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Luis Lamberti Pinto da Silva

RIBEIRÃO PRETO

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Januário, Yunan Costa

Caracterização funcional de AP-1 e Arc/Arg3.1 no transporte e processamento de APP na via secretória tardia. Ribeirão Preto, 2021.

97 p.: il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientador: da Silva, Luis Lamberti Pinto

1. Alzheimer. 2. APP. 3. Arc/Arg3.1. 4. AP-1. 5. Via secretória. 6. Golgi. 7. Endossomos.

JANUÁRIO, Y. C. **Caracterização funcional de AP-1 e Arc/Arg3.1 no transporte e processamento de APP na via secretória tardia.** Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de doutor em Biologia Celular e Molecular.

Aprovado em:

Banca examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

"É desse jeito que você vive
É o negro drama
Eu não li, eu não assisti
Eu vivo o negro drama, eu sou o negro drama
Eu sou o fruto do negro drama
Aí dona Ana, sem palavra, a senhora é uma rainha, rainha"
Trecho da música Negro Drama (Racionais MC's)

Agradecimentos

Eu agradeço a Deus pelas oportunidades ao longo da minha vida e por ter me guardado do início ao fim dessa etapa na USP.

Agradeço aos meus pais, Ana Paula e Elizeu. Vocês foram gentis e amorosos comigo ao longo da minha vida. Agora, espero poder retribuir o amor e os cuidados que me deram.

Agradeço também à minha esposa Mara Elisama, companheira pra vida e de bancada. Somos um casal muito diferente em vários sentidos. Nossas filhas, Noemi e Olívia, são nosso maior bem e conquista. Abrigado por me apoiar, me dar força e carinho nesses 12 anos que estamos juntos.

Agradeço também ao Professor Dr. Luis Lamberti, pela orientação ao longo desses 10 anos. Registro aqui o primeiro e-mail que lhe envie, em 14 de abril de 2011, para conhecer seu laboratório após a sua participação em uma aula de biologia celular no primeiro ano da minha graduação: “Prof. Luis, meu nome é Yunan C. Januário e sou aluno do 1º semestre de Biologia. Assisti a sua palestra na aula de biologia celular da Prof.^a Maria de Lourdes, na Faculdade de Filosofia, no dia 13 de abril. Fiquei muito interessado em poder aprender mais sobre o assunto da palestra, transporte de proteínas na via secretora, principalmente sobre os estudos ao combate de doenças. Gostaria de poder visitar o seu laboratório, saber mais as sobre as pesquisas nesta área e, quando tiver conhecimento suficiente, estagiar em seu laboratório. Aguardo resposta. Grato”.

Obrigado a todos do laboratório de tráfego intracelular: Luan, Vinícius, Cris, Roger, Milena, Juan, Lucas, Mara e Andreia. Agradeço também aos vários amigos que passaram pelo laboratório durante minha permanência, em especial a Érika, Nat, Leila, Ju, Estela, Eulália, Luciana e Rodrigo. Cada um de vocês contribuiu de alguma forma para o meu crescimento profissional e pessoal.

Agradeço também ao Centro de Pesquisa em Virologia (CPV) da USP-RP pelo espaço para trabalhar e pelas amizades. Gostaria de agradecer à FAPESP, pela bolsa de doutorado no país (Nº de processo 2017/12022-0), à CAPES pela bolsa nos meses iniciais do meu doutorado (141940/2017-4), ao CNPq, à FMRP-USP e funcionários, aos estudantes e aos professores da pós-graduação em biologia celular e molecular da FMRP-USP.

RESUMO

JANUÁRIO, Y. C. **Caracterização funcional de AP-1 e Arc/Arg3.1 no transporte e processamento de APP na via secretória tardia**. 2021. 97f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

A doença de Alzheimer é um tipo comum de demência causada por degeneração e morte neuronal. Uma das características histopatológicas desta doença é o acúmulo de peptídeos tóxicos β -amiloide ($A\beta$) no espaço extracelular, contribuindo para a formação das placas senis. O precursor direto de $A\beta$ é o fragmento carboxi-terminal (CTF β ou C99) da proteína precursora do beta-amiloide (APP). O C99 é detectado em níveis elevados no cérebro com Alzheimer e seu acúmulo intracelular foi relacionado à neurotoxicidade precoce, independentemente de $A\beta$. A clivagem proteolítica de APP em C99 ocorre durante seu transporte na via secretória. No entanto, as causas para o aumento dos níveis celulares de C99 são pouco compreendidas. Neste trabalho objetivou-se estudar a participação da proteína adaptadora 1 (AP-1) e de Arc/Arg3.1 no transporte e processamento de APP na via secretória tardia. Ensaios de imunoprecipitação e duplo híbrido mostraram que AP-1 interage com a APP e esta interação requer o domínio conservado 682YENPTY687 na cauda citosólica de APP e dois locais de ligação na subunidade μ 1A de AP-1. Para entender a importância de AP-1 no transporte de APP utilizou-se ensaios de imunofluorescência e microscopia confocal realizados em células de linhagem humana (HeLa e H4) ou cultura primária de neurônios de rato. As análises foram realizadas empregando técnicas de silenciamento por RNAi, uso de células com gene deletado por CRISPR/Cas9 combinado com o resgate da expressão, expressão de dominante negativo e a expressão de um mutante de APP deficiente na interação com AP-1. A observação dos dados mostrou que AP-1 é essencial para transferir APP do complexo de Golgi para os endossomos. A interferência no transporte mediado por AP-1 leva a retenção de APP na rede trans-Golgi. Para analisar o processamento de APP e geração do fragmento C99 em células HeLa foi utilizado o ensaio de western blot com uso da ferramenta de transporte sincronizado na via secretória com *Retention Using Selective Hooks* (RUSH). O bloqueio no transporte de APP mediado por AP-1 reduz a cinética de geração de C99, mas leva ao aumento dos níveis intracelulares de C99 no estado de equilíbrio da distribuição subcelular de APP. Os resultados indicam que AP-1 controla diretamente a distribuição subcelular de APP de forma a regular a geração e o acúmulo intracelular do fragmento patogênico C99. Isso indica que os defeitos no transporte de APP/C99 mediado por AP-1 podem ser um fator potencial que contribui para o desenvolvimento da doença de Alzheimer. Em conjunto com estes resultados também foi estudado a participação da proteína Arc/Arg3.1 no transporte e processamento de APP. Arc é uma proteína que controla a plasticidade neuronal e cuja atividade foi anteriormente relacionada ao acúmulo de $A\beta$. Ensaios de western blot em células H4 mostraram que a expressão de Arc aumenta os níveis de APP e todos os seus fragmentos carboxi-terminais (CTFs), incluindo o fragmento C99. O uso de uma droga que inibe a atividade lisossomal mostrou que Arc favorece a geração do fragmento C99. Além disso, ensaios de imunofluorescência e microscopia confocal indicaram que Arc favorece o acúmulo de APP no sistema endossomal. Como tentativa de elucidar o possível mecanismo pelo qual Arc controla o transporte intracelular de APP na via secretória tardia foi analisado se Arc interage com as proteínas adaptadoras

de vesículas (APs). Foi observado por ensaio de imunoprecipitação e ensaio de duplo híbrido que Arc interage eficientemente com a subunidade média μ de AP1, AP-2, AP-3 e AP-4. Estes dados mostram que Arc interfere no trânsito endolisossomal de APP levando ao aumento do fragmento C99 e que é capaz de interagir com diferentes APs, sendo esta a base de um possível mecanismo pelo qual Arc regula o transporte de APP.

Palavras-chave: 1. Alzheimer. 2. APP. 3. Arc/Arg3.1. 4. AP-1. 5. Via secretória. 6. Golgi. 7. Endossomos.

ABSTRACT

JANUÁRIO, Y. C. **Functional characterization of AP-1 and Arc/Arg3.1 in the transport and processing of APP at the late secretory pathway**. 2021. 97p. Thesis (pHD Degree). Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Alzheimer's disease is a common type of dementia caused by neuronal degeneration and death. A hallmark of this disease in the brain is the accumulation of toxic amyloid- β ($A\beta$) peptides in the extracellular space, contributing to the formation of senile plaques. The direct precursor of $A\beta$ is the carboxy-terminal fragment (CTF β or C99) of the amyloid-beta precursor protein (APP). C99 is detected at high levels in the brain with Alzheimer's disease and its intracellular accumulation has been linked to early neurotoxicity, independently of $A\beta$. The proteolytic cleavage of APP at C99 occurs during its transport in the secretory pathway. However, the causes for the increased cellular levels of C99 are poorly understood. This work aimed to study the participation of adaptor protein 1 (AP-1) and Arc/Arg3.1 in the transport and processing of APP at the late secretory pathway. Immunoprecipitation and yeast two-hybrid assays showed that AP-1 interacts with APP. This interaction requires the conserved domain 682YENPTY687 in the cytosolic tail of APP and two binding sites in the μ 1A subunit of AP-1. To understand the AP-1 importance in the APP transport, immunofluorescence and confocal microscopy assays were performed in human cell lines (HeLa and H4) or primary rat neurons. Analyzes were performed using RNAi silencing techniques, CRISPR/Cas9 gene deleted cells combined with the rescue of expression, dominant-negative expression and the expression of an APP mutant deficient in the interaction with AP-1. Observation of the data revealed that AP-1 is essential for transferring APP from the Golgi complex to endosomes. Interference with AP-1-mediated transport leads to APP retention in the trans-Golgi network. To analyze APP processing and C99 fragment generation in cells, we used western blot assays using the synchronized transport tool in the secretory pathway with Retention Using Selective Hooks (RUSH). Delaying APP transport in AP-1 deleted cells reduces C99 generation kinetics. Interestingly, at the steady state of APP subcellular distribution, the intracellular levels of C99 were increased upon AP-1 depletion. Our results indicate that AP-1 directly controls the subcellular distribution of APP in a way that regulates the generation and intracellular accumulation of the pathogenic C99 fragment. This indicates that defects in AP-1-mediated transport of APP/C99 may be a potential contributing factor to Alzheimer's disease. Together with these results, the participation of the Arc/Arg3.1 protein in the transport and processing of APP was also studied. Arc is a protein that controls neuronal plasticity and whose activity was previously related to $A\beta$ accumulation. Western blot assays in H4 cells show that Arc expression increases APP levels and all of its carboxy-terminal fragments (CTFs), including the C99 fragment. The use of a drug that inhibits lysosomal activity showed that Arc favors the generation of the C99 fragment. Immunofluorescence and confocal microscopy assays indicated that Arc favors the accumulation of APP in the endosomal system. In an attempt to elucidate the possible mechanism by which Arc controls the intracellular transport of APP in the late secretory pathway, was analyzed whether Arc interacts with vesicle adapter proteins (APs). It was observed by immunoprecipitation and yeast two-hybrid assay that Arc interacts with the medium μ subunit of AP1, AP-2, AP-3 and AP-4. These data indicated that Arc alters APP endolysosomal transit, leading to an increase in the C99

fragment and interacts with different APs as a possible mechanism by which Arc regulates APP transport.

Keywords: 1. Alzheimer. 2. APP. 3. Arc/Arg3.1. 4. AP-1. 5. Secretory pathway. 6. Golgi. 7. Endosomes.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iv
SUMÁRIO.....	vii
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIACÕES	xi
INTRODUÇÃO.....	1
Introdução geral	2
Epidemiologia da doença de Alzheimer	3
Histórico.....	4
Características histopatológicas da doença de Alzheimer	5
Alzheimer familiar de início precoce e Alzheimer esporádico de início tardio	6
A proteína precursora do beta-amiloide (APP).....	8
As secretases de processamento de APP	9
A hipótese da cascata amiloide	10
Hipóteses alternativas para o desenvolvimento da doença de Alzheimer	11
O processamento de APP e geração do A β	12
Sítios intracelulares de produção de A β	14
O itinerário de APP no sistema de endomembranas	14
As proteínas adaptadoras (APs)	15
Motivos de aminoácidos reconhecidos pelos APs	17
Funções de AP-1	18
A proteína como Arc/Arg3.1	19
Arc modifica o tráfego intracelular de APP e geração do peptídeo neurotóxico A β ..	20
Arc interage com as proteínas adaptadoras AP-2 e AP-4	21
OBJETIVOS E HIPÓTESE	23
Objetivo geral do trabalho	24
Objetivos específicos para AP-1 e APP	24
Objetivos específicos para Arc e APP	24
Hipótese geral da tese	24
MATERIAL E MÉTODOS.....	25
Plasmídeos para expressão das proteínas de interesse.....	26
Cultura celular.....	28

Transfecções e drogas utilizadas na cultura celular	29
Anticorpos.....	30
Alinhamento de sequências e representação da estrutura de proteínas.....	31
Ensaio de duplo híbrido	31
Ensaio de interação proteína-proteína por <i>pull down</i>	33
Imunoprecipitação por ensaio de GFP-Trap	34
Imunofluorescência e Microscopia Confocal	34
Retention using selective hooks (RUSH)	35
Preparo de lisados celulares e western blot	37
Análise estatística	38
RESULTADOS	40
Parte I.....	41
Mapeamento dos aminoácidos de APP mediadores da interação com μ 1A	41
Mapeamento dos aminoácidos de μ 1A mediadores da interação com APP.....	43
Ausência de AP-1 funcional leva ao acúmulo de APP no complexo de Golgi	46
O mutante APP Y682A tem seu tráfego na via secretória tardia comprometido	49
A saída de APP do complexo de Golgi e seu direcionamento para endossomos iniciais é prejudicado na ausência de AP-1	52
O transporte de APP mediado por AP-1 modifica o acúmulo intracelular de C99	54
A superexpressão de Arf1 modifica o processamento e tráfego de APP.....	56
Parte II.....	58
Arc induz o acúmulo de APP e seus fragmentos de processamento	58
A inibição da acidificação endolisossomal mostra que Arc favorece a formação do fragmento C99	59
Arc redireciona APP para o interior de endossomos aumentados	60
Arc interage com AP-1, AP-2, AP-3 e AP-4 via subunidade μ	60
DISCUSSÃO	63
Parte I: AP-1 e APP	64
Parte II: Arc e APP	70
CONCLUSÕES	72
Conclusões	73
REFERÊNCIAS	74

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

FIGURAS.

Figura 1: Principais causas de morte no mundo nos anos de 2019 e 2020 de acordo com a OMS.

Figura 2: Mutações raras e comuns que contribuem para o risco da doença de Alzheimer.

Figura 3: Anomalias neurológicas observadas na doença de Alzheimer nos diferentes estágios clínicos da doença.

Figura 4: Figura esquemática das vias de processamento de APP.

Figura 5: Características estruturais e rotas de tráfego dos APs.

Figura 6: Esquema representativo do sistema de duplo híbrido em leveduras.

Figura 7: Desenho esquemático do plasmídeo bicistrônico e monocistrônico do sistema RUSH.

Figura 8: A caracterização da interação de APP com $\mu 1A$ demonstra que o domínio $^{682}YENPTY^{687}$ de APP é requerido para a interação.

Figura 9: O bolso de ligação de tirosina de $\mu 1A$ é necessário para sua interação com APP.

Figura 10: Interferir no transporte mediado por AP-1 aumenta a associação de APP com o complexo de Golgi.

Figura 11: A ausência da subunidade $\mu 1A$ aumenta a associação de APP com o complexo de Golgi.

Figura 12: APP Y682A está mais associado ao complexo Golgi e menos associado a endossomos.

Figura 13: APP Y682A é mais associado ao TGN e a endossomos tardios em comparação a APP WT.

Figura 14: APP Y682A tem seu transporte entre o complexo de Golgi-endossomos alterada em neurônios.

Figura 15: AP-1 é necessário para a eficiente saída de APP do complexo de Golgi e seu transporte anterógrado para endossomos iniciais.

Figura 16: Ausência de interação com AP-1 altera o processamento de APP e geração do fragmento C99.

Figura 17: A superexpressão de Arf1 modifica o processamento e o tráfego de APP.

Figura 18: A expressão de Arc aumenta especificamente os níveis totais de APP e seus produtos de processamento.

Figura 19: Arc favorece a geração do fragmento C99.

Figura 20: Arc aumenta a associação de APP com endossomos.

Figura 21: Arc interage com a subunidade μ de AP-1, AP-2, AP-3 e AP-4.

Figura 22: Modelo proposto para a via de transporte celular mediada por AP-1.

TABELAS

Tabela 1. Plasmídeos para expressão das proteínas de interesse em células de mamíferos.

Tabela 2. Plasmídeos para expressão das proteínas de interesse em leveduras.

Tabela 3. Plasmídeos para expressão das proteínas de interesse em *E. coli*.

Tabela 4. Anticorpos utilizados para western blot e imunofluorescência.

LISTA DE ABREVIACOES

DA: Doença de Alzheimer

ADAM: A Disintegrin and Metalloprotease

AICD: APP intracellular domain

AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-5-isoxazolepropionic acid

AP: Adaptor protein complex

APH1: Anterior pharynx-defective 1

APLP: APP-like protein

APOE: Apolipoprotein E

APP: Proteína precursora do beta-amiloide

Arc: Activity-dependent cytoskeleton associated protein

Arf: ADP-ribosylation factor

Arg3.1: Activity-regulated gene 3.1 protein homolog

A β : peptídeo β -amiloide

BACE1: β -site APP cleaving enzyme/ β -secretase

C83: CTF- α (83 resíduos)

C99: CTF- β (99 resíduos)

CTF: Fragmento C-terminal

DAPT: N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-l-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's médium

EEA1: Early endosome antigen 1

EGFR: Epidermal growth factor receptor

fAD/EOAD: Alzheimer familiar/ familiar Alzheimer's disease/early-onset AD

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GFP: Green fluorescent protein

GM130: *cis*-Golgi membrane protein of 130 kDa

GST: Glutathione S-transferases

GWAS: Genome-wide association study

HA: Hemaglutinina

HRP: Horseradish peroxidase

HRS: Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate

IEGs: Immediate-early genes

IL-2: Interleucina 2

IRES: Internal Ribosome Entry Site

KD: knockdown

KO: knockout

LOAD: Late-onset AD

LTD: Depressão de longa duração

LTP: Potenciação de longa duração

NFT: Neurofibrillary tangle/emaranhados neurofibrilares

NCT: Nicastrina

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: Phosphate buffered saline

PEN-2: Presenilin enhancer 2

PLA: Proximity ligation assay

PSEN1: Presenilina 1

PSEN2: Presenilina 2

Rab: Ras-associated binding protein

RE: Retículo endoplasmático

RUSH: Retention using selective hooks

sAPP β : fragmento solúvel de APP β

SBP: Streptavidin-binding peptide

SDS: Sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

SNP: Polimorfismos de nucleotídeo único

SorLA: Sorting protein-related receptor/Sortilin-related receptor with A-type repeats

STIM-1: Stromal interaction molecule 1

TGN: trans-Golgi network / rede trans-Golgi

TGN38: trans-Golgi network 38 kDa protein

WT: Tipo selvagem/controlado

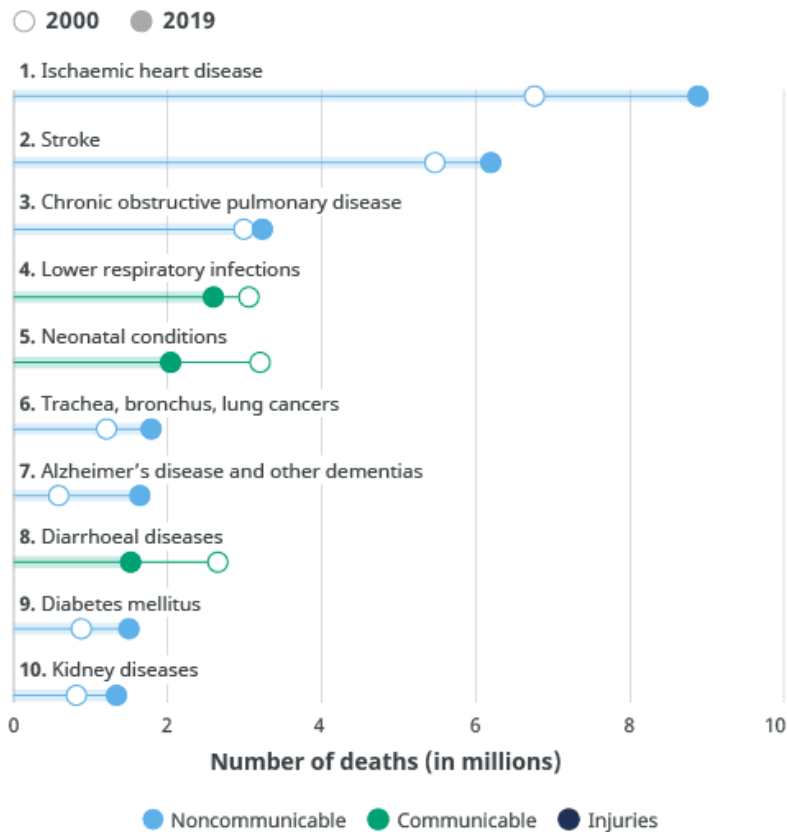
INTRODUÇÃO

Introdução geral

O sistema de endomembranas das células eucarióticas transporta de forma dinâmica proteínas entre os seus diferentes compartimentos (Dacks and Field 2018). O tráfego de vesículas mantém a identidade dos diferentes compartimentos intracelulares, regula as comunicações célula-célula e governa diferentes processos celulares (De Matteis and Luini 2011). As vesículas de transporte formam um sistema fechado que podem carregar diferentes tipos de carga em seu interior ou associada a elas, como proteínas e lipídios, que são direcionadas para compartimentos alvo específicos (Cho and Stahelin 2005). As células possuem diversas rotas de transporte intracelular e diferentes maquinarias participam da inicialização, da seleção de cargas específicas e do direcionamento das vesículas de transporte para compartimentos alvo (De Matteis and Luini 2011; More et al. 2020; Feyder et al. 2015). Fatores que levam ao desequilíbrio funcional de componentes das maquinarias de transporte de vesículas podem resultar na desregulação do equilíbrio dinâmico. Isto pode resultar na retenção prolongada de cargas em compartimentos de membrana, no direcionamento das cargas para compartimentos incorretos e a degradação prematura ou atrasada das cargas (Olkkonen and Ikonen 2006; De Matteis and Luini 2011; Yarwood et al. 2020).

Existem associações descritas entre defeitos no transporte de vesículas e doenças neurodegenerativas como doença de Huntington, doença de Parkinson e vários outros distúrbios neurológicos (Yarwood et al. 2020). Na doença de Alzheimer (DA) essa associação é também evidente e tem um papel relevante em promover os eventos moleculares que desencadeiam a doença (Rajendran and Annaert 2012; Yarwood et al. 2020). A DA é uma doença neurodegenerativa e é a causa prevalente de demência que cresce em todo o mundo. Os relatórios mais recentes da Organização Mundial da Saúde (OMS) enfatizam que a DA está em sétimo lugar no ranking das principais causas de morte no mundo (OMS, 2020) (Figura 1). Estes números alarmantes reforçam a importância de se entender mais aspectos moleculares sobre essa doença. Nesta revisão bibliográfica serão abordadas informações relevantes sobre a DA enfatizando a importância do transporte intracelular da proteína precursora do beta-amiloide (APP) na via secretória tardia. Também serão introduzidas duas proteínas com funções relevantes no transporte de APP, o complexo adaptador 1 (AP-1) e a proteína Arc/Arg3.1 (*activity-regulated cytoskeleton-associated/Activity-Regulated Gene 3.1 Protein Homolog*), a qual será chamada neste trabalho apenas como Arc.

Leading causes of death globally



Source: WHO Global Health Estimates.

Figura 1: Principais causas de morte no mundo nos anos de 2019 e 2020 de acordo com a OMS. 1. Doenças do coração (isquemia); 2. Derrame; 3. Doenças pulmonares obstrutivas crônicas; 4. Infecções respiratórias das vias aéreas inferiores; 5. Condições neonatais; 6. Câncer de traqueia, brônquios ou pulmão; 7. Doença de Alzheimer e outras demências; 8. Doenças diarreicas; 9. Diabetes mellitus; e 10. Doenças renais. Fonte: OMS.

Epidemiologia da doença de Alzheimer

A DA é uma doença neurodegenerativa progressiva. Os sintomas iniciais são falhas de memória, confusão e concentração reduzida. Com a progressão da doença podem ocorrer manifestações mais graves como déficits de memória, dificuldade para falar, deficiência motora, ansiedade, paranoia e outras deficiências cognitivas. Nos estágios finais da doença, os pacientes tornam-se totalmente dependentes de cuidadores para o gerenciamento de seu bem-estar físico e mental. As projeções sobre os custos associados ao cuidado e ao tratamento medicamentoso de pacientes com DA representam um dos principais problemas socioeconômicos à medida que a população global envelhece e a prevalência da doença aumenta. DA representa cerca de 60 a 70% dos casos de demência. De acordo com a OMS, 50 milhões de pessoas vivem com demência (OMS,

2020) e os custos globais associados a doença foram de aproximadamente 818 bilhões de dólares em 2015. As projeções para 2050 são que 152 milhões de pessoas sejam diagnosticadas com demência, sendo que, grande parte dessa população será de países subdesenvolvidos (OMS, 2020). Os impactos sociais e financeiros nos próximos anos também devem subir se não forem desenvolvidos tratamentos efetivos ou cura.

No Brasil, o número de pessoas com DA representa cerca de 1,2 milhão. Contudo, nem todos os casos são diagnosticados. Muitas vezes os sintomas da doença são interpretados erroneamente como sinais normais do envelhecimento (Associação Brasileira De Alzheimer, 2020). Um levantamento recente realizado com dados obtidos de hospitais de diferentes regiões do país, entre os anos de 2008 e 2018, mostrou que houve um aumento do número de pessoas internadas diagnosticadas com DA, com predominância de mulheres, da raça branca, acima de 80 anos e residentes na região Sudeste (Santos et al. 2019). Estes dados refletem o envelhecimento da população brasileira e o concomitante crescimento de doenças neurodegenerativas.

Histórico

O médico alemão Alois Alzheimer descreveu em 1906 o caso clínico de Auguste Deter. A paciente de 50 anos apresentava distúrbios progressivos de sono e memória, agressão e confusão. Seu relato inicialmente gerou pouco interesse entre os psiquiatras e neuropatologistas da época, mas ele persistiu na caracterização da condição peculiar de Auguste Deter. As investigações morfológicas e histológicas realizadas por Alzheimer no cérebro de Auguste Deter após sua morte revelaram uma atrofia cerebral geral. Ele notou também uma abundância de emaranhados neurofibrilares intraneuronais (NFTs) e placas amiloides extracelulares, duas alterações marcantes na histopatologia da DA (Hippius and Neundörfer 2003; Serrano-Pozo et al. 2011). Durante grande parte do século XX o nome de Alois Alzheimer permaneceu em relativa obscuridade até que o aumento de casos clínicos de demência despertasse o interesse nas investigações de sua base neuropatológica. Desde então, a compreensão das bases genéticas e moleculares da DA se expandiram e é defendido que se trata de uma doença majoritariamente multifatorial.

Características histopatológicas da doença de Alzheimer

A DA pode ter seu início de forma precoce (Alzheimer familiar) ou com início tardio (Alzheimer esporádico), ocorrendo majoritariamente antes e depois dos 65 anos, respectivamente (discutido em mais detalhes na sessão “Alzheimer familiar de início precoce e Alzheimer esporádico de início tardio”). As duas formas de Alzheimer apresentam as mesmas neuropatologias típicas da DA (Lane, Hardy, and Schott 2018). Além dos NFTs e placas amiloides, outras características neuropatológicas no cérebro doente com DA incluem neurites distróficas contendo a proteína tau hiperfosforilada, astrócitos com funções celulares e moleculares alteradas, células da microglia ativadas e angiopatia amiloide cerebral (Serrano-Pozo et al. 2011). Essas características neuropatológicas podem influenciar na neurodegeneração progressiva com perda sináptica e neuronal (Serrano-Pozo et al. 2011).

Os NFTs são compostos por filamentos citoplasmáticos agregados da proteína tau hiperfosforilada (Montejo de Garcini, Serrano, and Avila 1986; Kosik, Joachim, and Selkoe 1986; Grundke-Iqbal et al. 1986). A proteína tau faz parte da família de proteínas associadas a microtúbulos (MAP) e são essenciais para a montagem e estabilização de microtúbulos em neurônios (Weingarten et al. 1975; Neve et al. 1986). A fosforilação de tau regula sua associação aos microtúbulos e a hiperfosforilação de tau dissocia a proteína dos microtúbulos (Alonso et al. 1994). Problemas no enovelamento e a hiperfosforilação no C-terminal de tau representam acontecimentos moleculares importantes para a agregação de tau e eventual formação de NFTs (Nizynski, Dzwolak, and Nieznanski 2017). Agregados de tau liberados pelos neurônios afetados podem espalhar o processo neurodegenerativo no cérebro em um mecanismo semelhante ao príon (J.L. Guo and Lee 2014; Frost, Jacks, and Diamond 2009).

As placas amiloides são agregados proteicos de peptídeos A β com tamanho predominante de 40 ou 42 aminoácidos, denominados respectivamente A β 40 ou A β 42 (Masters et al. 1985; Glenner and Wong 1984). O peptídeo A β é um subproduto metabólico derivado da clivagem proteolítica sequencial de APP (Kang et al. 1987). O processo ocorre a partir da clivagem proteolítica sequencial de APP pelas enzimas de processamento β -secretase e γ -secretase (Haass et al. 2012). As placas amiloides tem maior abundância de A β 42, o qual é mais insolúvel e tem maior propensão à auto agregação em comparação a A β 40 (Iwatsubo et al. 1995). Em 1992 foi postulada a hipótese da cascata amiloide a qual defende que a agregação do A β seja o agente

desencadeador das neuropatologias da DA, incluindo a formação de NFTs, morte neuronal e demência (J.A. Hardy and Higgins 1992). A hipótese amiloidogênica e outras hipóteses desencadeadoras da DA serão introduzidas nas sessões posteriores.

Alzheimer familiar de início precoce e Alzheimer esporádico de início tardio

O Alzheimer familiar de início precoce ou fAD (*familiar Alzheimer's disease*) se manifesta como uma doença hereditária rara associada a mutações genéticas autossômicas dominantes (Shao, Peng, and Wang 2017). Nestes casos os sintomas normalmente surgem antes dos 65 anos, com alguns casos podendo ocorrer já aos 30 anos de idade. As mutações no fAD são predominantemente encontradas em APP e nas presenilinas 1 e 2 (PSEN1 e PSEN2) do complexo γ -secretase, as quais são responsáveis pela etapa final de clivagem de APP e liberação do $A\beta$ (Figura 2) (Shao, Peng, and Wang 2017). Grande parte das mutações no fAD alteram o processo de clivagem de APP, levando a produção aumentada de $A\beta$ ou uma maior produção de $A\beta_{42}$ em razão de $A\beta_{40}$ (Shao, Peng, and Wang 2017). Mutações em PSEN1, a qual é a subunidade catalítica da γ -secretase que cliva APP e libera o $A\beta$ (De Strooper et al. 1998; Baulac et al. 2003; Bai, Rajendra, et al. 2015), também foram identificadas (Cruts, Theuns, and Van Broeckhoven 2012). Estas mutações propiciam uma maior geração de $A\beta_{42}$ e desencadeamento da doença (Bai, Yan, et al. 2015). De forma semelhante, mutações em PSEN2, uma subunidade da γ -secretase homóloga a PSEN1, também aumentam a produção de $A\beta_{42}$ em razão de $A\beta_{40}$ (Shao, Peng, and Wang 2017).

Cerca de 95% dos casos de DA são da forma esporádica de início tardio (late onset Alzheimer's disease. LOAD), onde os sintomas surgem aos 65 anos ou mais (Shao, Peng, and Wang 2017). LOAD tem causa multifatorial como a idade, genética e exposição a fatores de risco (Shao, Peng, and Wang 2017). Apesar de multifatorial existem alguns fatores genéticos descritos que favorecem o surgimento de LOAD. Mutações no gene APOE configuram uma das causas mais conhecidas como fator de risco para LOAD (Pericak-Vance et al. 1991; Shao, Peng, and Wang 2017). APOE codifica a Apolipoproteína E, uma lipoproteína responsável pelo transporte e metabolismo de lipídios e colesterol. Existem três isoformas principais de APOE ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$). APOE $\epsilon 4$ é reconhecida como um fator de risco para LOAD, nos portadores heterozigotos o risco de desenvolver DA é três vezes maior, enquanto que nos portadores homozigotos o risco de desenvolver DA aumenta de 10-12 vezes (Corder et al. 1993; Saunders et al. 1993).

Embora os mecanismos moleculares sobre a associação de APOE com a patogênese da DA ainda não sejam totalmente elucidados, os dados indicam que as diferentes isoformas de APOE estão associadas às diferenças na degradação e agregação de A β (Christensen et al. 2010; Hashimoto et al. 2012). Além disso, a dosagem do alelo APOE ϵ 4 (homozigoto ou heterozigoto) está associada a secreção aumentada de A β , formação de oligômeros A β e de placas amiloides no cérebro (Christensen et al. 2010; Hashimoto et al. 2012).

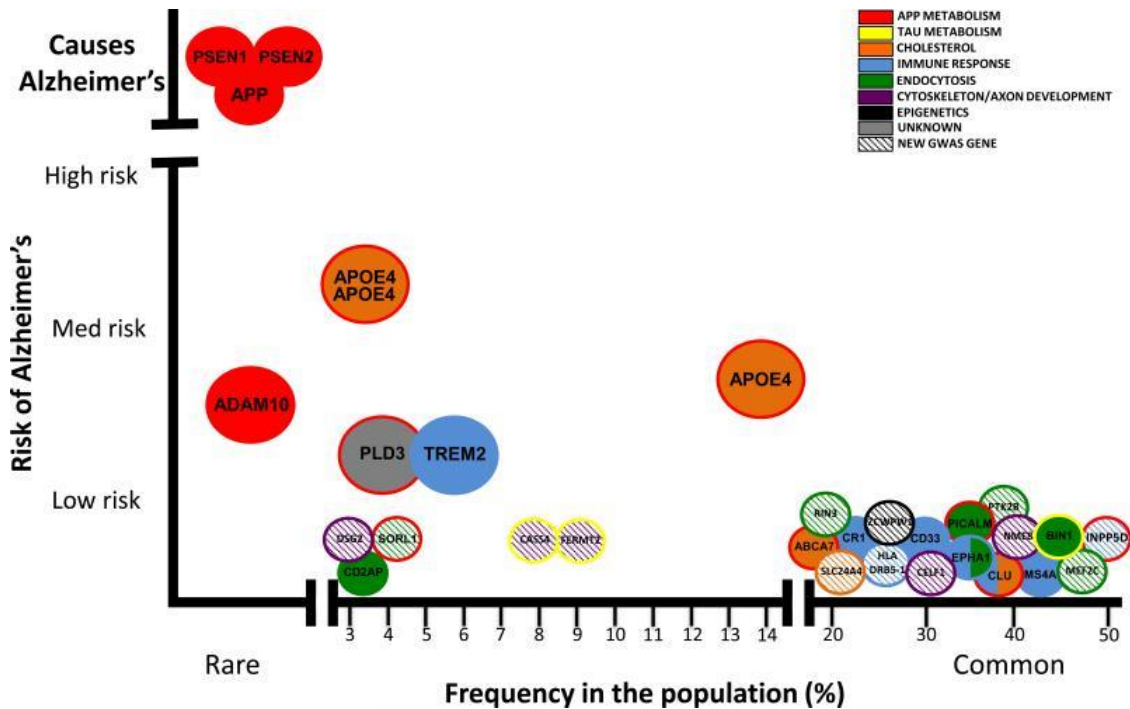


Figura 2: Mutações raras e comuns que contribuem para o risco da doença de Alzheimer. São demonstrados diferentes genes com o risco maior ou menor de desencadear a doença de Alzheimer e sua relação com a frequência com que é encontrada na população. As diferentes cores representam diferentes grupos funcionais de proteínas. Fonte: Karch and Goate 2015.

Recentemente, estudos de GWAS (*genome-wide association study*) analisaram milhões de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) em milhares de amostras para identificar genes de risco associados a DA (Figura 2) (Hirschhorn and Daly 2005; Karch and Goate 2015). Os fatores de risco genéticos identificados de LOAD podem ser classificados em diferentes classes funcionais como genes de resposta imunológica, de metabolismo do colesterol e do tráfego no sistema endossomal (Lane, Hardy, and Schott 2018; Karch and Goate 2015). É importante ressaltar que várias mutações associadas a LOAD foram identificadas em diversos genes associados ao transporte de proteínas, como a proteína SorLA (também chamada de SorL1 ou LR11), um receptor que facilita o tráfego de vesículas da superfície celular para o complexo de Golgi, também regula o

transporte e processamento de APP e a produção de A β (Offe et al. 2006; Andersen et al. 2005; Na et al. 2017). Outros ensaios de GWAS observaram mutações associadas a LOAD em componentes do complexo retrômero (Small et al. 2005; Vardarajan et al. 2012). Mais informações sobre maquinarias de transporte intracelular serão abordadas nesta introdução.

A proteína precursora do beta-amiloide (APP)

APP é uma proteína transmembrana do tipo 1, altamente conservada e foi o primeiro gene descoberto ligado à patogênese da DA (Goldgaber et al. 1987; Tanzi et al. 1987; Kang et al. 1987). Além disso, APP é importante para diversas funções neurofisiológicas ao longo do desenvolvimento (Müller, Deller, and Korte 2017). APP pertence a uma pequena família de proteínas que incluem homólogos APLP1 (*amyloid beta precursor like protein 1*) (Wasco et al. 1992) e APLP2 (*amyloid beta precursor like protein 2*) (Wasco et al. 1993). Todas as proteínas da família têm um grande domínio N-terminal extracelular, um domínio transmembrana de passagem única e uma cauda citoplasmática curta (Müller, Deller, and Korte 2017). Embora APP e APLPs compartilhem diversas regiões conservadas a sequência A β está exclusivamente presente em APP (Müller, Deller, and Korte 2017). APP e APLP2 são expressas em todos os tecidos com maiores níveis de expressão no sistema nervoso e na junção neuromuscular (Slunt et al. 1994; Lorent et al. 1995; Thinakaran et al. 1995), em contraste com a expressão de APLP1 que é encontrado apenas no sistema nervoso (Lorent et al. 1995).

APP é codificado por um único gene localizado no cromossomo 21 e o *splicing* alternativo dá origem a três isoformas principais, sendo APP695, APP751 e APP770 de acordo com o número de resíduos de aminoácido da proteína (Sandbrink, Masters, and Beyreuther 1994, 1996). As isoformas APP751 e APP770 são expressas em todos os tecidos (Sandbrink, Masters, and Beyreuther 1994, 1996) enquanto a isoforma APP695 é predominantemente expressa no cérebro (Kang and Müller-Hill 1990). As proteínas da família APP são importantes no desenvolvimento inicial do sistema nervoso, em especial na diferenciação e migração neuronal (Magara et al. 1999; López-Sánchez, Müller, and Frade 2005; Shariati et al. 2013; Müller, Deller, and Korte 2017). APP e APLPs também são importantes para a manutenção da morfologia neuronal (Hick et al. 2015) e nos mecanismos de aprendizagem espacial e memória (Weyer et al. 2011; Hick et al. 2015).

As secretases de processamento de APP

Existem dois genes com atividade de clivagem β -secretase, BACE1 (β -site APP cleaving enzyme 1) e BACE2 (β -site APP cleaving enzyme 2), provenientes dos cromossomos 11 e 21, respectivamente (Acquati et al. 2000; Solans, Estivill, and de La Luna 2000; Sun et al. 2005). BACE1 e BACE2 são aspartil-proteases transmembrana do tipo 1 e compartilham 64% dos aminoácidos com organização estrutural semelhante (Bennett et al. 2000; Solans, Estivill, and de La Luna 2000; Yan 2017; Ostermann et al. 2006). BACE1 foi identificada por quatro grupos independentes em 1999 como a β -secretase iniciadora da clivagem de APP para a produção de subsequente A β (Hussain et al. 1999; Sinha et al. 1999; Vassar et al. 1999; Yan et al. 1999). Em contraste, BACE2 mostrou-se clivar APP de forma mais eficiente em uma porção interna de A β , gerando um peptídeo menor e sem a toxicidade de A β (Farzan et al. 2000; Sun et al. 2005; Sun, He, and Song 2006; Yan et al. 2001).

APP também pode ser clivado por outra secretase em uma porção interna do peptídeo A β de APP impedindo sua geração (Esch et al. 1990). Este local de clivagem é conhecido como o local de clivagem da α -secretase e representa a etapa de clivagem inicial ao longo da via de processamento não amiloidogênica (Esch et al. 1990; Yuan et al. 2017). A proteína transmembrana ADAM10 foi posteriormente identificada como a principal protease com atividade α -secretase atuante na clivagem constitutiva de APP (Kuhn et al. 2010; Jorissen et al. 2010).

O complexo γ -secretase é uma aspartil-protease composto por proteínas transmembrana responsáveis por gerar a clivagem final de várias proteínas transmembrana do tipo 1 em porções intramembrana, como APP, Notch e N-caderina (Struhl and Adachi 2000; Wolfe et al. 1999; Bai, Yan, et al. 2015; Uemura et al. 2006). O complexo γ -secretase é composto pela PSEN1 ou PSEN2, as quais representam o núcleo catalítico de γ -secretase, e três outras subunidades com funções acessórias: nicastrina (NCT), APH1 (*anterior pharynx-defective 1*) e PEN-2 (*presenilin enhancer 2*) (Baulac et al. 2003; Bai, Yan, et al. 2015; Steiner et al. 2002; Gu et al. 2003; LaVoie et al. 2003; Kimberly et al. 2003). A perda de qualquer subunidade do complexo compromete a atividade proteolítica de γ -secretase (Pardossi-Piquard et al. 2009).

A hipótese da cascata amiloide

A hipótese da cascata amiloide preconiza os agregados de A β como elemento desencadeador da DA (Figura 3). Existem evidências substanciais que apoiam a hipótese amiloidogênica e vêm, por exemplo, de descobertas de mutações genéticas associadas a DA presentes em APP, PSEN1 e PSEN2 do complexo γ -secretase as quais alteram o processamento de APP, resultando na superprodução de espécies tóxicas de A β (Scheuner et al. 1996; Saito et al. 2011; Cruchaga et al. 2012; J. Hardy 2017).

Indivíduos com síndrome de Down (trissomia do cromossomo 21) possuem 3 cópias do gene APP e normalmente desenvolvem a neuropatologia da DA com cerca de 40 anos (Masters et al. 1985; Glenner and Wong 1984). Além disso, casos raros de indivíduos com duplicação do locus APP desenvolvem DA, mas não são portadores da síndrome de Down (Rovelet-Lecrux et al. 2006). Em contrapartida, portadores da síndrome de Down que adquiriram uma porção do cromossomo 21 que não possui o gene APP não desenvolvem DA (Prasher et al. 1998). Esses dados indicam que a expressão aumentada de APP favorece o surgimento da DA presumivelmente devido à produção excessiva de A β .

Outro fator importante são mutações pontuais presentes em APP que protegem contra o surgimento da DA ou favorecem seu desenvolvimento. Um exemplo notável é a mutação missense (A673T) no gene APP identificada em islandeses a qual resulta na menor produção de A β , diminuindo o risco de DA e o declínio cognitivo em idosos (Jonsson et al. 2012). Em contrapartida, o gene APP que carrega a “mutação sueca” (K670N/M671L), a qual já é caracterizada como risco aumentado de fAD (Citron et al. 1992) favorece o processamento amiloidogênico (Kimura, Hata, and Suzuki 2016) e a produção de A β (Perez, Squazzo, and Koo 1996). Ensaios *in vitro* utilizando neurônios derivados de células-tronco obtidas a partir da biópsia de indivíduos com DA mostraram inicialmente um acúmulo de A β extracelular, seguido por um aumento nos níveis da proteína tau hiperfosforilada (Muratore et al. 2014; Moore et al. 2015). A remoção dos peptídeos A β liberados com anticorpos específicos diminuiu os níveis de tau hiperfosforilada (Muratore et al. 2014). Também foi observado que a adição de

oligômeros A β isolados a partir do córtex de pacientes com DA são suficiente para induzir a hiperfosforilação de tau (Jin et al. 2011).

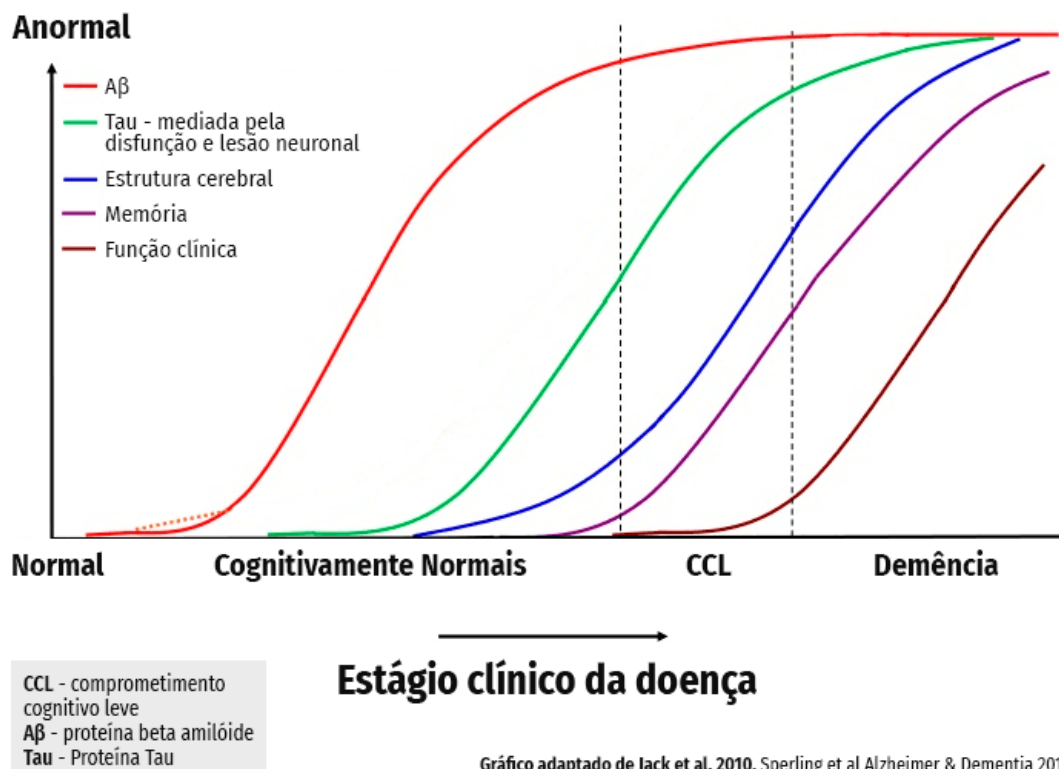


Figura 3: Anomalias neurológicas observadas na doença de Alzheimer nos diferentes estágios clínicos da doença. Inicialmente os níveis de A β são alterados afetando a proteína tau. Estas modificações iniciam o processo de neurodegeneração e o comprometimento das funções cognitivas. Fonte: traduzido e adaptado de Jack et al. 2010, Alzheimer's & Dementia.

Hipóteses alternativas para o desenvolvimento da doença de Alzheimer

A hipótese da proteína tau como causadora de DA é a mais investigada entre as alternativas à hipótese da cascata amiloide. Algumas das evidências que suportam esta hipótese são, por exemplo, que emaranhados de tau podem ser observados nos cérebros de pacientes com DA sem o acúmulo de A β (Ghoshal et al. 2002). A patologia causada pela tau também se correlaciona mais com a gravidade e progressão da DA do que os níveis de A β (Maccioni et al. 2006). Contudo, é notável a diferença na quantidade de pesquisas relacionadas a A β no desencadeamento da DA em comparação a tau o que indica que mais pesquisas devem ser feitas para corroborar ou descartar a “hipótese tau” na DA. Outras hipóteses discutidas na literatura científica da DA tratam sobre a “hipótese do estresse oxidativo” (Markesbery 1997) e “hipótese inflamatória” (Zotova et al. 2010).

Mais recentemente tem surgido uma nova hipótese para explicar o surgimento da DA que deve ser destacada para este trabalho, a hipótese de que o fragmento C99 de APP

seria um importante desencadeador da DA (Checler et al. 2021; Jevtic and Provias 2019). Dentre as evidências é observado, por exemplo, que o acúmulo intracelular de C99 está associado à neurotoxicidade precoce e disfunção cognitiva no início da DA (Tan and Gleeson 2019; Lauritzen et al. 2019). A esse respeito, também se observou que o acúmulo intracelular de C99 em neurônios humanos compromete a função do lisossomal (Hung and Livesey 2018; Lauritzen et al. 2016; Lauritzen et al. 2012), um fator frequentemente observado na fAD (Lie and Nixon 2019).

O processamento de APP e geração do A β

O processamento de APP pode ocorrer pela via amiloidogênica, gerando o A β , ou pela via não amiloidogênica sem a geração do A β , sendo que, as clivagens são realizadas pelas secretases de processamento α -secretase, β -secretase e γ -secretase (Figura 4). Concomitantemente, APP pode ser processado por outras enzimas gerando fragmentos com diferentes funções fisiológicas (Müller, Deller, and Korte 2017; Czechor and McGee 2017).

A via de processamento amiloidogênica é iniciada pela clivagem de APP por BACE1 na extremidade N-terminal do peptídeo A β , entre a metionina M596 e o ácido aspártico D597 (1º aminoácido do A β), com as posições dos aminoácidos referentes a isoforma APP695. Esta clivagem inicial por BACE1 gera o fragmento C99 (o termo C99 será adotado neste trabalho), também chamado de fragmento C-terminal β (β -CTF) e o ectodomínio solúvel sAPP β (Hussain et al. 1999; Sinha et al. 1999; Vassar et al. 1999; Yan et al. 1999). O fragmento C99 transmembrana é subsequentemente clivado pela γ -secretase em uma porção intramembrana liberando o peptídeo A β e o fragmento AICD (*APP intracellular domain*) (Qi-Takahara et al. 2005; Takami et al. 2009; Tomita 2014). Interessantemente, a clivagem intramembrana de C99 por γ -secretase pode ocorrer em vários locais, produzindo, espécies distintas de peptídeos A β de vários comprimentos que variam entre A β 37 a A β 49 (Qi-Takahara et al. 2005; Takami et al. 2009; Tomita 2014). Os dados indicam que os peptídeos A β mais longos sofrem múltiplas clivagens sucessivas por γ -secretase até produzir as duas espécies mais abundantes de A β , os peptídeos A β 40 e A β 42 (Qi-Takahara et al. 2005; Takami et al. 2009; Tomita 2014).

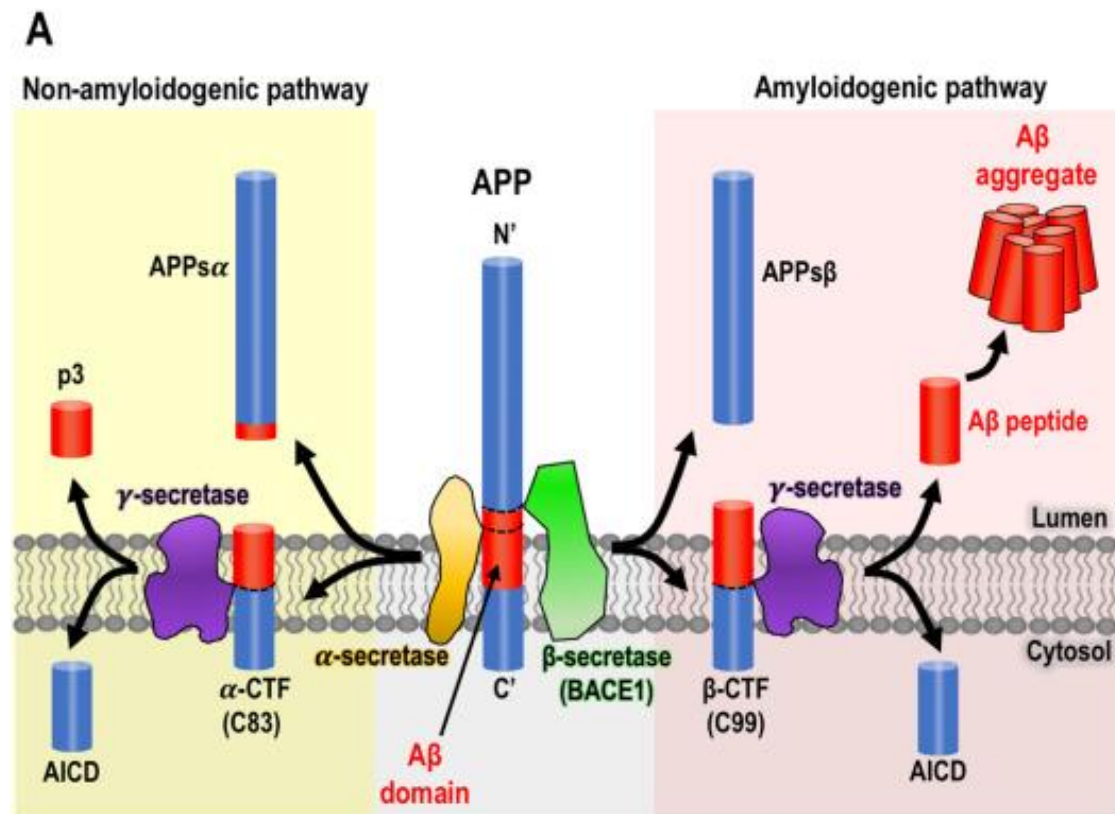


Figura 4: Figura esquemática das vias de processamento de APP. A via de processamento não amiloidogênica é iniciada pela clivagem de APP por α -secretase (fundo amarelo) e a via de processamento amiloidogênica e geração do A β é iniciada pela β -secretase (fundo vermelho). Na via não amiloidogênica, a clivagem inicial por α -secretase gera os fragmentos sAPP α e C83. A clivagem por γ -secretase gera os fragmentos p3 e AICD. Na via amiloidogênica, o processamento é iniciado pela β -secretase gerando os fragmentos sAPP β e C99. A clivagem subsequente por γ -secretase gera os fragmentos A β e AICD. Fonte: (Tan and Gleeson 2019).

A via de processamento não amiloidogênica elimina a produção do peptídeo A β intacto a partir da clivagem inicial de APP entre a lisina K16 e leucina L17 do A β pela α -secretase. Esta clivagem gera o fragmento transmembrana C83 (também chamado de fragmento C-terminal α ou α -CTF) e o ectodomínio de sAPP α (Esch et al. 1990; Kuhn et al. 2010). Diferentes evidências tem mostrado que sAPP α possui atividades neurotróficas (Ninomiya et al. 1994) e neuroprotetoras (Smith-Swintosky et al. 1994; Hefter et al. 2016; Corrigan et al. 2014), propriedades que se contrastam com a neurotoxicidade de A β (Lane, Hardy, and Schott 2018) e a possível função pró-apoptótica atribuída ao fragmento sAPP β (Nikolaev et al. 2009), ambos gerados na via amiloidogênica do processamento de APP. A clivagem subsequente de C83 na porção intramembrana por γ -secretase gera um peptídeo truncado A β 17-40/ A β 17-42 de 3 kDa (peptídeo p3) e o fragmento intracelular AICD (Haass et al. 1993; Haass and Selkoe 1993). O peptídeo p3 não é tóxico e não possui uma função fisiológica conhecida (Müller,

Deller, and Korte 2017). O fragmento AICD pode funcionar como um regulador transcricional (Cao and Südhof 2001; Cupers et al. 2001; Gao and Pimplikar 2001).

Sítios intracelulares de produção de A β

O encontro de APP com BACE1 no sistema de endomembranas é uma etapa essencial para o processamento amiloidogênico e subsequente produção de A β (Tan and Gleeson 2019). O processamento de APP pode ocorrer em vários compartimentos intracelulares ao longo da via secretória e endocítica, mas as evidências indicam que o processamento amiloidogênico e produção de A β deve ocorrer principalmente no complexo de Golgi e em compartimentos endossomais (Kinoshita et al. 2003; Greenfield et al. 1999; Xu et al. 1997; Toh et al. 2017; Toh et al. 2018; Chia et al. 2013; Burgos et al. 2010; Yamazaki, Koo, and Selkoe 1996; Choy, Cheng, and Schekman 2012). BACE1 tem a atividade catalítica ideal em pH ácido (Vassar et al. 1999; Shimizu et al. 2008; Das et al. 2013) e este fato é consistente com o pH encontrado em endossomos e no complexo de Golgi, onde BACE1 cliva APP (Kinoshita et al. 2003; Greenfield et al. 1999; Xu et al. 1997; Toh et al. 2017; Toh et al. 2018; Chia et al. 2013; Burgos et al. 2010; Yamazaki, Koo, and Selkoe 1996; Choy, Cheng, and Schekman 2012). Esses dados demonstram que o tráfego intracelular e a localização de BACE1 e APP são eventos importantes para a geração de peptídeos A β .

O itinerário de APP no sistema de endomembranas

APP é sintetizado no RE e sofre modificações pós-traducionais no complexo de Golgi. Na rede trans-Golgi (TGN), APP é direcionado para endossomos iniciais (Burgos et al. 2010; Toh et al. 2017). Na via endocítica, APP é internalizado a partir da membrana plasmática (MP) por meio da endocitose mediada por clatrina e direcionado para endossomos iniciais (Xiao et al. 2012; Nordstedt et al. 1993; Koo and Squazzo 1994; Kinoshita et al. 2003). A partir dos endossomos iniciais APP é transportado para endossomos tardios e para posterior degradação lisossomal (Koo et al. 1996; Yamazaki, Koo, and Selkoe 1996; Haass et al. 1992; Lorenzen et al. 2010). Alternativamente, parte do APP internalizado pode ser reciclado de volta para o TGN a partir dos endossomos iniciais (Choy, Cheng, and Schekman 2012; Chia et al. 2013).

O transporte de APP entre os diferentes compartimentos é regulado por maquinarias de transporte que predominantemente utilizam sinais presentes em sua cauda citosólica. APP possui três motivos de tirosina em sua cauda citosólica que podem mediar seu tráfego intracelular. O motivo de transporte 653YTSI656 compreende o motivo canônico de tirosina, seguindo a sequência consenso YXXØ, onde Y é um tirosina, X é um aminoácido qualquer e Ø um aminoácido hidrofóbico (Lai, Sisodia, and Trowbridge 1995). A serina S655 de APP695 é passível de ser fosforilada, o que regula o destino de APP na via endocítica. Com a serina S655 fosforilada, APP segue uma via de transporte retrógrado a partir dos endossomos iniciais para o TGN (Vieira et al. 2010). A via de transporte retrógrado de APP fosforilada para o TGN é mediada indiretamente pelo complexo retrômero via interação com o receptor SorLA (Vieira et al. 2010; Bhalla et al. 2012). Estes estudos mostram como o estado fosforilado de APP regula seu destino entre a degradação e a reciclagem para o TGN.

As outras duas tirosinas da cauda citosólica de APP estão contidas no domínio conservado 681GYENPTY687 de APP695. Neste domínio está contida a sequência consenso de endocitose NPXY (Lai, Sisodia, and Trowbridge 1995). Mutações nos resíduos G681, Y682, N684 e P685 de GYENPTY comprometem a endocitose de APP e culminam na diminuição da geração de A β em ensaios com culturas celulares (Lai, Sisodia, and Trowbridge 1995; Perez et al. 1999). Por outro lado, a tirosina Y687 em 681GYENPTY687 não é necessária para a endocitose de APP (Perez et al. 1999). No entanto, ela participa do processo de degradação de APP, pois a mutação Y687A aumenta a meia-vida de APP em aproximadamente 50% (Perez et al. 1999). A tirosina Y687 é parte de um terceiro motivo de interação 687YKFFE691 o qual é necessário para regular o tráfego pós-Golgi de APP para os endossomos em uma via dependente do adaptador AP-4 (Burgos et al. 2010). A interrupção desta via de tráfego resulta na retenção de APP no TGN e o aumento na geração de A β (Burgos et al. 2010). Este foi o primeiro achado relevante que relaciona as proteínas adaptadoras (APs) com o transporte e processamento de APP.

As proteínas adaptadoras (APs)

A família de proteínas adaptadoras (APs) desempenha um papel central no transporte de proteínas na via secretória e endocítica (Bonifacino 2014). Atualmente existem cinco APs identificados, sendo AP-1, AP-2, AP-3, AP-4 e AP-5 (Figura 5). Os

adaptadores AP-1 e AP-2 foram os primeiros APs identificados a partir de extratos enriquecidos de vesículas revestidas por clatrina (Pearse and Robinson 1984; Pearse 1975; Keen 1987; Keen, Willingham, and Pastan 1979). O adaptador AP-1 regula o transporte de proteínas entre o TGN e em endossomos iniciais, enquanto que AP-2 recruta cargas para endocitose na membrana plasmática (Robinson 2004). AP-3 e AP-4 foram os próximos adaptadores descobertos a partir de buscas por sequências similares as de AP-1 e AP-2 (Simpson et al. 1996; Simpson et al. 1997; Dell'Angelica et al. 1997; Dell'Angelica, Ooi, and Bonifacino 1997; Dell'Angelica, Mullins, and Bonifacino 1999; Hirst et al. 1999). AP-3 e AP-4 foram observados associados ao TGN e endossomos como AP-1. AP-3 participa do direcionamento de cargas para endossomos tardios/ lisossomos e AP-4 direciona cargas a partir do TGN para endossomos iniciais e para periferia da célula (Bonifacino 2014; Mattera et al. 2017; Davies et al. 2018). O último adaptador descrito, AP-5, foi identificado a partir de análises comparativas das estruturas secundárias de suas subunidades em relação as subunidades dos demais APs (Hirst et al. 2011). AP-5 atua na seleção de cargas direcionando-as para endossomos tardios e lisossomos (Figura 5) (Hirst et al. 2011; Hirst et al. 2013).

Os APs são complexos heterotetraméricos (4 subunidades distintas) composto por duas subunidades grandes de aproximadamente 100 kDa, sendo uma subunidade β em cada AP denominada $\beta 1$ a $\beta 5$ para AP-1 a AP-5, e uma com nome específico para cada AP sendo γ , α , δ , ϵ e ζ para AP-1 a AP-5, respectivamente; uma subunidade média de aproximadamente 50 kDa, $\mu 1$ a $\mu 5$ para AP-1 a AP-5, respectivamente; e uma subunidade pequena de aproximadamente 20 kDa, $\sigma 1$ a $\sigma 5$ para AP-1 a AP-5, respectivamente (Hirst, Irving, and Borner 2013; Robinson 2004). AP-1, AP-2 e AP-3 são mais heterogêneos devido à existência de isoformas múltiplas de suas subunidades as quais são codificadas por diferentes genes. AP-1 possui duas subunidades γ ($\gamma 1$ e $\gamma 2$), duas subunidades $\mu 1$ ($\mu 1A$ e $\mu 1B$) e três $\sigma 1$ ($\sigma 1A$, $\sigma 1B$ e $\sigma 1C$). AP-2 possui duas subunidades α (αA e αC). AP-3 possui duas subunidades $\beta 3$ ($\beta 3A$ e $\beta 3B$), duas subunidades $\mu 3$ ($\mu 3A$ e $\mu 3B$) e duas $\sigma 3$ ($\sigma 3A$ e $\sigma 3B$) (Boehm and Bonifacino 2001). Isso aumenta o repertório funcional desses APs de acordo com a composição das diferentes isoformas.

Estruturalmente os APs são observados como um complexo globular formando um núcleo central do qual se projetam duas alças flexíveis contendo em suas extremidades um pequeno domínio globular (Collins et al. 2002; Heldwein et al. 2004; Traub and Bonifacino 2013; Ren et al. 2013; Robinson and Bonifacino 2001). O núcleo central dos APs é importante para o seu recrutamento para membranas específicas de forma

dependente de GTPases Arf e fosfolipídios, bem como reconhecimento de sinal das proteínas carga (Bonifacino 2014; Hirst, Irving, and Borner 2013; Traub and Bonifacino 2013). Por outro lado, as alças flexíveis e os domínios globulares recrutam proteínas de revestimento, como a clatrina, e proteínas acessórias importantes para a curvatura da membrana e formação da vesícula de transporte carregando cargas específicas para compartimentos alvo (Bonifacino 2014; Hirst, Irving, and Borner 2013; Traub and Bonifacino 2013).

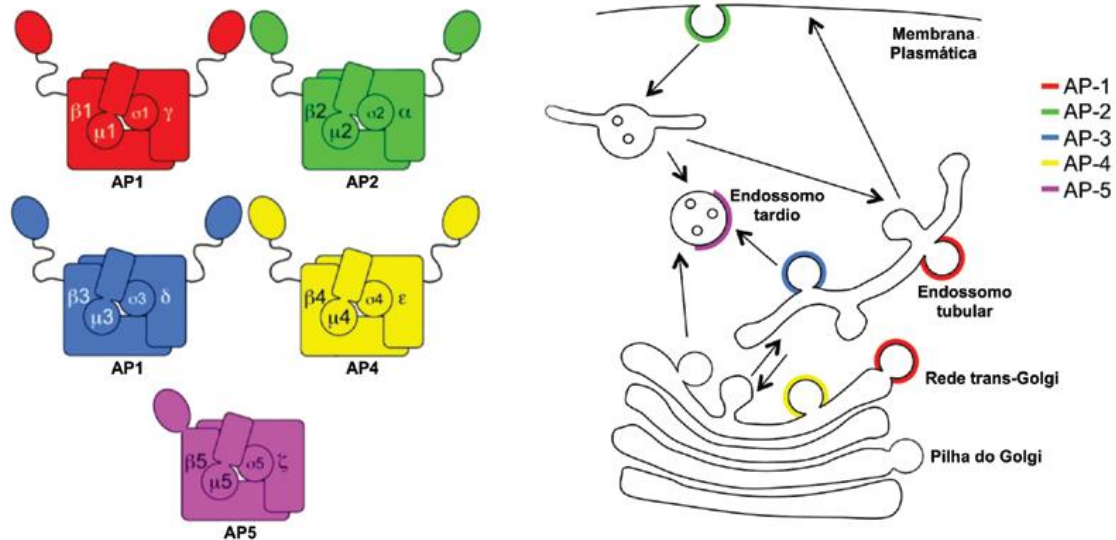


Figura 5: Características estruturais e rotas de tráfego dos APs. Desenho esquemático da estrutura generalizada de AP-1 a AP-5 demonstrando as subunidades pequena denominada σ ($\sigma 1$ para AP-1 a $\sigma 5$ para AP-5), a subunidade média μ ($\mu 1$ - $\mu 5$ para AP-1-AP-5, respectivamente), importante para o reconhecimento da cauda citosólica de proteínas que serão transportadas nas vesículas e as duas subunidades grandes $\beta 1$ - $\beta 5$ para AP-1 a AP-5, e as subunidades γ , α , δ , ϵ e ζ , respectivamente presentes em AP-1 a AP-5. As subunidades grandes são importantes para a interação com as proteínas da maquinaria de tráfego, como clatrina. Os complexos adaptadores direcionam proteínas carga a partir de diferentes locais no sistema de endomembranas da célula. AP-2 direciona proteínas a partir da membrana plasmática para endossomos iniciais; AP-1 transporta entre o TGN e endossomos iniciais; AP-3 direciona proteínas dos endossomos para lisossomos; AP-4 transporta proteínas carga a partir do TGN para endossomos iniciais ou diretamente para a membrana plasmática; AP-5 reconhece proteínas carga a partir de endossomos tardios, mas o compartimento alvo ainda não é conhecido. Neste esquema não é representado o direcionamento polarizado que AP-1 e AP-4 participam ou o papel diferenciado de outras isoformas no tráfego. Fonte: modificado de Hirst et al. 2011.

Motivos de aminoácidos reconhecidos pelos APs

O reconhecimento de sinais específicos nas caudas citosólicas de proteínas carga permitem a incorporação seletiva dessas proteínas em vesículas de transporte nas vias de tráfego biossintéticas e endocíticas. O motivo de tirosina YXX \emptyset e o motivo de dileucina [DE]XXXL[LI] são dois sinais de classificação bem caracterizados (X é um aminoácido qualquer e \emptyset é hidrofóbico). Os sinais YXX \emptyset são tipicamente reconhecidos pela subunidade μ de AP-1 a AP-4 (Bonifacino and Traub 2003; Park and Guo 2014). Os

sinais de dileucina [DE]XXXL[LI] são reconhecidos pelos hemicomplexos de AP-1 (γ e σ_1), AP-2 (α e σ_2), e AP-3 (δ e σ_3) (Bonifacino and Traub 2003; Park and Guo 2014).

Análises de interações com caudas de proteínas carga permitiram o entendimento com mais detalhes de como os motivos de interação se ligam a μ_1A (Jia et al. 2012), μ_2 (Collins et al. 2002; Owen and Evans 1998), μ_3A (Mardones et al. 2013) e μ_4 (Hirst et al. 1999; Aguilar et al. 2001). Os sítios de reconhecimento da sequência sinal canônica YXX \emptyset presentes em μ_1 , μ_2 e μ_3 foram denominados bolso de ligação de tirosinas (Owen and Evans 1998). Interessantemente, o bolso de ligação de tirosinas de μ_4 estruturalmente equivalente ao presente em μ_2 está localizado na região oposta da molécula (Burgos et al. 2010; Ross et al. 2014).

Funções de AP-1

AP-1 pode transportar proteínas carga entre o TGN e endossomos iniciais. Esta função de AP-1 foi descoberta a partir de estudos do transporte de hidrolases lisossomais ligadas a receptores de manose 6-fosfato (MPRs) do TGN para os endossomos (Hille-Rehfeld 1995; Meyer et al. 2000). A ausência de AP-1 funcional levou a secreção das hidrolases lisossomais para o meio extracelular ao invés de entregá-las aos lisossomos (Meyer et al. 2000). Interessantemente, observou-se também que a ausência de AP-1 funcional resulta no acúmulo de MPRs nos endossomos iniciais (Meyer et al. 2000), indicando o que AP-1 atua no transporte bidirecional entre o TGN e endossomos iniciais.

Outros estudos visaram entender as diferenças funcionais de AP-1 contendo diferentes isoformas de suas subunidades. AP-1 possui duas isoformas da subunidade μ_1 , μ_1A e μ_1B , chamados de AP-1A e AP-1B, respectivamente (Ohno et al. 1999; X. Guo et al. 2013). Enquanto AP-1A é expresso em todos os tecidos, AP-1B é encontrado apenas em células epiteliais polarizadas (Ohno et al. 1999; X. Guo et al. 2013). Os papéis de AP-1A e AP-1B no direcionamento polarizado de proteínas para a membrana basolateral de células epiteliais foram extensivamente investigados (Gravotta et al. 2012; H. Zhang et al. 2012; X. Guo et al. 2013). Análises funcionais AP-1A e AP-1B mostraram que ambos são importantes para o direcionamento de várias proteínas transmembranas para a região basolateral de células epiteliais polarizadas (Fölsch et al. 1999; Gan, McGraw, and Rodriguez-Boulan 2002; Sugimoto et al. 2002; Diaz et al. 2009; Almomani et al. 2012; Gravotta et al. 2012; Hase et al. 2013). Ensaios de interação do domínio citosólico de proteínas transmembrana com AP-1B identificaram motivos de interação não-canônicos

com afinidades de interação diferentes das observadas para AP-1A (X. Guo et al. 2013). Portanto, AP-1A e AP-1B têm papéis complementares e não sobrepostos no direcionamento do transporte basolateral em células epiteliais polarizadas.

AP-1A, mas não AP-1B, é expresso em neurônios e realiza o transporte polarizado de cargas nessas células, tais como o do receptor de transferrina (TfR), mGluR1, NMDA, NR2A e NR2B, direcionando-os para domínios somatodendríticos em neurônios do hipocampo de rato (Farías et al. 2012; Bonifacino 2014). O bloqueio da função de AP-1 nessas células leva ao direcionamento incorreto de mGluR1, NR2A e NR2B para os axônios (Farías et al. 2012). Esses resultados destacam a importância do AP-1 na regulação da polaridade de neurônios. Além disso, uma mutação na subunidade $\sigma 1$ em humanos está associada ao retardo mental ligado ao cromossomo X e diversos distúrbios neurológicos, destacando a importância de AP-1 para os neurônios (Tarpey et al. 2006; Saillour et al. 2007).

A cauda citosólica de APP contém motivos de aminoácidos que medeiam sua interação com a subunidade $\mu 4$ de AP-4 (Burgos et al. 2010). Foi também relatada a interação de APP com as subunidades $\mu 1A$ e $\mu 1B$ de AP-1 (Icking et al. 2007). No contexto da possível interação de APP com AP-1, apenas a função de AP-1B foi analisada, onde se observou que AP-1B medeia o tráfego polarizado de APP em células epiteliais (Icking et al. 2007). Contudo, a relevância da possível interação de APP com AP-1A não foi mais estudada. Até a produção deste trabalho a interação descrita de APP com AP-1A não tinha sido confirmada por outros pesquisadores e sua relevância para o tráfego e processamento de APP não era conhecida.

A proteína como Arc/Arg3.1

As conexões sinápticas entre os neurônios são dinâmicas, podendo ser reforçadas ou interrompidas. A modificação dinâmica no processo de comunicação sináptica entre neurônios é denominada plasticidade sináptica, fenômeno essencial para o aprendizado de novas informações e consolidação da memória (Benfenati 2007; Squire et al. 2008). Dentre as modificações associadas a plasticidade sináptica podem ser destacadas a potenciação de longa duração (LTP) e a depressão de longa duração (LTD). Na LTP é observado um aumento de longa duração no potencial sináptico, o qual pode durar dias ou até semanas e está diretamente relacionado ao aumento da densidade de proteínas canais na sinapse. Por outro lado, na LTD ocorre uma diminuição no potencial sináptico

por um longo tempo duração, sendo associada à redução da densidade de proteínas canal envolvidas na atividade sináptica (Benfenati 2007; Squire et al. 2008).

A plasticidade sináptica requer em nível molecular a expressão transitória de genes, que tem funções importantes na modulação da atividade sináptica (Minatohara et al. 2015). Estes genes são denominados *immediate-early genes* (IEGs) e participam da indução da LTP ou LTD (Miyashita et al. 2008; Okuno 2011; Minatohara, Akiyoshi, and Okuno 2015). Dentre os IEGs com ação efetora e papel determinante na manutenção da plasticidade sináptica foi identificado o gene que codifica a proteína Arc (Lyford et al. 1995; Link et al. 1995).

Arc é uma proteína citoplasmática de aproximadamente 50 kDa capaz de se associar com membranas por meio de um mecanismo ainda não conhecido e que também possui sinal de localização nuclear (Chowdhury et al. 2006; Korb et al. 2013). Arc é expressa em diferentes regiões cerebrais como o hipotálamo (Nishimura et al. 2003), córtex (Ramírez-Amaya et al. 2005; Vazdarjanova et al. 2006), bulbo olfatório (Guthrie et al. 2000) e o hipocampo (Lyford et al. 1995; Link et al. 1995). Estudos em camundongos *knockout* para o gene de Arc mostraram que esta proteína é importante para o armazenamento de memórias de longo prazo e aprendizado espacial (Plath et al. 2006). A nível molecular, sabe-se que o aumento prolongado da atividade sináptica ativa vias de sinalização que induzem a expressão gênica de Arc e a proteína atua localmente nas espinhas dendríticas diminuindo a atividade sináptica e induzindo a LTD (Chowdhury et al. 2006; Rial Verde et al. 2006; Korb et al. 2013; W. Zhang et al. 2015).

Arc modifica o tráfego intracelular de APP e geração do peptídeo neurotóxico A β

Apesar de sua importância na plasticidade sináptica, a desregulação da expressão e degradação de Arc está associada com várias doenças neurocognitivas, como a síndrome do X frágil (Niere, Wilkerson, and Huber 2012), síndrome de Angelman (Greer et al. 2010), a esquizofrenia (W. Zhang et al. 2015) e a DA (Wu et al. 2011; Bi et al. 2017).

Foi observada a ocorrência de uma variação na região 3' UTR do gene codificante de Arc a qual está significativamente associada com a DA. Esta mutação leva ao aumento da expressão de Arc e favorece a produção do A β (Bi et al. 2017). Arc também é altamente expresso no córtex frontal de pacientes com a DA (Wu et al. 2011). Como mecanismo molecular, foi proposto que Arc induz o direcionamento de APP, β -secretase BACE1 e γ -secretase para endossomos iniciais, favorecendo o processamento amiloidogênico de

APP e a geração do A β (Wu et al. 2011). Neste processo foi demonstrado que Arc é capaz de interagir com a γ -secretase e redirecioná-la para os endossomos iniciais (Wu et al. 2011). Contudo, os mecanismos moleculares utilizados por Arc para modificar o transporte intracelular de APP e de BACE1 não são conhecidos. É importante ressaltar que entender como Arc modifica o transporte de APP e BACE1 permite compreender a relação entre a desregulação da plasticidade sináptica e desencadeamento da DA.

Arc interage com as proteínas adaptadoras AP-2 e AP-4

A plasticidade sináptica tem como um dos fatores regulatórios a alteração da disponibilidade dos receptores de glutamato do tipo AMPA (AMPARs) nas membranas pós-sinápticas (Derkach et al. 2007). Diferentes trabalhos demonstraram que a expressão de Arc regula negativamente a expressão dos AMPARs na sinapse dendrítica (Chowdhury et al. 2006; Rial Verde et al. 2006; Korb et al. 2013; W. Zhang et al. 2015). O principal mecanismo utilizado por Arc para diminuir os níveis de AMPARs na membrana dos dendritos se dá por meio da indução da endocitose do receptor (Chowdhury et al. 2006; Rial Verde et al. 2006). Em concordância com este achado, camundongos *knockout* para Arc têm a densidade de AMPARs anormalmente aumentada nas membranas dendríticas e sua endocitose ocorre de forma menos dinâmica (Chowdhury et al. 2006). Contudo, pouco se sabe sobre o destino de AMPARs endocitados de forma dependente da ação de Arc.

O processo de endocitose de AMPARs mediado por Arc requer a interação de Arc com duas proteínas da maquinaria endocítica: endofilina e dinamina (Chowdhury et al. 2006). Estas proteínas participam da formação da vesícula endocítica facilitando a deformação da membrana plasmática, seguido de estrangulamento para liberação da vesícula, respectivamente, o que parece facilitar o processo de endocitose de AMPARs mediado por Arc (Chowdhury et al. 2006). Durante meu mestrado, eu fui coautor de um trabalho o qual demonstrou que Arc é capaz de interagir com o complexo AP-2 e que esta interação é determinante para regular negativamente a expressão dos AMPARs (DaSilva et al. 2016). A descoberta da interação de Arc com AP-2, bem como, da sua interação com dinamina e endofilina, demonstra a importância da interação de Arc com elementos da maquinaria de transporte para realizar suas funções celulares. O achado da interação de Arc com AP-2 levanta o questionamento sobre a possibilidade de Arc interagir com outros membros da família de adaptadores (AP1, AP3, AP4 e AP5), e se a interação de

Arc com os complexos APs é importante para as modificações no tráfego e processamento de APP mediadas por Arc.

Durante meu mestrado foi identificado que Arc interage especificamente com a subunidade $\mu 4$ do complexo AP4. Neste mesmo contexto, também foi observado que a expressão de Arc eleva os níveis de APP e do fragmento C99 (Dissertação de Mestrado de Yunan C. Januário, dados não publicados). Ensaios preliminares de imunofluorescência e microscopia confocal também permitiram observar que Arc aumenta os níveis de APP em endossomos iniciais. Juntos estes dados preliminares pavimentam questões importantes sobre a interação de Arc com os APs e a importância dessas interações para alterações no transporte e processamento de APP.

OBJETIVOS E HIPÓTESE

Objetivo geral do trabalho

- Analisar a relevância de AP-1 e Arc para o tráfego e processamento de APP.

Objetivos específicos para AP-1 e APP

- Confirmar e caracterizar a interação de APP com a subunidade $\mu 1A$.
- Determinar se AP-1 atua no transporte de APP entre o complexo de Golgi e endossomos iniciais.
- Analisar se a interrupção do transporte de APP mediado por AP-1 altera o processamento amiloidogênico.

Objetivos específicos para Arc e APP

- Analisar se a superexpressão de Arc altera os níveis totais dos fragmentos C-terminal de APP.
- Determinar quais proteínas adaptadoras APs interagem com Arc.

Hipótese geral da tese

Levando em consideração o levantamento bibliográfico que relaciona AP-1 e Arc com o transporte de APP e de suas secretases de processamento, a hipótese geral desta tese é que o desequilíbrio funcional em AP-1 ou Arc deve afetar diretamente o transporte e processamento amiloidogênico de APP.

MATERIAL E MÉTODOS

Material e métodos

Plasmídeos para expressão das proteínas de interesse

As tabelas abaixo descrevem plasmídeos comerciais utilizados, as respectivas proteínas de interesse codificadas e a referência da origem dos plasmídeos.

Tabela 1. Plasmídeos para expressão das proteínas de interesse em células de mamíferos.

pEGFP C2	vazio	Clontech (adquirido comercialmente)
pEGFP N1	APP WT-GFP	(Burgos et al. 2010)
pEGFP N1	APP F/P-D/A-GFP	(Burgos et al. 2010)
pEGFP N1	APP Y682A-GFP	Plasmídeo gerado durante o doutorado
pCI-Neo	μ 1A WT-3xHA	(Farías et al. 2012)
pCI-Neo	μ 1A W408S-3xHA	(Farías et al. 2012)
pCI-Neo	μ 4A WT-3xHA	(Ross et al. 2014)
pEGFP N1	Rab5 Q79L-GFP	Doado por J. Bonifacino (NIH)
pmCherry N1	vazio	Clontech (adquirido comercialmente)
pmCherry C2	APP WT-mCherry	Doado por J. Bonifacino (NIH, EUA)
pmCherry C2	Arf1 Q71L-mCherry	Doado por J. Bonifacino (NIH, EUA)
RUSH monocitrônico	APP WT	Doado por D. Gershlick (CIMR, Inglaterra)
RUSH bicitrônico	APP WT	Doado por D. Gershlick (CIMR, Inglaterra)
RUSH bicitrônico	APP Y682A	Plasmídeo gerado durante o doutorado
pVSV-G	-	Addgene (adquirido comercialmente)
pCL-Eco	-	Addgene (adquirido comercialmente)
pMSCV	estreptavidin-KDEL	Doado por D. Gershlick (CIMR, Inglaterra)
pCI-Neo	Arc WT	(DaSilva et al. 2016)

Os plasmídeos Rab5 Q79L-GFP, Arf1 WT-mCherry e Arf1 Q71L-mCherry foram cedidos por Juan Bonifacino (NICHD/NIH, Maryland, EUA). Os plasmídeos comerciais pEGFP-C2 e pmCherry foram obtidos comercialmente (Clontech, Califórnia, EUA). As

mutações em APP F/P-D/A referem-se a substituições de ponto F615P e D664A. O plasmídeo expressando APP Y682A-GFP foi gerado durante o doutorado por mutagênese sítio dirigida utilizando o *kit QuikChange II Site-Directed Mutagenesis* a partir do plasmídeo APP F/P-D/A-GFP (Agilent, Califórnia, EUA). Os plasmídeos utilizados no sistema RUSH para expressar APP WT foram cedidos por David Gershlick (CIMR, Cambridge, Inglaterra) e a descrição dos plasmídeos e mecanismos moleculares de funcionamento do sistema estão descritos em detalhes na sessão “*Retention using selective hooks (RUSH)*”, no material e métodos. Os demais plasmídeos foram doações de diferentes autores e a metodologia para gerar cada plasmídeo está descrita nas respectivas referências.

Tabela 2. Plasmídeos para expressão das proteínas de interesse em leveduras.

pACT	μ 1A	(Janvier et al. 2003; Chaudhuri et al. 2007)
pACT	μ 1B (c-terminal)	(X. Guo et al. 2013)
pACT	μ 2	(Janvier et al. 2003; Chaudhuri et al. 2007)
pACT	μ 3A	(Janvier et al. 2003; Chaudhuri et al. 2007)
pACT	μ 4	(Janvier et al. 2003; Chaudhuri et al. 2007)
pACT	β 2	Doado por J. Bonifacino (NIH)
pACT	μ 1A D174A	(Farías et al. 2012)
pACT	μ 1A W408S	(Farías et al. 2012)
pACT	μ 1A F238A	Plasmídeo gerado durante o doutorado
pACT	μ 1A S266D	Plasmídeo gerado durante o doutorado
pGADT7	vazio	Clontech (adquirido comercialmente)
pGBKT7	Arc WT	Plasmídeo gerado durante o mestrado
pGBT9	TGN38 tail	(Ohno et al. 1995)
pGBKT7	APP tail	(Burgos et al. 2010)
pGBKT7	vazio	Clontech (Adquirido comercialmente)
pGBKT7	APP tail Y653A	Plasmídeo gerado durante o doutorado
pGBKT7	APP tail I656A	Plasmídeo gerado durante o doutorado
pGBKT7	APP tail Y-A/I-A	Plasmídeo gerado durante o doutorado
pGBKT7	APP tail Y687A	Plasmídeo gerado durante o doutorado

pGBKT7	APP tail F690A	Plasmídeo gerado durante o doutorado
--------	----------------	--------------------------------------

O plasmídeo pACT β 2 foi cedido por Juan Bonifacino (NICHD/NIH, Maryland, EUA). Os plasmídeos comerciais pGBKT7 e pGADT7 foram obtidos comercialmente (Clontech, Califórnia, EUA). O plasmídeo pGBKT7 Arc foi gerado previamente no laboratório a partir da subclonagem de Arc com as enzimas de restrição EcoRI e SalI. As mutações listadas na cauda citosólica de APP e em μ 1A foram geradas por mutagenese sítio dirigida utilizando o kit *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis* (Agilent, Califórnia, EUA). Os plasmídeos pGBKT7 APP Y-A/I-A refere-se a mutações pontuais na cauda citosólica de APP nos aminoácidos Y653A e I656A. Os demais plasmídeos foram doações de diferentes autores e a metodologia para gerar cada plasmídeo está descrita nas respectivas referências.

Tabela 3. Plasmídeos para expressão das proteínas de interesse em *E. coli*.

pGEX	GST	GE Healthcare (adquirido comercialmente)
pGEX	GST-Arc WT	(DaSilva et al. 2016)
pGEX	GST-Arc W197A	(DaSilva et al. 2016)

O plasmídeo comercial pGEX-GST foi obtido comercialmente (GE Healthcare, Illinois, EUA). GST-Arc WT e GST-Arc W197A foram gerados anteriormente no laboratório e foram descritos na referência citada.

Cultura celular

As linhagens celulares foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM - Life Technologies, Califórnia, EUA), suplementado com soro fetal bovino 10% (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA), glutamina 584mg/L (Life Technologies, Califórnia, EUA), NaHCO₃ 3,7g/L, penicilina 100U/mL e estreptomicina 100g/mL (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). Células H4 (neuroglioma humano) foram obtidas comercialmente (American Type Culture Collection, Virginia, EUA). As células HeLa CRISPR/Cas9 μ 1A KO e a HeLa WT parental foram doadas por Margaret S. Robinson (Universidade de Cambridge, Inglaterra) e foram descritas anteriormente (Navarro Negredo et al. 2017). Células PEAK são células HEK-293 transfectadas com o

antígeno T de SV-40 (de Carvalho et al. 2014) e foram usadas para ensaios de co-
imunoprecipitação.

Culturas primárias de neurônios corticais foram estabelecidas a partir de cérebro de ratos Wistar embrionários no 18° dia após o acasalamento. As áreas corticais foram dissecadas, submetidas à digestão com tripsina (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e mecanicamente dissociadas na presença de DNase (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). As células foram plaqueadas em lamínulas de vidro de 22 mm revestidas com poli-L-lisina 0,5mg/mL (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). O meio de cultura consistiu em Neurobasal (Gibco, Massachusetts, EUA) suplementado com Penicilina-Estreptomicina a 1% (Invitrogen, Califórnia, EUA), L-Glutamina a 0,5% (ForMedium, Norfolk, Inglaterra), B-27 a 2% (Gibco, Massachusetts, EUA) e soro de cavalo a 5% (Invitrogen, Califórnia, EUA). No dia seguinte, o meio foi trocado por meio isento de soro de cavalo. As células foram mantidas a 37 °C e 5% de CO₂ em uma incubadora umidificada. A cultura de neurônios e transfecções foram realizadas pelo estudante de Mestrado do laboratório Luan Oliveira em visita ao laboratório da Dra. Sônia A. L. Correa (University of Bradford, Inglaterra) seguindo critérios do comitê de ética da Inglaterra. A aquisição das imagens no microscópio, análise dos resultados e montagem das imagens foi realizada pelo doutorando Yunan Costa Januário, autor desta tese.

Transfecções e drogas utilizadas na cultura celular

Para transfecção de plasmídeos de expressão foi utilizado o reagente lipofectamina 2000 (Life Technologies, Califórnia, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Para transfecção de siRNA foi utilizado o reagente Oligofectamina (Life Technologies, Califórnia, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. A sequência de siRNA utilizada é constituída de duplex de nucleotídeos com 3'dTdT com sequência de humano como alvo sendo $\gamma 1$ (5'-GGAAGAGCCUAUUCAGGUA-3') (Dharmacon, Lafayette, EUA).

A droga DAPT (*N*-[*N*-(3,5-Difluorophenacetyl)-*L*-alanyl]-*S*-phenylglycine *t*-butyl ester) foi obtida comercialmente (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e adicionada no meio de cultura completo na concentração de 1 μ M, após aproximadamente 4 horas de transfecção para inibir a atividade de γ -secretase. O tempo de incubação variou em cada experimento e é descrito em detalhes nas legendas das respectivas figuras. O tratamento com biotina foi realizado aproximadamente 16 horas após as transfecções por diferentes

tempos e é descrito na sessão “*Retention using selective hooks (RUSH)*” do material e métodos. As células foram incubadas com 40µM de biotina solúvel (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) por diferentes tempos antes da fixação ou lise. A droga bafilomincina A1 (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) foi adicionada no meio de cultivo de células e incubada a 37 °C pelos tempos de 0, 2, 4 e 8 horas. O ligante EGF (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) foi adicionado no meio de cultura na concentração de 50ng/mL e incubado com as células a 37 °C por 3 horas.

Anticorpos

Tabela 4. Anticorpos utilizados para western blot e imunofluorescência.

Anti-µ1A (AP-1)	Abcam (Cambridge, Inglaterra)
Anti-γ1 (AP-1)	BD Biosciences (Califórnia, EUA)
Anti-ε (AP-4)	BD Biosciences (Califórnia, EUA)
Anti-µ2 (AP-2)	Doado por G. Mardones (UACH, Chile)
Anti- µ3A (AP-3)	Doado por G. Mardones (UACH, Chile)
Anti- µ4 (AP-4)	Doado por G. Mardones (UACH, Chile)
Anti-TGN46	Bio-Rad (Califórnia, EUA)
Anti-EEA1	BD Biosciences (Califórnia, EUA)
Anti-GM130	BD Biosciences (Califórnia, EUA)
Anti-CD63	BD Biosciences (Califórnia, EUA)
Anti-HGS/HRS	Abcam (Cambridge, Inglaterra)
Anti-GAPDH	Sigma (Missouri, EUA)
Anti-HA	Sigma (Missouri, EUA)
Anti-GFP	Doado por R. Hedge (MRC, Inglaterra)
Anti-mCherry	Doado por R. Hedge (MRC, Inglaterra)
Anti-Arc	Synaptic Systems (Goettingen, Alemanha)
Anti-β-actina	Thermo Scientific (Massachusetts, EUA)
Anti-6E10	Covance (New Jersey, EUA)
Anti-EGFR	Abcam (Cambridge, Inglaterra)
Anti-IgG de Camundongo-HRP	GE (Buckinghamshire, Inglaterra)

Anti-IgG de Coelho-HRP	GE (Buckinghamshire, Inglaterra)
Anti-IgG de Camundongo-Alexa 594	GE (Buckinghamshire, Inglaterra)
Anti-IgG de Coelho-Alexa 647	GE (Buckinghamshire, Inglaterra)
Anti-IgG de Ovelha-Alexa 647	GE (Buckinghamshire, Inglaterra)

O anticorpo anti-GFP e anti-mCherry foram cedidos por Ramanujan Hedge (MRC, Cambridge, Inglaterra). Os anticorpos anti- μ 2 (AP-2), anti- μ 3A (AP-3) e anti- μ 4 (AP-4) foram doados por Gonzalo Mardones (FAME/UACH, Chile).

Alinhamento de sequências e representação da estrutura de proteínas

Diferentes sequências de proteínas de genes homólogos de APP de diferentes organismos e da família de genes APP em humanos foram obtidas do banco de dados UniProt. O identificador de entrada da sequência das proteínas utilizadas são: P05067-4 (APP isoforma 695 de *Homo sapiens*), P12023-2 (APP isoforma 695 de *Mus musculus*), Q6NRR1 (APP de *Xenopus laevis*), E1C440 (AAPP de *Gallus gallus*), O93279 (APP de *Takifugu rubripes*), 14599 (APP-like de *Drosophila melanogaster*), Q10651 (APP-like de *Caenorhabditis elegans*), P51693 (APLP1 de *Homo sapiens*), Q06481 (APLP2 de *Homo sapiens*). As sequências das caudas citosólicas foram alinhadas utilizando o software livre Clustal Omega (Sievers et al. 2011). A representação de superfície do domínio C-terminal de μ 1A foi obtida a partir do banco de dados de estruturas de proteínas PDB (PDB ID 1W63) (Heldwein et al. 2004). A visualização e a análise do modelo estrutural da proteína foram realizadas usando a versão gratuita do software PyMOL (www.pymol.org).

Ensaio de duplo híbrido

Os ensaios de interação proteínas-proteína no sistema de duplo híbrido foram realizados pela co-expressão dos plasmídeos codificando GAL4-BD; *TRP1* e GAL4-AD; *LEU2*; GAL4-BD e GAL4-AD são expressas fusionadas às proteínas estudadas (Figura 6). Os plasmídeos foram utilizados para expressão em leveduras competentes *S. cerevisiae*. Os genes *TRP1* e *LEU2* são marcadores nutricionais que codificam enzimas essenciais para a síntese de triptofano e leucina, respectivamente. A transformação das

leveduras com os dois plasmídeos capacita o seu crescimento em meio restritivo sem os aminoácidos triptofano e leucina. A interação das proteínas de interesse resulta na transcrição do gene repórter HIS3 dependente de Gal4, capacitando o crescimento das leveduras em meios restritivo sem o aminoácido essencial histidina (-His) (Figura 6).

Para os ensaios de duplo híbrido foram utilizadas as cepas de AH109 e HF7c (Clontech Laboratories, Mountain View, EUA). Colônias da levedura foram pré-cultivadas em meio YPD (1% extrato de levedura, 2% peptona, 20% glicose, 0,001% sulfato de adenina) a 30 °C por 16-18 horas sob agitação. A pré-cultura foi então quantificada e diluída em meio fresco para a DO₆₀₀ de 0,5 e incubadas a 30 °C até a D.O₆₀₀ alcançasse 0.7. Os plasmídeos foram inseridos nas leveduras pelo método de transformação mediado por acetato de lítio (LiAc) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). As leveduras foram recuperadas do meio YPD, lavadas em água estéril e ressuspensas em solução fresca de TE 1X (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.5) e LiAc 1M. Em seguida, foi adicionado na suspensão de leveduras a solução de transformação composta por LiAc 1M, TE 10X, 50% PEG 3350 (polietilenoglicol) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 1µg de DNA carreador fita simples (espermatozoide de salmão) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 1 µg de cada DNA plasmideal. A mistura foi incubada a 30 °C por 30 minutos sob agitação. Em seguida, foi adicionado DMSO (contração final de 10%) (Dimethyl Sulphoxide) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e as células submetidas ao choque térmico por 15 minutos a 42 °C seguido por 2 minutos de incubação no gelo. As células transformadas foram lavadas com água estéril e incubadas em meio restritivo, 0.67% de *Bacto Yeast Nitrogen base without aminoacids* (BD Difco, Franklin Lakes, EUA), 2% glicose (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 10% solução 10X de aminoácidos essenciais menos leucina (-Leu) e triptofano (-Trp) (aminoácidos da Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e incubadas a 30 °C por 2-4 dias para obtenção de colônias. As leveduras que cresceram no meio restritivo foram diluídas em água estéril e normalizadas para DO₆₀₀ de 0.2. Este material foi igualmente distribuído em placas com os meios restritivos -Leu/-Trp (placas controle) e -Leu/-Trp/-His (placas de teste onde o crescimento indica a interação das proteínas) e incubadas a 30 °C por 2-4 dias para observação do resultado.

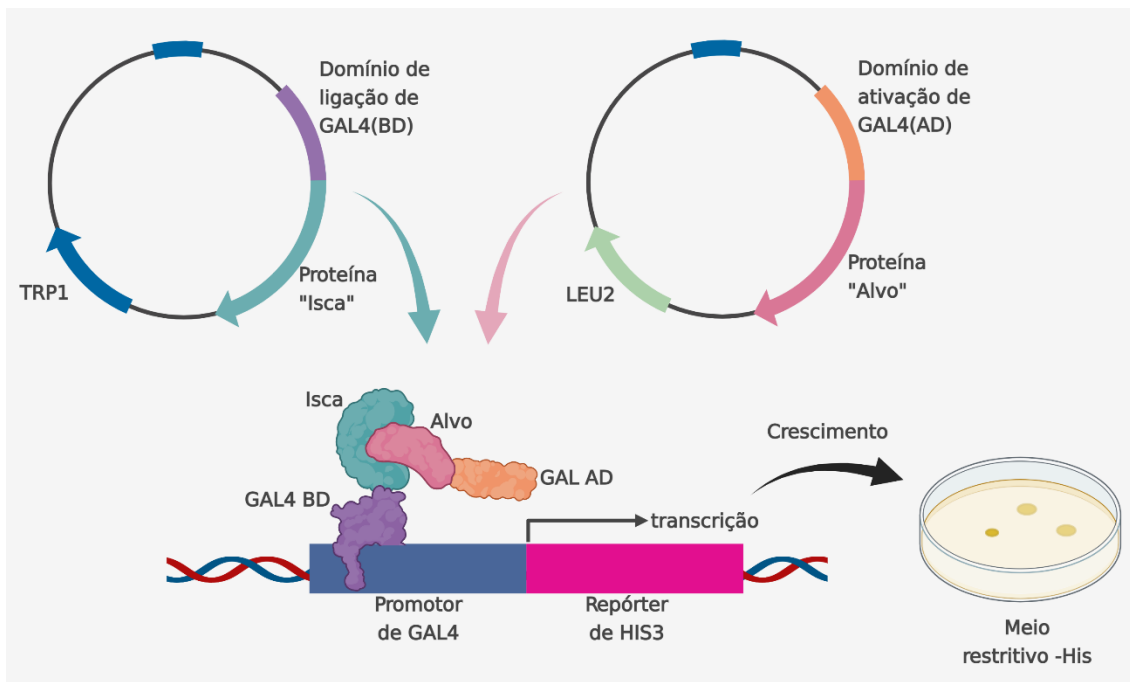


Figura 6: Esquema representativo do sistema de duplo híbrido em leveduras. Estão representados os vetores de expressão (acima) e a transcrição do gene repórter decorrente da interação entre as proteínas de interesse pela ativação de Gal4 (abaixo) permitindo o crescimento das leveduras em meio restritivo sem o aminoácido essencial histidina. A co-transformação é feita com os plasmídeos codificando o domínio de ligação do fator de transcrição Gal4 (BD) expresso em fusão com a 'proteína isca' e a enzima da via metabólica do triptofano (TRP1); ou o domínio de ativação de Gal4 (AD) expresso em fusão com a 'proteína alvo' e a enzima da via metabólica da leucina (LEU2).

Ensaio de interação proteína-proteína por *pull down*

Para a expressão das proteínas recombinantes GST ou GST-Arc foi utilizada a linhagem de *E. coli* BL21 Rosetta (Merck Millipore, Massachusetts, EUA). Após 18 horas de proliferação em meio LB, as culturas foram diluídas para D.O₆₀₀ igual a 0,2 e então incubadas a 37 °C sob agitação até que a D.O₆₀₀ fosse igual a 0,8. Adicionou-se então IPTG na concentração final de 0,5mM e as culturas foram incubadas a 30 °C por 3 horas para a expressão das proteínas de interesse. Após o tempo de expressão os pellets foram congelados a -80 °C para posterior lise. O tampão de lise utilizado consistiu em 50mM de Tris; 1mM de EDTA; 500mM NaCl; 50µL/mL de lisozima (estoque 100mg/mL); 1µL/mL de aprotinina (estoque a 1,2mg/mL), 1% de triton X-100 e 1% de NP-40, pH igual a 7.4. Os lisados foram incubados com *beads* de agarose conjugada com glutationa (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra) por 3 horas a 4 °C, sob agitação. As lavagens para remoção de proteínas ligadas de forma inespecífica foram realizadas utilizando o tampão de lise. Em seguida os lisados contendo as proteínas de interesse foram adicionados em iguais quantidades aos tubos contendo as *beads* com as proteínas fusionadas a GST. As amostras foram novamente incubadas por 3 horas a 4 °C, sob

agitação. Após a incubação realizou-se as lavagens com tampão de lavagem (Tris/HCl 10mM, pH 7,5, NaCl 150mM, EDTA 0,5mM) gelado por 3 vezes, seguido da adição de tampão de amostra contendo SDS. As amostras foram estocadas a -80 °C e posteriormente analisadas por western blot.

Imunoprecipitação por ensaio de GFP-Trap

O ensaio de GFP-Trap® (ChromoTek, Munich, Alemanha) foi realizado seguindo as recomendações do fabricante. Células PEAK foram plaqueadas em placa de 100 mm. No dia seguinte as células foram transfectadas com plasmídeos para expressar GFP ou APP-GFP em conjunto com μ 1A WT-3X-HA. Após expressão por aproximadamente 16 horas, as células foram lisadas com tampão contendo 10mM de Tris/HCl pH 7,5, 150mM de NaCl, 0,5mM de EDTA, 0,5% de NP40 e inibidores de proteases (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). O lisado proteico clarificado foi incubado com as *beads* de GFP-Trap durante 1 hora a 4 °C sob rotação. Em seguida, as *beads* foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (Tris/HCl 10mM, pH 7,5, NaCl 150mM, EDTA 0,5mM), seguido de análise das proteínas por western blot.

Imunofluorescência e Microscopia Confocal

As células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro (Knittel Glase, Bielefeld, Alemanha). Após aproximadamente 18 horas para adesão das células, elas foram transfectadas com plasmídeos de interesse, incubadas por 2-4 horas com meio de transfecção e em seguida incubadas por mais 18-24 horas para a expressão das proteínas. As células foram então fixadas em 4% de paraformaldeído diluído em PBS, por 10 minutos à temperatura ambiente. Então, as células foram lavadas com PBS e permeabilizadas com 0,1% de Saponina (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) diluída em PBS durante 30 minutos em temperatura ambiente. Antes de realizar a imunomarcagem os sítios inespecíficos de ligação foram bloqueados com gelatina porcina 0,2% (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e 0,1% de Saponina diluídos em PBS por 30 minutos a 37 °C. Posteriormente, as células foram incubadas com os anticorpos primários diluídos na solução de bloqueio por 30 minutos a 37 °C, lavadas com PBS e em seguida incubadas com anticorpos secundários diluídos na solução de bloqueio por 30 minutos a 37 °C. Ao término da incubação com os anticorpos as lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro com Fluoromount G

(EM Sciences, Washington, DC, EUA). A aquisição das imagens foi realizada no microscópio confocal Zeiss LSM 780 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha), situado no departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da FMRP-USP. O processamento da imagem pós-aquisição foi realizado com o software Fiji/ImageJ (Schindelin et al. 2012). A análise de colocalização foi realizada usando o plugin *colocalization threshold* para determinar o coeficiente de correlação de Pearson entre dois canais de fluorescência, usando fatias de imagens no plano Z com intervalos de 0,3µm de pelo menos sete células de três experimentos independentes. O coeficiente de correlação de Pearson representa todos os pixels diferentes de zero que se sobrepõem às imagens dos canais e retorna um valor entre -1 e +1, onde +1 é a correlação positiva total e 0 é nenhuma correlação e -1 é a correlação negativa total. O ensaio PLA-Duolink (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) foi realizado seguindo as instruções do fabricante.

Os ensaios de imunofluorescência em neurônios foram realizadas pelo estudante de Mestrado do laboratório Luan Oliveira em visita ao laboratório da Dra. Sônia A. L. Correa (University of Bradford, Inglaterra) de acordo com protocolo descrito previamente (Eales et al. 2014). Resumidamente, os neurônios foram fixados usando paraformaldeído 4%, pH 7,4, em HBS por 10 minutos. A autofluorescência foi reduzida por tratamento com glicina 0,1M e as lâminulas montados na presença do meio de montagem Mowiol (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). As lâminas foram trazidas para o Brasil para aquisição das imagens, processamento e análises as quais foram realizadas pelo doutorando Yunan Costa Januário, autor desta tese.

Retention using selective hooks (RUSH)

O Sistema RUSH se utiliza da interação reversível entre as proteínas estreptavidina de *Streptomyces avidinii* e o peptídeo de ligação à estreptavidina (*streptavidin-binding peptide* - SBP). A adição de biotina no sistema libera a SBP da estreptavidina, uma vez que a afinidade entre estreptavidina e biotina é extremamente forte. No sistema usado neste trabalho, a estreptavidina foi expressa em fusão com uma sequência sinal para tradução no retículo endoplasmático proveniente da proteína STIM1 de humano em seu N-terminal e a sequência de retenção/ recuperação no retículo KDEL no C-terminal. Dessa forma estreptavidina-KDEL funciona como um “gancho” de retenção no retículo endoplasmático (RE) mantendo SBP neste compartimento (Figura 7). A proteína SBP, por sua vez, é expressa também com uma sequência sinal de tradução

no retículo endoplasmático da proteína IL-2 de humano (interleucina 2) em seu N-terminal. APP de humano, isoforma 695, foi expresso em fusão com o C-terminal de SBP. As proteínas fluorescentes mCherry e eGFP foram expressas em fusão com APP em seu N e C-terminal, respectivamente (Figura 7). Ao longo desta tese este sistema será chamado de plasmídeo APP-RUSH. A presença das duas proteínas fluorescentes nas extremidades opostas de APP também permite monitorar a clivagem de APP em células vivas.

Para os ensaios de imunofluorescência de APP no sistema RUSH, utilizou-se um plasmídeo de expressão bicistrônico contendo um promotor CMV para expressar estreptavidina-KDEL, seguido de uma sequência IRES que permite a tradução de uma segunda fase de leitura e que codifica a SBP-mCherry-APP-GFP, ambas traduzidas no retículo endoplasmático a partir de suas respectivas sequências sinais. O plasmídeo bicistrônico do APP-RUSH foi gerado pelo método Gibson *assembly* a partir do plasmídeo estreptavidina-KDEL/SBP-EGFP-Ecadherin, o qual foi cedido por Franck Perez (plasmídeo Addgene # 65286) (Boncompain et al. 2012). As células HeLa WT parentais e HeLa μ 1A KO foram transfectadas com o plasmídeo bicistrônico APP-RUSH. Aproximadamente 16 horas após a transfecção, as células foram incubadas com biotina 40 μ M para saída sincronizada de APP do retículo endoplasmático e incubadas por diferentes tempos antes da fixação. A imunofluorescência foi realizada conforme descrito no item “Imunofluorescência e Microscopia Confocal” do material e métodos. As células foram fotografadas em um microscópio confocal de varredura a laser Zeiss LSM 780 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha). O ensaio *in vivo* seguiu as mesmas etapas. A adição de biotina nas células foi realizada no microscópio após focalizar células transfectadas. As células foram mantidas com 5% de CO₂ a 37 °C provenientes do próprio microscópio e as imagens foram obtidas pelo período de 3 horas.

Para ensaios de western blot utilizando o sistema RUSH, as células HeLa WT parentais e HeLa μ 1A KO foram transduzidas com lentivirus para o estabelecer linhagens estáveis expressando estreptavidina-KDEL. Células PEAK foram co-transfectadas em uma placa de cultura de 100 mm com os plasmídeos pVSV-G (plasmídeo Addgene # 138479), pCL-Eco (plasmídeo Addgene # 12371) e pMSCV-estreptavidina-KDEL, o qual foi gerado a partir do plasmídeo pMSCV-GFP (plasmídeo Addgene # 86537). Para a transfecção utilizou-se polietilenoimina linear de massa molar 25 kDa (PEI) (Polysciences Inc., Warrington, EUA). Após aproximadamente 36 horas da transfecção, o sobrenadante foi coletado, submetido a centrifugações para eliminar debris celulares e

adicionado as células HeLa WT parentais e HeLa μ 1A KO para transdução viral. Após aproximadamente 24 horas de incubação, adicionou-se puromicina 1 μ g/ml, para seleção das células transduzidas. Células controle não transduzidas foram mantidas com puromicina para monitorar o tempo de seleção das células.

O ensaio de western blot de APP-RUSH utilizou o plasmídeo monocistrônico para expressar SBP-mCherry-APP-GFP nas linhagens HeLa WT e HeLa μ 1A KO expressando estreptavidina-KDEL. O plasmídeo SBP-mCherry-APP-GFP foi gerado a partir do plasmídeo comercial pEGFP C2 (Clontech, Califórnia, EUA) inserido a sequência de SBP-mCherry-APP entre o promotor CMV e GFP (Figura 7). As linhagens HeLa WT e μ 1A KO expressando estreptavidina-KDEL foram transfectadas com o plasmídeo APP-RUSH monocistrônico. 4 horas após a transfecção, o meio de cultura foi trocado por meio completo contendo 1 μ M de DAPT e mantidas na cultura por aproximadamente 18 horas para expressão das proteínas. O meio de cultura foi então substituído por meio completo contendo 40 μ M de biotina e 1 μ M de DAPT, as células foram incubadas por diferentes tempos e então lisadas para análise por western blot como descrito na sessão (“Preparo de lisados celulares e western blot”)

Plasmídeo do RUSH Bicistrônico



Plasmídeo do RUSH Monocistrônico



Figura 7: Desenho esquemático do plasmídeo bicistrônico e monocistrônico do sistema RUSH. Representação esquemática do vetor bicistrônico e monocistrônico utilizado nos experimentos. No plasmídeo bicistrônico o promotor CMV expressa estreptavidina contendo o peptídeo sinal de STIM-1 (p.s. STIM-1) no N-terminal e o peptídeo KDEL no C-terminal. Esta sequência sinal retém a estreptavidina no RE. A sequência IRES permite a tradução de APP independente de estreptavidina. APP é expresso com o peptídeo sinal de IL-2 (p.s. IL-2) o qual direciona à tradução da proteína no RE. A proteína de ligação à estreptavidina (SBP) se liga fortemente a estreptavidina-KDEL e retém APP no RE. mCherry é expresso no N-terminal e GFP é expresso no C-terminal de APP, associado a cauda citoplasmática. No plasmídeo monocistrônico o promotor CMV expressa diretamente SBP com o peptídeo sinal no N-terminal e mCherry-APP-GFP no C-terminal. Estreptavidina-KDEL é expresso por meio de infecção lentiviral e seleção com drogas. O tratamento com biotina solúvel libera APP de estreptavidina-KDEL, permitindo que a APP siga a rota secretora.

Preparo de lisados celulares e western blot

As células foram lisadas utilizando o tampão de lise contendo Tris/HCl 50mM, pH 7,5, NaCl 15mM, glicerol 10%, EDTA 5mM, triton X-100 1%, suplementado com coquetel de inibidor de proteases (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). As amostras foram

centrifugadas por 20 minutos a 4 °C e 18.000 x g para separar a fase nuclear da fase citoplasmática. A quantificação e equalização da concentração de proteínas nas amostras foi feita com o reagente *protein assay* da Bio-Rad (Califórnia, EUA). Após serem equalizadas adicionou-se o tampão de amostra (160mM de Tris/HCl pH 6,8, glicerol 20%, SDS 4%, β-mercaptoetanol 4% e azul de bromofenol 0,1%). O lisado total de cérebro utilizado no ensaio de pull down foi obtido de camundongos adultos C57BL6/J, protocolo CEUA/FMRP 219/2019.

O gel para separação de proteínas utilizado no SDS-PAGE continha 10% de acrilamida. A eletroforese foi realizada com voltagem constante de 90 volts em tampão de corrida eletroforética composto por 25mM de Trizma base, 190mM de glicina e 0,1% de SDS. As proteínas foram eletrotransferidas a partir do gel de poliacrilamida para membranas de nitrocelulose (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra) com tampão gelado composto de 25mM Trizma base, 190mM glicina em metanol 10% a 360mA por 1 hora e 15 minutos. A eficiência da transferência foi avaliada por coloração com solução de 0,1% de Ponceau (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) diluída em 5% de ácido acético.

Após a transferência as membranas foram incubadas em solução de bloqueio contendo 5% de leite em pó desnatado (Leite Molico) e 0,1% de BSA (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), diluídos em PBS suplementado com 0,1% de Tween (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), por 1 hora sob agitação. As membranas foram lavadas e incubadas com a solução contendo o anticorpo primário por 1 hora à temperatura ambiente ou por 18 horas a 4 °C. Em seguida, as membranas foram lavadas novamente e incubadas com a solução de anticorpos secundários adequados conjugados com HRP por 1 hora sob agitação. A detecção das proteínas foi feita utilizando-se solução de ECL 0,1M de Tris-HCl, pH 8,5, 1,25mM de Luminol (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), 0,2mM de ácido cumárico (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e 0,02% de H₂O₂ com subsequente captação do sinal de luminescência no aparelho ChemicDoc (Bio-Rad, Califórnia, EUA) acoplado ao sistema digital e software Image Lab (Bio-Rad, Califórnia, EUA).

Análise estatística

Todos os dados estatísticos são demonstrados como média ± desvio padrão e o número de amostras “n” é indicado na legenda de cada experimento. Os diferentes testes estatísticos utilizados estão descritos nas legendas das respectivas figuras. Os valores p são rotulados da seguinte forma: * representa p<0,05; ** representa p<0,01; ***

representa $p < 0,001$. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para valores $p < 0,05$. Os dados foram plotados em gráficos e analisados usando o software GraphPad Prism 5.0.

RESULTADOS

Resultados

Parte I

Mapeamento dos aminoácidos de APP mediadores da interação com μ 1A

Um trabalho anterior descreveu a interação de μ 1A com APP, porém não investigou a relevância funcional dessa interação (Icking et al. 2007). Assim, para entender a importância de AP-1A no tráfego e processamento de APP, inicialmente, visou-se confirmar a interação de APP com μ 1A utilizando ensaio de co-immunoprecipitação. Desta forma, μ 1A fusionado com HA foi co-expresso juntamente com GFP ou APP-GFP em células PEAK seguido da captura do GFP a partir dos extratos celulares utilizando *beads* de GFP-Trap. A partir da análise por western blot observou-se que μ 1A foi eficientemente co-immunoprecipitado com APP-GFP em comparação com a condição controle contendo apenas GFP (Figura 8A). A análise da cauda citosólica de APP de humano, isoforma 695, mostra a existência de três tirosinas (posições 653, 682 e 687) que podem potencialmente mediar a interação com μ 1A (Figura 8B). Assim, foram realizados ensaios de interação proteína-proteína por ensaio de duplo híbrido em leveduras para mapear aminoácidos essenciais na interação APP; μ 1A. Nestes ensaios a cauda citosólica da proteína TGN38 foi utilizada como controle positivo para a interação com μ 1A (Ohno et al. 1995). Dessa forma, foi confirmada a interação da cauda de APP com μ 1A, bem como a interação com a subunidade μ 4 de AP-4, como demonstrado anteriormente (Burgos et al. 2010) (Figura 8C). Em contraste, a cauda de APP não interagiu com μ 2 (AP-2) ou μ 3A (AP-3) (Figura 8C). TGN38 interagiu com μ 1A, μ 2 e μ 3A, como esperado (Figura 8C). Em seguida, analisou-se a relevância das tirosinas presentes na cauda de APP para sua interação com as isoformas μ 1A e μ 1B de AP-1. Os ensaios de duplo híbrido mostraram que o mutante APP Y653A tem sua interação parcialmente reduzida com μ 1A, mas a mutação não afetou a interação com μ 1B (Figura 8D). Em contraste, foi observado que as substituições nas tirosinas Y682A ou Y687A reduzem a interação de APP com μ 1A e μ 1B (Figura 8D). Nenhuma dessas substituições comprometeram integralmente a interação de APP com μ 4 (Figura 8D), conforme mostrado anteriormente (Burgos et al. 2010).

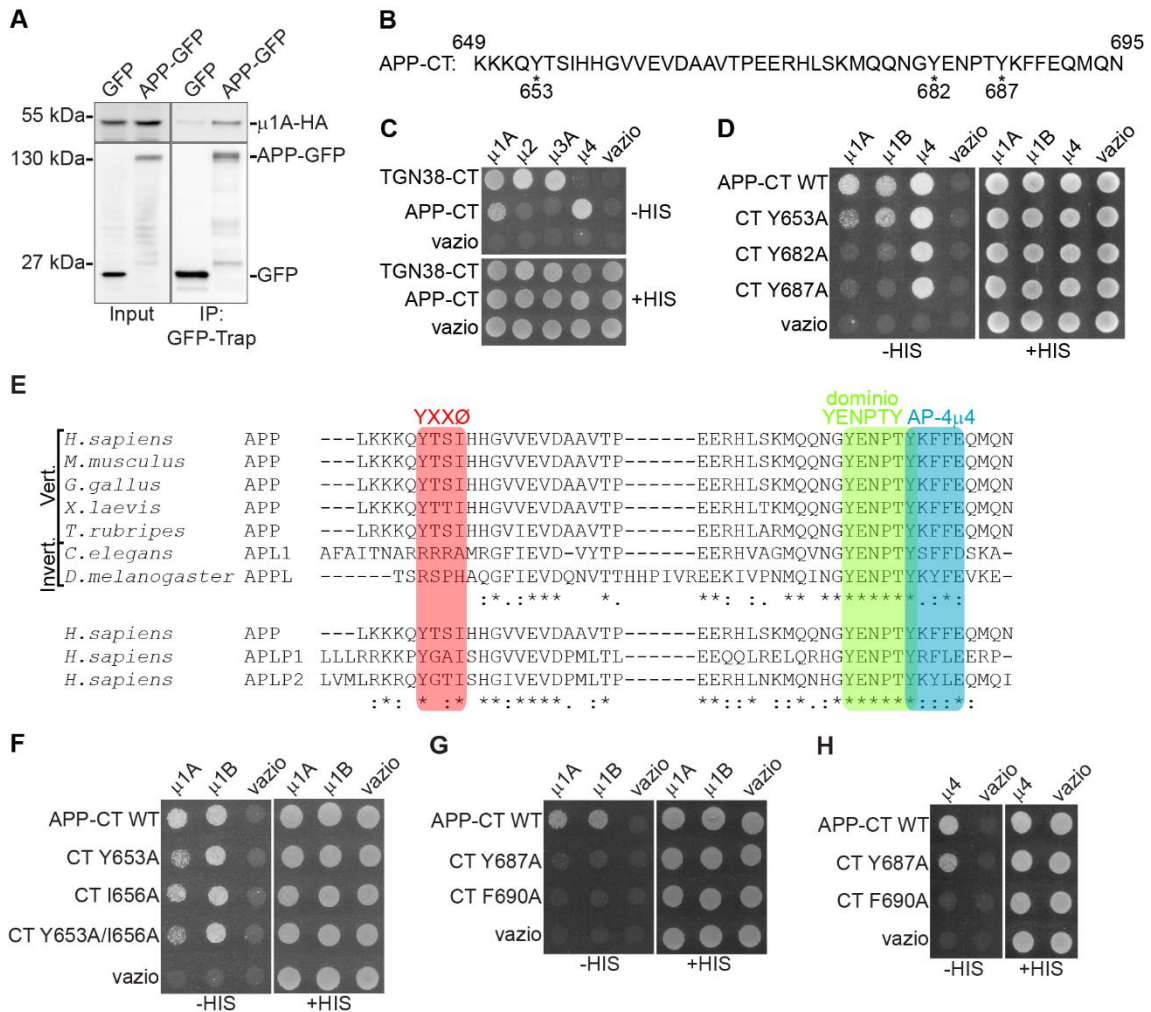


Figura 8: A caracterização da interação de APP com μ1A demonstra que o domínio ⁶⁸²YENPTY⁶⁸⁷ de APP é requerido para a interação. **A)** Ensaio de imunoprecipitação pela técnica de GFP-Trap com células co-expressando GFP ou APP-GFP com μ1A-HA. O μ1A-HA foi eficientemente co-immunoprecipitado com APP-GFP em níveis mais altos em comparação com o controle negativo expressando apenas GFP. O input representa 5% da amostra utilizada no ensaio de interação. **B)** Aminoácidos que compõem a cauda citosólica de APP, isoforma 695, destacando as tirosinas nas posições 653, 682 e 687. **C)** Ensaio de duplo híbrido da cauda citosólica de APP com as subunidades médias μ de AP-1 a AP-4. O crescimento da levedura em meio sem histidina (-HIS) indica interação entre as proteínas. A cauda de APP interagiu com μ1A e μ4. A cauda citosólica da proteína transmembrana TGN38 foi utilizada como controle positivo para interações com μ1A, μ2 e μ3A. “Vazio” representa o plasmídeo necessário para a transformação da levedura, mas sem nenhuma proteína expressa e foi utilizado como controle negativo da interação. **D)** Ensaio de duplo híbrido para testar a interação da cauda citosólica de APP contendo mutações em suas tirosinas com μ1A, μ1B e μ4. APP Y653A teve sua interação reduzida com μ1A. As mutações em ambas as tirosinas Y682A ou Y687A bloquearam a interação com μ1A e μ1B. **E)** Alinhamento da sequência de APP de vertebrados (Vert.), genes relacionados a APP (APL1 e APPL) presentes em invertebrados (Invert.) e genes da família APP em humanos (APLP1 e APLP2). Em destaque, o motivo de aminoácidos YXXØ (vermelho), YENPTY (verde) e o sítio de ligação a AP-4μ4 (azul). **F)** Mutações no motivo YXXØ (especificamente, APP Y653A, APP I656A ou o duplo mutante APP Y653A/I656A) afetam parcialmente a interação de APP com μ1A. APP contendo as mutações no motivo YXXØ não apresentou diferenças na interação com μ1B. **G)** Mutações no domínio YKFFE de APP (especificamente, APP Y687A e APP F690A) inibem a interação de APP com μ1A e μ1B. **H)** A interação de APP Y687A com μ4 é parcialmente afetada, enquanto que o mutante APP F690A não interage com μ4. O resultado do ensaio de GFP-Trap é um resultado representativo de 4 ensaios independentes e os resultados dos ensaios de duplo híbrido são representativos de pelo menos dois ensaios independentes.

Cada uma das tirosinas da cauda citosólica de APP faz parte de um domínio conservado presente em APPs homólogos de diferentes espécies ou em diferentes genes da família APP de humanos (Figura 8E). A tirosina 653 está no contexto de um domínio de tirosina clássico YXXØ (sendo Y uma tirosina, X qualquer aminoácido e Ø um aminoácido hidrofóbico). Notavelmente, os resíduos Y e Ø são conservados nas caudas citosólicas de APP de diferentes vertebrados e na cauda citosólica de genes da família APP (Figura 8E). As tirosinas 682 e 687 são parte de um domínio conhecido como YENPTY, o qual tem todos os seus aminoácidos conservados em vertebrados, invertebrados e na família APP (Figura 8E). A tirosina 687 também foi descrita como parte do domínio YKFFE o qual é mediador da interação com $\mu 4$ e é conservada nos APPs de vertebrados, mas mostra algumas variações em invertebrados e na família APP (Figura 8E). Realizou-se então novas mutações nos aminoácidos dos diferentes domínios da cauda de APP. Foi observada uma redução na interação de $\mu 1A$ com os mutantes APP I656A ou APP Y653A/I656A duplo mutante (Figura 8F), indicando que mutações no motivo canônico YXXØ da cauda de APP afetam parcialmente a interação com $\mu 1A$. Contudo, não foi observado redução na interação com $\mu 1B$. A tirosina Y687 é parte do motivo YKFFE e é essencial para a interação com $\mu 1A$ e sua substituição por uma alanina afeta parcialmente a interação com $\mu 4$ (Figura 8D e 8H). Em contrapartida, a mutação APP F690A bloqueou a interação de APP com $\mu 1A$, $\mu 1B$ e $\mu 4$ (Figuras 8G-H). Estes resultados indicam que aminoácidos distintos são requeridos para a interação de APP com $\mu 1A$, $\mu 1B$ e $\mu 4$. Além disso, os dados revelam que o mutante APP Y682A é uma ferramenta útil para estudar a função da interação de AP-1, preservando sua interação com AP-4.

Mapeamento dos aminoácidos de $\mu 1A$ mediadores da interação com APP

Após mapear aminoácidos presentes na cauda de APP necessários para a interação com $\mu 1A$ procurou-se investigar o sítio de ligação de APP em $\mu 1A$. O domínio C-terminal das subunidades μs dos APs contém dois locais de interação distintos para interação com proteínas carga e são localizados em superfícies opostas da molécula (Owen and Evans 1998; Mardones et al. 2013; Mattera et al. 2014) (Figura 9A). O sítio A, também conhecido como bolso de ligação de tirosinas, normalmente reconhece o motivo canônico YXXØ. O sítio B foi originalmente descrito na subunidade $\mu 4$ como o sítio de reconhecimento da sequência YKFFE de APP (Burgos et al. 2010; Ross et al. 2014).

Inicialmente foi testada a importância do sítio A de μ 1A na interação com APP. Para isto, foram realizados ensaios de duplo híbrido usando μ 1A contendo mutações no bolso de ligação de tirosinas e que comprometem a interação com a sequência YXXØ, especificamente os mutantes μ 1A D174A ou μ 1A W408S (Bonifacino and Traub 2003; Traub and Bonifacino 2013). Como esperado, a interação da cauda de TGN38 com μ 1A foi perdida com mutações em ambos os resíduos (Figura 9B) (Farías et al. 2012). Interessantemente, observou-se que a interação de APP com μ 1A foi abolida pela substituição W408S (Figura 9B), sugerindo que o sítio A em μ 1A é necessário para esta interação. Com base na homologia estrutural com μ 4, também analisou-se a importância do sítio B homólogo em μ 1A, usando mutantes μ 1A com substituições nos resíduos F238A ou S266D (Mattera et al. 2014). A substituição μ 1A F238A reduz a interação com a cauda de APP, enquanto a substituição S266D não mostrou diferenças visíveis (Figura 9C). Similarmente, a interação de TGN38 com μ 1A também foi comprometida com a mutação F238A no sítio B de μ 1A (Figura 9C). Estes resultados indicam a participação do sítio B de μ 1A para a interação com APP e TGN38.

Em seguida, buscou-se observar a interação de APP com μ 1A no ambiente intracelular utilizando a técnica de Duolink em células de neuroglioma humano H4. Duolink é um ensaio de ligação por proximidade (PLA) que permite a detecção da interação de proteínas *in situ* no nível de molécula única gerando sinais fluorescentes em locais de interações proteína-proteína (Fredriksson et al. 2002; Söderberg et al. 2006). APP-GFP e μ 1A WT apresentaram um sinal detectável do PLA, representado por pontos dispersos no citosol (Figura 9D). O mapa de pixels mostra a intensidade de pixels co-localizados obtidos no canal do PLA e TGN46. Uma baixa co-localização entre os pixels de PLA e TGN46 gera a cor preta. A alta co-localização entre estes pixels gera a cor branca. O mapa de pixels co-localizados mostrou que alguns pontos do PLA estão bastante próximos ao marcador da rede trans-Golgi TGN46 (Figura 9D). Como controle negativo do experimento foi utilizado o mutante μ 1A W408S, o qual observou-se não interagir com APP (Figura 9B). A co-expressão de APP-GFP com μ 1A W408S não apresentou sinal detectável do PLA (Figura 9E). APP-GFP também foi expresso com μ 4-

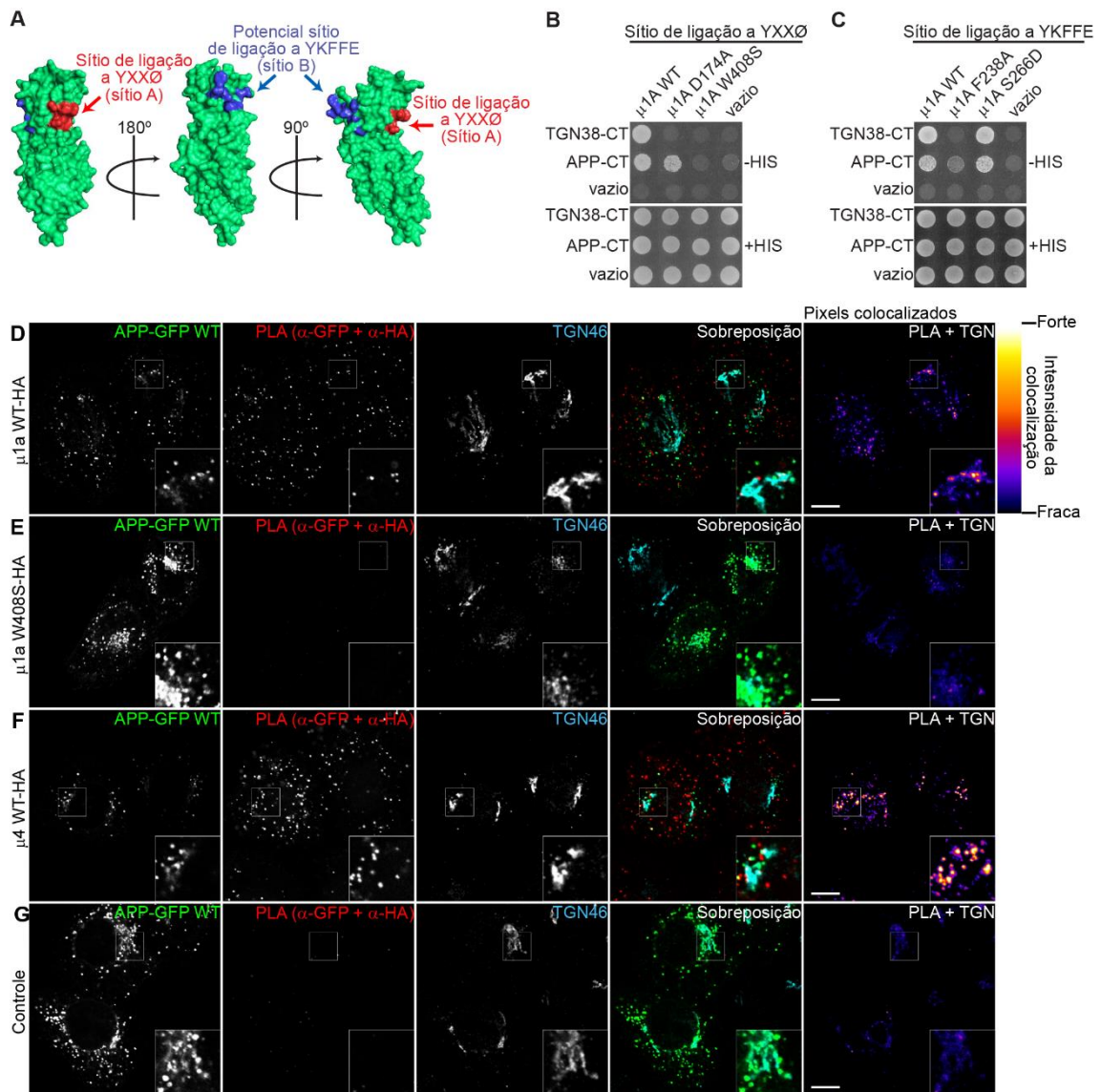


Figura 9: O bolso de ligação de tirosina de μ 1A é necessário para sua interação com APP. **A)** Estrutura tridimensional do C-terminal de μ 1A (obtido a partir do *Protein Data Bank* PDB ID 1W63) destacando o bolso de ligação de tirosina (em vermelho, bolso de ligação do motivo YXXØ) e a região homóloga em μ 1A que reconhece a sequência YKFFE de APP em μ 4 (em azul, potencial sítio de ligação de YKFFE), modificado de (Mattera et al. 2014). **B)** Avaliação da interação da cauda de APP com μ 1A contendo duas mutações individuais no bolso de ligação de tirosina (mutantes μ 1A D174A e μ 1A W408S). A ausência de crescimento de levedura indica que μ 1A W408S não interage com a cauda de APP. A cauda citosólica de TGN38 não interagiu com ambas as mutações em μ 1A. **C)** μ 1A contendo mutações no sítio de ligação homólogo em μ 4 (mutantes μ 1A F238A e μ 1A S266D) foi submetido ao ensaio de duplo híbrido com cauda de APP. μ 1A F238A apresentou clara redução na interação com APP. A cauda TGN38 perdeu completamente a interação com μ 1A F238A. **D-G)** Detecção da interação APP com μ 1A *in situ* utilizando ensaio de Duo-link *Proximity Ligation Assay* (PLA). Células H4 foram transfectadas com APP-GFP em conjunto com μ 1A WT-HA (**D**), μ 1A W408S-HA (**E**), μ 4 WT-HA (**F**) ou transfectadas com plasmídeo vazio (**G**). 16 horas após a transfecção as células foram fixadas, permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100, imunomarcadas com anticorpos anti-GFP (coelho) e anti-HA (camundongo) e anti-TGN46 (cabra) para imunomarcagem da rede trans-Golgi. Em seguida foi seguido o protocolo Duolink-PLA com sondas para os anticorpos de coelho e camundongo, seguindo o manual do fabricante. O anti-TGN46 foi imunomarcado com anticorpo secundário conjugado com Alexa 647. A fluorescência do PLA foi detectada na transfecção de APP-GFP + μ 1A WT e APP-GFP + μ 4 WT (**D** e **F**, respectivamente). Um menor sinal de fluorescência foi detectado para a transfecção de APP-GFP + μ 1A W408S e APP-GFP + plasmídeo controle negativo (**E** e **G**, respectivamente). Os pixels colocalizados entre o sinal observado para o PLA e o marcador TGN46 representam a projeção total gerada a partir da soma dos pixels colocalizados de cada

plano Z. Para gerar o mapa de pixels de cada corte Z foi utilizado o software Fiji com o plugin *colocalization threshold*. Na coluna referente a sobreposição, APP-GFP está representado em verde, o sinal do PLA em vermelho e o sinal TGN46 em ciano. A barra de escala representa 10 μ m. O zoom é uma ampliação de 2X de uma área representativa. As imagens em B a G são representativas de dois experimentos independentes.

HA como um controle positivo de interação. Como esperado, APP-GFP e μ 4 apresentam um forte sinal do PLA em pontos dispersos no citosol e com associação ao marcador TGN46 (Figura 9F). O controle negativo expressando apenas APP-GFP com plasmídeo vazio mostrou uma fraca detecção do ensaio de PLA (Figura 9G). A distribuição subcelular de APP nas células expressando μ 1A W408S mostrou-se diferente da observadas para as demais condições, com sua fluorescência acumulada na região justanuclear (Figura 9D-G). É importante ressaltar que alguns pontos de fluorescência do PLA não apresentaram também a fluorescência do GFP associado ao APP. Uma possível resposta é a de que o PLA tem um sinal de fluorescência mais forte que o GFP. Dessa forma o GFP não foi observado porque está em baixa concentração. Além disso, não foi observado sinal de fluorescência do PLA nos controles negativos como com a expressão de μ 1A W408S ou com o plasmídeo vazio. Em conclusão, estes resultados suportam o achado da interação de μ 1A com APP e reforçam a importância do bolso de ligação a tirosinas de μ 1A para a interação.

Ausência de AP-1 funcional leva ao acúmulo de APP no complexo de Golgi

Para confirmar a importância de AP-1 no tráfego de APP o mutante μ 1A W408S-HA foi expresso em células H4 (Figura 10A-B). Este mutante é eficientemente incorporado no complexo AP-1 (Farías et al. 2012) e atua como um dominante negativo, inibindo o transporte de cargas dependentes de μ 1A (Farías et al. 2012; Navarro Negro et al. 2017). Em comparação com μ 1A WT, a superexpressão de μ 1A W408S aumentou o sinal de APP endógeno na área justanuclear em estreita associação com TGN46 (Figura 9D-E e Figura 10A-C). A função de AP-1 no tráfego de APP também foi testada utilizando RNAi para o *knockdown* (KD) da subunidade γ 1 de AP-1 nas células H4. Usando esta abordagem observou-se que em condições controle o APP endógeno está principalmente presente em estruturas pontilhadas dispersas no citosol (Figura 10D). Em contraste, no KD de AP-1 γ 1, APP endógeno é redistribuído para a região justanuclear onde aumenta sua associação com o marcador TGN46 (Figura 10E-G).

A importância de AP-1 para o tráfego de APP foi confirmada também em células HeLa expressando APP-GFP. APP pode ser clivado no sistema de endomembranas gerando fragmentos CTFs contendo GFP na porção C-terminal. Dessa forma, a fluorescência de GFP pode ser APP-GFP ou CTFs-GFP (Figura 11A). Na condição controle a expressão de APP-GFP tem distribuição principalmente em pontos dispersos no citosol (Figura 11B). Em contraste, APP-GFP foi claramente acumulado na região justanuclear em células HeLa CRISPR/Cas9 knockout (KO) para μ 1A (Navarro Negredo et al. 2017), onde se co-localiza com a proteína do complexo de Golgi GM130 (Figura 11C-D e 11F). A expressão dispersa no citosol, característica de APP-GFP, foi resgatada nas células μ 1A KO ao expressar μ 1A WT-HA exógeno (Figura 11E-F). Juntos, os dados demonstram a importância de AP-1 para o transporte de APP na via secretória tardia.

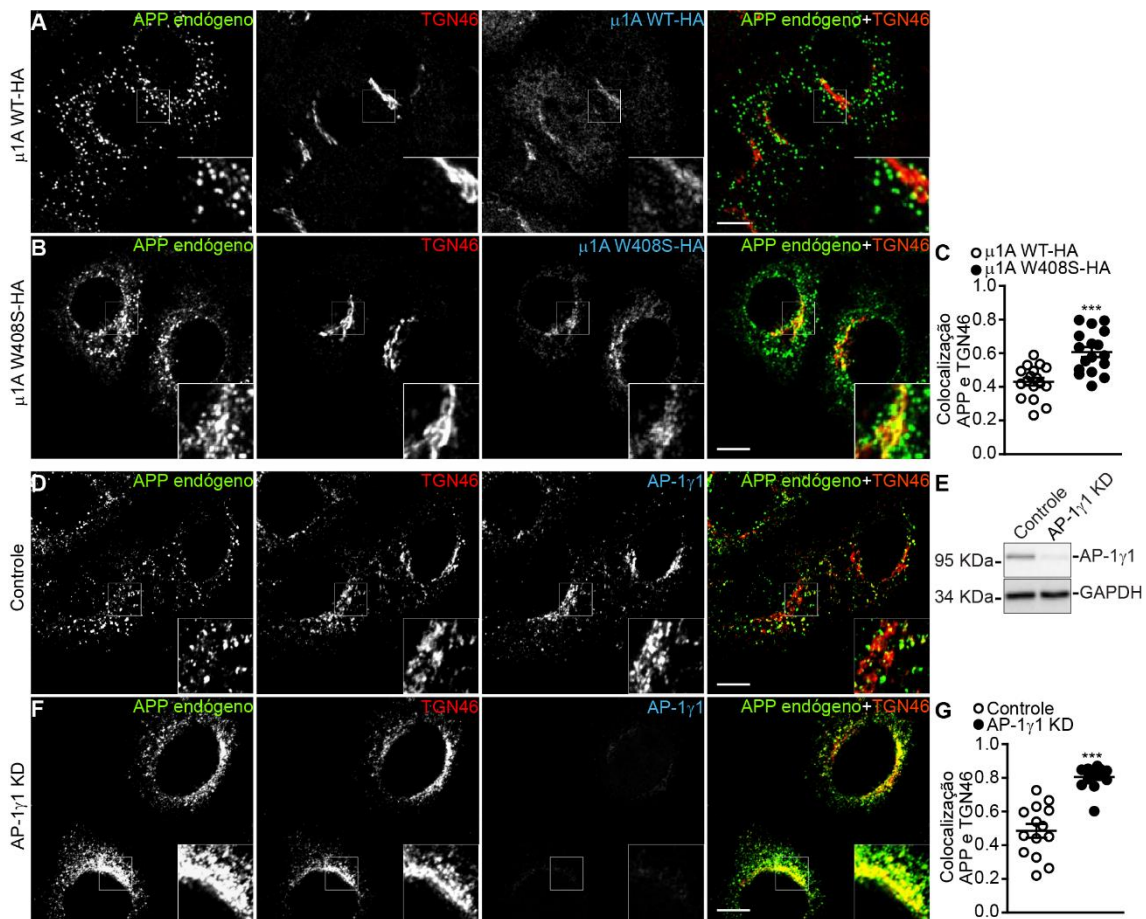


Figura 10: Interferir no transporte mediado por AP-1 aumenta a associação de APP com o complexo de Golgi. A e B) μ 1A WT-HA ou μ 1A W408S-HA foram transfectadas em células H4. Após aproximadamente 16 horas da transfecção, as células foram fixadas, permeabilizadas e imunomarcadas com anticorpo anti-6E10 para detecção de APP endógeno em conjunto com anticorpos anti-HA e anti-TGN46. As células que expressam μ 1A W408S-HA apresentaram mais APP acumulado à região justanuclear em associação com TGN46. A sobreposição é a combinação dos canais APP e TGN46. C) A co-localização de APP endógeno com TGN46 foi medida usando o software Fiji com coeficiente de Pearson. Os valores representam a média \pm SEM de pelo menos 15 células diferentes provenientes de 3 experimentos independentes. D) Células H4 foram imunomarcadas para APP endógeno, subunidade γ 1 de AP-1 e

TGN46, seguido por análise de microscopia confocal. O APP endógeno é observado principalmente em pontos no citosol com associação moderada com o marcador TGN46 (G). E) As células H4 foram submetidas a duas transfecções de siRNA para o KD de $\gamma 1$, o qual foi confirmado por western blot. F) As células KD para a subunidade $\gamma 1$ foram fixadas, permeabilizadas e imunomarcadas para APP endógeno, subunidade $\gamma 1$ e TGN46. Na ausência de $\gamma 1$, o APP endógeno se acumulou na região justanuclear em estreita associação com o marcador TGN46. G) A co-localização de proteínas foi analisada usando software Fiji com coeficiente de Pearson. APP apresentou uma co-localização aumentada com o marcador TGN46 no KD de $\gamma 1$. Os valores representam a média \pm SEM de pelo menos 11 células diferentes provenientes de 3 experimentos independentes. A barra de escala representa 10 μ m. As caixas de zoom são uma ampliação de 2X. *** representa $p < 0,001$. A significância estatística foi calculada pelo teste *t de Student* bicaudal em (C) e (G).

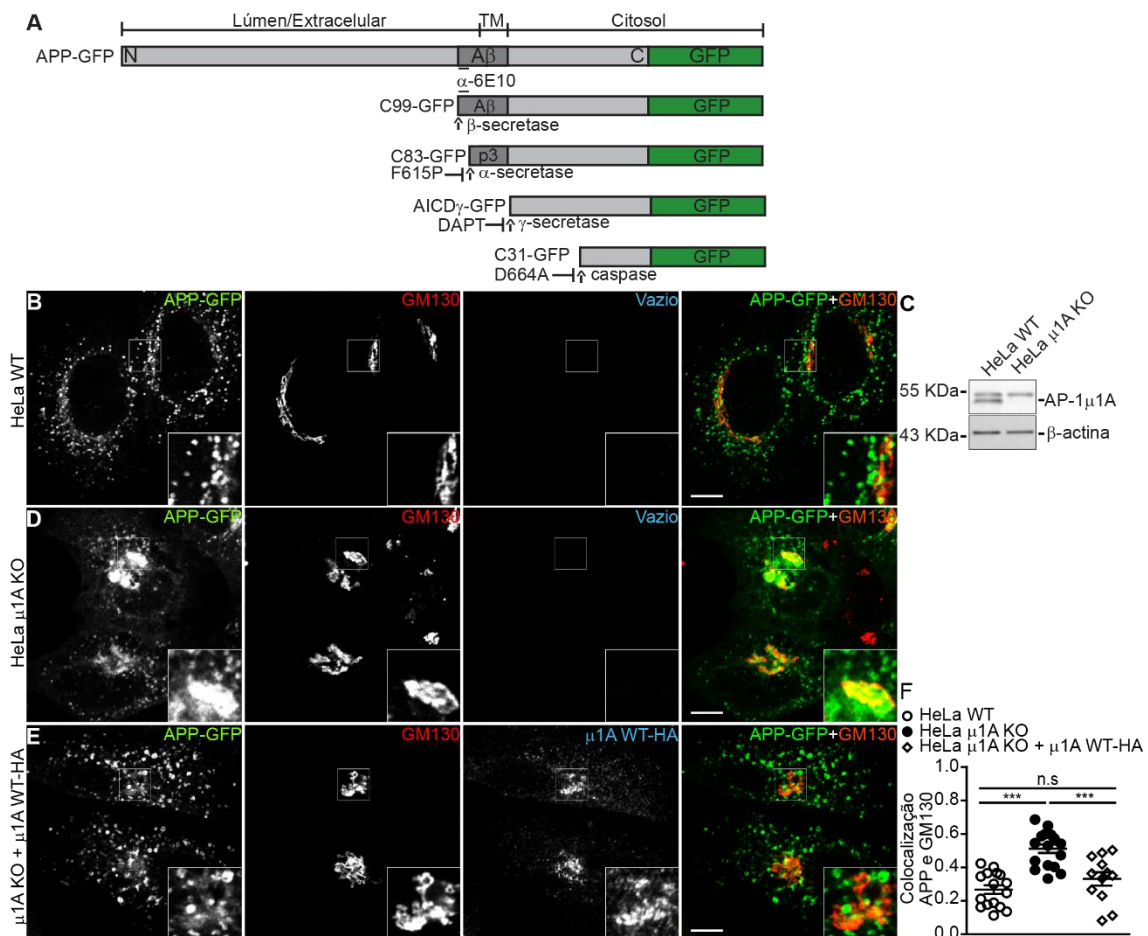


Figura 11: A ausência da subunidade $\mu 1A$ aumenta a associação de APP com o complexo de Golgi.

A) Esquema representativo do processamento de APP-GFP. Os fragmentos de processamento de APP são o C99, C83, AICD- γ e C31. Todos estes fragmentos estão fusionados ao GFP. O processamento é mediado pelas enzimas β -secretase, α -secretase, γ -secretase ou caspases. O local de reconhecimento do anticorpo 6E10, o qual reconhece APP não clivado e o fragmento C99 são representados. APP foi expresso com as mutações F615P e D664A, que diminuem a atividade da α -secretase e bloqueia a clivagem por caspases. A droga DAPT foi utilizada para inibir a atividade da γ -secretase e permitir a visualização do fragmento C99 no western blot. B) Células HeLa transfectadas com APP-GFP foram fixadas, permeabilizadas e imunomarcadas com anti-GM130 e anti-HA, seguido por análise em microscópio confocal. APP-GFP foi observado em pontos no citosol com moderada colocalização com GM130 (F). C) Western blot de HeLa comparando células WT com as células KO para a subunidade $\mu 1A$ de AP-1. D) Células HeLa $\mu 1A$ KO transfectadas com APP-GFP foram imunomarcadas com anti-GM130 e anti-HA e visualizadas em microscópio confocal. APP-GFP foi principalmente observado acumulado na região justanuclear em associação com GM130 (F). E) As células $\mu 1A$ KO foram co-transfectadas com APP-GFP e $\mu 1A$ WT-HA

para resgatar a função de AP-1, seguida da imunomarcção com anti-GM130 e anti-HA. APP-GFP foi observada principalmente em pontos no citosol com baixa associao com o marcador GM130 (F). A co-localizao de APP-GFP e GM130 foi analisada usando o software Fiji com o coeficiente de Pearson. Células KO para μ 1A apresentaram maior co-localizao de APP com o marcador GM130 em comparao com as células WT e as células com o resgate da expresso de μ 1A. Os valores representam a média \pm desvio padrão de pelo menos 11 células diferentes provenientes de 3 experimentos independentes. A barra de escala representa 10 μ m. As caixas de zoom são uma ampliao de 2X. *** representa valor $p < 0,001$. A significância estatística foi calculada por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

O mutante APP Y682A tem seu tráfego na via secretória tardia comprometido

Os ensaios de interao proteína-proteína mostraram que APP contendo a mutao Y682A não interage com μ 1A (Figura 8D). Para aprofundar o entendimento da importância de μ 1A no tráfego de APP, APP Y682A-GFP e APP WT-mCherry foram expressas em células H4 e comparadas de forma direta seu padrão de distribuio em uma mesma célula co-transfectada. Foi observado que APP Y682A está marcadamente presente na regio justanuclear, na superfície celular e mais associada ao marcador TGN46, diferentemente da distribuio de APP WT que foi encontrada principalmente em pontos dispersos no citosol (Figura 12A). A reduzida presena de APP Y682A em pontos dispersos no citosol sugere uma restrio no seu direcionamento para endossomos. Em seguida, expressou-se a forma mutante da GTPase Rab5 Q79L constitutivamente ativa que provoca um aumento dramático no tamanho de endossomos iniciais favorecendo análises em microscopia (Stenmark et al. 1994). Com esta abordagem observou-se que, enquanto APP WT está fortemente associado a esses endossomos aumentados (Figura 12B), APP Y682A apresenta sinal fluorescente reduzido nestas estruturas e um sinal aumentado na periferia da célula (Figura 12C), confirmando que o resíduo Y682 é importante para a localizao de APP em endossomos.

A distribuio de APP Y682A e APP WT foi caracterizada comparando sua associao com diferentes marcadores endógenos da via secretória tardia, como TGN46 (marcador do TGN), EEA1 e HRS (marcadores de endossomos iniciais) e CD63 (marcador de endossomos tardios). Observou-se que APP Y682A se acumula na regio justanuclear e apresenta uma co-localizao aumentada com o marcador TGN46, como esperado (Figura 13A e 13E). Também foi observado quantidades reduzidas de APP Y682A associado a EEA1 e HRS, em comparao com APP WT (Figuras 13B-C e 13F-G). APP Y682A também apresentou um aumento em sua associao com CD63 em comparao com APP WT (Figura 13D e 13H).

Finalmente, utilizou-se neurônios primários de rato para coexpressar APP Y682A-GFP e APP WT-mCherry. Desta forma, foi confirmado o aumento da colocalização de APP Y682A com a proteína do complexo de Golgi GM130 na região justanuclear também em neurônios primários (Figura 14A-B), em comparação com APP WT-mCherry. Em conjunto, estes resultados indicam que a tirosina Y682 em APP é parte de um sinal de transporte entre endossomos e o TGN.

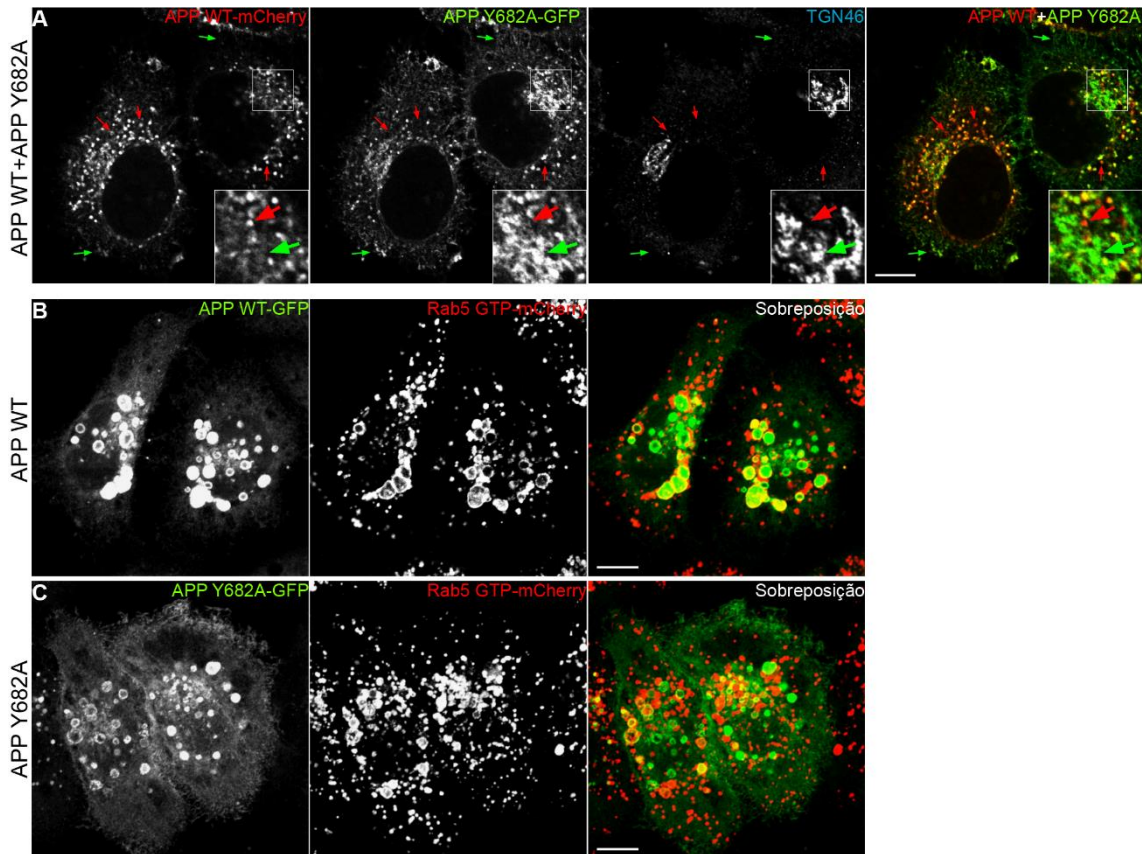


Figura 12: APP Y682A está mais associado ao complexo Golgi e menos associado a endossomos. A) A linhagem H4 de neuroglioma humano foi transfectada com APP WT-mCherry juntamente com APP Y682A-GFP. 16 horas após a transfecção, as células foram fixadas, permeabilizadas e imunomarcadas com anti-TGN46. Análises de microscopia confocal mostraram APP Y682A mais concentrado na região justanuclear em estreita associação com TGN46 e enriquecido na superfície celular. As setas verdes destacam locais contendo exclusivamente APP Y682A-GFP e as setas vermelhas destacam locais contendo apenas com o APP WT-mCherry. **B) e C)** As células H4 foram transfectadas com Rab5-mCherry Q79L em conjunto com APP Y682A-GFP (**C**) ou APP WT-GFP (**B**). 16 horas após a transfecção, as células foram fixadas e analisadas sob microscópio confocal. APP WT mostrou-se enriquecido nos endossomos aumentados, visualizados pela alta fluorescência da GFP nestas estruturas. APP Y682A apresentou fluorescência reduzida nestas estruturas e é enriquecido na região justanuclear e na superfície celular. A barra de escala representa 10μm. As caixas de zoom são uma ampliação de 2X. As imagens em (**A**), (**B**) e (**C**) são representativas de dois experimentos independentes.

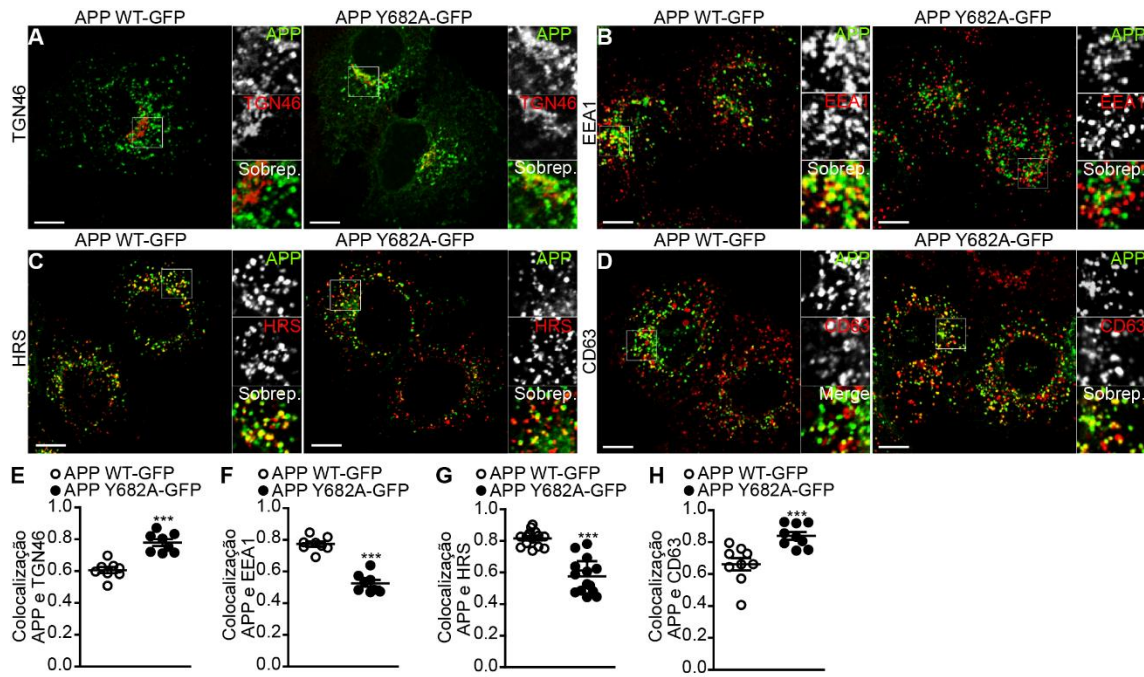


Figura 13: APP Y682A é mais associado ao TGN e a endossomos tardios em comparação a APP WT. APP Y682A-GFP e APP WT-GFP foram transfectadas em células H4 e 16 horas pós-transfecção foram fixadas, permeabilizadas e imunomarcadas com anticorpos anti-TGN46 (A), anti-EEA1 (B), anti-HRS (C) e CD63 (D). APP WT-GFP está principalmente associado a endossomos iniciais imunomarcados com EEA1 e HRS, marcadores de endossomos iniciais. APP Y682A-GFP é mais associado ao TGN46 e CD63, marcadores do TGN e endossomos tardios, respectivamente. A colocalização das proteínas foi analisada pelo coeficiente de Pearson. APP Y682A-GFP apresentou uma maior colocalização com TGN46 e CD63, acompanhada de uma redução na colocalização com EEA1 e HRS (E-H). Os valores representam a média \pm desvio padrão de pelo menos 8 células diferentes provenientes de dois experimentos independentes. A barra de escala representa 10 μ m. As caixas de zoom são uma ampliação de 2X. *** representa $p < 0,001$. A significância estatística foi calculada pelo teste *t* de Student bicaudal em E-H.

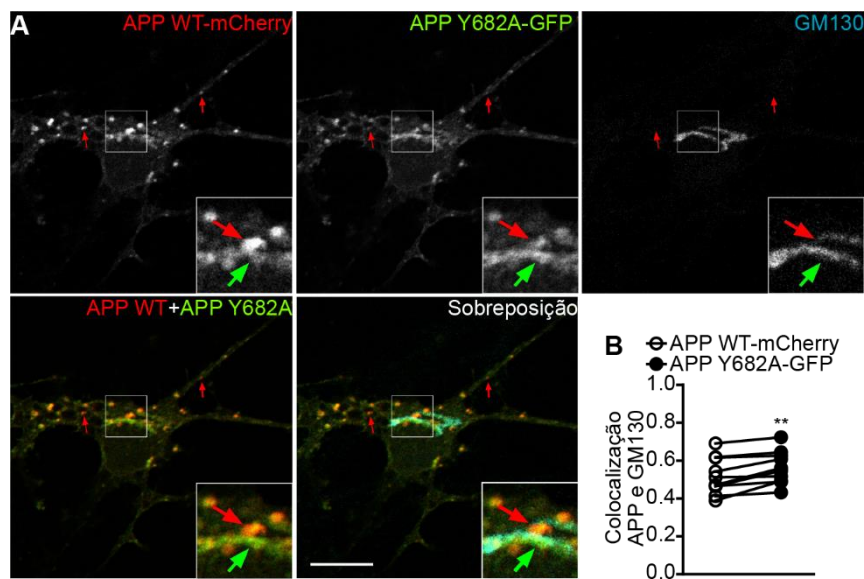


Figura 14: APP Y682A tem seu transporte entre o complexo de Golgi-endossomos alterada em neurônios. A) Neurônios corticais de rato foram cotransfectados com APP WT-mCherry e APP Y682A-GFP. 16 horas após a transfecção, as células foram fixadas, permeabilizadas e imunomarcadas com o marcador do complexo de Golgi GM130. As setas verdes destacam pontos enriquecidos para APP Y682A-

GFP e as setas vermelhas destacam pontos enriquecidos para APP WT-mCherry. **B)** A colocalização de APP WT-mCherry e APP Y682A-GFP com GM130 foi comparada em um mesmo neurônio cotransfectado usando o coeficiente de Pearson. Os valores representam a média \pm desvio padrão de 10 células diferentes provenientes de 3 experimentos independentes. O painel de sobreposição é a combinação dos canais APP WT-mCherry, APP Y682A-GFP e GM130. A barra de escala representa 10 μ m em todo o conjunto de experimentos. As caixas de zoom são uma ampliação de 2X. ** representa valor $p < 0,01$. A significância estatística foi calculada pelo teste *t de Student* pareado bicaudal.

A saída de APP do complexo de Golgi e seu direcionamento para endossomos iniciais é prejudicado na ausência de AP-1

Para mostrar evidências diretas de que AP-1 medeia o transporte anterógrado de APP do complexo de Golgi para os endossomos iniciais, o tráfego de APP na via secretória foi monitorado por meio da técnica de *retention using selective hooks* (RUSH) (Boncompain et al. 2012). Neste sistema, a proteína de interesse é fusionada com uma proteína repórter e a um peptídeo de ligação à estreptavidina (SBP). A proteína de interesse pode ser reversivelmente aprisionada no RE pela coexpressão de estreptavidina fusionada à uma proteína do RE contendo um sinal de retenção no retículo. Após a adição de biotina nas células, a quimera repórter-proteína-SBP é liberada do RE e segue seu itinerário dentro da via secretória de forma sincronizada. Para implementar este sistema para estudar o tráfego de APP, utilizou-se um vetor baseado em IRES que permite a coexpressão de estreptavidina em fusão com a sequência KDEL de retenção/ recuperação no RE (Boncompain et al. 2012), juntamente com APP fusionado à SBP, mCherry no N-terminal e GFP no C-terminal (aqui denominado APP-RUSH) (Figura 7). A presença das duas proteínas fluorescentes nas extremidades opostas da APP também permite monitorar a clivagem da APP. As células HeLa WT e HeLa μ 1A KO foram transfectadas com a construção APP-RUSH e monitorou-se a fluorescência de mCherry e GFP antes e depois da adição de biotina (Vídeo 1). A análise preliminar do APP-RUSH *in vivo* indicou um atraso no transporte anterógrado de APP-GFP/CTFs-GFP (canal verde) em células KO para μ 1A.

Para confirmar essa observação, repetiu-se esses experimentos com células imunomarcadas para o complexo de Golgi (anti-GM130) ou endossomos iniciais (anti-HRS). Nesses experimentos foi monitorado apenas o GFP, uma vez que ele está fusionado à cauda citosólica, à qual interage com μ 1A e representa o APP íntegro ou os fragmentos C-terminais de APP. Os resultados mostram que APP atinge o complexo de Golgi com eficiência semelhante após 30 minutos nas células WT e μ 1A KO (Figura 15A-B e 15G). Contudo, a falta de AP-1 causa um evidente atraso na saída de APP do Golgi até 120

minutos (Figura 15D-E e 15G). Em conformidade com estes dados, APP é direcionado mais eficientemente para os endossomos iniciais nas células WT em comparação com células μ 1A KO nos tempos posteriores a 30 minutos (Figura 15H-I, 15K-L e 15N). O transporte anterógrado de APP Y682A e sua associação com o complexo de Golgi ou endossomos iniciais também foram analisados usando o sistema RUSH. Foi observado que o transporte de APP Y682A do complexo de Golgi para os endossomos iniciais é atrasado, semelhante ao observado nas células μ 1A KO (Figura 15C, 15F-G, 15J e 15M-N). Juntos, esses resultados mostram que a ausência de AP-1 ou a mutação pontual Y682A prejudica o transporte intracelular de APP do complexo de Golgi para os endossomos iniciais.

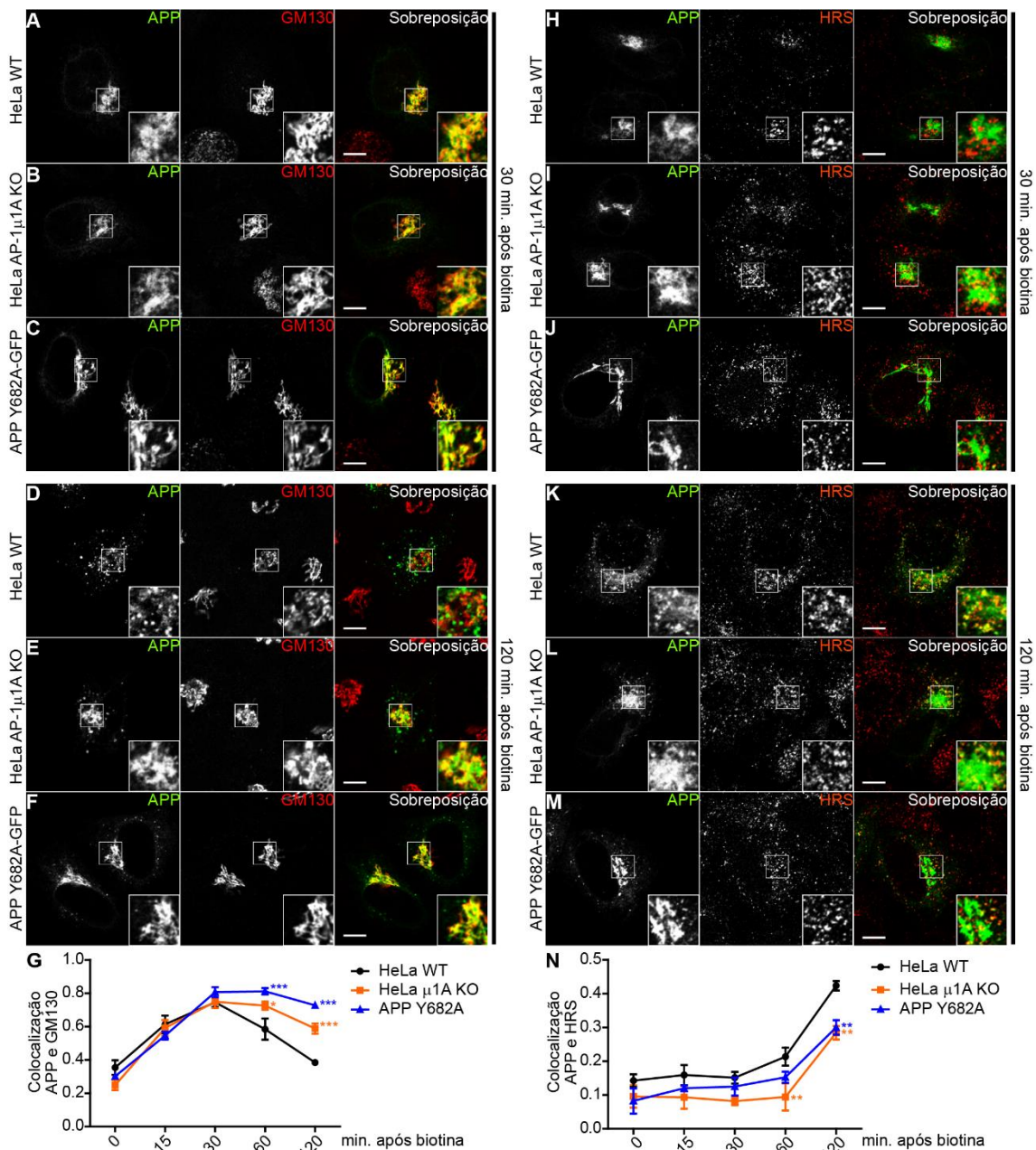


Figura 15: AP-1 é necessário para a eficiente saída de APP do complexo de Golgi e seu transporte anterógrado para endossomos iniciais. As células HeLa WT e HeLa μ 1A KO foram transfectadas com o plasmídeo bicistrônico que codifica estreptavidina-KDEL e mCherry-APP-GFP. Nas células HeLa WT foi transfectado APP WT-RUSH ou APP Y682A-RUSH. 16 horas após a transfecção, as células foram incubadas com biotina solúvel por diferentes tempos para monitorar o transporte anterógrado de APP. As células foram então fixadas, permeabilizadas e imunomarcadas com anti-GM130 (A-F) ou anti-HRS (H-M). No painel são apresentadas imagens com tempos de 30 minutos (A-C e H-J) ou 120 minutos (D-F e K-M) de incubação com biotina. O painel de APP representa a fluorescência de GFP presente no C-terminal de APP-RUSH. 30 minutos após a adição de biotina, APP mostrou-se fortemente colocalizada ao marcador do complexo de Golgi GM130 em todas as condições analisadas (A-C) e com uma baixa associação com o marcador de endossomos iniciais (H-J). 120 minutos após a adição de biotina, APP WT expresso na HeLa μ 1A KO ou APP Y682A estavam mais associados ao marcador do complexo de Golgi (D-F) e menos associados ao marcador de endossomos iniciais (K-M) em relação ao controle APP WT nas células WT. G) APP expresso nas células μ 1A KO ou com a mutação Y682A manteve valores mais altos de colocalização com GM130 nos tempos de 60 e 120 minutos comparado a situação controle. N) A colocalização de APP com HRS manteve níveis mais baixos nas células μ 1A KO ou com a mutação Y682A após 30 minutos em comparação com o controle. Os valores nos gráficos representam a média \pm SEM de pelo menos 7 células diferentes provenientes de 3 experimentos independentes. A barra de escala representa 10 μ m em todos os conjuntos de experimentos. As caixas de zoom são uma ampliação de 2X. * representa $p < 0,05$, ** representa $p < 0,01$ e *** representa $p < 0,001$. A significância estatística foi calculada pelo teste *t de Student* bicaudal em (G) e (N).

O transporte de APP mediado por AP-1 modifica o acúmulo intracelular de C99

O processamento de APP depende de sua associação com secretases no sistema de endomembranas (Tan and Gleeson 2019). Alterações no transporte intracelular que favoreçam o encontro de β -secretase com APP favorecem a geração de C99 e secreção dos peptídeos A β . (Tan and Gleeson 2019). Inicialmente buscou-se analisar se a ausência de AP-1 funcional altera o processamento de APP. Dessa forma, o processamento de APP na via secretória foi monitorado utilizando o sistema RUSH. As células HeLa WT e HeLa μ 1A KO expressando constitutivamente estreptavidina-KDEL foram transfectadas com APP-RUSH com APP contendo as mutações de ponto F615P e D664A. Essas mutações na APP inibem a atividade da α -secretase e a clivagem das caspases, favorecendo a visualização do fragmento C99 (Haass et al. 1994; Jäger et al. 2009; Lu et al. 2000). Os experimentos foram realizados utilizando o fármaco DAPT, que bloqueia a atividade da γ -secretase facilitando a visualização do fragmento C99 (Burgos et al. 2010; Prabhu et al. 2012; Bustamante et al. 2013; González et al. 2017). Após 16 horas da transfecção, as células foram incubadas com biotina solúvel por diferentes tempos, lisadas e analisadas por western blot para monitorar o processamento de APP (Figura 16A-B). Usando um anticorpo anti-6E10, que reconhece APP e o fragmento C99, fomos capazes de detectar níveis basais deste produto da β -secretase em células tratadas com o inibidor de γ -secretase. Foi observado que a geração do fragmento C99 foi reduzida nos tempos iniciais em HeLa μ 1A KO em comparação com as células WT (Figura 16A-B).

Interessantemente, 18 horas após a liberação de APP na via secretória pela adição de biotina o fragmento C99 acumulou-se intracelularmente em maior quantidade nas células HeLa μ 1A KO em comparação com as células WT (Figura 16A-B).

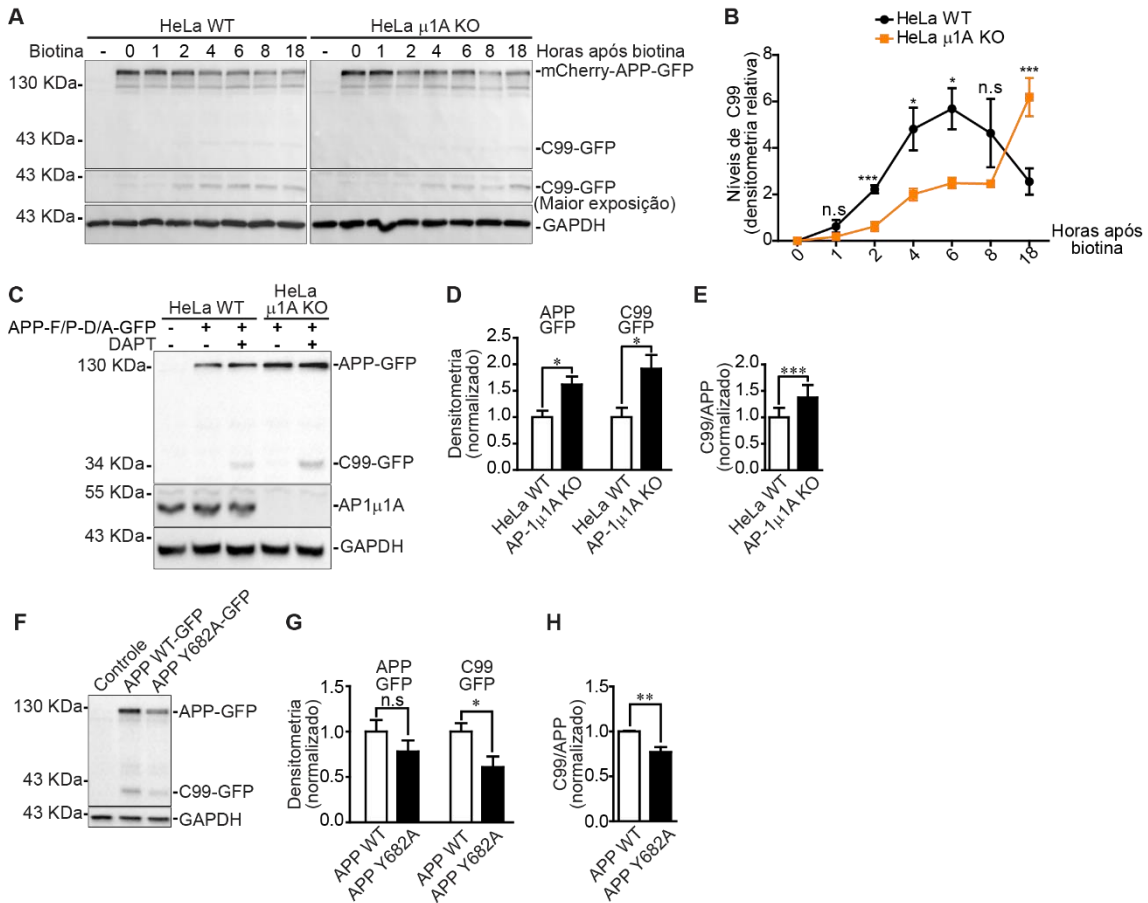


Figura 16: Ausência de interação com AP-1 altera o processamento de APP e geração do fragmento C99.

A) Linhagens celulares HeLa WT e HeLa μ 1A KO expressando constitutivamente estreptavidina-KDEL foram transfectadas com o plasmídeo que codifica mCherry-APP-F615P/D664A-GFP no sistema RUSH. Após 4 horas na presença do reagente de transfecção, adicionou-se meio de cultura completo contendo $1\mu\text{M}$ de DAPT e as células foram mantidas por aproximadamente 16 horas para expressão. Em seguida foi adicionado meio de cultura completo contendo $1\mu\text{M}$ de DAPT e $40\mu\text{M}$ de biotina. As células foram incubadas por 1, 2, 4, 6, 8 e 18 horas com biotina, lisadas e então analisadas por western blot para monitorar o processamento de APP e geração do fragmento C99. **B)** A análise da densitometria de C99 mostrou que as células HeLa μ 1A KO geraram menores níveis do fragmento C99 até 6 horas de tratamento com a biotina e após 18 horas ocorreu um forte acúmulo de C99 invertendo as quantidades em comparação com a HeLa WT. **C)** Células HeLa WT e HeLa μ 1A KO foram transfectadas com APP F615P/D664A-GFP com ou sem DAPT $1\mu\text{M}$. Após 16 horas as células foram lisadas e as proteínas submetidas a western blot. **D)** A análise da densitometria de APP e C99 mostrou que os níveis de APP e C99 estão aumentados na HeLa μ 1A KO. **E)** A razão C99/APP também foi aumentada em células μ 1A KO. **F)** Células H4 foram transfectadas com APP WT-GFP ou APP Y682A-GFP na presença DAPT $1\mu\text{M}$ e o lisado celular analisado por western blot após 16 horas de expressão. **G)** A análise da densitometria de APP e C99 mostrou que os

níveis de APP e C99 diminuíram com a mutação Y682A. **H)** A razão C99/APP também diminuiu em APP Y682A. Como controle de carregamento foi marcado a proteína GAPDH em **(A)**, **(C)** e **(F)**. Os níveis de APP e C99 foram medidos por densitometria de banda usando o software Fiji. Os valores representam a média \pm SEM de pelo menos 3 experimentos independentes. * representa $p < 0,05$, ** representa $p < 0,01$ e *** representa $p < 0,001$. A significância estatística foi calculada pelo teste *t de Student* bicaudal em **(B)**, **(D-E)**, **(G-H)**.

O processamento de APP na HeLa WT e μ 1A KO foi analisado após a transfecção para expressão de APP, na presença ou ausência de DAPT. Em comparação com as células WT, as células μ 1A KO mostraram níveis aumentados de APP e C99 (Figura 16C-D) e também com proporção aumentada deste fragmento patogênico em relação ao APP *full length* (Figura 16E). Este dado foi semelhante ao observado para o RUSH após 18 horas de tratamento com biotina. Isso indica que o transporte de APP mediado por AP-1 modifica o processamento e os níveis intracelulares de APP e C99. Em seguida, analisou-se o processamento do APP Y682A na presença de DAPT. Em contraste ao observado para o processamento de APP nas células μ 1A KO, a mutação Y682A mostrou níveis reduzidos de APP e C99 (Figura 16F-G) e uma proporção diminuída de fragmento patogênico C99 (Figura 16H). Os resultados sugerem que AP-1 é essencial no transporte eficiente de APP do complexo de Golgi para os endossomos iniciais, uma etapa crucial na regulação da geração e degradação do C99 patogênico nos lisossomos.

A superexpressão de Arf1 modifica o processamento e tráfego de APP

A GTPase Arf1 modula várias etapas do tráfego vesicular e recrutamento de AP-1, AP-3 e AP-4 para o TGN e endossomos iniciais (D'Souza-Schorey and Chavrier 2006). Interferir na homeostase da atividade de Arf1 afeta o tráfego de proteínas na via secretória inicial e tardia (D'Souza-Schorey and Chavrier 2006). Assim, buscou-se analisar se a perturbação da homeostase celular de Arf1 altera o tráfego e processamento de APP. Arf1 WT ou o mutante dominante negativo Arf1 Q71L foi coexpresso em conjunto com APP-GFP, seguido da análise do processamento de APP. A expressão de Arf1 WT modestamente reduziu os níveis de C99 em comparação com as células de controle (Figura 17A). Em contraste, APP se acumulou em células expressando Arf1 Q71L, e os fragmentos C-terminais não foram gerados (Figura 17A). Em seguida, investigou-se a localização subcelular de APP-GFP ao coexpressar Arf1 WT ou Arf1 Q71L. Diferente da condição controle, em que o APP é distribuído principalmente em pontos no citosol, as

células expressando Arf1 WT acumularam APP na região justanuclear com forte associação a Arf1 WT (Figura 17B-C). Por outro lado, a expressão de Arf1 Q71L levou a um forte acúmulo de APP no RE e complexo de Golgi (Figura 17D). Estes resultados demonstram que perturbar o equilíbrio de Arf1 altera o transporte e processamento de APP.

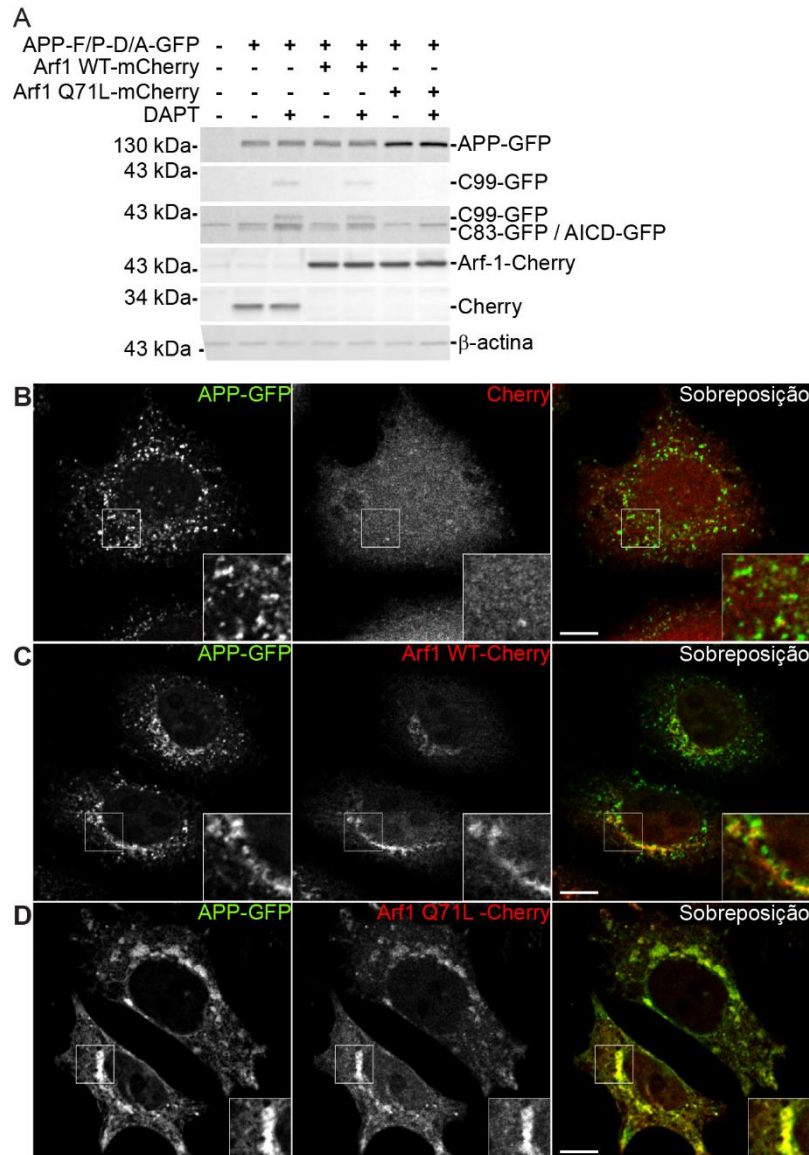


Figura 17: A superexpressão de Arf1 modifica o processamento e o tráfego de APP. A) Células H4 foram transfectadas com APP F-P/D/A-GFP em combinação com mCherry, Arf1 WT-mCherry ou Arf1 Q71L-mCherry. As células foram tratadas ou não com DAPT 1 μ M durante 16 horas antes da lise. A produção de C99 foi reduzida nas células que expressam Arf1 WT em comparação com o controle que expressa apenas mCherry. A expressão de Arf1 Q71L bloqueou o processamento de APP e acumulou a forma imatura da APP. Como controle de carregamento foi marcada a proteína β -actina. A localização subcelular de APP em células superexpressando Arf1 foi analisada por microscopia confocal. Arf1 WT aumentou a presença de APP na região justanuclear em comparação ao controle negativo expressando apenas mCherry (B-C). Arf1 Q71L levou bloqueio do transporte de APP-GFP na via secretória (D). A barra de escala representa 10 μ m. O zoom é uma ampliação de 2X. Figuras (A-D) são experimentos representativos de dois ensaios independentes.

Parte II

Arc induz o acúmulo de APP e seus fragmentos de processamento

Arc desempenha um importante papel na formação da memória, mas sua expressão também está associada a doenças cognitivas como o Alzheimer (Bi et al. 2017; Wu et al. 2011). Dados anteriores presentes em minha dissertação de mestrado permitiram observar que a superexpressão de Arc afeta os níveis de APP no interior das células. A fim de obter mais dados sobre como Arc afeta o processamento de APP e a produção do A β foi analisado o efeito da expressão de Arc nos níveis de APP e seus fragmentos de processamento. Arc foi expresso com APP WT ou APP F615P/D664A-GFP na presença ou ausência de DAPT. Os fragmentos C-terminais do processamento de APP são inferidos baseando-se nos pesos moleculares, na alteração das bandas de processamento devido as mutações presentes em APP e na presença de DAPT inibindo a clivagem por γ -secretase (Burgos et al. 2010; Bustamante et al. 2013; González et al. 2017; Prabhu et al. 2012). Foi observado que a expressão de Arc aumenta os níveis de APP e dos fragmentos C-terminais derivados do seu processamento (fragmentos C99, C83, AICD e C31) (Figura 18A). O acúmulo de APP e seus CTFs levantou o questionamento de que a expressão de Arc poderia estar inibindo a via de degradação lisossomal de forma inespecífica. Para testar essa possibilidade, realizados um ensaio de monitoramento da degradação do receptor de EGF (EGFR) na presença de Arc (Figura 18B). O EGFR é amplamente utilizado como modelo para estudos de tráfego intracelular de receptores de superfície e o estímulo com o ligante EGF leva a rápida endocitose e direcionamento do receptor para degradação lisossomal (Ceresa and Peterson 2014). Arc não afetou os níveis do EGFR no estado de equilíbrio ou sua degradação após estímulo com o ligante (Figura 18B).

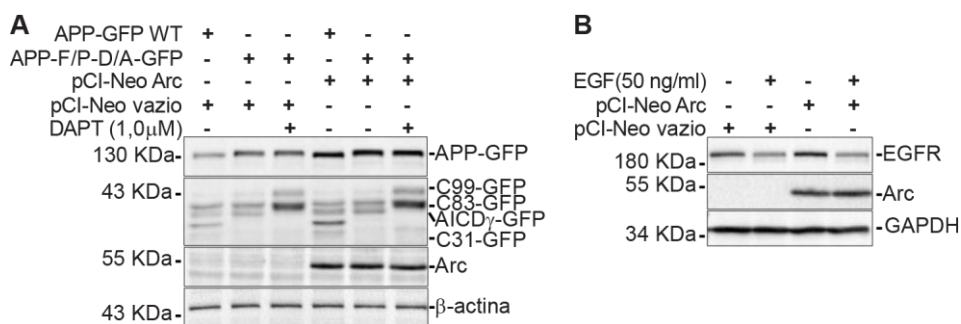


Figura 18: A expressão de Arc aumenta especificamente os níveis totais de APP e seus produtos de processamento. **A)** Células H4 foram transfectadas com Arc e APP WT-GFP ou APP F615P/D664A-GFP na presença ou ausência de DAPT 1 μ M, incubadas em cultura por aproximadamente 18 horas e em seguida lisadas e analisadas por western blot. Para visualizar APP e seus fragmentos de processamento foi utilizado o anticorpo anti-GFP, presente em todos os fragmentos produzidos. A presença de Arc levou ao aumento dos níveis totais de APP, C99, C83, AICD e C31. **B)** Células H4 expressando ou não Arc foram tratadas com o ligante EGF e incubadas a 37 °C por 3 horas. Em seguida as células foram lisadas e os extratos proteicos analisados por western blot. Foi observado que os níveis do receptor de EGF foram reduzidos após o tratamento com ligante EGF mesmo na presença de Arc. Como controle de carregamento foi utilizada a proteína β -actina (**A**) ou GAPDH (**B**). Figuras **A** e **B** são experimentos representativos de dois ensaios independentes.

A inibição da acidificação endolisossomal mostra que Arc favorece a formação do fragmento C99

A expressão de Arc leva ao acúmulo de APP-GFP e do fragmento C99-GFP (Figura 18). Esse resultado indica que Arc pode favorecer a clivagem por BACE1 ou inibir a degradação do fragmento gerado, resultando em um aumento dos níveis no estado de equilíbrio. Para investigar essas duas possibilidades o experimento foi repetido tratando as células com bafilomicina A1. Foi analisada a cinética de geração do C99-GFP em células tratadas com bafilomicina A1. Esta droga é um inibidor específico de ATPases bombeadoras de prótons. Sua ação bloqueia acidificação lisossomal e este efeito também interrompe a degradação lisossomal/autofágica nas células (González et al. 2017). Células H4 expressando transitoriamente Arc e APP F/P-D/A foram tratadas com a droga bafilomicina A1 pelos tempos de 2, 4 e 8 horas. Neste experimento também foi adicionado a droga DAPT para visualização do fragmento C99 (Figura 19A-B). Novamente, o acúmulo do C99 foi mais acentuado na presença de Arc e a inibição da degradação lisossomal resultou em incremento dos níveis de C99. Esse resultado indica que o aumento causado por Arc não se deve meramente a inibição da degradação (Figura 19A-B). Também foi observado que fragmento denominado GFP-core, uma porção de GFP resistente a clivagem nos lisossomos (daSilva et al. 2005; daSilva, Foresti, and Denecke 2006), teve sua produção reduzida ao longo do tempo, demonstrando que a degradação lisossomal foi eficientemente interrompida pelo tratamento com a droga (Figura 19A). Estes dados indicam que Arc acelera a formação do C99 e quando a

degradação lisossomal/autofágica está comprometida é possível observar o incremento no acúmulo deste fragmento.

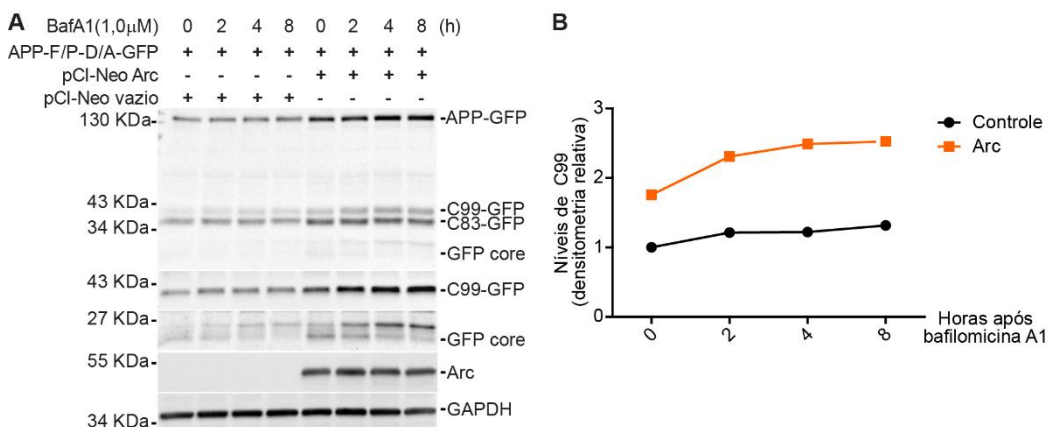


Figura 19: Arc favorece a geração do fragmento C99. **A)** Células H4 expressando APP F615P/D664A-GFP com ou sem Arc foram incubadas com bafilomicina A1 (1mM) por diferentes tempos para analisar o efeito da inibição da degradação lisossomal nos níveis de APP e o acúmulo de seus fragmentos na presença de Arc. O fragmento C99 é acumulado mais rapidamente nas células expressando Arc. **B)** A quantificação de C99 foi calculada em relação ao produzido na condição controle na ausência de Arc. A produção do fragmento GFP-core foi reduzida ao longo do tratamento independente da presença de Arc indicando a eficiência da droga bafilomicina A1. Experimento representativo de dois ensaios independentes.

Arc redireciona APP para o interior de endossomos aumentados

A distribuição subcelular de APP na presença de Arc foi analisada por ensaio de imunofluorescência e microscopia confocal (Figura 20). Neste ensaio foi analisado a distribuição subcelular de APP endógeno. As células foram transfectadas com Rab5 Q79L-GFP e Arc. Com este experimento foi analisado se Arc modifica a distribuição de APP para os endossomos. A análise do perfil da distribuição do APP endógeno nas células que não expressavam Arc demonstrou que o APP estava majoritariamente espalhado em pontos no citosol e também presente na membrana limitante dos endossomos (Figura 20A). Entretanto, a expressão de Arc modificou o padrão de distribuição de APP tornando-o mais concentrado na membrana e no interior dos endossomos aumentados (Figura 20B).

Arc interage com AP-1, AP-2, AP-3 e AP-4 via subunidade μ

Em minha dissertação de mestrado eu mostrei a interação de Arc com AP-2 e AP-4. Devido a importância destas moléculas adaptadoras para o transporte de várias proteínas, incluindo APP, busquei analisar se Arc pode interagir com outras proteínas

adaptadoras. Com este objetivo foi realizado um ensaio de *pull down* com GST-Arc recombinante expresso e purificado a partir de *E. coli*. O mutante Arc W197A também foi testado por ter sido demonstrado que ele é deficiente na interação com AP-2 (DaSilva et al. 2016). Foi adicionado o lisado total de cérebro de camundongo na presença de Arc WT ou W197A imobilizados nas *beads* de glutationa para interação das proteínas. Após lavagens, o material foi analisado por western blot utilizando anticorpos contra a subunidade média μ de AP-1, AP-2, AP-3 e AP-4. Com esta metodologia foi possível observar que Arc WT interage com as subunidades μ de todos os APs testados (Figura 21A). Arc W197A apresentou uma pequena diminuição na interação com as subunidades μ , mas ainda ligeiramente superior ao controle contendo apenas GST. Esse ensaio foi feito uma única vez e deverá ser repetido. Para determinar se a subunidade μ é mediadora da interação, foi realizado ensaio de duplo híbrido de Arc com μ 1A, μ 2, μ 3A e μ 4. Desta forma também poderia ser verificado se a interação ocorre diretamente, sem a mediação de outra proteína animal. Arc interagiu eficientemente com μ 1A, μ 2, μ 3A e μ 4 (Figura 21B). O controle negativo da interação coexpressando Arc e a subunidade β 2 de AP-2 não apresentou crescimento. Estes resultados permitem concluir que Arc interage diretamente com AP-1, AP-2, AP-3 e AP-4 utilizando a subunidade μ .

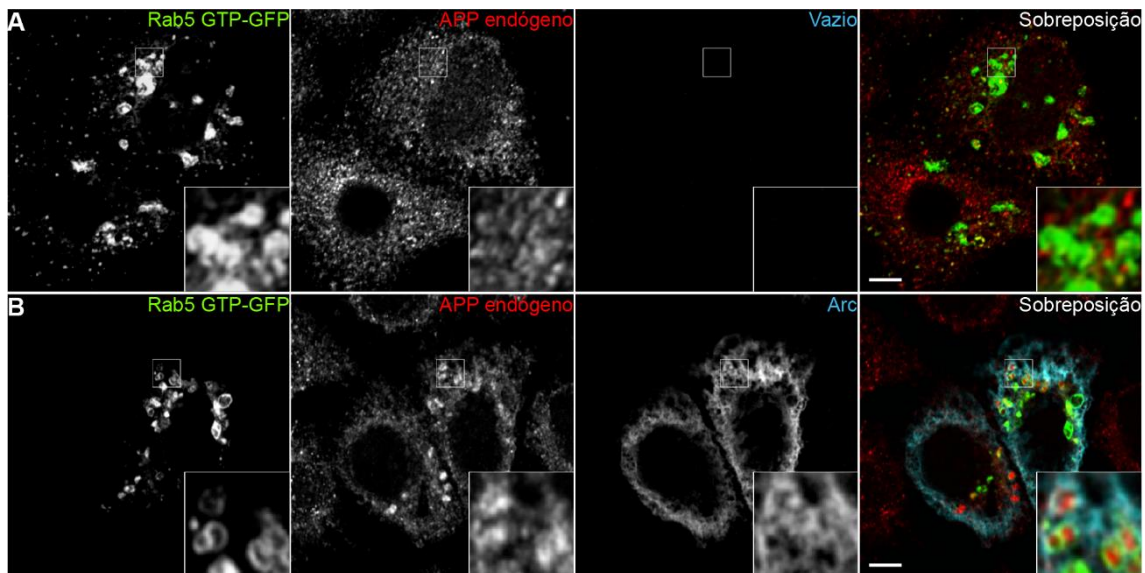


Figura 20: Arc aumenta a associação de APP com endossomos. Células H4 foram transfectadas com o mutante Rab5 Q79L-GFP com ou sem Arc. Após 16 horas de expressão as células foram fixadas, permeabilizadas e imunomarcadas com anticorpo anti-Arc e anti-6E10 para detecção de APP endógeno. APP ficou mais concentrado no interior de endossomos aumentados contendo Rab5 Q79L nas células expressando Arc (**B**) em comparação a condição controle (**A**). Imagem representativa de 2 experimentos independentes. A barra de escala representa 10 μ m. O zoom é uma ampliação de 2X.

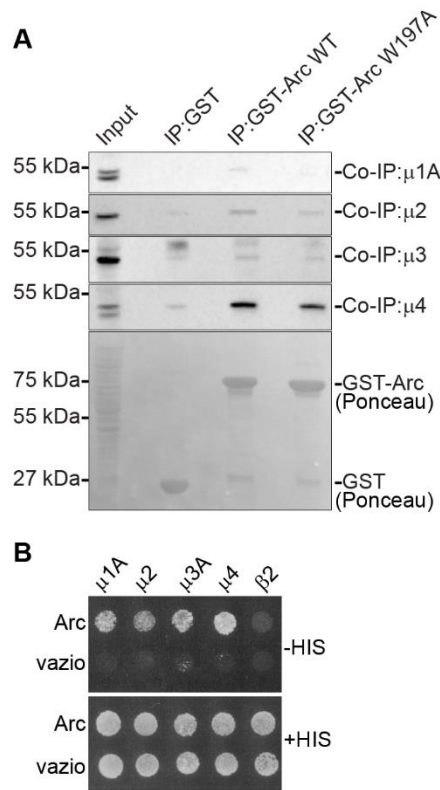


Figura 21: Arc interage com a subunidade μ de AP-1, AP-2, AP-3 e AP-4. **A)** GST e GST-Arc foram expressos em *E. coli*. As bactérias foram lisadas e o extrato proteico clarificado foi incubado com *beads* de sefarose conjugadas com glutationa para adesão das proteínas recombinantes. Após lavagens, foi adicionada em iguais quantidades extrato proteico de cérebro de camundongo para interação das proteínas. As amostras foram então analisadas por western blot e 5% do extrato total de cérebro foi utilizado como input. Arc interagiu com as subunidades μ 1A, μ 2, μ 3 e μ 4. Arc contendo a mutação W197A foi testado e observou-se uma pequena diminuição na interação com a subunidade μ dos APs. A membrana foi corada com ponceau para visualização da adesão de GST e GST-Arc nas *beads*. **B)** Ensaio de duplo híbrido utilizando a cepa HF7C para analisar a interação de Arc com as subunidades μ 1A, μ 2, μ 3A e μ 4, respectivamente de AP-1, AP-2, AP-3 e AP-4. Foi observado que Arc interage com a subunidade μ de todos os APs testados, demonstrado pelo crescimento das leveduras em meio restritivo sem histidina (-HIS). O controle negativo expressando a subunidade β 2 de AP-2 não apresentou nenhum crescimento.

DISCUSSÃO

Discussão

Parte I: AP-1 e APP

Os resultados neste estudo estabelecem o complexo adaptador de clatrina AP-1 contendo a isoforma μ 1A (AP-1A) como um fator essencial no controle da distribuição de APP/C99 na via secretória. Os dados mostram que o AP-1 interage com a cauda de APP no TGN e medeia seu transporte para o sistema endolisossômico. A interrupção prolongada desta rota de transporte de AP-1 causa o acúmulo intracelular de C99. A interação de APP com AP-1A e com a isoforma específica de células epiteliais AP-1B era conhecida (Icking et al. 2007). No entanto, a análise funcional destas interações foi restrita a AP-1B, o qual é responsável pela entrega de APP para o domínio basolateral de células epiteliais polarizadas (Icking et al. 2007). No presente estudo, objetivamos compreender a importância da variante AP-1 ubíqua, AP-1A, no tráfego e processamento de APP. AP-1A é expresso em todos os tipos de células e medeia o transporte bidirecional entre o TGN e os endossomos iniciais (Robinson 2015). Além disso, AP-1A é uma única variante expressa em neurônios, onde também medeia o tráfego de proteínas polarizadas para o domínio somatodendrítico (Bonifacino 2014; Mattera et al. 2014; Farías et al. 2012).

A mutação na tirosina Y653, a qual compreende o motivo clássico de tirosina YXX \emptyset afeta parcialmente a interação de APP com μ 1A, mas não afetou a interação com a isoforma μ 1B (Figura 8). Este dado se opõe com as observações de Icking (2007) onde observou-se a diminuição na interação de APP mutante Y653A com μ 1B, mas não com μ 1A (Icking et al. 2007). A diferença nas observações podem ser devido a técnica de interação utilizada, sendo que neste trabalho utilizou-se ensaio de duplo híbrido e Icking (2007) utilizou ensaios de *pull down* de GST (Icking et al. 2007). As mutações nas tirosinas Y682 e o Y687 na cauda do APP aboliram totalmente a interação com AP-1A e AP-1B (Figura 8). Esses resíduos de tirosina são parte do domínio YENPTY, um sinal de classificação (*sorting*) implicado em diferentes funções no transporte intracelular de APP (Tan and Gleeson 2019). A análise específica de APP Y682 foi importante porque esta tirosina não é necessária para a interação de APP com a subunidade μ 4 de AP-4 (Burgos et al. 2010), permitindo investigar o transporte de APP dependente da interação de AP-1, sem perturbar a interação de APP com AP-4. Curiosamente, mutações adicionais em APP

no sítio YKFFE também aboliram a interação de APP com μ 1A, μ 1B e μ 4 (Figura 8), indicando que AP-1 e AP-4 compartilham resíduos desta região de interação em APP.

Também foram obtidos resultados de que μ 1A pode utilizar dois domínios estruturalmente separados para interações com as caudas citosólicas, denominados sítios A e B (Figura 9). As mutações na cauda de APP no motivo de tirosina YXX \emptyset diminuíram a afinidade por μ 1A e mutações na porção YENPTY e YKFFE aboliram a interação. Por outro lado, mutações no sítio de ligações a YXX \emptyset presente no sítio A de μ 1A aboliram completamente sua interação com APP e TGN38. Já mutações no sítio B, que por homologia estrutural com μ 4 reconheceria a sequência YKFFE, afetaram parcialmente a interação de μ 1A com APP e aboliu totalmente a interação com TGN38 (Figura 9). Em concordância com estes dados, um trabalho anterior também discutiu a possibilidade da participação de dois sítios de reconhecimento em μ 1A para interação com a cauda citosólica, especificamente na interação de μ 1A com a glicoproteína viral NiV-F (Mattera et al. 2014). A distância entre os dois sítios de ligação em μ 1A é de 30 Å, e um peptídeo não estruturado composto por pelo menos 14 aminoácidos apresenta aproximadamente 45 Å (Mattera et al. 2014). A cauda de APP tem 47 resíduos de aminoácidos e a cauda de TGN38 possui 33 resíduos, isto indica que uma interação simultânea com ambos os locais de ligação em μ 1A é fisicamente possível. Trabalhos anteriores já relataram ainda um terceiro domínio em μ 1A composto de aminoácidos básicos que funcionam em conjunto com o bolso de ligação de tirosina para regular a interação com moléculas de MHC-I e a interação com Nef do HIV (X. Guo et al. 2013; Navarro Negredo et al. 2017; Jia et al. 2012), sugerindo mais uma vez que a interação estável de μ 1A com proteínas carga pode ser dependente de mais de um ponto de interação.

Um achado central neste estudo foi o de demonstrar que a interação de APP com AP-1A é necessária para a saída eficiente de APP do complexo de Golgi, fato que não havia sido observado anteriormente (Icking et al. 2007). Para isso, foram utilizadas diversas abordagens complementares. Inicialmente, foi demonstrado que células H4 com os níveis da subunidade γ 1 diminuídos por RNAi redistribuem a APP endógena da periferia da célula para a região justanuclear e aumenta sua colocalização com um marcador de TGN (Figura 10). Vale ressaltar que é conhecido na literatura que comprometer uma das subunidades dos APs com RNAi, por exemplo, desestabiliza o complexo e compromete os níveis de expressão das demais subunidades como o μ 1A (Tavares et al. 2017; Tavares et al. 2020). Um fenótipo semelhante também foi observado em células HeLa μ 1A KO expressando APP-GFP (Figura 11). É importante ressaltar que

a mudança na distribuição de APP-GFP para o complexo de Golgi nas células KO foi revertida a partir do resgate da expressão de μ 1A exógeno, confirmando a especificidade do fenótipo de μ 1A KO (Figura 11). Em concordância com estes dados, a superexpressão do mutante de μ 1A que não se liga a APP (μ 1A W408S), mas é capaz de se integrar em um complexo de AP-1 (Navarro Negredo et al. 2017; Farías et al. 2012), aumentou a associação de APP com marcador TGN46 em células H4 (Figuras 9-10). A expressão do dominante negativo μ 1A W408S já foi utilizada em estudos para caracterizar outras proteínas carga de AP-1 (Navarro Negredo et al. 2017; Mattera et al. 2014; Farías et al. 2012). Estes dados corroboram que a ausência de AP-1A funcional aumentam os níveis de APP endógeno ou exógeno no complexo de Golgi.

A evidência para o papel de AP-1 no tráfego de APP foi reforçada comparando a distribuição subcelular de APP WT e o mutante APP Y682A, que não interage com AP-1, enquanto preserva a capacidade de ligação de AP-4 (Figura 8). Os resultados obtidos em cultura primária de neurônios (Figura 14) e células H4 (Figura 12 e 13) demonstram que a APP Y682A está mais associada ao complexo de Golgi/TGN em comparação com APP WT. Além disso, APP Y682A é enriquecida na superfície celular (Figura 12), exibe menor associação com marcadores de endossomos iniciais (Figura 13), mas mostra uma associação aumentada com marcadores de endossomos tardios (Figura 13). Essas observações são consistentes com descrições anteriores (Caster and Kahn 2013; Lai, Sisodia, and Trowbridge 1995; Matrone et al. 2008; Matrone et al. 2012; Perez et al. 1999). Contudo, nenhum desses estudos anteriores correlacionou a função de AP-1 com mudanças na localização de APP. Uma possível interpretação desses achados é que AP-1 seja responsável por mediar uma rota de transporte direta e eficiente de APP a partir do complexo de Golgi para endossomos iniciais. Na ausência desta interação, APP poderia seguir a via secretória constitutiva em direção a membrana plasmática ou ter o seu transporte mediado por AP-4 (Burgos et al. 2010). Dados recentes sobre a função de AP-4 no transporte de proteínas carga tem demonstrado que este adaptador estaria envolvido no direcionamento de proteínas para sítios de biogênese de autofagossomos (Davies et al. 2018; Mattera et al. 2017; Ivankovic et al. 2020; De Pace et al. 2018). Desta forma, uma maior associação de APP Y682A mutante com marcador de endossomos tardios faria sentido. Vale ressaltar que outras proteínas também podem participar deste fenótipo observado. A tirosina Y682 é descrita como fosforilável e a principal mediadora da interação de APP diversas proteínas como FE65, X11/Mint e JIP-1 (Tan and Gleeson

2019). Esta lista agora aumenta com os achados deste trabalho incluindo também AP-1 na complexa rede de interação com APP.

A função de AP-1 no transporte entre o TGN e os endossomos é bem elucidada, com evidências para participação nas rotas de transporte anterógrado e retrógrado, dependendo da carga proteica transportada (Robinson 2015). As análises realizadas da distribuição de APP no estado estacionário indicam um acúmulo de APP no TGN ao interferir na atividade de AP-1 (Figuras 10 e 11). No entanto, esses experimentos não permitem distinguir com rigor entre um transporte anterógrado defeituoso do TGN ou uma recuperação acelerada a partir dos endossomos pelo transporte retrógrado. Uma proteína importante neste contexto é a proteína SorLA a qual interage diretamente com APP e o direciona a partir de endossomos iniciais de volta para o TGN, um mecanismo dependente da interação de SorLA com o complexo retromer (Goldstein and Das 2021; Fjorback et al. 2012). A ausência de AP-1 funcional direcionando APP para endossomos iniciais poderia favorecer a via retrograda mediada por SorLA-retromer deslocando o equilíbrio de APP intracelular para o complexo de Golgi. Neste sentido, para definir a rota de transporte mediada por AP-1 no transporte de APP e sua importância no tráfego entre o TGN e endossomos iniciais foi utilizado o sistema de RUSH (Boncompain et al. 2012) o qual permitiu monitorar o transporte anterógrado de APP ao longo do tempo de forma sincronizada. Usando essa abordagem, fomos capazes de mostrar que o AP-1 é necessário para a saída eficiente de APP do Golgi e sua entrega aos endossomos iniciais (Figura 15).

Trabalhos anteriores demonstraram que a retenção de APP no Golgi aumenta os níveis de C99 intracelular (Huse et al. 2000; Burgos et al. 2010; Tan and Gleeson 2019; Toh et al. 2018). Portanto, a hipótese inicial deste trabalho era a de que interferir com a função de AP-1, a qual mostrou-se ser importante para a saída de APP do complexo de Golgi, aumentaria os níveis de C99 na célula. De fato, esta noção foi confirmada por nossos dados mostrando que os níveis de C99 aumentam em células $\mu 1A$ KO no estado de equilíbrio (Figura 16). Uma hipótese plausível que explica este fato é que APP retido no complexo de Golgi poderia aumentar a sua exposição ao BACE1 recém-sintetizado, facilitando a geração do fragmento C99. É relevante destacar que enquanto este trabalho estava sendo realizado, foi demonstrado que o BACE1 também é transportado a partir do TGN de maneira dependente de AP-1 (Tan et al. 2020). Em seus experimentos, os autores do estudo observaram que a ausência de AP-1 funcional eleva a associação de BACE1 com o TGN e o mais importante, a ausência de AP-1 aumentou os níveis do fragmento

C99 e a secreção de A β (Tan et al. 2020). Contudo, a análise da cinética de produção de C99 utilizando o sistema RUSH demonstrou um resultado mais complexo. A geração de C99 em células μ 1A KO é mais lenta nos tempos iniciais e o acúmulo só ocorre após várias horas de expressão quando o sistema fica em equilíbrio. Este resultado refuta hipóteses anteriores as quais argumentam que a retenção de APP no complexo de Golgi favorece o processamento pela β -secretase BACE1 (Huse et al. 2000; Burgos et al. 2010; Tan and Gleeson 2019; Toh et al. 2018). Estes dados indicam, na verdade, uma menor capacidade de clivagem pela BACE1 no complexo de Golgi. De fato, BACE1 tem sua atividade catalítica ótima em pH ácido (Vassar et al. 1999; Shimizu et al. 2008; Das et al. 2013). A retenção de APP no complexo de Golgi gera o fragmento C99 mais lentamente (Figura 16). Com seu transporte anterógrado para endossomos comprometido ele deve se acumular gradativamente superando os níveis totais gerados em condições normais. Em concordância com esta observação, o artigo que descreve a importância da interação de AP-4 para o transporte de APP a partir do TGN também observou um atraso na geração de C99 nos momentos iniciais, ocorrendo um acúmulo deste fragmento apenas no estado de equilíbrio, mas não discutiram esse dado observado (Burgos et al. 2010).

APP contendo a mutação na tirosina Y682 gerou menores níveis de C99 no estado de equilíbrio (Figura 16). A diminuição nos níveis de APP Y682A e seu fragmento C99 está em concordância com a observação de que eles estão mais associados ao marcador de endossomos tardios/lisossomos (Figura 13). Evidências anteriores demonstraram que mutações nesta tirosina diminuem a secreção de A β e isto se deve em parte pela endocitose comprometida de APP com a tirosina Y682 mutante (Caster and Kahn 2013; Lai, Sisodia, and Trowbridge 1995; Matrone et al. 2008; Matrone et al. 2012; Perez et al. 1999). Também já foi observado que mutações na tirosina Y682 comprometem a interação de APP com SorLA (La Rosa et al. 2015). Na ausência desta interação, APP é direcionada mais rapidamente para degradação lisossomal resultando em menores níveis da proteína e seus fragmentos de processamento (La Rosa et al. 2015).

Recentemente foi demonstrado que os autofagossomos são organelas críticas no processo de controle dos níveis de APP e seus fragmentos citoplasmáticos e que este processo envolve seu transporte para o sistema endolisossômico (González et al. 2017). Portanto, outra consequência do transporte ineficiente de APP do complexo de Golgi para o sistema endossomal é uma deficiência no controle dos níveis de APP/C99 mediada por autofagia, resultando em um aumento de seus níveis intracelulares. O C99 se acumula

nos estágios iniciais da patologia no hipocampo de modelos de camundongos com Alzheimer (Lauritzen et al. 2012) e acredita-se que ele possa atuar como iniciador de deficiências de plasticidade sináptica (Bourgeois et al. 2018; Jiang et al. 2010; Lauritzen et al. 2016; Checler et al. 2021; Pulina et al. 2020). Discussões mais recentes têm apontado o C99 como possível responsável pela morte neuronal na DA e não as placas amiloides de A β (Pulina et al. 2020). As estratégias clínicas mais recentes que atuaram diretamente no A β secretado não conseguiram resultados promissores (Huang, Shen, and Zhao 2019; Panza et al. 2019). Isto reforça a importância de entender quais mecanismos moleculares favorecem a clivagem de APP por BACE1 e o acúmulo de C99 de forma desequilibrada.

Coletivamente, os resultados definem AP-1A como um adaptador chave que controla diretamente a distribuição subcelular de APP e com um papel decisivo no transporte de APP do TGN para o sistema endolisossômico, auxiliando na regulação dos níveis do fragmento C99 patogênico (Figura 22). Portanto, defeitos no transporte mediado por AP-1 de APP podem ser considerados um fator potencial de contribuição para a etiologia da DA.

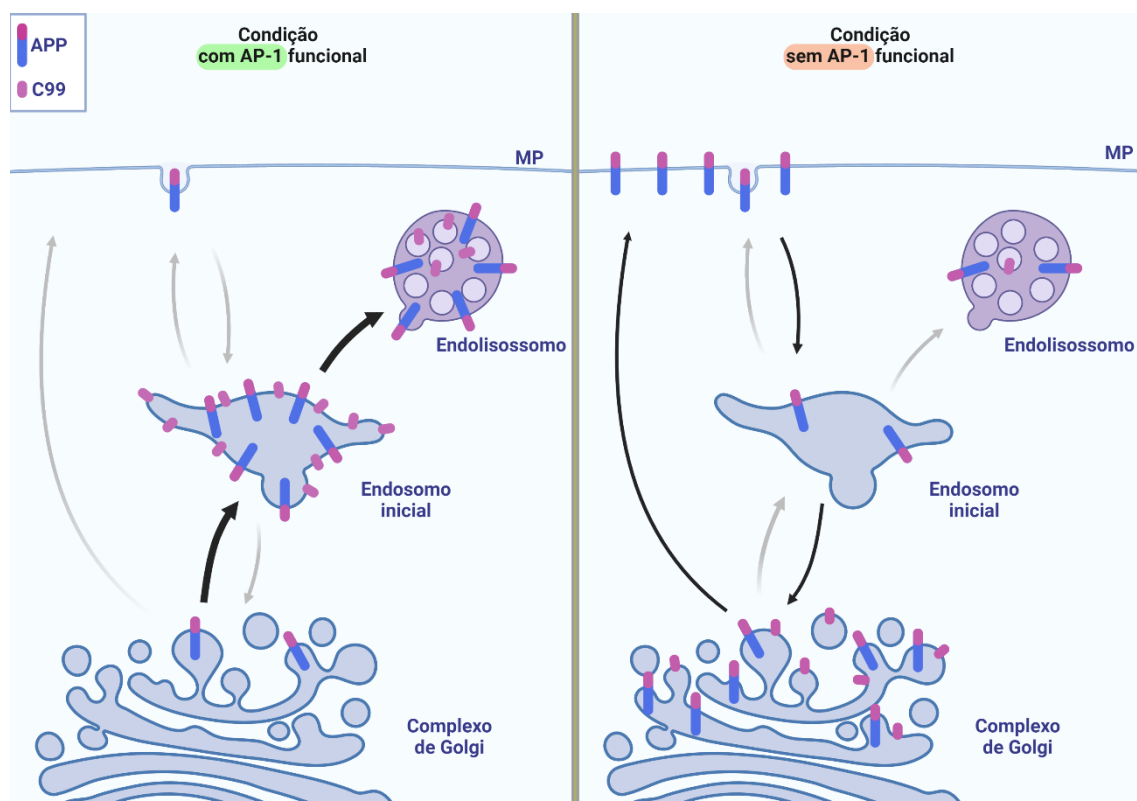


Figura 22: Modelo proposto para a via de transporte celular mediada por AP-1. Em condições normais APP é majoritariamente transportado a partir do complexo de Golgi para endossomos iniciais de forma dependente de AP-1. Este transporte favorece o rápido processamento de APP e geração do fragmento C99

nos endossomos iniciais. A partir dos endossomos iniciais C99 e APP podem seguir para via de degradação lisossomal, controlando os níveis intracelulares do fragmento C99. Na ausência do transporte mediado por AP-1, APP tem seu transporte, a partir do complexo de Golgi para endossomos iniciais, prejudicado. Isto leva ao acúmulo de APP no complexo de Golgi, com seu processamento e geração do fragmento C99 ocorrendo mais lentamente. Devido ao seu acúmulo no complexo de Golgi, APP pode ser transportado pela via constitutiva para a superfície celular. Na membrana plasmática APP é endocitado e enviado para endossomos iniciais onde também pode ser clivado gerando o fragmento C99. Nos endossomos iniciais, APP e C99 podem ser enviados pela via retrógrada de volta para o complexo de Golgi. A ausência da via direta de degradação mediada por AP-1 permite o acúmulo a longo prazo do fragmento C99 no interior das células.

Parte II: Arc e APP

Os dados obtidos demonstram que Arc modifica o transporte intracelular de APP culminando em seu acúmulo intracelular e aumento da geração do C99 e demais fragmentos de processamento (Figura 18). O fato da expressão de Arc não modificar os níveis de EGFR, bem como não atrapalhar sua degradação após estímulo com EGF, reforçam a ideia de que Arc está agindo especificamente sobre o transporte e processamento de APP (Figura 18). Interessantemente, a inibição da degradação lisossomal/autofágica com bafilomicina A1 demonstrou que Arc favorece a produção do C99 (Figura 19). Outro dado que reforça esta ideia é o acúmulo de APP em endossomos (Figura 20), já que este acúmulo pode favorecer o processamento amiloidogênico de APP (Agostinho et al. 2015; Das et al. 2016). Estes dados ajudam a entender a associação de Arc com a DA reportados anteriormente (Wu et al. 2011; Bi et al. 2017) e reforçam a importância da correta regulação da expressão de Arc, uma vez que a expressão contínua de Arc favorece a produção do A β (Wu et al. 2011; Bi et al. 2017).

Apesar da forte relevância de APP para a DA, esta proteína é indispensável para o desenvolvimento e funcionamento normal da neurofisiologia do cérebro (Müller, Deller, and Korte 2017). APP participa da regulação da plasticidade sináptica e homeostase do cálcio. É importante destacar que o fragmento solúvel sAPP α , produzido a partir da clivagem de APP pela α -secretase, medeia muitas de suas ações fisiológicas neuroprotetoras (Fol et al. 2016; Forest et al. 2018). Foi observado que o aumento de sAPP α eleva a produção de mRNA de Arc e a síntese da proteína (Livingstone et al. 2019). Estes dados sugerem uma cascata coordenada onde a clivagem não amiloidogênica de APP induz a expressão de Arc regulando a plasticidade sináptica (Livingstone et al. 2019).

A interação de Arc com as proteínas adaptadoras de transporte pode ser o mecanismo molecular utilizado por Arc para seletivamente modificar o transporte de

APP. De fato, APP e suas enzimas de processamento tem seu transporte intracelular mediado por AP-1, AP-2 e AP-4 e perturbações nestas interações modificam o processamento amiloidogênico de APP (Icking et al. 2007; Burgos et al. 2010; Prabhu et al. 2012; Marcello et al. 2013; Sannerud et al. 2016). Nossos esforços visando caracterizar a interação de Arc com as proteínas adaptadoras permitiram concluir que Arc interage com a subunidade μ de AP-1, AP-2, AP-3 e AP-4 (Figura 21). As proteínas adaptadoras regulam o transporte intracelular de diversas proteínas transmembrana, associadas com diversas funções celulares (Robinson 2015). Levando em consideração que Arc requer AP-2 para induzir a endocitose do receptor AMPA (DaSilva et al. 2016) uma pergunta que fica em aberto é se Arc modifica o transporte intracelular de outras proteínas que tem o transporte mediado pelos APs. É interessante ressaltar a similaridade observada entre Arc e a proteína Nef, uma proteína acessória do HIV que é objeto de estudo do nosso laboratório. Nef interage com AP-1, AP-2 e AP-3 e esta interação é importante para modular o transporte de diferentes receptores celulares a fim de favorecer a patogênese do vírus (Pereira and daSilva 2016). Nef, por exemplo, utiliza-se de AP-2 para acelerar a endocitose de CD4 a partir da membrana plasmática (Chaudhuri et al. 2007). Os achados sobre a interação de Arc com os APs podem demonstrar um mecanismo geral utilizado por Arc para modular o transporte de diferentes receptores neuronais.

CONCLUSÕES

Conclusões

Em conclusão, os resultados apresentados nesta tese demonstram a interação de AP-1A e a cauda citosólica de APP. Os aminoácidos presentes no domínio YENPTY e YKFFE de APP são necessários para a interação de APP com AP-1A. No transporte intracelular observou-se que AP-1 participa do transporte de APP a partir do TGN para endossomos iniciais. Interromper este processo retém o APP no TGN e isto altera a geração do fragmento C99. A retenção por um curto período de APP no TGN diminui a geração do C99 e a retenção prolongada de APP no TGN até o estado de equilíbrio aumenta a produção de C99. Assim, estes achados mostram que AP-1 é importante para o correto transporte e processamento de APP.

Conclui-se também que a expressão da proteína Arc altera os níveis intracelulares de APP e seus fragmentos de processamento. Arc também mostrou-se favorecer a produção do fragmento C99. No transporte intracelular, Arc favoreceu a associação de APP com endossomos. Também foi observado que Arc interage fisicamente com as subunidades μ 1A, μ 2, μ 3A e μ 4 dos APs. Estes dados permitem concluir que Arc pode interagir com múltiplos elementos da maquinaria de transporte intracelular.

REFERÊNCIAS

Referências

- Acquati, F., M. Accarino, C. Nucci, P. Fumagalli, L. Jovine, S. Ottolenghi, and R. Taramelli. 2000. "The gene encoding DRAP (BACE2), a glycosylated transmembrane protein of the aspartic protease family, maps to the down critical region." *FEBS Lett* 468 (1): 59-64. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)01192-3](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01192-3). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10683441>.
- Agostinho, P., A. Pliássova, C. R. Oliveira, and R. A. Cunha. 2015. "Localization and Trafficking of Amyloid- β Protein Precursor and Secretases: Impact on Alzheimer's Disease." *J Alzheimers Dis* 45 (2): 329-47. <https://doi.org/10.3233/JAD-142730>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25589722>.
- Aguilar, R. C., M. Boehm, I. Gorshkova, R. J. Crouch, K. Tomita, T. Saito, H. Ohno, and J. S. Bonifacino. 2001. "Signal-binding specificity of the mu4 subunit of the adaptor protein complex AP-4." *J Biol Chem* 276 (16): 13145-52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010591200>. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11139587>.
- Almomani, E. Y., J. C. King, J. Netsawang, P. T. Yenchitsomanus, P. Malasit, T. Limjindaporn, R. T. Alexander, and E. Cordat. 2012. "Adaptor protein 1 complexes regulate intracellular trafficking of the kidney anion exchanger 1 in epithelial cells." *Am J Physiol Cell Physiol* 303 (5): C554-66. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00124.2012>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22744004>.
- Alonso, A. C., T. Zaidi, I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal. 1994. "Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (12): 5562-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5562>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8202528>.
- Andersen, O. M., J. Reiche, V. Schmidt, M. Gotthardt, R. Spoelgen, J. Behlke, C. A. von Arnim, T. Breiderhoff, P. Jansen, X. Wu, K. R. Bales, R. Cappai, C. L. Masters, J. Gliemann, E. J. Mufson, B. T. Hyman, S. M. Paul, A. Nykjaer, and T. E. Willnow. 2005. "Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (38): 13461-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503689102>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16174740>.
- Bai, X. C., E. Rajendra, G. Yang, Y. Shi, and S. H. Scheres. 2015. "Sampling the conformational space of the catalytic subunit of human γ -secretase." *Elife* 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.11182>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26623517>.
- Bai, X. C., C. Yan, G. Yang, P. Lu, D. Ma, L. Sun, R. Zhou, S. H. W. Scheres, and Y. Shi. 2015. "An atomic structure of human γ -secretase." *Nature* 525 (7568): 212-217. <https://doi.org/10.1038/nature14892>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26280335>.
- Baulac, S., M. J. LaVoie, W. T. Kimberly, J. Strahle, M. S. Wolfe, D. J. Selkoe, and W. Xia. 2003. "Functional gamma-secretase complex assembly in Golgi/trans-Golgi network: interactions among presenilin, nicastrin, Aph1, Pen-2, and gamma-secretase substrates." *Neurobiol Dis* 14 (2): 194-204. [https://doi.org/10.1016/s0969-9961\(03\)00123-2](https://doi.org/10.1016/s0969-9961(03)00123-2). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14572442>.
- Benfenati, F. 2007. "Synaptic plasticity and the neurobiology of learning and memory." *Acta Biomed* 78 Suppl 1: 58-66. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17465325>.
- Bennett, B. D., S. Babu-Khan, R. Loeloff, J. C. Louis, E. Curran, M. Citron, and R. Vassar. 2000. "Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues." *J Biol Chem* 275 (27): 20647-51. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002688200>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10749877>.

- Bhalla, A., C. P. Vetanovetz, E. Morel, Z. Chamoun, G. Di Paolo, and S. A. Small. 2012. "The location and trafficking routes of the neuronal retromer and its role in amyloid precursor protein transport." *Neurobiol Dis* 47 (1): 126-34.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.03.030>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22516235>.
- Bi, R., L. L. Kong, M. Xu, G. D. Li, D. F. Zhang, T. Li, Y. Fang, C. Zhang, B. Zhang, Y. G. Yao, and Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. 2017. "The Arc Gene Confers Genetic Susceptibility to Alzheimer's Disease in Han Chinese." *Mol Neurobiol*.
<https://doi.org/10.1007/s12035-017-0397-6>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28108859>.
- Boehm, M., and J. S. Bonifacino. 2001. "Adaptins: the final recount." *Mol Biol Cell* 12 (10): 2907-20. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.10.2907>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11598180>.
- Boncompain, G., S. Divoux, N. Gareil, H. de Forges, A. Lescure, L. Latreche, V. Mercanti, F. Jollivet, G. Raposo, and F. Perez. 2012. "Synchronization of secretory protein traffic in populations of cells." *Nat Methods* 9 (5): 493-8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1928>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22406856>.
- Bonifacino, J. S. 2014. "Adaptor proteins involved in polarized sorting." *J Cell Biol* 204 (1): 7-17.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201310021>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24395635>.
- Bonifacino, J. S., and L. M. Traub. 2003. "Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes." *Annu Rev Biochem* 72: 395-447.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161800>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12651740>.
- Bourgeois, A., I. Lauritzen, T. Lorivel, C. Bauer, F. Checler, and R. Pardossi-Piquard. 2018. "Intraneuronal accumulation of C99 contributes to synaptic alterations, apathy-like behavior, and spatial learning deficits in 3xTgAD and 2xTgAD mice." *Neurobiol Aging* 71: 21-31. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.06.038>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30071370>.
- Burgos, P. V., G. A. Mardones, A. L. Rojas, L. L. daSilva, Y. Prabhu, J. H. Hurley, and J. S. Bonifacino. 2010. "Sorting of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein mediated by the AP-4 complex." *Dev Cell* 18 (3): 425-36.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.01.015>.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20230749>.
- Bustamante, H. A., A. Rivera-Dictter, V. A. Cavieres, V. C. Muñoz, A. González, Y. Lin, G. A. Mardones, and P. V. Burgos. 2013. "Turnover of C99 is controlled by a crosstalk between ERAD and ubiquitin-independent lysosomal degradation in human neuroglioma cells." *PLoS One* 8 (12): e83096.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083096>.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24376644>.
- Cao, X., and T. C. Südhof. 2001. "A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60." *Science* 293 (5527): 115-20. <https://doi.org/10.1126/science.1058783>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11441186>.
- Caster, A. H., and R. A. Kahn. 2013. "Recruitment of the Mint3 adaptor is necessary for export of the amyloid precursor protein (APP) from the Golgi complex." *J Biol Chem* 288 (40): 28567-80. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.481101>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23965993>.
- Ceresa, B. P., and J. L. Peterson. 2014. "Cell and molecular biology of epidermal growth factor receptor." *Int Rev Cell Mol Biol* 313: 145-78. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800177-6.00005-0>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25376492>.

- Chaudhuri, R., O. W. Lindwasser, W. J. Smith, J. H. Hurley, and J. S. Bonifacino. 2007. "Downregulation of CD4 by human immunodeficiency virus type 1 Nef is dependent on clathrin and involves direct interaction of Nef with the AP2 clathrin adaptor." *J Virol* 81 (8): 3877-90. <https://doi.org/10.1128/JVI.02725-06>.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17267500>.
- Checler, F., E. Afram, R. Pardossi-Piquard, and I. Lauritzen. 2021. "Is γ -secretase a beneficial inactivating enzyme of the toxic APP C-terminal fragment C99?" *J Biol Chem* 296: 100489. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100489>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33662398>.
- Chia, P. Z., W. H. Toh, R. Sharples, I. Gasnereau, A. F. Hill, and P. A. Gleeson. 2013. "Intracellular itinerary of internalised β -secretase, BACE1, and its potential impact on β -amyloid peptide biogenesis." *Traffic* 14 (9): 997-1013. <https://doi.org/10.1111/tra.12088>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23773724>.
- Cho, W., and R. V. Stahelin. 2005. "Membrane-protein interactions in cell signaling and membrane trafficking." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 34: 119-51.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.33.110502.133337>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15869386>.
- Chowdhury, S., J. D. Shepherd, H. Okuno, G. Lyford, R. S. Petralia, N. Plath, D. Kuhl, R. L. Huganir, and P. F. Worley. 2006. "Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking." *Neuron* 52 (3): 445-59.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.033>.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17088211>.
- Choy, R. W., Z. Cheng, and R. Schekman. 2012. "Amyloid precursor protein (APP) traffics from the cell surface via endosomes for amyloid β ($A\beta$) production in the trans-Golgi network." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (30): E2077-82.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1208635109>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22711829>.
- Christensen, D. Z., T. Schneider-Axmann, P. J. Lucassen, T. A. Bayer, and O. Wirths. 2010. "Accumulation of intraneuronal A β correlates with ApoE4 genotype." *Acta Neuropathol* 119 (5): 555-66. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0666-1>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20217101>.
- Citron, M., T. Oltersdorf, C. Haass, L. McConlogue, A. Y. Hung, P. Seubert, C. Vigo-Pelfrey, I. Lieberburg, and D. J. Selkoe. 1992. "Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production." *Nature* 360 (6405): 672-4. <https://doi.org/10.1038/360672a0>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1465129>.
- Collins, B. M., A. J. McCoy, H. M. Kent, P. R. Evans, and D. J. Owen. 2002. "Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex." *Cell* 109 (4): 523-35.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12086608>.
- Corder, E. H., A. M. Saunders, W. J. Strittmatter, D. E. Schmechel, P. C. Gaskell, G. W. Small, A. D. Roses, J. L. Haines, and M. A. Pericak-Vance. 1993. "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families." *Science* 261 (5123): 921-3. <https://doi.org/10.1126/science.8346443>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8346443>.
- Corrigan, F., E. Thornton, L. C. Roisman, A. V. Leonard, R. Vink, P. C. Blumbergs, C. van den Heuvel, and R. Cappai. 2014. "The neuroprotective activity of the amyloid precursor protein against traumatic brain injury is mediated via the heparin binding site in residues 96-110." *J Neurochem* 128 (1): 196-204. <https://doi.org/10.1111/jnc.12391>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23919582>.
- Cruchaga, C., G. Haller, S. Chakraverty, K. Mayo, F. L. Vallania, R. D. Mitra, K. Faber, J. Williamson, T. Bird, R. Diaz-Arrastia, T. M. Foroud, B. F. Boeve, N. R. Graff-Radford, P. St Jean, M. Lawson, M. G. Ehm, R. Mayeux, A. M. Goate, and NIA-LOAD/NCRAD Family

- Study Consortium. 2012. "Rare variants in APP, PSEN1 and PSEN2 increase risk for AD in late-onset Alzheimer's disease families." *PLoS One* 7 (2): e31039. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031039>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22312439>.
- Cruts, M., J. Theuns, and C. Van Broeckhoven. 2012. "Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases." *Hum Mutat* 33 (9): 1340-4. <https://doi.org/10.1002/humu.22117>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22581678>.
- Cupers, P., I. Orlans, K. Craessaerts, W. Annaert, and B. De Strooper. 2001. "The amyloid precursor protein (APP)-cytoplasmic fragment generated by gamma-secretase is rapidly degraded but distributes partially in a nuclear fraction of neurones in culture." *J Neurochem* 78 (5): 1168-78. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00516.x>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11553691>.
- Czeczor, J. K., and S. L. McGee. 2017. "Emerging roles for the amyloid precursor protein and derived peptides in the regulation of cellular and systemic metabolism." *J Neuroendocrinol* 29 (5). <https://doi.org/10.1111/jne.12470>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28349564>.
- D'Souza-Schorey, C., and P. Chavrier. 2006. "ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7 (5): 347-58. <https://doi.org/10.1038/nrm1910>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16633337>.
- Dacks, J. B., and M. C. Field. 2018. "Evolutionary origins and specialisation of membrane transport." *Curr Opin Cell Biol* 53: 70-76. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.06.001>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29929066>.
- Das, U., D. A. Scott, A. Ganguly, E. H. Koo, Y. Tang, and S. Roy. 2013. "Activity-induced convergence of APP and BACE-1 in acidic microdomains via an endocytosis-dependent pathway." *Neuron* 79 (3): 447-60. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.05.035>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23931995>.
- Das, U., L. Wang, A. Ganguly, J. M. Saikia, S. L. Wagner, E. H. Koo, and S. Roy. 2016. "Visualizing APP and BACE-1 approximation in neurons yields insight into the amyloidogenic pathway." *Nat Neurosci* 19 (1): 55-64. <https://doi.org/10.1038/nn.4188>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26642089>.
- daSilva, L. L., O. Foresti, and J. Denecke. 2006. "Targeting of the plant vacuolar sorting receptor BP80 is dependent on multiple sorting signals in the cytosolic tail." *Plant Cell* 18 (6): 1477-97. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.040394>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16714388>.
- daSilva, L. L., J. P. Taylor, J. L. Hadlington, S. L. Hanton, C. J. Snowden, S. J. Fox, O. Foresti, F. Brandizzi, and J. Denecke. 2005. "Receptor salvage from the prevacuolar compartment is essential for efficient vacuolar protein targeting." *Plant Cell* 17 (1): 132-48. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.026351>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15632053>.
- DaSilva, L. L., M. J. Wall, L. P de Almeida, S. C. Wauters, Y. C. Januário, J. Müller, and S. A. Corrêa. 2016. "Activity-Regulated Cytoskeleton-Associated Protein Controls AMPAR Endocytosis through a Direct Interaction with Clathrin-Adaptor Protein 2." *eNeuro* 3 (3). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0144-15.2016>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27257628>.
- Davies, A. K., D. N. Itzhak, J. R. Edgar, T. L. Archuleta, J. Hirst, L. P. Jackson, M. S. Robinson, and G. H. H. Borner. 2018. "AP-4 vesicles contribute to spatial control of autophagy via RUSC-dependent peripheral delivery of ATG9A." *Nat Commun* 9 (1): 3958. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06172-7>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30262884>.
- de Carvalho, J. V., R. O. de Castro, E. Z. da Silva, P. P. Silveira, M. E. da Silva-Januário, E. Arruda, M. C. Jamur, C. Oliver, R. S. Aguiar, and L. L. daSilva. 2014. "Nef neutralizes the ability

- of exosomes from CD4+ T cells to act as decoys during HIV-1 infection." *PLoS One* 9 (11): e113691. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113691>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25423108>.
- De Matteis, M. A., and A. Luini. 2011. "Mendelian disorders of membrane trafficking." *N Engl J Med* 365 (10): 927-38. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0910494>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21899453>.
- De Pace, R., M. Skirzewski, M. Damme, R. Mattera, J. Mercurio, A. M. Foster, L. Cuitino, M. Jarnik, V. Hoffmann, H. D. Morris, T. U. Han, G. M. S. Mancini, A. Buonanno, and J. S. Bonifacino. 2018. "Altered distribution of ATG9A and accumulation of axonal aggregates in neurons from a mouse model of AP-4 deficiency syndrome." *PLoS Genet* 14 (4): e1007363. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007363>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29698489>.
- De Strooper, B., P. Saftig, K. Craessaerts, H. Vanderstichele, G. Guhde, W. Annaert, K. Von Figura, and F. Van Leuven. 1998. "Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein." *Nature* 391 (6665): 387-90.
<https://doi.org/10.1038/34910>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9450754>.
- Dell'Angelica, E. C., C. Mullins, and J. S. Bonifacino. 1999. "AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors." *J Biol Chem* 274 (11): 7278-85.
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.11.7278>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10066790>.
- Dell'Angelica, E. C., H. Ohno, C. E. Ooi, E. Rabinovich, K. W. Roche, and J. S. Bonifacino. 1997. "AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression." *EMBO J* 16 (5): 917-28. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.5.917>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9118953>.
- Dell'Angelica, E. C., C. E. Ooi, and J. S. Bonifacino. 1997. "Beta3A-adaptin, a subunit of the adaptor-like complex AP-3." *J Biol Chem* 272 (24): 15078-84.
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.24.15078>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9182526>.
- Derkach, V. A., M. C. Oh, E. S. Guire, and T. R. Soderling. 2007. "Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity." *Nat Rev Neurosci* 8 (2): 101-13.
<https://doi.org/10.1038/nrn2055>. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17237803>.
- Diaz, F., D. Gravotta, A. Deora, R. Schreiner, J. Schoggins, E. Falck-Pedersen, and E. Rodriguez-Boulan. 2009. "Clathrin adaptor AP1B controls adenovirus infectivity of epithelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (27): 11143-8.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0811227106>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19549835>.
- Eales, K. L., O. Palygin, T. O'Loughlin, S. Rasooli-Nejad, M. Gaestel, J. Müller, D. R. Collins, Y. Pankratov, and S. A. Corrêa. 2014. "The MK2/3 cascade regulates AMPAR trafficking and cognitive flexibility." *Nat Commun* 5: 4701. <https://doi.org/10.1038/ncomms5701>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25134715>.
- Esch, F. S., P. S. Keim, E. C. Beattie, R. W. Blacher, A. R. Culwell, T. Oltersdorf, D. McClure, and P. J. Ward. 1990. "Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor." *Science* 248 (4959): 1122-4. <https://doi.org/10.1126/science.2111583>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2111583>.
- Farzan, M., C. E. Schnitzler, N. Vasilieva, D. Leung, and H. Choe. 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 (17): 9712-7.
<https://doi.org/10.1073/pnas.160115697>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10931940>.
- Fariás, G. G., L. Cuitino, X. Guo, X. Ren, M. Jarnik, R. Mattera, and J. S. Bonifacino. 2012. "Signal-mediated, AP-1/clathrin-dependent sorting of transmembrane receptors to the somatodendritic domain of hippocampal neurons." *Neuron* 75 (5): 810-23.

- <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.07.007>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22958822>.
- Feyder, S., J. O. De Craene, S. Bär, D. L. Bertazzi, and S. Friant. 2015. "Membrane trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model." *Int J Mol Sci* 16 (1): 1509-25.
<https://doi.org/10.3390/ijms16011509>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25584613>.
- Fjorback, A. W., M. Seaman, C. Gustafsen, A. Mehmedbasic, S. Gokool, C. Wu, D. Militz, V. Schmidt, P. Madsen, J. R. Nyengaard, T. E. Willnow, E. I. Christensen, W. B. Mobley, A. Nykjær, and O. M. Andersen. 2012. "Retromer binds the FANSHY sorting motif in SorLA to regulate amyloid precursor protein sorting and processing." *J Neurosci* 32 (4): 1467-80. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2272-11.2012>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22279231>.
- Fol, R., J. Braudeau, S. Ludewig, T. Abel, S. W. Weyer, J. P. Roederer, F. Brod, M. Audrain, A. P. Bemelmans, C. J. Buchholz, M. Korte, N. Cartier, and U. C. Müller. 2016. "Viral gene transfer of APP_{sα} rescues synaptic failure in an Alzheimer's disease mouse model." *Acta Neuropathol* 131 (2): 247-266. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1498-9>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26538149>.
- Forest, K. H., N. Alfulaj, K. Arora, R. Taketa, T. Sherrin, C. Todorovic, J. L. M. Lawrence, G. T. Yoshikawa, H. L. Ng, V. J. Hruby, and R. A. Nichols. 2018. "Protection against β -amyloid neurotoxicity by a non-toxic endogenous N-terminal β -amyloid fragment and its active hexapeptide core sequence." *J Neurochem* 144 (2): 201-217.
<https://doi.org/10.1111/jnc.14257>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29164616>.
- Fredriksson, S., M. Gullberg, J. Jarvius, C. Olsson, K. Pietras, S. M. Gústafsdóttir, A. Ostman, and U. Landegren. 2002. "Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays." *Nat Biotechnol* 20 (5): 473-7. <https://doi.org/10.1038/nbt0502-473>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11981560>.
- Frost, B., R. L. Jacks, and M. I. Diamond. 2009. "Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell." *J Biol Chem* 284 (19): 12845-52.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M808759200>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19282288>.
- Fölsch, H., H. Ohno, J. S. Bonifacino, and I. Mellman. 1999. "A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells." *Cell* 99 (2): 189-98.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81650-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81650-5).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10535737>.
- Gan, Y., T. E. McGraw, and E. Rodriguez-Boulan. 2002. "The epithelial-specific adaptor AP1B mediates post-endocytic recycling to the basolateral membrane." *Nat Cell Biol* 4 (8): 605-9. <https://doi.org/10.1038/ncb827>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12105417>.
- Gao, Y., and S. W. Pimplikar. 2001. "The gamma -secretase-cleaved C-terminal fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (26): 14979-84. <https://doi.org/10.1073/pnas.261463298>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11742091>.
- Ghoshal, N., F. García-Sierra, J. Wu, S. Leurgans, D. A. Bennett, R. W. Berry, and L. I. Binder. 2002. "Tau conformational changes correspond to impairments of episodic memory in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease." *Exp Neurol* 177 (2): 475-93.
<https://doi.org/10.1006/exnr.2002.8014>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12429193>.
- Glenner, G. G., and C. W. Wong. 1984. "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein." *Biochem Biophys Res Commun* 120 (3): 885-90. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(84\)80190-4](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(84)80190-4).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6375662>.

- Goldgaber, D., M. I. Lerman, O. W. McBride, U. Saffiotti, and D. C. Gajdusek. 1987. "Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease." *Science* 235 (4791): 877-80.
<https://doi.org/10.1126/science.3810169>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3810169>.
- Goldstein, L. S. B., and U. Das. 2021. "The cellular machinery of post-endocytic APP trafficking in Alzheimer's disease: A future target for therapeutic intervention?" *Prog Mol Biol Transl Sci* 177: 109-122. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2020.08.001>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33453937>.
- González, A. E., V. C. Muñoz, V. A. Cavieres, H. A. Bustamante, V. H. Cornejo, Y. C. Januário, I. González, C. Hetz, L. L. daSilva, A. Rojas-Fernández, R. T. Hay, G. A. Mardones, and P. V. Burgos. 2017. "Autophagosomes cooperate in the degradation of intracellular C-terminal fragments of the amyloid precursor protein via the MVB/lysosomal pathway." *FASEB J*. <https://doi.org/10.1096/fj.201600713R>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28254759>.
- Gravotta, D., J. M. Carvajal-Gonzalez, R. Mattera, S. Deborde, J. R. Banfelder, J. S. Bonifacino, and E. Rodriguez-Boulan. 2012. "The clathrin adaptor AP-1A mediates basolateral polarity." *Dev Cell* 22 (4): 811-23. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.02.004>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22516199>.
- Greenfield, J. P., J. Tsai, G. K. Gouras, B. Hai, G. Thinakaran, F. Checler, S. S. Sisodia, P. Greengard, and H. Xu. 1999. "Endoplasmic reticulum and trans-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer beta-amyloid peptides." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (2): 742-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.2.742>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9892704>.
- Greer, P. L., R. Hanayama, B. L. Bloodgood, A. R. Mardinly, D. M. Lipton, S. W. Flavell, T. K. Kim, E. C. Griffith, Z. Waldon, R. Maehr, H. L. Ploegh, S. Chowdhury, P. F. Worley, J. Steen, and M. E. Greenberg. 2010. "The Angelman Syndrome protein Ube3A regulates synapse development by ubiquitinating arc." *Cell* 140 (5): 704-16.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.026>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20211139>.
- Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, Y. C. Tung, M. Quinlan, H. M. Wisniewski, and L. I. Binder. 1986. "Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (13): 4913-7.
<https://doi.org/10.1073/pnas.83.13.4913>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3088567>.
- Gu, Y., F. Chen, N. Sanjo, T. Kawarai, H. Hasegawa, M. Duthie, W. Li, X. Ruan, A. Luthra, H. T. Mount, A. Tandon, P. E. Fraser, and P. St George-Hyslop. 2003. "APH-1 interacts with mature and immature forms of presenilins and nicastrin and may play a role in maturation of presenilin.nicastrin complexes." *J Biol Chem* 278 (9): 7374-80.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M209499200>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12471034>.
- Guo, J. L., and V. M. Lee. 2014. "Cell-to-cell transmission of pathogenic proteins in neurodegenerative diseases." *Nat Med* 20 (2): 130-8.
<https://doi.org/10.1038/nm.3457>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24504409>.
- Guo, X., R. Mattera, X. Ren, Y. Chen, C. Retamal, A. González, and J. S. Bonifacino. 2013. "The adaptor protein-1 μ 1B subunit expands the repertoire of basolateral sorting signal recognition in epithelial cells." *Dev Cell* 27 (3): 353-66.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.10.006>.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24229647>.
- Guthrie, K., J. Rayhanabad, D. Kuhl, and C. Gall. 2000. "Odors regulate Arc expression in neuronal ensembles engaged in odor processing." *Neuroreport* 11 (9): 1809-13.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10884024>.

- Haass, C., A. Y. Hung, M. G. Schlossmacher, D. B. Teplow, and D. J. Selkoe. 1993. "beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms." *J Biol Chem* 268 (5): 3021-4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8428976>.
- Haass, C., A. Y. Hung, D. J. Selkoe, and D. B. Teplow. 1994. "Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid beta-protein precursor." *J Biol Chem* 269 (26): 17741-8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8021287>.
- Haass, C., C. Kaether, G. Thinakaran, and S. Sisodia. 2012. "Trafficking and proteolytic processing of APP." *Cold Spring Harb Perspect Med* 2 (5): a006270. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006270>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22553493>.
- Haass, C., E. H. Koo, A. Mellon, A. Y. Hung, and D. J. Selkoe. 1992. "Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments." *Nature* 357 (6378): 500-3. <https://doi.org/10.1038/357500a0>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1608449>.
- Haass, C., and D. J. Selkoe. 1993. "Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide." *Cell* 75 (6): 1039-42. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90312-e](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90312-e). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8261505>.
- Hardy, J. 2017. "The discovery of Alzheimer-causing mutations in the APP gene and the formulation of the "amyloid cascade hypothesis"." *FEBS J* 284 (7): 1040-1044. <https://doi.org/10.1111/febs.14004>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28054745>.
- Hardy, J. A., and G. A. Higgins. 1992. "Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis." *Science* 256 (5054): 184-5. <https://doi.org/10.1126/science.1566067>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1566067>.
- Hase, K., F. Nakatsu, M. Ohmae, K. Sugihara, N. Shioda, D. Takahashi, Y. Obata, Y. Furusawa, Y. Fujimura, T. Yamashita, S. Fukuda, H. Okamoto, M. Asano, S. Yonemura, and H. Ohno. 2013. "AP-1B-mediated protein sorting regulates polarity and proliferation of intestinal epithelial cells in mice." *Gastroenterology* 145 (3): 625-35. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.05.013>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23684748>.
- Hashimoto, T., A. Serrano-Pozo, Y. Hori, K. W. Adams, S. Takeda, A. O. Banerji, A. Mitani, D. Joyner, D. H. Thyssen, B. J. Bacskai, M. P. Frosch, T. L. Spires-Jones, M. B. Finn, D. M. Holtzman, and B. T. Hyman. 2012. "Apolipoprotein E, especially apolipoprotein E4, increases the oligomerization of amyloid β peptide." *J Neurosci* 32 (43): 15181-92. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1542-12.2012>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23100439>.
- Hefter, D., M. Kaiser, S. W. Weyer, I. E. Papageorgiou, M. Both, O. Kann, U. C. Müller, and A. Draguhn. 2016. "Amyloid Precursor Protein Protects Neuronal Network Function after Hypoxia via Control of Voltage-Gated Calcium Channels." *J Neurosci* 36 (32): 8356-71. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4130-15.2016>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27511009>.
- Heldwein, E. E., E. Macia, J. Wang, H. L. Yin, T. Kirchhausen, and S. C. Harrison. 2004. "Crystal structure of the clathrin adaptor protein 1 core." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (39): 14108-13. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406102101>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15377783>.
- Hick, M., U. Herrmann, S. W. Weyer, J. P. Mallm, J. A. Tschäpe, M. Borgers, M. Mercken, F. C. Roth, A. Draguhn, L. Slomianka, D. P. Wolfer, M. Korte, and U. C. Müller. 2015. "Acute function of secreted amyloid precursor protein fragment APP α in synaptic plasticity." *Acta Neuropathol* 129 (1): 21-37. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1368-x>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25432317>.

- Hille-Rehfeld, A. 1995. "Mannose 6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes." *Biochim Biophys Acta* 1241 (2): 177-94. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(95\)00004-b](https://doi.org/10.1016/0304-4157(95)00004-b). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7640295>.
- Hippius, H., and G. Neundörfer. 2003. "The discovery of Alzheimer's disease." *Dialogues Clin Neurosci* 5 (1): 101-8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22034141>.
- Hirschhorn, J. N., and M. J. Daly. 2005. "Genome-wide association studies for common diseases and complex traits." *Nat Rev Genet* 6 (2): 95-108. <https://doi.org/10.1038/nrg1521>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15716906>.
- Hirst, J., L. D. Barlow, G. C. Francisco, D. A. Sahlender, M. N. Seaman, J. B. Dacks, and M. S. Robinson. 2011. "The fifth adaptor protein complex." *PLoS Biol* 9 (10): e1001170. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001170>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22022230>.
- Hirst, J., G. H. Borner, J. Edgar, M. Y. Hein, M. Mann, F. Buchholz, R. Antrobus, and M. S. Robinson. 2013. "Interaction between AP-5 and the hereditary spastic paraplegia proteins SPG11 and SPG15." *Mol Biol Cell* 24 (16): 2558-69. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-03-0170>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23825025>.
- Hirst, J., N. A. Bright, B. Rous, and M. S. Robinson. 1999. "Characterization of a fourth adaptor-related protein complex." *Mol Biol Cell* 10 (8): 2787-802. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.8.2787>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10436028>.
- Hirst, J., C. Irving, and G. H. Borner. 2013. "Adaptor protein complexes AP-4 and AP-5: new players in endosomal trafficking and progressive spastic paraplegia." *Traffic* 14 (2): 153-64. <https://doi.org/10.1111/tra.12028>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23167973>.
- Huang, Y. M., J. Shen, and H. L. Zhao. 2019. "Major Clinical Trials Failed the Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease." *J Am Geriatr Soc* 67 (4): 841-844. <https://doi.org/10.1111/jgs.15830>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30851121>.
- Hung, C. O. Y., and F. J. Livesey. 2018. "Altered γ -Secretase Processing of APP Disrupts Lysosome and Autophagosome Function in Monogenic Alzheimer's Disease." *Cell Rep* 25 (13): 3647-3660.e2. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.095>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30590039>.
- Huse, J. T., D. S. Pijak, G. J. Leslie, V. M. Lee, and R. W. Doms. 2000. "Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase." *J Biol Chem* 275 (43): 33729-37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004175200>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10924510>.
- Hussain, I., D. Powell, D. R. Howlett, D. G. Tew, T. D. Meek, C. Chapman, I. S. Gloger, K. E. Murphy, C. D. Southan, D. M. Ryan, T. S. Smith, D. L. Simmons, F. S. Walsh, C. Dingwall, and G. Christie. 1999. "Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase." *Mol Cell Neurosci* 14 (6): 419-27. <https://doi.org/10.1006/mcne.1999.0811>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10656250>.
- Icking, A., M. Amadii, M. Ruonala, S. Höning, and R. Tikkanen. 2007. "Polarized transport of Alzheimer amyloid precursor protein is mediated by adaptor protein complex AP1-1B." *Traffic* 8 (3): 285-96. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00526.x>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17319802>.
- Ivankovic, D., J. Drew, F. Lesept, I. J. White, G. López Doménech, S. A. Tooze, and J. T. Kittler. 2020. "Axonal autophagosome maturation defect through failure of ATG9A sorting underpins pathology in AP-4 deficiency syndrome." *Autophagy* 16 (3): 391-407. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1615302>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31142229>.

- Iwatsubo, T., D. M. Mann, A. Odaka, N. Suzuki, and Y. Ihara. 1995. "Amyloid beta protein (A beta) deposition: A beta 42(43) precedes A beta 40 in Down syndrome." *Ann Neurol* 37 (3): 294-9. <https://doi.org/10.1002/ana.410370305>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7695229>.
- Janvier, K., Y. Kato, M. Boehm, J. R. Rose, J. A. Martina, B. Y. Kim, S. Venkatesan, and J. S. Bonifacino. 2003. "Recognition of dileucine-based sorting signals from HIV-1 Nef and LIMP-II by the AP-1 gamma-sigma1 and AP-3 delta-sigma3 hemicomplexes." *J Cell Biol* 163 (6): 1281-90. <https://doi.org/10.1083/jcb.200307157>.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14691137>.
- Jevtic, Stefan, and John Provias. 2019. The Amyloid Precursor Protein: More than Just AmyloidBeta. *Journal of Neurology and Experimental Neuroscience: United Scientific Group*.
- Jia, X., R. Singh, S. Homann, H. Yang, J. Guatelli, and Y. Xiong. 2012. "Structural basis of evasion of cellular adaptive immunity by HIV-1 Nef." *Nat Struct Mol Biol* 19 (7): 701-6. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2328>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22705789>.
- Jiang, Y., K. A. Mullaney, C. M. Peterhoff, S. Che, S. D. Schmidt, A. Boyer-Boiteau, S. D. Ginsberg, A. M. Cataldo, P. M. Mathews, and R. A. Nixon. 2010. "Alzheimer's-related endosome dysfunction in Down syndrome is Abeta-independent but requires APP and is reversed by BACE-1 inhibition." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (4): 1630-5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908953107>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20080541>.
- Jin, M., N. Shepardson, T. Yang, G. Chen, D. Walsh, and D. J. Selkoe. 2011. "Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (14): 5819-24. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017033108>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21421841>.
- Jonsson, T., J. K. Atwal, S. Steinberg, J. Snaedal, P. V. Jonsson, S. Bjornsson, H. Stefansson, P. Sulem, D. Gudbjartsson, J. Maloney, K. Hoyte, A. Gustafson, Y. Liu, Y. Lu, T. Bhangale, R. R. Graham, J. Huttenlocher, G. Bjornsdottir, O. A. Andreassen, E. G. Jönsson, A. Palotie, T. W. Behrens, O. T. Magnusson, A. Kong, U. Thorsteinsdottir, R. J. Watts, and K. Stefansson. 2012. "A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline." *Nature* 488 (7409): 96-9. <https://doi.org/10.1038/nature11283>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22801501>.
- Jorissen, E., J. Prox, C. Bernreuther, S. Weber, R. Schwanbeck, L. Serneels, A. Snellinx, K. Craessaerts, A. Thathiah, I. Tesseur, U. Bartsch, G. Weskamp, C. P. Blobel, M. Glatzel, B. De Strooper, and P. Saftig. 2010. "The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex." *J Neurosci* 30 (14): 4833-44. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5221-09.2010>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20371803>.
- Jäger, S., S. Leuchtenberger, A. Martin, E. Czirr, J. Wesselowski, M. Dieckmann, E. Waldron, C. Korth, E. H. Koo, M. Heneka, S. Weggen, and C. U. Pietrzik. 2009. "alpha-secretase mediated conversion of the amyloid precursor protein derived membrane stub C99 to C83 limits Abeta generation." *J Neurochem* 111 (6): 1369-82. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06420.x>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19804379>.
- Kang, J., H. G. Lemaire, A. Unterbeck, J. M. Salbaum, C. L. Masters, K. H. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther, and B. Müller-Hill. 1987. "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor." *Nature* 325 (6106): 733-6. <https://doi.org/10.1038/325733a0>.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2881207>.

- Kang, J., and B. Müller-Hill. 1990. "Differential splicing of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor RNA in rat tissues: PreA4(695) mRNA is predominantly produced in rat and human brain." *Biochem Biophys Res Commun* 166 (3): 1192-200.
[https://doi.org/10.1016/0006-291x\(90\)90992-v](https://doi.org/10.1016/0006-291x(90)90992-v).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1689572>.
- Karch, C. M., and A. M. Goate. 2015. "Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis." *Biol Psychiatry* 77 (1): 43-51.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.05.006>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24951455>.
- Keen, J. H. 1987. "Clathrin assembly proteins: affinity purification and a model for coat assembly." *J Cell Biol* 105 (5): 1989-98. <https://doi.org/10.1083/jcb.105.5.1989>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2890644>.
- Keen, J. H., M. C. Willingham, and I. H. Pastan. 1979. "Clathrin-coated vesicles: isolation, dissociation and factor-dependent reassociation of clathrin baskets." *Cell* 16 (2): 303-12. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(79\)90007-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(79)90007-2).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/455437>.
- Kimberly, W. T., M. J. LaVoie, B. L. Ostaszewski, W. Ye, M. S. Wolfe, and D. J. Selkoe. 2003. "Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (11): 6382-7.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1037392100>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12740439>.
- Kimura, A., S. Hata, and T. Suzuki. 2016. "Alternative Selection of β -Site APP-Cleaving Enzyme 1 (BACE1) Cleavage Sites in Amyloid β -Protein Precursor (APP) Harboring Protective and Pathogenic Mutations within the A β Sequence." *J Biol Chem* 291 (46): 24041-24053.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M116.744722>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27687728>.
- Kinoshita, A., H. Fukumoto, T. Shah, C. M. Whelan, M. C. Irizarry, and B. T. Hyman. 2003. "Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes." *J Cell Sci* 116 (Pt 16): 3339-46.
<https://doi.org/10.1242/jcs.00643>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12829747>.
- Koo, E. H., and S. L. Squazzo. 1994. "Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway." *J Biol Chem* 269 (26): 17386-9.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8021238>.
- Koo, E. H., S. L. Squazzo, D. J. Selkoe, and C. H. Koo. 1996. "Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. I. Secretion, endocytosis and recycling as detected by labeled monoclonal antibody." *J Cell Sci* 109 (Pt 5): 991-8.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8743946>.
- Korb, E., C. L. Wilkinson, R. N. Delgado, K. L. Lovero, and S. Finkbeiner. 2013. "Arc in the nucleus regulates PML-dependent GluA1 transcription and homeostatic plasticity." *Nat Neurosci* 16 (7): 874-83. <https://doi.org/10.1038/nn.3429>.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23749147>.
- Kosik, K. S., C. L. Joachim, and D. J. Selkoe. 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 (11): 4044-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.11.4044>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2424016>.
- Kuhn, P. H., H. Wang, B. Dislich, A. Colombo, U. Zeitschel, J. W. Ellwart, E. Kremmer, S. Rossner, and S. F. Lichtenthaler. 2010. "ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons." *EMBO J* 29 (17): 3020-32. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.167>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20676056>.
- La Rosa, L. R., L. Perrone, M. S. Nielsen, P. Calissano, O. M. Andersen, and C. Matrone. 2015. "Y682G Mutation of Amyloid Precursor Protein Promotes Endo-Lysosomal Dysfunction

- by Disrupting APP-SorLA Interaction." *Front Cell Neurosci* 9: 109.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00109>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25904844>.
- Lai, A., S. S. Sisodia, and I. S. Trowbridge. 1995. "Characterization of sorting signals in the beta-amyloid precursor protein cytoplasmic domain." *J Biol Chem* 270 (8): 3565-73.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7876092>.
- Lane, C. A., J. Hardy, and J. M. Schott. 2018. "Alzheimer's disease." *Eur J Neurol* 25 (1): 59-70.
<https://doi.org/10.1111/ene.13439>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28872215>.
- Lauritzen, I., R. Pardossi-Piquard, C. Bauer, E. Brigham, J. D. Abraham, S. Ranaldi, P. Fraser, P. St-George-Hyslop, O. Le Thuc, V. Espin, L. Chami, J. Dunys, and F. Checler. 2012. "The β -secretase-derived C-terminal fragment of β APP, C99, but not A β , is a key contributor to early intraneuronal lesions in triple-transgenic mouse hippocampus." *J Neurosci* 32 (46): 16243-1655a. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2775-12.2012>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23152608>.
- Lauritzen, I., R. Pardossi-Piquard, A. Bourgeois, A. Bécot, and F. Checler. 2019. "Does Intraneuronal Accumulation of Carboxyl-terminal Fragments of the Amyloid Precursor Protein Trigger Early Neurotoxicity in Alzheimer's Disease?" *Curr Alzheimer Res* 16 (5): 453-457. <https://doi.org/10.2174/1567205016666190325092841>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30907322>.
- Lauritzen, I., R. Pardossi-Piquard, A. Bourgeois, S. Pagnotta, M. G. Biferi, M. Barkats, P. Lacor, W. Klein, C. Bauer, and F. Checler. 2016. "Intraneuronal aggregation of the β -CTF fragment of APP (C99) induces A β -independent lysosomal-autophagic pathology." *Acta Neuropathol* 132 (2): 257-276. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1577-6>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27138984>.
- LaVoie, M. J., P. C. Fraering, B. L. Ostaszewski, W. Ye, W. T. Kimberly, M. S. Wolfe, and D. J. Selkoe. 2003. "Assembly of the gamma-secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin." *J Biol Chem* 278 (39): 37213-22.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M303941200>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12857757>.
- Lie, P. P. Y., and R. A. Nixon. 2019. "Lysosome trafficking and signaling in health and neurodegenerative diseases." *Neurobiol Dis* 122: 94-105.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.05.015>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29859318>.
- Link, W., U. Konietzko, G. Kauselmann, M. Krug, B. Schwanke, U. Frey, and D. Kuhl. 1995. "Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (12): 5734-8.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7777577>.
- Livingstone, R. W., M. K. Elder, M. C. Barrett, C. M. Westlake, K. Peppercorn, W. P. Tate, W. C. Abraham, and J. M. Williams. 2019. "Secreted Amyloid Precursor Protein-Alpha Promotes Arc Protein Synthesis in Hippocampal Neurons." *Front Mol Neurosci* 12: 198.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00198>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31474829>.
- Lorent, K., L. Overbergh, D. Moechars, B. De Strooper, F. Van Leuven, and H. Van den Berghe. 1995. "Expression in mouse embryos and in adult mouse brain of three members of the amyloid precursor protein family, of the alpha-2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and of its ligands apolipoprotein E, lipoprotein lipase, alpha-2-macroglobulin and the 40,000 molecular weight receptor-associated protein." *Neuroscience* 65 (4): 1009-25. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)00555-j](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)00555-j). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7542371>.
- Lorenzen, A., J. Samosh, K. Vandewark, P. H. Anborgh, C. Seah, A. C. Magalhaes, S. P. Cregan, S. S. Ferguson, and S. H. Pasternak. 2010. "Rapid and direct transport of cell surface APP

- to the lysosome defines a novel selective pathway." *Mol Brain* 3: 11.
<https://doi.org/10.1186/1756-6606-3-11>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20409323>.
- Lu, D. C., S. Rabizadeh, S. Chandra, R. F. Shayya, L. M. Ellerby, X. Ye, G. S. Salvesen, E. H. Koo, and D. E. Bredesen. 2000. "A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid beta-protein precursor." *Nat Med* 6 (4): 397-404.
<https://doi.org/10.1038/74656>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10742146>.
- Lyford, G. L., K. Yamagata, W. E. Kaufmann, C. A. Barnes, L. K. Sanders, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, A. A. Lanahan, and P. F. Worley. 1995. "Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites." *Neuron* 14 (2): 433-45.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7857651>.
- López-Sánchez, N., U. Müller, and J. M. Frade. 2005. "Lengthening of G2/mitosis in cortical precursors from mice lacking beta-amyloid precursor protein." *Neuroscience* 130 (1): 51-60. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.09.020>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15561424>.
- Maccioni, R. B., M. Lavados, M. Guillón, C. Mujica, R. Bosch, G. Farías, and P. Fuentes. 2006. "Anomalously phosphorylated tau and Aβ fragments in the CSF correlates with cognitive impairment in MCI subjects." *Neurobiol Aging* 27 (2): 237-44.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.01.011>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16399209>.
- Magara, F., U. Müller, Z. W. Li, H. P. Lipp, C. Weissmann, M. Stagljar, and D. P. Wolfer. 1999. "Genetic background changes the pattern of forebrain commissure defects in transgenic mice underexpressing the beta-amyloid-precursor protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (8): 4656-61. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.8.4656>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10200318>.
- Marcello, E., C. Saraceno, S. Musardo, H. Vara, A. G. de la Fuente, S. Pelucchi, D. Di Marino, B. Borroni, A. Tramontano, I. Pérez-Otaño, A. Padovani, M. Giustetto, F. Gardoni, and M. Di Luca. 2013. "Endocytosis of synaptic ADAM10 in neuronal plasticity and Alzheimer's disease." *J Clin Invest* 123 (6): 2523-38. <https://doi.org/10.1172/JCI65401>.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23676497>.
- Mardones, G. A., P. V. Burgos, Y. Lin, D. P. Kloer, J. G. Magadán, J. H. Hurley, and J. S. Bonifacino. 2013. "Structural basis for the recognition of tyrosine-based sorting signals by the μ3A subunit of the AP-3 adaptor complex." *J Biol Chem* 288 (13): 9563-71.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.450775>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23404500>.
- Markesbery, W. R. 1997. "Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease." *Free Radic Biol Med* 23 (1): 134-47. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(96\)00629-6](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(96)00629-6).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9165306>.
- Masters, C. L., G. Simms, N. A. Weinman, G. Multhaup, B. L. McDonald, and K. Beyreuther. 1985. "Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome." *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 (12): 4245-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.12.4245>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3159021>.
- Matrone, C., M. T. Ciotti, D. Mercanti, R. Marolda, and P. Calissano. 2008. "NGF and BDNF signaling control amyloidogenic route and Aβ production in hippocampal neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (35): 13139-44.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0806133105>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18728191>.
- Matrone, C., S. Luvisetto, L. R. La Rosa, R. Tamayev, A. Pignataro, N. Canu, L. Yang, A. P. Barbagallo, F. Biundo, F. Lombino, H. Zheng, M. Ammassari-Teule, and L. D'Adamio. 2012. "Tyr682 in the Aβ-precursor protein intracellular domain regulates synaptic connectivity, cholinergic function, and cognitive performance." *Aging Cell* 11 (6): 1084-

93. <https://doi.org/10.1111/ace.12009>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23020178>.
- Mattera, R., G. G. Farías, G. A. Mardones, and J. S. Bonifacino. 2014. "Co-assembly of viral envelope glycoproteins regulates their polarized sorting in neurons." *PLoS Pathog* 10 (5): e1004107. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004107>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24831812>.
- Mattera, R., S. Y. Park, R. De Pace, C. M. Guardia, and J. S. Bonifacino. 2017. "AP-4 mediates export of ATG9A from the." *Proc Natl Acad Sci U S A* 114 (50): E10697-E10706.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1717327114>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29180427>.
- Meyer, C., D. Zizioli, S. Lausmann, E. L. Eskelinen, J. Hamann, P. Saftig, K. von Figura, and P. Schu. 2000. "mu1A-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors." *EMBO J* 19 (10): 2193-203.
<https://doi.org/10.1093/emboj/19.10.2193>.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10811610>.
- Minatohara, K., M. Akiyoshi, and H. Okuno. 2015. "Role of Immediate-Early Genes in Synaptic Plasticity and Neuronal Ensembles Underlying the Memory Trace." *Front Mol Neurosci* 8: 78. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00078>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26778955>.
- Miyashita, T., S. Kubik, G. Lewandowski, and J. F. Guzowski. 2008. "Networks of neurons, networks of genes: an integrated view of memory consolidation." *Neurobiol Learn Mem* 89 (3): 269-84. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.08.012>.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17931913>.
- Montejo de Garcini, E., L. Serrano, and J. Avila. 1986. "Self assembly of microtubule associated protein tau into filaments resembling those found in Alzheimer disease." *Biochem Biophys Res Commun* 141 (2): 790-6. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(86\)80242-x](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(86)80242-x).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3099793>.
- Moore, S., L. D. Evans, T. Andersson, E. Portelius, J. Smith, T. B. Dias, N. Saurat, A. McGlade, P. Kirwan, K. Blennow, J. Hardy, H. Zetterberg, and F. J. Livesey. 2015. "APP metabolism regulates tau proteostasis in human cerebral cortex neurons." *Cell Rep* 11 (5): 689-96.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.068>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25921538>.
- More, K., C. M. Klinger, L. D. Barlow, and J. B. Dacks. 2020. "Evolution and Natural History of Membrane Trafficking in Eukaryotes." *Curr Biol* 30 (10): R553-R564.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.03.068>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32428497>.
- Muratore, C. R., H. C. Rice, P. Srikanth, D. G. Callahan, T. Shin, L. N. Benjamin, D. M. Walsh, D. J. Selkoe, and T. L. Young-Pearse. 2014. "The familial Alzheimer's disease APPV717I mutation alters APP processing and Tau expression in iPSC-derived neurons." *Hum Mol Genet* 23 (13): 3523-36. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu064>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24524897>.
- Müller, U. C., T. Deller, and M. Korte. 2017. "Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family." *Nat Rev Neurosci* 18 (5): 281-298.
<https://doi.org/10.1038/nrn.2017.29>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28360418>.
- Na, J. Y., K. Song, J. W. Lee, S. Kim, and J. Kwon. 2017. "Sortilin-related receptor 1 interacts with amyloid precursor protein and is activated by 6-shogaol, leading to inhibition of the amyloidogenic pathway." *Biochem Biophys Res Commun* 484 (4): 890-895.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.02.029>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28188785>.
- Navarro Negredo, P., J. R. Edgar, A. G. Wrobel, N. R. Zaccai, R. Antrobus, D. J. Owen, and M. S. Robinson. 2017. "Contribution of the clathrin adaptor AP-1 subunit μ 1 to acidic cluster

- protein sorting." *J Cell Biol* 216 (9): 2927-2943.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201602058>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28743825>.
- Neve, R. L., P. Harris, K. S. Kosik, D. M. Kurnit, and T. A. Donlon. 1986. "Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2." *Brain Res* 387 (3): 271-80. [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(86\)90033-1](https://doi.org/10.1016/0169-328x(86)90033-1).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3103857>.
- Niere, F., J. R. Wilkerson, and K. M. Huber. 2012. "Evidence for a fragile X mental retardation protein-mediated translational switch in metabotropic glutamate receptor-triggered Arc translation and long-term depression." *J Neurosci* 32 (17): 5924-36.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4650-11.2012>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22539853>.
- Nikolaev, A., T. McLaughlin, D. D. O'Leary, and M. Tessier-Lavigne. 2009. "APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases." *Nature* 457 (7232): 981-9. <https://doi.org/10.1038/nature07767>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19225519>.
- Ninomiya, H., J. M. Roch, L. W. Jin, and T. Saitoh. 1994. "Secreted form of amyloid beta/A4 protein precursor (APP) binds to two distinct APP binding sites on rat B103 neuron-like cells through two different domains, but only one site is involved in neuritotropic activity." *J Neurochem* 63 (2): 495-500. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.63020495.x>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7913487>.
- Nishimura, M., K. Yamagata, H. Sugiura, and H. Okamura. 2003. "The activity-regulated cytoskeleton-associated (Arc) gene is a new light-inducible early gene in the mouse suprachiasmatic nucleus." *Neuroscience* 116 (4): 1141-7.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12617955>.
- Nizynski, B., W. Dzwolak, and K. Nieznanski. 2017. "Amyloidogenesis of Tau protein." *Protein Sci* 26 (11): 2126-2150. <https://doi.org/10.1002/pro.3275>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28833749>.
- Nordstedt, C., G. L. Caporaso, J. Thyberg, S. E. Gandy, and P. Greengard. 1993. "Identification of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein in clathrin-coated vesicles purified from PC12 cells." *J Biol Chem* 268 (1): 608-12.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8416966>.
- Offe, K., S. E. Dodson, J. T. Shoemaker, J. J. Fritz, M. Gearing, A. I. Levey, and J. J. Lah. 2006. "The lipoprotein receptor LR11 regulates amyloid beta production and amyloid precursor protein traffic in endosomal compartments." *J Neurosci* 26 (5): 1596-603.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4946-05.2006>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16452683>.
- Ohno, H., J. Stewart, M. C. Fournier, H. Bosshart, I. Rhee, S. Miyatake, T. Saito, A. Gallusser, T. Kirchhausen, and J. S. Bonifacino. 1995. "Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins." *Science* 269 (5232): 1872-5.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7569928>.
- Ohno, H., T. Tomemori, F. Nakatsu, Y. Okazaki, R. C. Aguilar, H. Foelsch, I. Mellman, T. Saito, T. Shirasawa, and J. S. Bonifacino. 1999. "Mu1B, a novel adaptor medium chain expressed in polarized epithelial cells." *FEBS Lett* 449 (2-3): 215-20.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10338135>.
- Okuno, H. 2011. "Regulation and function of immediate-early genes in the brain: beyond neuronal activity markers." *Neurosci Res* 69 (3): 175-86.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2010.12.007>.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21163309>.

- Olkkonen, V. M., and E. Ikonen. 2006. "When intracellular logistics fails--genetic defects in membrane trafficking." *J Cell Sci* 119 (Pt 24): 5031-45.
<https://doi.org/10.1242/jcs.03303>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17158910>.
- Ostermann, N., J. Eder, U. Eidhoff, F. Zink, U. Hassiepen, S. Worpenberg, J. Maibaum, O. Simic, U. Hommel, and B. Gerhartz. 2006. "Crystal structure of human BACE2 in complex with a hydroxyethylamine transition-state inhibitor." *J Mol Biol* 355 (2): 249-61.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.10.027>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16305800>.
- Owen, D. J., and P. R. Evans. 1998. "A structural explanation for the recognition of tyrosine-based endocytotic signals." *Science* 282 (5392): 1327-32.
<https://doi.org/10.1126/science.282.5392.1327>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9812899>.
- Panza, F., M. Lozupone, G. Logroschino, and B. P. Imbimbo. 2019. "A critical appraisal of amyloid- β -targeting therapies for Alzheimer disease." *Nat Rev Neurol* 15 (2): 73-88.
<https://doi.org/10.1038/s41582-018-0116-6>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30610216>.
- Pardossi-Piquard, R., S. P. Yang, S. Kanemoto, Y. Gu, F. Chen, C. Böhm, J. Sevalle, T. Li, P. C. Wong, F. Checler, G. Schmitt-Ulms, P. St George-Hyslop, and P. E. Fraser. 2009. "APH1 polar transmembrane residues regulate the assembly and activity of presenilin complexes." *J Biol Chem* 284 (24): 16298-16307.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.000067>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19369254>.
- Park, S. Y., and X. Guo. 2014. "Adaptor protein complexes and intracellular transport." *Biosci Rep* 34 (4). <https://doi.org/10.1042/BSR20140069>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24975939>.
- Pearse, B. M. 1975. "Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization." *J Mol Biol* 97 (1): 93-8. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(75\)80024-6](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(75)80024-6). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1177317>.
- Pearse, B. M., and M. S. Robinson. 1984. "Purification and properties of 100-kd proteins from coated vesicles and their reconstitution with clathrin." *EMBO J* 3 (9): 1951-7.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6149117>.
- Pereira, E. A., and L. L. daSilva. 2016. "HIV-1 Nef: Taking Control of Protein Trafficking." *Traffic* 17 (9): 976-96. <https://doi.org/10.1111/tra.12412>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27161574>.
- Perez, R. G., S. Soriano, J. D. Hayes, B. Ostaszewski, W. Xia, D. J. Selkoe, X. Chen, G. B. Stokin, and E. H. Koo. 1999. "Mutagenesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including Abeta42." *J Biol Chem* 274 (27): 18851-6. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.27.18851>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10383380>.
- Perez, R. G., S. L. Squazzo, and E. H. Koo. 1996. "Enhanced release of amyloid beta-protein from codon 670/671 "Swedish" mutant beta-amyloid precursor protein occurs in both secretory and endocytic pathways." *J Biol Chem* 271 (15): 9100-7.
<https://doi.org/10.1074/jbc.271.15.9100>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8621560>.
- Pericak-Vance, M. A., J. L. Bebout, P. C. Gaskell, L. H. Yamaoka, W. Y. Hung, M. J. Alberts, A. P. Walker, R. J. Bartlett, C. A. Haynes, and K. A. Welsh. 1991. "Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage." *Am J Hum Genet* 48 (6): 1034-50. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2035524>.
- Plath, N., O. Ohana, B. Dammermann, M. L. Errington, D. Schmitz, C. Gross, X. Mao, A. Engelsberg, C. Mahlke, H. Welzl, U. Kobalz, A. Stawrakakis, E. Fernandez, R. Waltereit, A. Bick-Sander, E. Therstappen, S. F. Cooke, V. Blanquet, W. Wurst, B. Salmen, M. R. Bösl, H. P. Lipp, S. G. Grant, T. V. Bliss, D. P. Wolfer, and D. Kuhl. 2006. "Arc/Arg3.1 is

- essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories." *Neuron* 52 (3): 437-44. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.024>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17088210>.
- Prabhu, Y., P. V. Burgos, C. Schindler, G. G. Farías, J. G. Magadán, and J. S. Bonifacino. 2012. "Adaptor protein 2-mediated endocytosis of the β -secretase BACE1 is dispensable for amyloid precursor protein processing." *Mol Biol Cell* 23 (12): 2339-51.
<https://doi.org/10.1091/mbc.E11-11-0944>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22553349>.
- Prasher, V. P., M. J. Farrer, A. M. Kessling, E. M. Fisher, R. J. West, P. C. Barber, and A. C. Butler. 1998. "Molecular mapping of Alzheimer-type dementia in Down's syndrome." *Ann Neurol* 43 (3): 380-3. <https://doi.org/10.1002/ana.410430316>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9506555>.
- Pulina, M. V., M. Hopkins, V. Haroutunian, P. Greengard, and V. Bustos. 2020. "C99 selectively accumulates in vulnerable neurons in Alzheimer's disease." *Alzheimers Dement* 16 (2): 273-282. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.09.002>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31677937>.
- Qi-Takahara, Y., M. Morishima-Kawashima, Y. Tanimura, G. Dolios, N. Hirotsani, Y. Horikoshi, F. Kametani, M. Maeda, T. C. Saido, R. Wang, and Y. Ihara. 2005. "Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase." *J Neurosci* 25 (2): 436-45.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1575-04.2005>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15647487>.
- Rajendran, L., and W. Annaert. 2012. "Membrane trafficking pathways in Alzheimer's disease." *Traffic* 13 (6): 759-70. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2012.01332.x>.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22269004>.
- Ramírez-Amaya, V., A. Vazdarjanova, D. Mikhael, S. Rosi, P. F. Worley, and C. A. Barnes. 2005. "Spatial exploration-induced Arc mRNA and protein expression: evidence for selective, network-specific reactivation." *J Neurosci* 25 (7): 1761-8.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4342-04.2005>.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15716412>.
- Ren, X., G. G. Farías, B. J. Canagarajah, J. S. Bonifacino, and J. H. Hurley. 2013. "Structural basis for recruitment and activation of the AP-1 clathrin adaptor complex by Arf1." *Cell* 152 (4): 755-67. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.042>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23415225>.
- Rial Verde, E. M., J. Lee-Osbourne, P. F. Worley, R. Malinow, and H. T. Cline. 2006. "Increased expression of the immediate-early gene arc/arg3.1 reduces AMPA receptor-mediated synaptic transmission." *Neuron* 52 (3): 461-74.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.031>.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17088212>.
- Robinson, M. S. 2004. "Adaptable adaptors for coated vesicles." *Trends Cell Biol* 14 (4): 167-74.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.02.002>.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15066634>.
- . 2015. "Forty Years of Clathrin-coated Vesicles." *Traffic* 16 (12): 1210-38.
<https://doi.org/10.1111/tra.12335>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26403691>.
- Robinson, M. S., and J. S. Bonifacino. 2001. "Adaptor-related proteins." *Curr Opin Cell Biol* 13 (4): 444-53. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(00\)00235-0](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(00)00235-0).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11454451>.
- Ross, B. H., Y. Lin, E. A. Corales, P. V. Burgos, and G. A. Mardones. 2014. "Structural and functional characterization of cargo-binding sites on the μ 4-subunit of adaptor protein complex 4." *PLoS One* 9 (2): e88147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088147>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24498434>.

- Rovelet-Lecrux, A., D. Hannequin, G. Raux, N. Le Meur, A. Laquerrière, A. Vital, C. Dumanchin, S. Feuillet, A. Brice, M. Vercelletto, F. Dubas, T. Frebourg, and D. Campion. 2006. "APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy." *Nat Genet* 38 (1): 24-6. <https://doi.org/10.1038/ng1718>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16369530>.
- Saillour, Y., G. Zanni, V. Des Portes, D. Heron, L. Guibaud, M. T. Iba-Zizen, J. L. Pedespan, K. Poirier, L. Castelnaud, C. Julien, C. Franconnet, D. Bonthron, M. E. Porteous, J. Chelly, and T. Bienvenu. 2007. "Mutations in the AP1S2 gene encoding the sigma 2 subunit of the adaptor protein 1 complex are associated with syndromic X-linked mental retardation with hydrocephalus and calcifications in basal ganglia." *J Med Genet* 44 (11): 739-44. <https://doi.org/10.1136/jmg.2007.051334>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17617514>.
- Saito, T., T. Suemoto, N. Brouwers, K. Slegers, S. Funamoto, N. Mihira, Y. Matsuba, K. Yamada, P. Nilsson, J. Takano, M. Nishimura, N. Iwata, C. Van Broeckhoven, Y. Ihara, and T. C. Saido. 2011. "Potent amyloidogenicity and pathogenicity of A β 43." *Nat Neurosci* 14 (8): 1023-32. <https://doi.org/10.1038/nn.2858>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21725313>.
- Sandbrink, R., C. L. Masters, and K. Beyreuther. 1994. "APP gene family: unique age-associated changes in splicing of Alzheimer's betaA4-amyloid protein precursor." *Neurobiol Dis* 1 (1-2): 13-24. <https://doi.org/10.1006/nbdi.1994.0003>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9216982>.
- . 1996. "APP gene family. Alternative splicing generates functionally related isoforms." *Ann N Y Acad Sci* 777: 281-7. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1996.tb34433.x>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8624099>.
- Sannerud, R., C. Esselens, P. Ejsmont, R. Mattera, L. Rochin, A. K. Tharkeshwar, G. De Baets, V. De Wever, R. Habets, V. Baert, W. Vermeire, C. Michiels, A. J. Groot, R. Wouters, K. Dillen, K. Vints, P. Baatsen, S. Munck, R. Derua, E. Waelkens, G. S. Basi, M. Mercken, M. Vooijs, M. Bollen, J. Schymkowitz, F. Rousseau, J. S. Bonifacino, G. Van Niel, B. De Strooper, and W. Annaert. 2016. "Restricted Location of PSEN2/ γ -Secretase Determines Substrate Specificity and Generates an Intracellular A β Pool." *Cell* 166 (1): 193-208. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.020>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27293189>.
- Saunders, A. M., W. J. Strittmatter, D. Schmechel, P. H. George-Hyslop, M. A. Pericak-Vance, S. H. Joo, B. L. Rosi, J. F. Gusella, D. R. Crapper-MacLachlan, and M. J. Alberts. 1993. "Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease." *Neurology* 43 (8): 1467-72. <https://doi.org/10.1212/wnl.43.8.1467>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8350998>.
- Scheuner, D., C. Eckman, M. Jensen, X. Song, M. Citron, N. Suzuki, T. D. Bird, J. Hardy, M. Hutton, W. Kukull, E. Larson, E. Levy-Lahad, M. Viitanen, E. Peskind, P. Poorkaj, G. Schellenberg, R. Tanzi, W. Wasco, L. Lannfelt, D. Selkoe, and S. Younkin. 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 (8): 864-70. <https://doi.org/10.1038/nm0896-864>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8705854>.
- Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J. Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, and A. Cardona. 2012. "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis." *Nat Methods* 9 (7): 676-82. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22743772>.
- Serrano-Pozo, A., M. P. Frosch, E. Masliah, and B. T. Hyman. 2011. "Neuropathological alterations in Alzheimer disease." *Cold Spring Harb Perspect Med* 1 (1): a006189.

- <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006189>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22229116>.
- Shao, W., D. Peng, and X. Wang. 2017. "Genetics of Alzheimer's disease: From pathogenesis to clinical usage." *J Clin Neurosci* 45: 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2017.06.074>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28869135>.
- Shariati, S. A., P. Lau, B. A. Hassan, U. Müller, C. G. Dotti, B. De Strooper, and A. Gärtner. 2013. "APLP2 regulates neuronal stem cell differentiation during cortical development." *J Cell Sci* 126 (Pt 5): 1268-77. <https://doi.org/10.1242/jcs.122440>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23345401>.
- Shimizu, H., A. Tosaki, K. Kaneko, T. Hisano, T. Sakurai, and N. Nukina. 2008. "Crystal structure of an active form of BACE1, an enzyme responsible for amyloid beta protein production." *Mol Cell Biol* 28 (11): 3663-71. <https://doi.org/10.1128/MCB.02185-07>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18378702>.
- Sievers, F., A. Wilm, D. Dineen, T. J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Söding, J. D. Thompson, and D. G. Higgins. 2011. "Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega." *Mol Syst Biol* 7: 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21988835>.
- Simpson, F., N. A. Bright, M. A. West, L. S. Newman, R. B. Darnell, and M. S. Robinson. 1996. "A novel adaptor-related protein complex." *J Cell Biol* 133 (4): 749-60. <https://doi.org/10.1083/jcb.133.4.749>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8666661>.
- Simpson, F., A. A. Peden, L. Christopoulou, and M. S. Robinson. 1997. "Characterization of the adaptor-related protein complex, AP-3." *J Cell Biol* 137 (4): 835-45. <https://doi.org/10.1083/jcb.137.4.835>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9151686>.
- Sinha, S., J. P. Anderson, R. Barbour, G. S. Basi, R. Caccavello, D. Davis, M. Doan, H. F. Dovey, N. Frigon, J. Hong, K. Jacobson-Croak, N. Jewett, P. Keim, J. Knops, I. Lieberburg, M. Power, H. Tan, G. Tatsuno, J. Tung, D. Schenk, P. Seubert, S. M. Suomensaaari, S. Wang, D. Walker, J. Zhao, L. McConlogue, and V. John. 1999. "Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain." *Nature* 402 (6761): 537-40. <https://doi.org/10.1038/990114>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10591214>.
- Slunt, H. H., G. Thinakaran, C. Von Koch, A. C. Lo, R. E. Tanzi, and S. S. Sisodia. 1994. "Expression of a ubiquitous, cross-reactive homologue of the mouse beta-amyloid precursor protein (APP)." *J Biol Chem* 269 (4): 2637-44. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8300594>.
- Small, S. A., K. Kent, A. Pierce, C. Leung, M. S. Kang, H. Okada, L. Honig, J. P. Vonsattel, and T. W. Kim. 2005. "Model-guided microarray implicates the retromer complex in Alzheimer's disease." *Ann Neurol* 58 (6): 909-19. <https://doi.org/10.1002/ana.20667>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16315276>.
- Smith-Swintosky, V. L., L. C. Pettigrew, S. D. Craddock, A. R. Culwell, R. E. Rydel, and M. P. Mattson. 1994. "Secreted forms of beta-amyloid precursor protein protect against ischemic brain injury." *J Neurochem* 63 (2): 781-4. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.63020781.x>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8035204>.
- Solans, A., X. Estivill, and S. de La Luna. 2000. "A new aspartyl protease on 21q22.3, BACE2, is highly similar to Alzheimer's amyloid precursor protein beta-secretase." *Cytogenet Cell Genet* 89 (3-4): 177-84. <https://doi.org/10.1159/000015608>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10965118>.
- Squire, Larry, Darwin Berg, Floyd Bloom, Sascha du Lac, Anirvan Ghosh, and Nicholas Spitzer. 2008. *Fundamental Neuroscience*. Edited by Elsevier. Vol. 1. Vol. 3.

- Steiner, H., E. Winkler, D. Edbauer, S. Prokop, G. Basset, A. Yamasaki, M. Kostka, and C. Haass. 2002. "PEN-2 is an integral component of the gamma-secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin." *J Biol Chem* 277 (42): 39062-5. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200469200>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12198112>.
- Stenmark, H., R. G. Parton, O. Steele-Mortimer, A. Lütcke, J. Gruenberg, and M. Zerial. 1994. "Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis." *EMBO J* 13 (6): 1287-96. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8137813>.
- Struhl, G., and A. Adachi. 2000. "Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins." *Mol Cell* 6 (3): 625-36. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)00061-7](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00061-7). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11030342>.
- Sugimoto, H., M. Sugahara, H. Fölsch, Y. Koide, F. Nakatsu, N. Tanaka, T. Nishimura, M. Furukawa, C. Mullins, N. Nakamura, I. Mellman, and H. Ohno. 2002. "Differential recognition of tyrosine-based basolateral signals by AP-1B subunit mu1B in polarized epithelial cells." *Mol Biol Cell* 13 (7): 2374-82. <https://doi.org/10.1091/mbc.e01-10-0096>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12134076>.
- Sun, X., G. He, and W. Song. 2006. "BACE2, as a novel APP theta-secretase, is not responsible for the pathogenesis of Alzheimer's disease in Down syndrome." *FASEB J* 20 (9): 1369-76. <https://doi.org/10.1096/fj.05-5632com>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16816112>.
- Sun, X., Y. Wang, H. Qing, M. A. Christensen, Y. Liu, W. Zhou, Y. Tong, C. Xiao, Y. Huang, S. Zhang, X. Liu, and W. Song. 2005. "Distinct transcriptional regulation and function of the human BACE2 and BACE1 genes." *FASEB J* 19 (7): 739-49. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3426com>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15857888>.
- Söderberg, O., M. Gullberg, M. Jarvius, K. Ridderstråle, K. J. Leuchowius, J. Jarvius, K. Wester, P. Hydbring, F. Bahram, L. G. Larsson, and U. Landegren. 2006. "Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation." *Nat Methods* 3 (12): 995-1000. <https://doi.org/10.1038/nmeth947>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17072308>.
- Takami, M., Y. Nagashima, Y. Sano, S. Ishihara, M. Morishima-Kawashima, S. Funamoto, and Y. Ihara. 2009. "gamma-Secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of beta-carboxyl terminal fragment." *J Neurosci* 29 (41): 13042-52. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2362-09.2009>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19828817>.
- Tan, J. Z. A., L. Fourriere, J. Wang, F. Perez, G. Boncompain, and P. A. Gleeson. 2020. "Distinct anterograde trafficking pathways of BACE1 and amyloid precursor protein from the TGN and the regulation of amyloid- β production." *Mol Biol Cell* 31 (1): 27-44. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-09-0487>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31746668>.
- Tan, J. Z. A., and P. A. Gleeson. 2019. "The role of membrane trafficking in the processing of amyloid precursor protein and production of amyloid peptides in Alzheimer's disease." *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1861 (4): 697-712. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.11.013>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30639513>.
- Tanzi, R. E., J. F. Gusella, P. C. Watkins, G. A. Bruns, P. St George-Hyslop, M. L. Van Keuren, D. Patterson, S. Pagan, D. M. Kurnit, and R. L. Neve. 1987. "Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus." *Science* 235 (4791): 880-4. <https://doi.org/10.1126/science.2949367>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2949367>.

- Tarpey, P. S., C. Stevens, J. Teague, S. Edkins, S. O'Meara, T. Avis, S. Barthorpe, G. Buck, A. Butler, J. Cole, E. Dicks, K. Gray, K. Halliday, R. Harrison, K. Hills, J. Hinton, D. Jones, A. Menzies, T. Mironenko, J. Perry, K. Raine, D. Richardson, R. Shepherd, A. Small, C. Tofts, J. Varian, S. West, S. Widaa, A. Yates, R. Catford, J. Butler, U. Mallya, J. Moon, Y. Luo, H. Dorkins, D. Thompson, D. F. Easton, R. Wooster, M. Bobrow, N. Carpenter, R. J. Simonsen, C. E. Schwartz, R. E. Stevenson, G. Turner, M. Partington, J. Gecz, M. R. Stratton, P. A. Futreal, and F. L. Raymond. 2006. "Mutations in the gene encoding the Sigma 2 subunit of the adaptor protein 1 complex, AP1S2, cause X-linked mental retardation." *Am J Hum Genet* 79 (6): 1119-24. <https://doi.org/10.1086/510137>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17186471>.
- Tavares, L. A., E. M. da Silva, M. E. da Silva-Januário, Y. C. Januário, J. V. de Cavalho, É Czernisz, G. A. Mardones, and L. L. daSilva. 2017. "CD4 downregulation by the HIV-1 protein Nef reveals distinct roles for the γ 1 and γ 2 subunits of the AP-1 complex in protein trafficking." *J Cell Sci* 130 (2): 429-443. <https://doi.org/10.1242/jcs.192104>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27909244>.
- Tavares, L. A., J. V. de Carvalho, C. S. Costa, R. M. Silveira, A. N. de Carvalho, E. A. Donadi, and L. L. P. daSilva. 2020. "Two Functional Variants of AP-1 Complexes Composed of either γ 2 or γ 1 Subunits Are Independently Required for Major Histocompatibility Complex Class I Downregulation by HIV-1 Nef." *J Virol* 94 (7). <https://doi.org/10.1128/JVI.02039-19>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31915283>.
- Thinakaran, G., C. A. Kitt, A. J. Roskams, H. H. Slunt, E. Masliah, C. von Koch, S. D. Ginsberg, G. V. Ronnett, R. R. Reed, and D. L. Price. 1995. "Distribution of an APP homolog, APLP2, in the mouse olfactory system: a potential role for APLP2 in axogenesis." *J Neurosci* 15 (10): 6314-26. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7472397>.
- Toh, W. H., P. Z. C. Chia, M. I. Hossain, and P. A. Gleeson. 2018. "GGA1 regulates signal-dependent sorting of BACE1 to recycling endosomes, which moderates A β production." *Mol Biol Cell* 29 (2): 191-208. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-05-0270>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29142073>.
- Toh, W. H., J. Z. Tan, K. L. Zulkefli, F. J. Houghton, and P. A. Gleeson. 2017. "Amyloid precursor protein traffics from the Golgi directly to early endosomes in an Arl5b- and AP4-dependent pathway." *Traffic* 18 (3): 159-175. <https://doi.org/10.1111/tra.12465>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28000370>.
- Tomita, T. 2014. "Molecular mechanism of intramembrane proteolysis by γ -secretase." *J Biochem* 156 (4): 195-201. <https://doi.org/10.1093/jb/mvu049>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25108625>.
- Traub, L. M., and J. S. Bonifacino. 2013. "Cargo recognition in clathrin-mediated endocytosis." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5 (11): a016790. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016790>. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24186068>.
- Uemura, K., T. Kihara, A. Kuzuya, K. Okawa, T. Nishimoto, H. Ninomiya, H. Sugimoto, A. Kinoshita, and S. Shimohama. 2006. "Characterization of sequential N-cadherin cleavage by ADAM10 and PS1." *Neurosci Lett* 402 (3): 278-83. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.04.018>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16687212>.
- Vardarajan, B. N., S. Y. Bruesegem, M. E. Harbour, R. Inzelberg, R. Friedland, P. St George-Hyslop, M. N. Seaman, and L. A. Farrer. 2012. "Identification of Alzheimer disease-associated variants in genes that regulate retromer function." *Neurobiol Aging* 33 (9): 2231.e15-2231.e30. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.04.020>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22673115>.
- Vassar, R., B. D. Bennett, S. Babu-Khan, S. Kahn, E. A. Mendiaz, P. Denis, D. B. Teplow, S. Ross, P. Amarante, R. Loeloff, Y. Luo, S. Fisher, J. Fuller, S. Edenson, J. Lile, M. A. Jarosinski, A. L. Biere, E. Curran, T. Burgess, J. C. Louis, F. Collins, J. Treanor, G. Rogers, and M.

- Citron. 1999. "Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE." *Science* 286 (5440): 735-41.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10531052>.
- Vazdarjanova, A., V. Ramirez-Amaya, N. Insel, T. K. Plummer, S. Rosi, S. Chowdhury, D. Mikhael, P. F. Worley, J. F. Guzowski, and C. A. Barnes. 2006. "Spatial exploration induces ARC, a plasticity-related immediate-early gene, only in calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-positive principal excitatory and inhibitory neurons of the rat forebrain." *J Comp Neurol* 498 (3): 317-29. <https://doi.org/10.1002/cne.21003>.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16871537>.
- Vieira, S. I., S. Rebelo, H. Esselmann, J. Wiltfang, J. Lah, R. Lane, S. A. Small, S. Gandy, E. F. da Cruz E Silva, and O. A. da Cruz E Silva. 2010. "Retrieval of the Alzheimer's amyloid precursor protein from the endosome to the TGN is S655 phosphorylation state-dependent and retromer-mediated." *Mol Neurodegener* 5: 40.
<https://doi.org/10.1186/1750-1326-5-40>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20937087>.
- Wasco, W., K. Bupp, M. Magendantz, J. F. Gusella, R. E. Tanzi, and F. Solomon. 1992. "Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (22): 10758-62. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.22.10758>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1279693>.
- Wasco, W., S. Gurubhagavatula, M. D. Paradis, D. M. Romano, S. S. Sisodia, B. T. Hyman, R. L. Neve, and R. E. Tanzi. 1993. "Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor." *Nat Genet* 5 (1): 95-100. <https://doi.org/10.1038/ng0993-95>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8220435>.
- Weingarten, M. D., A. H. Lockwood, S. Y. Hwo, and M. W. Kirschner. 1975. "A protein factor essential for microtubule assembly." *Proc Natl Acad Sci U S A* 72 (5): 1858-62.
<https://doi.org/10.1073/pnas.72.5.1858>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1057175>.
- Weyer, S. W., M. Klevanski, A. Delekate, V. Voikar, D. Aydin, M. Hick, M. Filippov, N. Drost, K. L. Schaller, M. Saar, M. A. Vogt, P. Gass, A. Samanta, A. Jäschke, M. Korte, D. P. Wolfer, J. H. Caldwell, and U. C. Müller. 2011. "APP and APLP2 are essential at PNS and CNS synapses for transmission, spatial learning and LTP." *EMBO J* 30 (11): 2266-80.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2011.119>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21522131>.
- Wolfe, M. S., W. Xia, B. L. Ostaszewski, T. S. Diehl, W. T. Kimberly, and D. J. Selkoe. 1999. "Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity." *Nature* 398 (6727): 513-7. <https://doi.org/10.1038/19077>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10206644>.
- Wu, J., R. S. Petralia, H. Kurushima, H. Patel, M. Y. Jung, L. Volk, S. Chowdhury, J. D. Shepherd, M. Dehoff, Y. Li, D. Kuhl, R. L. Haganir, D. L. Price, R. Scannevin, J. C. Troncoso, P. C. Wong, and P. F. Worley. 2011. "Arc/Arg3.1 regulates an endosomal pathway essential for activity-dependent β -amyloid generation." *Cell* 147 (3): 615-28.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.036>.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22036569>.
- Xiao, Q., S. C. Gil, P. Yan, Y. Wang, S. Han, E. Gonzales, R. Perez, J. R. Cirrito, and J. M. Lee. 2012. "Role of phosphatidylinositol clathrin assembly lymphoid-myeloid leukemia (PICALM) in intracellular amyloid precursor protein (APP) processing and amyloid plaque pathogenesis." *J Biol Chem* 287 (25): 21279-89.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.338376>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22539346>.

- Xu, H., D. Sweeney, R. Wang, G. Thinakaran, A. C. Lo, S. S. Sisodia, P. Greengard, and S. Gandy. 1997. "Generation of Alzheimer beta-amyloid protein in the trans-Golgi network in the apparent absence of vesicle formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (8): 3748-52. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.8.3748>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9108049>.
- Yamazaki, T., E. H. Koo, and D. J. Selkoe. 1996. "Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. II. Endocytosis, recycling and lysosomal targeting detected by immunolocalization." *J Cell Sci* 109 (Pt 5): 999-1008. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8743947>.
- Yan, R. 2017. "Physiological Functions of the β -Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1 and 2." *Front Mol Neurosci* 10: 97. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00097>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28469554>.
- Yan, R., M. J. Bienkowski, M. E. Shuck, H. Miao, M. C. Tory, A. M. Pauley, J. R. Brashier, N. C. Stratman, W. R. Mathews, A. E. Buhl, D. B. Carter, A. G. Tomasselli, L. A. Parodi, R. L. Heinrikson, and M. E. Gurney. 1999. "Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity." *Nature* 402 (6761): 533-7. <https://doi.org/10.1038/990107>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10591213>.
- Yan, R., J. B. Munzner, M. E. Shuck, and M. J. Bienkowski. 2001. "BACE2 functions as an alternative alpha-secretase in cells." *J Biol Chem* 276 (36): 34019-27. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105583200>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11423558>.
- Yarwood, R., J. Hellicar, P. G. Woodman, and M. Lowe. 2020. "Membrane trafficking in health and disease." *Dis Model Mech* 13 (4). <https://doi.org/10.1242/dmm.043448>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32433026>.
- Yuan, X. Z., S. Sun, C. C. Tan, J. T. Yu, and L. Tan. 2017. "The Role of ADAM10 in Alzheimer's Disease." *J Alzheimers Dis* 58 (2): 303-322. <https://doi.org/10.3233/JAD-170061>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28409746>.
- Zhang, H., A. Kim, N. Abraham, L. A. Khan, D. H. Hall, J. T. Fleming, and V. Gobel. 2012. "Clathrin and AP-1 regulate apical polarity and lumen formation during *C. elegans* tubulogenesis." *Development* 139 (11): 2071-83. <https://doi.org/10.1242/dev.077347>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22535410>.
- Zhang, W., J. Wu, M. D. Ward, S. Yang, Y. A. Chuang, M. Xiao, R. Li, D. J. Leahy, and P. F. Worley. 2015. "Structural basis of arc binding to synaptic proteins: implications for cognitive disease." *Neuron* 86 (2): 490-500. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.030>. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25864631>.
- Zotova, E., J. A. Nicoll, R. Kalara, C. Holmes, and D. Boche. 2010. "Inflammation in Alzheimer's disease: relevance to pathogenesis and therapy." *Alzheimers Res Ther* 2 (1): 1. <https://doi.org/10.1186/alzrt24>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20122289>.