



Université de Sherbrooke

**Maturation des membres de la famille de la protéine précurseur de l'amyloïde par la  
protéase à sérine transmembranaire de type II matriptase**

Par  
Lanhec Erwan  
Programmes de pharmacologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé  
en vue de l'obtention du grade de philosophiae doctor (Ph.D.)  
en pharmacologie

Sherbrooke, Québec, Canada  
02/2020

Membres du jury d'évaluation  
Lavoie, Christine, programme de pharmacologie  
Leduc, Richard, programme de pharmacologie  
Denault, Jean-Bernard, programme de pharmacologie  
Xavier Roucou, département de biochimie et de génomique fonctionnelle  
Sébastien Hébert, Département de psychiatrie et de neurosciences, faculté de médecine,  
Université Laval

© Lanhec Erwan, 2020

## RÉSUMÉ

### Clivage des membres de la famille de la protéine précurseur de l'amyloïde par la protéase à sérine transmembranaire de type II matriptase

Par

Lanchec Erwan

Programmes de pharmacologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de philosophiae doctor (Ph.D. en pharmacologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

La maladie d'Alzheimer (MA) est caractérisée par la présence de plaques amyloïdes, composées principalement du peptide amyloïde  $\beta$  ( $A\beta$ ). Ce peptide est dérivé du clivage protéolytique de la protéine précurseur de l'amyloïde (*amyloid-beta precursor protein*, APP) par la  $\beta$  et  $\gamma$ -sécrétases. Des études récentes ont indiqué que de nombreuses, autres protéases clivent APP et modulent la production d' $A\beta$ . APP possède deux protéines homologues appartenant à la même famille, APLP1 et APLP2 (protéine de type précurseur bêta-amyloïde, *amyloid beta precursor-like protein 1* et 2). APLP1 et APLP2 possèdent une structure homologue avec APP et partagent des domaines de forte similarité de séquence avec lui mais ne possèdent pas la séquence du peptide  $A\beta$ . Les interactions dimériques entre APP, APLP1 et APLP2 modulent leur métabolisme par les sécrétases et modifient la production du peptide  $A\beta$ . De plus, des isoformes spécifiques d'APP contiennent des domaines inhibiteurs de protéase de type Kunitz (KPI), connus pour réguler l'activité protéolytique des protéases à sérines. Nous avons donc émis l'hypothèse que la matriptase, un membre de la famille des protéases à sérines transmembranaires de type II, est impliquée dans le clivage des membres de la famille APP et altère la production de peptide  $A\beta$ . Nous nous sommes donc fixé trois objectifs principaux : confirmer l'expression de la matriptase dans le cerveau humain, confirmer qu'une interaction est possible entre la matriptase et les membres de la famille APP et enfin évaluer l'impact de la matriptase sur les membres de la famille APP et la production de peptide  $A\beta$ . Nous avons montré que les ARNm de la matriptase sont présents dans le cerveau humain, mais qu'en plus la matriptase interagit et clive APP. Le clivage d'APP par la matriptase réduit la production de peptide  $A\beta$  40 *in vitro*. Nous avons démontré que la matriptase interagit et clive APLP1 et APLP2 *in vitro*. Nous avons aussi observé que la matriptase réduit les interactions homodimériques d'APLP1 et d'APLP2 *in vitro*. Ces études identifient la matriptase comme une nouvelle protéase capable de cliver la famille des APP qui pourrait avoir des conséquences importantes sur le profil de production d' $A\beta$  dans des conditions physiologiques, mais aussi dans la MA.

Mots clés: Alzheimer, APP, APLP1, APLP2, Matriptase, *ST14*, TTSP, Cerveau

## SUMMARY

### **Processing of amyloid precursor protein family members by the type II transmembrane serine protease matriptase**

By  
Lanche Erwan  
Programmes de pharmacologie

Thesis submitted to the Faculty of Medicine and Health Sciences for the diploma of philosophiae doctor (Ph.D.) in pharmacology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada, J1H 5N4

Alzheimer's disease (AD) is characterized by the presence of amyloid plaques, mainly composed of  $\beta$ -amyloid peptide ( $A\beta$ ). This peptide is derived from the proteolytic cleavage of amyloid precursor protein (APP) by  $\beta$  and  $\gamma$ -secretases. Recent studies have indicated that many other proteases cleave APP and modulate  $A\beta$  production. APP has two homologous proteins belonging to the same family, APLP1 and APLP2 (amyloid beta precursor like protein 1 and 2). APLP1 and APLP2 have identical structure with APP and share domains of strong homology with I but do not have the  $A\beta$  peptide sequence. The dimeric interactions between APP, APLP1 and APLP2 modulate their metabolism by secretases and modify the production of the  $A\beta$  peptide. In addition, specific APP isoforms contain Kunitz-like protease inhibitor (KPI) domains, known to regulate the proteolytic activity of serine proteases. We therefore hypothesized that matriptase, a member of the type II transmembrane serine protease family, is involved in the cleavage of members of the APP family and alters the production of  $A\beta$  peptide. We therefore set ourselves three main objectives: confirm the expression of matriptase in the human brain, confirm that an interaction is possible between matriptase and members of the APP family, evaluate the impact of matriptase on members of the APP family and the production of  $A\beta$  peptide. We have shown that matriptase mRNA seems present in the human brain, and that matriptase also interacts and cleaves APP. APP cleavage by matriptase reduces production of  $A\beta_{40}$  peptide *in vitro*. We have shown that matriptase interacts directly and cleaves both APLP1 and APLP2 *in vitro*. We also observed that matriptase reduces homodimeric interactions of APLP1 and APLP2 *in vitro*. These studies identify matriptase as a novel enzyme capable of cleaving the APP family that could have important consequences on the  $A\beta$  production profile under physiological conditions, but also in AD.

Key words: Alzheimer, APP, APLP1, APLP2, Matriptase, *ST14*, TTSP, Brain

# TABLE DES MATIÈRES

## Table des matières

RÉSUMÉ .....	1
SUMMARY .....	2
TABLE DES MATIÈRES .....	3
LISTE DES FIGURES .....	5
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	6
<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 La Maladie d'Alzheimer .....</b>	<b>8</b>
1.1.1 Caractéristiques de la MA .....	8
1.1.2 Zones atteintes et conséquences physiologiques .....	9
1.1.3 Étiologie de la MA .....	11
1.1.3.1 <i>Forme sporadique</i> .....	11
1.1.3.2 <i>Forme familiale</i> .....	12
1.1.4 La famille APP .....	13
1.1.4.1 <i>Structure, isoformes et maturation</i> .....	14
1.1.4.2 <i>Rôle physiologique et cellulaire</i> .....	16
1.1.5 Clivage de la famille APP par les sécrétases .....	19
1.1.5.1 <i>Clivage par l'□□sécrétase</i> .....	19
1.1.5.2 <i>Clivage par la □□sécrétase</i> .....	22
1.1.5.3 <i>Clivage par la □□sécrétase</i> .....	23
1.1.5.4 <i>Clivage des APLP</i> .....	24
1.1.6 Clivage de la famille APP par d'autres enzymes .....	25
1.1.7 Le peptide Aβ .....	28
1.1.7.1 <i>Différentes formes</i> .....	28
1.1.7.2 <i>Rôle physiologique du peptide Amyloïde Beta</i> .....	29
1.1.7.3 <i>Neurotoxicité du peptide Amyloïde Beta</i> .....	31
1.1.8 L'hypothèse de la cascade amyloïde .....	34
<b>1.2 Les Protéases.....</b>	<b>36</b>
1.2.1 Le rôle des protéases dans la MA.....	36
1.2.2 Les protéases à sérine .....	36
1.2.1 La matriptase .....	39
1.2.1.1 <i>Structure et maturation de la matriptase</i> .....	39
1.2.1.2 <i>Expression de la matriptase</i> .....	42
1.2.1.3 <i>Rôles physiologiques de la matriptase</i> .....	42
1.2.1.4 <i>Rôles pathologiques de la matriptase</i> .....	43
<b>2. HYPOTHESE ET OBJECTIFS .....</b>	<b>44</b>

<b>3. ARTICLE 1</b> .....	45
<b>4. ARTICLE 2</b> .....	89
<b>5. DISCUSSION</b> .....	122
<b>6. CONCLUSION</b> .....	132
<b>7. REMERCIEMENTS</b> .....	135
<b>8. LISTE DES RÉFÉRENCES</b> .....	136

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 Représentation schématique des défauts histologiques dans la MA	8
Figure 2 Représentation schématique des différentes étapes de la progression de la MA	11
Figure 3 Représentation schématique des principales isoformes d'APP	15
Figure 4 Représentation schématique des protéines APLP1 et APLP2	16
Figure 5 Représentation schématique des interactions de la famille d'APP	18
Figure 6 Représentation schématique du métabolisme d'APP par l' $\alpha$ $\beta$ $\gamma$ -sécrétases	21
Figure 7 Représentation schématique des clivages d'APP par l' $\alpha$ $\beta$ $\gamma$ -sécrétases	21
Figure 8 Représentation schématique des différents sites de clivage de la protéine APP	28
Figure 9 Représentation schématique de l'hypothèse de la cascade amyloïde	36
Figure 10 Représentation schématique des TTSP	38
Figure 11 Représentation schématique de la matriptase	40
Figure 12 Représentation schématique de la maturation de la matriptase et de HAI-1	41
Figure 13 Alignement de la séquence P4 à P4' du site de clivage dans le domaine E1 d'APP, APLP1 et APLP2	125
Figure 14 Structure cristal du domaine N-terminal GFLD du domaine extracellulaire E1 de la protéine APP	126
Figure 15 Expression relative des ARNm de plusieurs TTSP dans le cerveau humain	128
Figure 16 Niveau relatif de sAPP alpha	130
Figure 17 Représentation schématique du métabolisme de la famille d'APP par la matriptase	132

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADAM	: <i>a disintegrin and metalloprotease</i>
AICD	: <i>APP intracellular domain</i>
ALID	: <i>APLP intracellular domain</i>
APH-1	: <i>anterior pharynx-defective 1</i>
APLP1	: <i>amyloid beta precursor like protein 1</i>
APLP2	: <i>amyloid beta precursor like protein 2</i>
APP	: <i>amyloid-beta precursor protein</i>
ARIA	: <i>amyloid-related imaging abnormalities</i>
A $\beta$	: <i>peptide amyloïde <math>\beta</math></i>
BACE1	: <i>beta-site APP cleaving enzyme 1</i>
BACE2	: <i>beta-site APP cleaving enzyme 2</i>
BRET	: <i>bioluminescence resonance energy transfer</i>
CDK5	: <i>cyclin-dependent kinase</i>
CUB	: <i>Clr/s, Uegf, bone morphogenic protein 1</i>
CuBD	: <i>copper-binding domain</i>
DAM	: <i>disease associated microglia</i>
DNF	: <i>dégénérescences neurofibrillaires</i>
DR6	: <i>death receptor 6</i>
FAD	: <i>familial Alzheimer's Disease</i>
FINGER	: <i>finnish geriatric intervention study to prevent cognitive impairment and disability</i>
FTDP-17	: <i>frontotemporal dementia with Parkinsonism linked to chromosome 17</i>
GFLD	: <i>growth factor like domain</i>
GSK3	: <i>glycogen synthase kinase 3</i>
HAI-1	: <i>hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1</i>
htrA	: <i>high-temperature requirement A serine peptidase</i>
KO	: <i>knock out</i>
KPI	: <i>kunitz protease inhibitor</i>
LCR	: <i>liquide céphalo-rachidien</i>
LDLR	: <i>low-Density Lipoprotein Receptor</i>
LDLRA	: <i>low density lipoprotein receptor class A domains</i>
LRP	: <i>lipoprotein receptor-related protein</i>
LTP	: <i>long term potentiation</i>
MA	: <i>maladie d'Alzheimer</i>
MAPT	: <i>microtubule-associated protein tau</i>
MVB	: <i>multivesicular body</i>
NICD	: <i>notch intracellular domain</i>
NMDA	: <i>N-méthyl-D-aspartate</i>
PEN-2	: <i>presenilin enhancer 2</i>
PFH	: <i>paire de filaments hélicoïdaux</i>
PrPc	: <i>protéine du prion cellulaire</i>
PS1	: <i>presenilin-1</i>
RE	: <i>réticulum endoplasmique</i>
SEA	: <i>sea urchin sperm protein, enteropeptidase, agrin</i>
TAU	: <i>tubulin-associated unit</i>
TREM2	: <i>triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i>
TTSP	: <i>type II transmembrane serine protease</i>



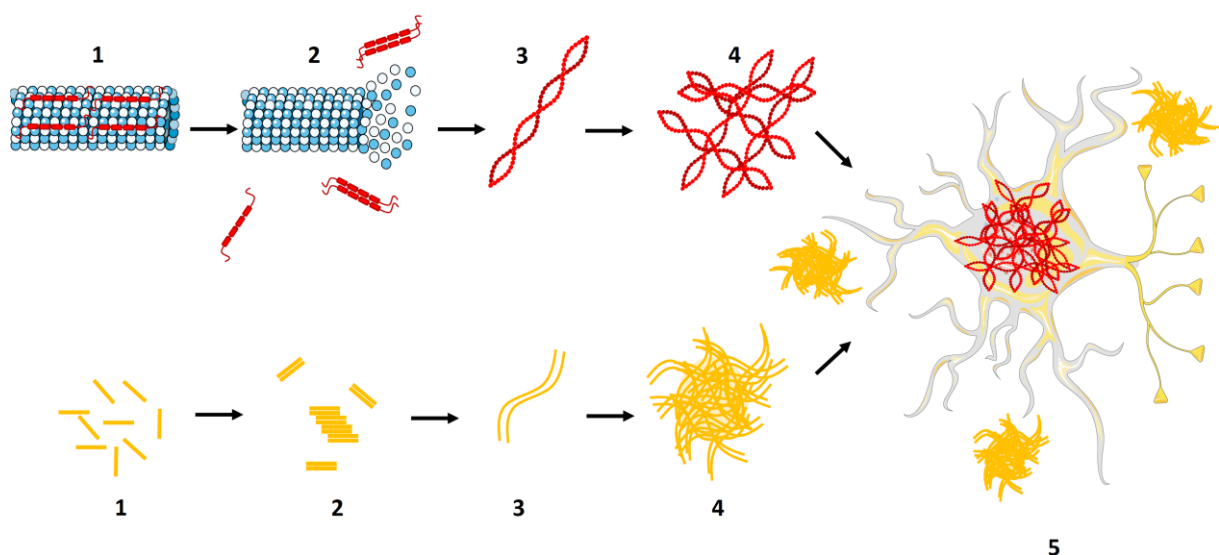
UPR : *unfolded protein response*  
VLDLR : *very-low-density-lipoprotein receptor*

# 1.INTRODUCTION

## 1.1 La Maladie d'Alzheimer

### 1.1.1 Caractéristiques de la MA

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative progressive, irréversible, pour le moment incurable. Elle est caractérisée par une atrophie cérébrale accélérée en comparaison au vieillissement normal, conduisant à des pertes cognitives, à la démence, et à la mort des patients (1). C'est la plus fréquente des démences chez l'être humain (de 60 à 70% des cas de démence) (2), les démences touchent environ 564 000 personnes au Canada. La prise en charge coûte environ 10.4 milliards de dollars en frais médicaux par année (3). On estime que le nombre de personnes atteintes de démence double presque tous les 20 ans (4). La MA fut initialement décrite par le médecin allemand Alois Alzheimer en 1906 qui rapporta les résultats d'une autopsie sur une femme de 55 ans, Auguste Deter, décédée après avoir montré des troubles cognitifs et comportementaux. Alzheimer nota la présence de deux caractéristiques histologiques distinctes dans le cerveau de cette patiente : des enchevêtrements neurofibrillaires et des plaques neuritiques (5). Ce n'est qu'en 1968 qu'une relation entre la quantité de plaques neuritiques dans le cerveau de sujets âgés et le risque de démence a été évoqué (6) (voir figure 1).



**Figure 1. Représentation schématique des défauts histologiques dans la MA.**

(1) La protéine tau stabilise les microtubules ; les peptides monomériques  $A\beta$  sont produits (2) Les protéines tau hyperphosphorylées forment des oligomères ainsi que le peptide  $A\beta$  ; les microtubules sont déstabilisés (3) Les protéines tau forment des paires de filaments hélicoïdaux (PFH) et les peptides  $A\beta$  des protofilaments (4) Les PFH et les protofilaments de peptide  $A\beta$

formes des agrégats (5) On retrouve les enchevêtrements neurofibrillaires composé de paires de filaments hélicoïdaux à l'intérieur des neurones rendus dystrophiques par la déstabilisation des microtubules. On retrouve les plaques amyloïdes à l'extérieur des neurones. (Adapté de *Servier Medical Art, Creative Commons Attribution 3.0.*)

Les enchevêtrements neurofibrillaires décrits par Alzheimer se sont révélés être des agrégats de la protéine tubule-associated unit (TAU) qui forme des inclusions intracellulaires ou des enchevêtrements neurofibrillaires composés de paires de filaments hélicoïdaux (PFH) lorsque la protéine TAU est hyperphosphorylée (7). Les enchevêtrements neurofibrillaires ainsi que les microtubules déstabilisés causent ainsi des dégénérescences neurofibrillaires (DNF) (voir figure 1).

D'autre part, les plaques neuritiques se sont révélées être les plaques amyloïdes extracellulaires principalement composées du peptide amyloïde  $\beta$  (majoritairement  $A\beta$  1-40 et  $A\beta$  1-42) provenant du clivage protéolytique de la protéine précurseur de l'amyloïde (*amyloid precursor protein*, APP) par les  $\beta$  et  $\gamma$ -sécrétases (8). Dix à trente pourcents des patients âgés, au statut cognitif normal, présentent des scanners positifs à l'amyloïde (9) et à la protéine tau. Plusieurs tauopathies présentent les mêmes caractéristiques que dans la MA, cependant sans les dépôts amyloïdes (10). La présence de ces deux marqueurs histologiques ainsi que les troubles cognitifs associés est la caractéristique de la MA (voir figure 1).

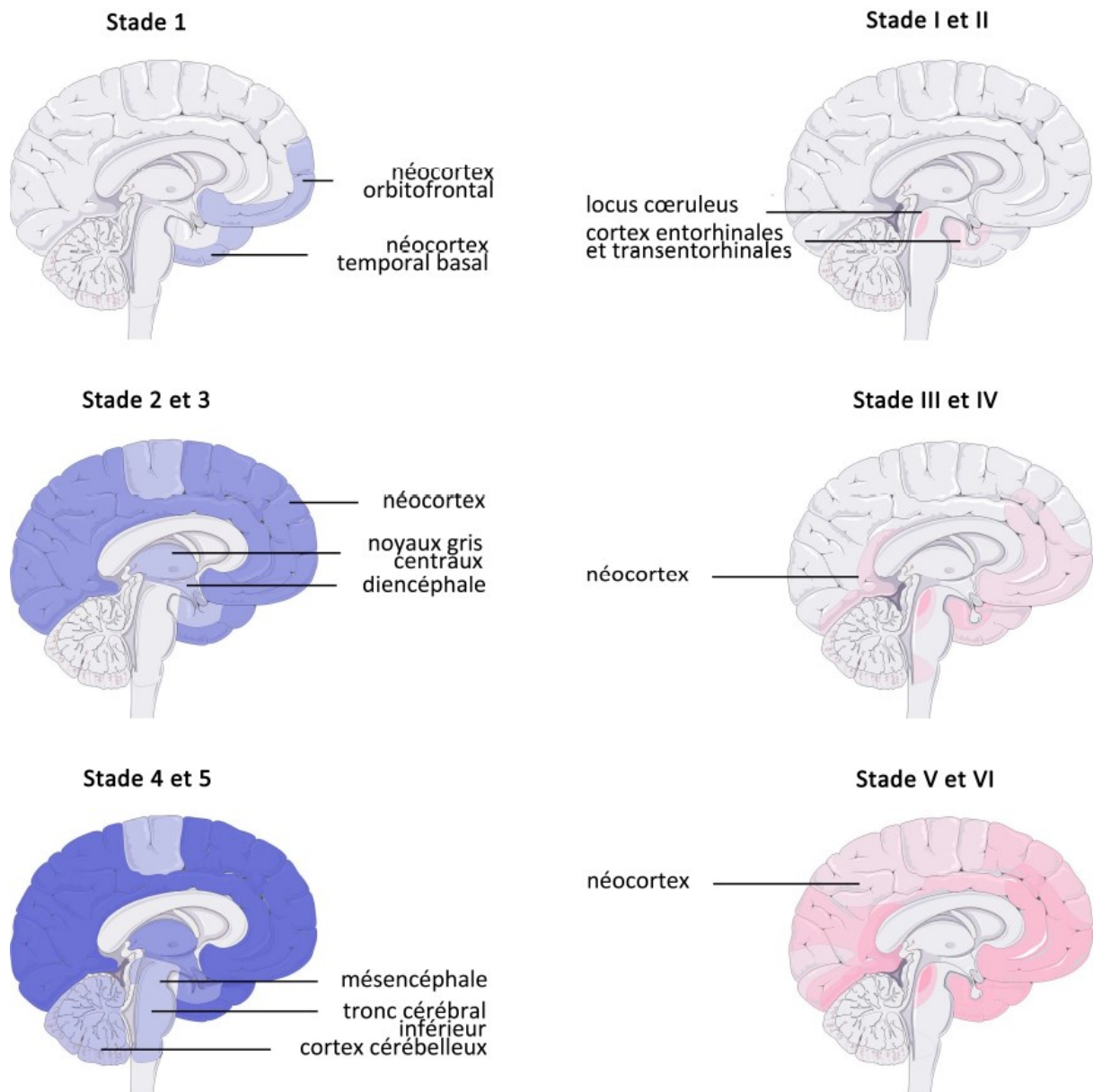
### 1.1.2 Zones atteintes et conséquences physiologiques.

Les DNF et les plaques amyloïdes sont considérées traditionnellement comme jouant un rôle majeur dans la perte de neurones et étant des événements précoces dans la maladie d'Alzheimer. Cependant, il a été démontré qu'il y avait une perte de neurones avant la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires et de plaques amyloïdes (11, 12). Il est donc probable que d'autres facteurs soient aussi responsables de la perte de neurones dans cette maladie. En effet, une partie importante des effets indésirables (Stress oxydatif, perte d'intégrité membranaire *etc...*) constatés dans la maladie d'Alzheimer serait due aux peptides  $A\beta$  solubles sous forme d'oligomères ou de monomères (13, 14).

Néanmoins, l'apparition de ces caractéristiques histologiques permet de suivre la progression de la maladie et explique aussi les déficiences cognitives et fonctionnelles comme la perte progressive de mémoire, ainsi que des changements de comportement, de pensée et de compétences linguistiques (15–17). Il existe différentes classifications utilisées pour décrire la

progression de la MA notamment celle décrite par Braak en 1991 qui décrit l'accumulation de tau dans le cerveau (18) puis par la suite en 2002 par Thal et Braak qui décrit l'accumulation de peptide A $\beta$  dans le cerveau (19). Ces classifications sont divisées en différentes étapes au cours desquelles de plus en plus de régions du cerveau des patients sont touchées et où l'atteinte de ces régions est de plus en plus sévère (voir figure 2).

Les plaques d'A $\beta$  se développent d'abord dans un ou plusieurs sites du néocortex temporal basal et orbitofrontal (phase 1). Elles sont observées plus tard dans tout le néocortex, dans l'hippocampe, l'amygdale, le diencephale et les noyaux gris centraux (phases 2 et 3). Dans les cas graves de MA, on trouve également des plaques d'A $\beta$  dans le mésencéphale, le tronc cérébral inférieur et le cortex cérébelleux (phases 4 et 5). Des inclusions de tau se développent dans le *locus caeruleus*, ainsi que dans les régions transentorhinales et entorhinales (stades I et II). Vient ensuite la présence d'inclusions de tau dans la formation de l'hippocampe et dans certaines parties du néocortex (stades III et IV), suivies par de grandes parties du néocortex (stades V et VI) (18, 19).



**Figure 2 : Représentation schématique des différentes étapes de la progression de la MA.** Les principales étapes de la MA sont représentées. L'atteinte et les zones touchées par, soit les plaques amyloïdes  $\beta$  (Gauche (1 à 5), en dégradé de bleu) soit les DNF (Droite (I à VI), dégradé de rose) sont schématisées selon les étapes (18, 19). (Adapté de *Servier Medical Art, Creative Commons Attribution 3.0.*)

### 1.1.3 Étiologie de la MA

#### 1.1.3.1 Forme sporadique

On estime qu'entre quatre-vingt-quinze et quatre-vingt-dix-neuf pourcents des cas de la MA correspondent à la MA sporadique (20, 21). À partir de 65 ans, la probabilité de développer la MA double environ tous les 5 ans et atteint presque cinquante pourcents de

probabilité à 85 ans (2). Plus de soixante pourcents des cas sporadiques ne sont pas associés à des facteurs de risque connu, suggérant que des facteurs génétiques et environnementaux peuvent contribuer au développement de la maladie (22).

### 1.1.3.2 *Forme familiale*

Entre un à cinq pourcents de tous les cas de la MA correspondent à la forme héréditaire de la MA, se manifestant généralement avant 65 ans (23). Ces formes familiales, héréditaires, possèdent des mutations dominantes dans APP, PSEN1 et PSEN2. Les gènes *PSEN1* et *PSEN2* correspondent aux gènes de deux enzymes (Presenilin-1 et 2, respectivement) interagissant et clivant la protéine APP.

Il existe à ce jour 51 mutations pour APP, 219 pour PSEN1 et 16 pour PSEN2 identifiées dans les formes familiales de la MA (pour un total de 60, 309 et 53 polymorphismes/mutations recensés actuellement, respectivement) (24). Ces mutations semblent avoir toutes pour conséquences une augmentation du ratio peptide A $\beta$  1-42/A $\beta$  1-40 ou de la sécrétion de peptide A $\beta$  1-40 et A $\beta$  1-42. Le peptide A $\beta$  1-42 est un produit de clivage de la protéine APP. Cette augmentation de la production de ce peptide résulte de mutations de la séquence d'APP, aux sites de clivage d'APP par les sécrétases, ou encore dans le domaine catalytique des sécrétases PSEN1 et PSEN2. Parmi les mutations les plus connues, on retrouve les mutations « Swedish » (K670N, M671L), « Florida » (I716V) et London (V717I) ainsi que le gène *PSEN1* humain portant deux mutations, M146L et L286V. Ces mutations furent découvertes dans des familles dont les membres présentaient les critères de diagnostic de la maladie d'Alzheimer. La numérotation des mutations prend comme référence l'isoforme la plus longue d'APP, l'isoforme APP770.

— Les mutations APP K670N, M671L sont dites « Swedish », car découverte dans deux familles suédoises. Ces doubles mutations sont proches du site de clivage d'APP par la  $\gamma$ -sécrétase. Il a été montré *in vitro* que ces mutations augmentent la production et la sécrétion de peptide A $\beta$  1-40 et A $\beta$  1-42 sans que le rapport A $\beta$  1-40/A $\beta$  1-42 ne semble affecté (25).

— La mutation APP I716V est dite « Florida », car découverte chez une patiente Américaine. Cette mutation entraîne une augmentation d'environ deux fois de la quantité de peptide A $\beta$  1-42 et une augmentation significative du rapport A $\beta$  1-42/A $\beta$  1-40 (26).

— La mutation APP V717I (London), cette mutation identifiée en 1991 en Angleterre est l'une des premières décrites et semble être l'une des mutations d'APP les plus courantes dans le monde avec environ 30 familles identifiées provenant de plusieurs pays (États-Unis, Angleterre, Japon, Thaïlande, Allemagne, France, Italie, Australie, Belgique, Iran, Chine). Cette mutation augmente le rapport A $\beta$  1-42/A $\beta$  1-40 en augmentant les niveaux d'A $\beta$  1-42 avec peu d'effet sur les niveaux d'A $\beta$  1-40 (27).

— La mutation PSEN1 M146L avait été détectée dans au moins 15 familles dans le monde. Cependant, il a récemment été démontré qu'en fait toutes ces familles étaient connectées par un ancêtre commun expliquant la présence de cette mutation chez plus de 148 individus dispersés sur plusieurs siècles et continents. L'origine de la mutation a été attribuée à une seule famille originaire du sud de l'Italie avant le 17<sup>e</sup> siècle (28). Il a été constaté *in vitro* que cette mutation augmentait les niveaux d'A $\beta$  42 et les rapports totaux A $\beta$  42/A $\beta$  40 (29).

— La mutation PSEN1 L286V a été identifiée en 1995 lors du clonage du gène PSEN1 en Allemagne. La mutation a pu être retracée à travers sept générations de cette famille. Il a été démontré que la mutation L286V augmente le rapport total A $\beta$  42/A $\beta$  *in vitro* (30).

Encore une fois, ces nombreuses mutations sont en faveur de l'importance de la protéine APP, du peptide A $\beta$  et des enzymes interagissant avec eux dans la pathogenèse de la MA.

#### 1.1.4 La famille APP

La protéine APP avait historiquement été identifiée comme étant la protéase nexine II, synthétisés et sécrétés par diverses cellules, capable de se lier à des protéases et les inhiber ainsi que de stimuler la croissance des neurites des cellules de neuroblastome en culture et les neurones (31–33). Par la suite, la séquence en acide aminé du peptide A $\beta$  a été identifiée dans la séquence de la protéase nexine II et la protéine a été associée à la production de peptide A $\beta$  (34) et renommé APP. APP est une protéine transmembranaire de type I appartenant chez l'être humain à une famille de protéine homologue composée d'APP, d'APLP1 et d'APLP2 (35) situés respectivement sur les chromosomes 21, 19 et 11. Cette famille est conservée au cours de l'évolution, et on retrouve ces trois protéines chez tous les mammifères dont le génome a été analysé, mais aussi des homologues chez la drosophile, le nématode et le poisson zébra.

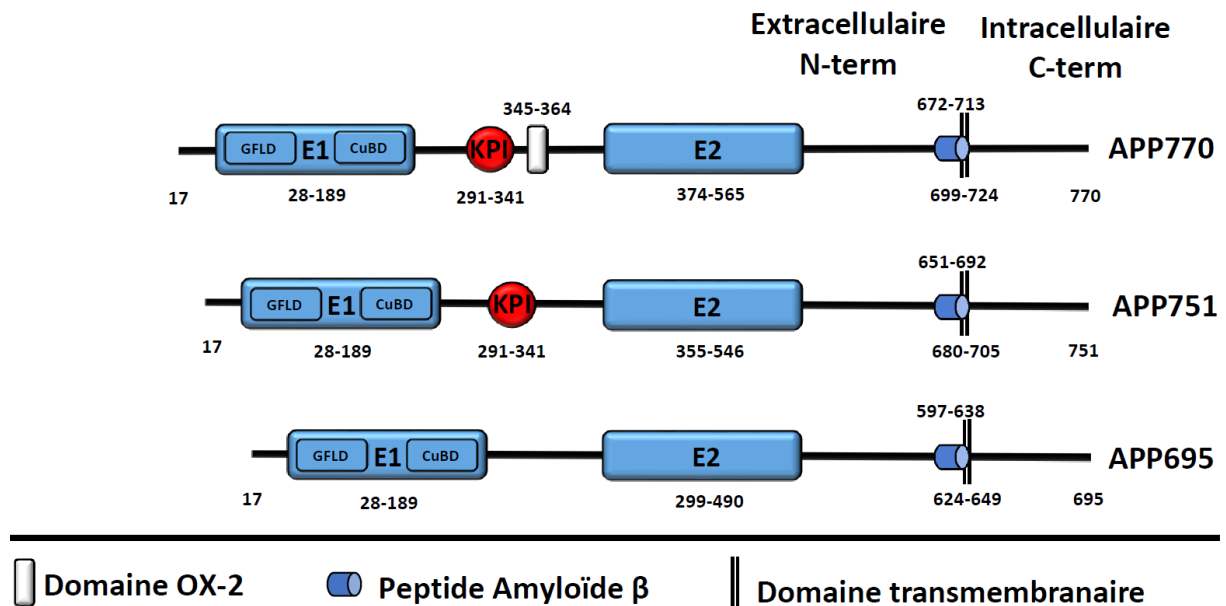
Cependant, elle n'a pas été identifiée chez les procaryotes, les levures et les plantes (36). Étant donné que la protéine APP est un acteur important de la formation de synapse (37), cela suggère que la protéine APP ancestrale au début de son évolution pourrait être une protéine transmembranaire responsable des interactions à la jonction synaptique et nécessaire à leur formation (36).

#### 1.1.4.1 Structure, isoformes et maturation

Les protéines APP, APLP1 et APLP2 partageant des ectodomaines conservés E1 et E2 (35) (voir figure 2). Le domaine E1, riche en résidus cystéine, comprend deux sous-domaines, un sous-domaine semblable à un facteur de croissance (*growth factor like domain*, GFLD) capable de se lier à l'héparine et de stimuler la croissance des neurites, ainsi qu'un sous-domaine capable de lier des ions  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  (*copper-binding domain*, CuBD) (38). La chaîne polypeptidique se plie en deux domaines séparés, mais contigus, correspondant aux GFLD et CuBD. Le domaine GFLD consiste en un feuillet  $\beta$  antiparallèle central, une hélice  $\alpha$  et un feuillet  $\beta$ , reliés par trois ponts disulfures. Le CuBD est constitué d'un feuillet  $\beta$  antiparallèle central à trois brins et d'une longue hélice  $\alpha$ . Les deux domaines sont interconnectés par une séquence d'acide aminé bien défini (39). Le domaine E2 peut former un dimère antiparallèle ayant la capacité de se lier lui aussi à l'héparine sous sa forme dimérique (40). Le domaine E2 contient deux sous-structures distinctes de superhélices enroulées. La sous-structure N-terminale contient une superhélice enroulée à deux brins. La sous-structure C-terminale consiste principalement en une superhélice triple brins et antiparallèle avec une rotation à gauche. Les deux sous-structures sont reliées par l'hélice centrale de 56 acides aminés. L'hélice centrale est légèrement incurvée au centre, de sorte que la super hélice C-terminale s'incline de quelques degrés (41). De plus, les domaines C-terminaux intracellulaires de ces protéines présentent un motif YENPTY pouvant servir de signal d'endocytose (42) ainsi qu'un domaine conservé de liaison aux protéines G (43). Bien que les trois protéines puissent être clivées par les sécrétases, seul APP comprend la séquence  $\text{A}\beta$  et contribue donc à la production de peptide  $\text{A}\beta$  dans la MA, bien que les autres membres peuvent aussi conduire à un produit de clivage de taille similaire, ceux-ci sont non pathologiques (44, 45). Enfin, la structure des domaines E1 et E2 est maintenue par plusieurs ponts disulfures. Après son expression, APP peut subir un certain nombre de modifications post-traditionnelles pouvant influencer la production de peptide  $\text{A}\beta$  comme la glycosylation (46, 47), la phosphorylation (48, 49), sulfatation (50), palmitoylation (51), l'ubiquitination (52, 53) et la sumoylation (54). Les modifications qu'APLP1 et APLP2 ont moins été étudiées en comparaison, cependant plusieurs sites de glycosylation et de



phosphorylation ont aussi été prédits (55). Physiologiquement APP, APLP1 et APLP2 se retrouvent en partie à la membrane plasmique, mais aussi au niveau de l'appareil de Golgi, du réticulum endoplasmique et des endosomes (56–58).

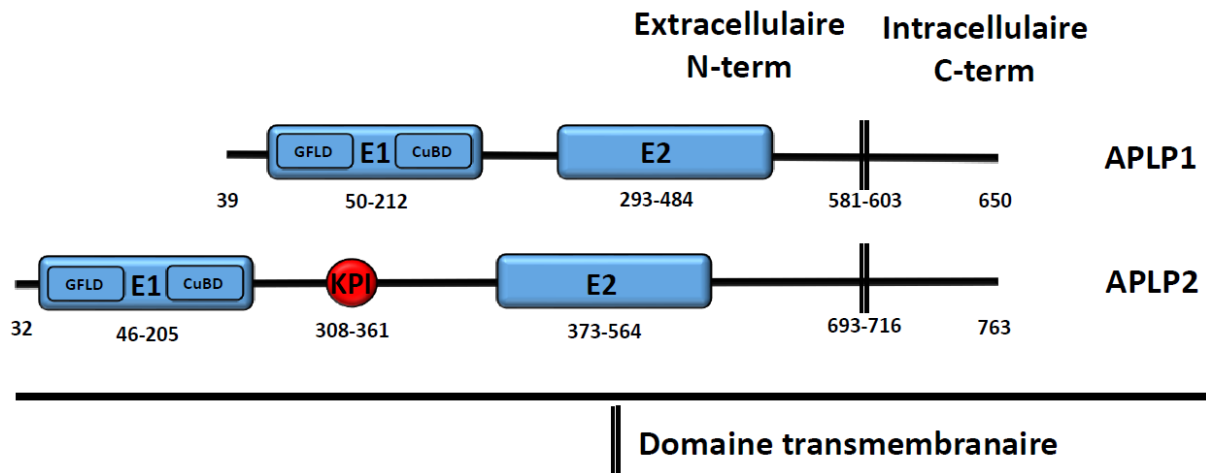


**Figure 3 : Représentation schématique des isoformes d'APP**

Les éléments structuraux des isoformes matures (sans peptide signal) sont décrits, notamment les domaines extracellulaires E1 et E2, le domaine Kunitz inhibiteur de protéase (KPI), le domaine OX-2, et enfin la région du peptide amyloïde. Le domaine E1 comprend les domaines GFLD (*Growth factor like domain*) et CuBD (*Copper-binding domain*). Les positions des acides aminés sont indiquées pour chaque région.

Il existe différentes isoformes de la protéine APP dans le cerveau : APP770, APP751 et APP695 (59) (voir figure 3). Ces isoformes diffèrent par la présence d'un domaine OX-2 de 19 acides aminés, qui présente des similitudes avec l'antigène OX-2 des cellules lymphoïdes, et d'un domaine d'inhibition de la protéase de type Kunitz (KPI) de 56 acides aminés, connu pour son aptitude à inhiber les protéases à sérine (59–61). L'isoforme la plus longue, APP770, contient les domaines KPI et OX-2, tandis que APP751 ne contient que le domaine KPI. En revanche, l'isoforme la plus courte, APP695, ne contient ni le domaine KPI ni le domaine OX-2. Il existe qu'une seule isoforme de la protéine APLP1, APLP1-650 qui ne comporte que les deux domaines E1 et E2 et aucun des autres domaines des autres membres de la famille APP (voir figure 4). Pour APLP2, il existe deux isoformes majoritaires, la forme la plus longue APLP2-763 comporte elle aussi un domaine KPI, en revanche la forme APLP2-707 ne possède pas le domaine KPI. APP695 et APLP1 sont majoritairement exprimés au niveau des neurones et du tissu cérébral respectivement alors que les autres isoformes, APP751 APP770 ainsi

qu'APLP2 sont majoritairement exprimés dans les autres cellules du tissu cérébral (comme la microglie ou les astrocytes) ainsi que dans le reste du corps de façon ubiquitaire (62, 63).



**Figure 4 : Représentation schématique des protéines APLP1 et APLP2**

Les éléments structuraux des isoformes matures (sans peptide signal) sont décrits, notamment les domaines extracellulaires E1 et E2 et le domaine Kunitz inhibiteur de protéase (KPI). Le domaine E1 comprend les domaines GFLD (*Growth factor like domain*) et CuBD (*Copper-binding domain*). Les positions des acides aminés sont indiquées pour chaque région.

#### 1.1.4.2 Rôle physiologique et cellulaire

##### Fonctions physiologiques

Les souris *APP* KO mutées pour APP présentent un poids cérébral et corporel réduit, une croissance des neurites altérés, une gliose réactive, une diminution de l'activité locomotrice de la force de préhension ainsi que de l'activité exploratrice, une hypersensibilité aux crises, un développement neurocomportemental altéré, une altération de l'apprentissage et présentent des défauts des commissures du cerveau antérieur ainsi qu'une susceptibilité aux agents toxiques. (61–67). Les souris *APP* KO âgées de 12 mois présentent aussi une densité réduite des épines dendritiques, une altération de la LTP au niveau de l'hippocampe et une altération de l'apprentissage spatial (71–73). Les souris *APLP1*-KO ont été moins étudiées par rapport au souris *APP* et *APLP2*-KO. Comme les souris *APP*-KO, les souris *APLP1*-KO présentent un poids réduit, mais une activité locomotrice et une force de préhension normales (74). En revanche, les souris *APLP2* ne présentent pas de symptôme clairement observable et ont un phénotype similaire au type sauvage.

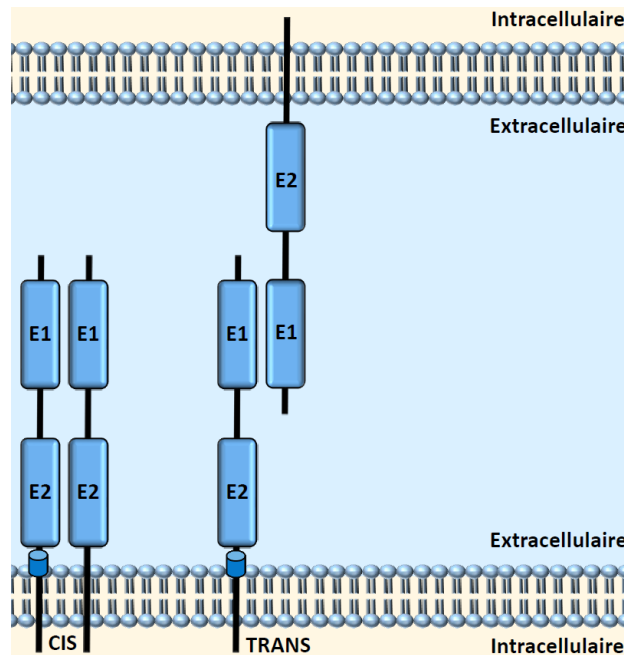
Les études sur les modèles de souris double KO suggèrent une certaine redondance dans les fonctions des protéines APP, APLP1 et APLP2 (75). En effet, bien que les souris KO *APLP2*

<sup>-/-</sup> n'aient pas de phénotype visible, les doubles KO *APLP2*<sup>-/-</sup>/*APP*<sup>-/-</sup> ou *APLP2*<sup>-/-</sup>/*APLP1*<sup>-/-</sup> sont non viables et meurent une journée après la naissance (74) contrairement au souris *APP*<sup>-/-</sup>/*APLP1*<sup>-/-</sup> KO. Les jonctions neuromusculaires des souris présentent des altérations graves des jonctions neuromusculaires sur les éléments pré et post-synaptiques ainsi qu'une neurotransmission gravement altérée (76). Elles présentaient aussi une réduction de la densité des vésicules synaptiques et du nombre de vésicules attachées à la membrane (77). Les souris dépourvues des trois membres de la famille *APP*<sup>-/-</sup>/*APLP1*<sup>-/-</sup>/*APLP2*<sup>-/-</sup> survivent au développement embryonnaire et meurent peu de temps après la naissance (78). Les triples mutants présentent des anomalies crâniennes comme des dysplasies corticales ressemblant à la lissencéphalie humaine de type II. Certains des mutants montrent aussi une perte partielle de cellules corticales. Il semble qu'une partie des fonctions de la protéine APP réside dans l'ectodomaine et le domaine intracellulaire. En effet les souris KO pour APP mais exprimant la forme sAPP $\alpha$  ou seulement le domaine C-terminal semblent en grande partie voir leurs phénotypes rétablis comparativement au souris KO (73). Le phénotype de perte de poids corporel et cérébral des animaux APP KO à différents âges est en grande partie restauré, ces souris ne présentent non plus aucun défaut de test de force de préhension et de test de labyrinthe aquatique ainsi que de déficits en LTP. Des expériences similaires ont été réalisées avec cette fois sAPP $\beta$  et les souris ne présentaient elles n'ont plus pas de défaut de poids ni de déformation du cerveau (79). Ces expériences de KI ont par la suite été réalisées sur les doubles mutants *APP*<sup>-/-</sup>/*APLP*<sup>-/-</sup>. Les souris double KO pour *APLP2*<sup>-/-</sup>/*APP*<sup>-/-</sup> meurent rapidement après la naissance et les mutants KI ne sont pas capables de prévenir cette létalité. En revanche l'expression de certains gènes impliqués dans le développement est restaurée (79).

L'implication des protéines APP et APLP ou leurs formes solubles clivées par les sécrétases a été confirmée dans la différenciation neuronale, la synaptogenèse, la croissance des neurites et la plasticité synaptique (37, 80, 81).

Il y a de plus en plus de preuves qu'APP ainsi qu'APLP1 et APLP2, sont capables de former des homos et des hétéro-dimères (82). Ces interactions peuvent se faire au niveau de la membrane plasmique en orientation *cis*, mais semble également se produire entre les protéines transmembranaires des cellules adjacentes (interaction *trans*) (83–85) (voir figure 5). L'interaction des protéines en *cis* semble avoir un impact sur le métabolisme d'APP et la génération de peptide A $\beta$ . En effet, lorsque la capacité d'APP à former des dimères est altérée, cela influence la capacité de l'enzyme de clivage d'APP au site bêta (*beta-site APP cleaving enzyme 1*, BACE1) à cliver APP, ce qui entraîne une production altérée du peptide A $\beta$  (56, 86–

88). Il a aussi été démontré que les interactions *trans* favorisent l'adhésion cellulaire de manière homo et hétéromère, mais aussi la synaptogenèse (37, 82).



**Figure 5 : Représentation schématique des interactions de la famille d'APP.** Les membres de la famille d'APP à la membrane plasmique peuvent former des dimères ou des hétéromères que ce soit en *cis* avec des protéines de la même membrane plasmique ou en *trans* avec des protéines des cellules adjacentes.

Les deux domaines impliqués majoritairement dans la dimérisation des protéines APP et APLP sont les domaines conservés E1 et E2. Ce processus semble être initié par la liaison de l'héparine au domaine E1 et de l'association du domaine E1 avec un autre domaine E1 suivie de l'induction de la dimérisation du domaine E2. Ce processus semble dépendant de la liaison avec la matrice extracellulaire, mais aussi dépendant des ions  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  (89). Dans le domaine E1, la boucle Cys98 à Cys105 de la protéine APP avait été identifiée comme étant primordiale pour la formation d'homodimère, car cette boucle relie deux sous structures du domaine E1 et est donc nécessaire à la structure globale de ce domaine et à sa dimérisation (86). Le domaine transmembranaire comprend trois motifs consécutifs GxxxG avec le motif central semblant aussi jouer un rôle dans la dimérisation d'APP. En effet les mutations des glycines diminuent progressivement la force de dimérisation du domaine transmembranaire (88) sans, semble-t-il, altérer la dimérisation en tant que tel (90) et altère aussi la formation de peptide  $\text{A}\beta$  42 (88).

D'un point de vue cellulaire, la protéine APP et ses homologues APLP semblent fonctionner comme des récepteurs. En effet, la structure du récepteur Notch dont la signalisation se produit notamment au cours du développement (91, 92) et est impliquée dans la neurogenèse, la croissance des axones et des dendrites, la plasticité des synapses et la mort neuronale (93, 94) et son métabolisme par les sécrétases est très similaire à la protéine APP. Il a été montré par exemple que le peptide A $\beta$  pouvait agir comme ligand en se liant à l'APP (95). La protéine APP peut également fonctionner en tant que récepteur couplé aux protéines G qui transmet des signaux via la protéine G hétérotrimérique Gao (43, 96). Cette association avec la protéine G via un domaine conservé, a été montrée *in vitro* (43), mais aussi *in vivo*, où elle régule notamment la motilité neuronale (96). La protéine APP peut être aussi phosphorylée sur la partie C-terminale, intracellulaire de la protéine, notamment sur le résidu Thr668. Plusieurs kinases ont été impliquées dans la phosphorylation de ce résidu, comme la kinase dépendante des cyclines 5 (*Cyclin-dependent kinase*, CDK5), la kinase N-terminale C-Jun (JNK3) et GSK3 $\beta$  (97–99). Cette phosphorylation régule la localisation d'APP dans les neurites. D'autre part, le motif YENPTY de la queue cytoplasmique permet aussi d'interagir avec diverses protéines adaptatrices, notamment Mint-1/X11a (et les membres de la famille Mint-2 et Mint-3), Fe65 et la protéine C-Jun-amino-terminal kinase-interacting protein 1 (JIP-1) par le biais de la protéine de liaison à la phosphotyrosine (PTB) (100, 101). Les interactions homo et hétérodimérique des membres de la famille d'APP que ce soit en *cis* ou en *trans* ont été impliquées dans plusieurs de ces fonctions : signalisation cellulaire (102), croissance des neurites (103), l'adhésion des cellules neuronales (85), formation et fonction des synapses (37, 104, 105), ainsi que la production de peptides A $\beta$  (56, 86, 87).

### 1.1.5 Clivage de la famille APP par les sécrétases

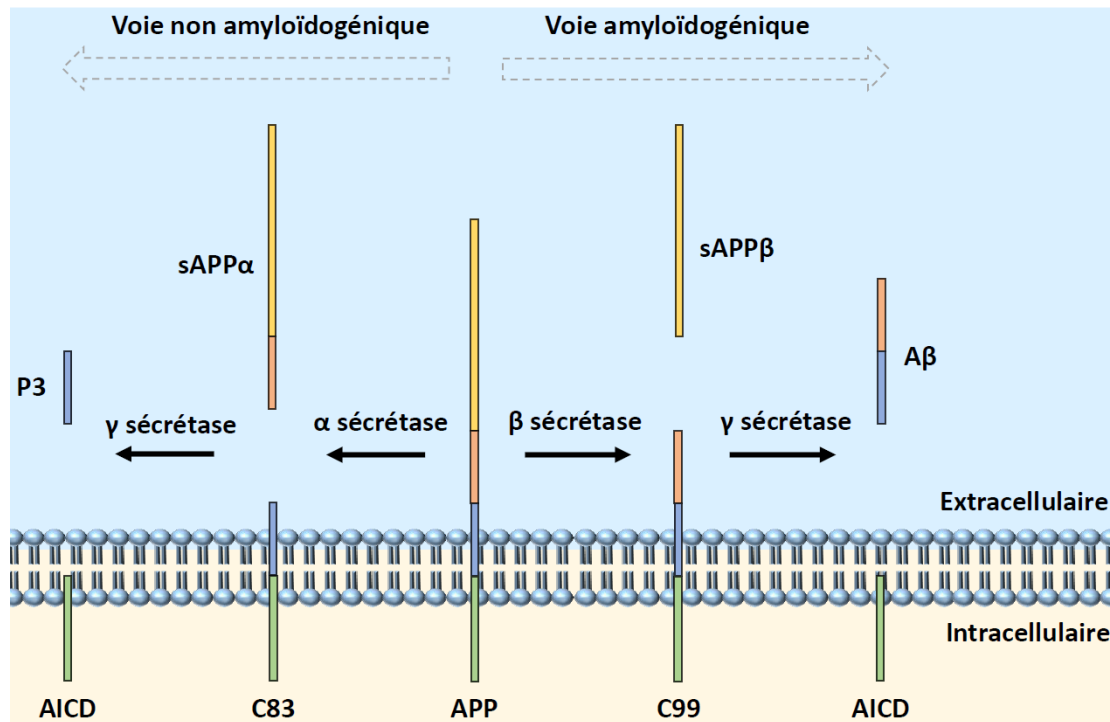
#### 1.1.5.1 Clivage par l' $\alpha$ -sécrétase

Dans la MA une classe d'enzymes qui a été très étudiés est les sécrétases. Les enzymes capables de cliver l'APP entre Lys687 et Leu688 (relatif à APP770) sont appelés  $\alpha$ -sécrétase (voir figure 6 et 7). Plusieurs enzymes ont été identifiés comme  $\alpha$ -sécrétase et sont des métalloprotéases sécrétées ou liées à la membrane plasmique appartenant à la famille des désintégrines et métalloprotéases (*A disintegrin and Metalloprotease*, ADAM) (106, 107). Plusieurs membres de la famille ont été impliqués dans cette activité comme ADAM9, 10, 17 et 19 dans diverses lignées cellulaires (106, 107). Cependant, les souris KO *ADAM9* n'ont pas de phénotype important (108) et dans des cultures primaires de ces souris, on n'observe pas de

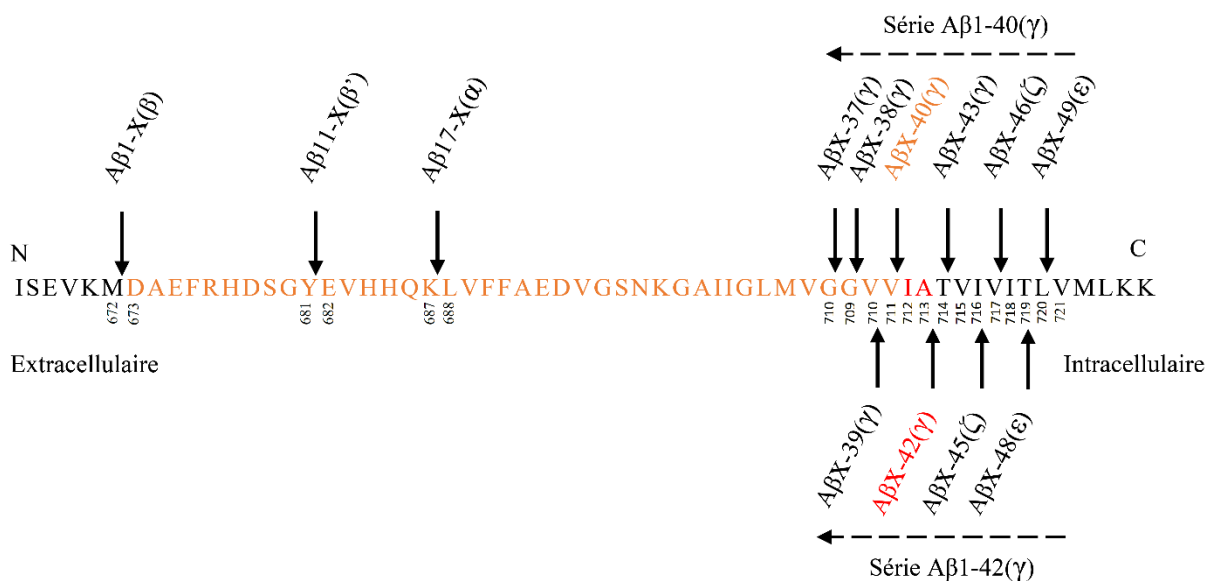
réduction du clivage de l'APP par l' $\alpha$ -sécrétase, suggérant que d'autres ADAM peuvent compenser la perte d'ADAM9 dans le cerveau en ce qui concerne l'activité  $\alpha$ -sécrétase (108). L'absence d'ADAM17 entraîne une létalité périnatale et les souris présentent des défauts dans plusieurs tissus épithéliaux, notamment la peau, les intestins et les poumons (109). Cependant, là aussi, dans les fibroblastes dérivés des souris KO *ADAM17*, l'activité sécrétase est maintenue suggérant que les autres ADAM peuvent compenser l'activité  $\alpha$ -sécrétase pour la perte d'ADAM17. La surexpression d'ADAM19 dans les cellules HEK293 entraîne une augmentation de sAPP $\alpha$ . Suggérant une activité constitutive  $\alpha$ -sécrétase pour ADAM19. Cependant, sur des modèles de cellules dérivées de glioblastome, seulement 21% de la quantité de sAPP $\alpha$  est diminué suite à la transfection des cellules avec des RNAi, suggérant là aussi que d'autres enzymes sont capables d'exercer cette activité. En revanche, la surexpression d'ADAM10, dans un modèle de souris de la MA, diminue le nombre de plaques amyloïdes et améliore les performances cognitives (110). Des inhibiteurs sélectifs d'ADAM10 bloquent également le clivage d'APP par la sécrétase (111, 112). Les souris KO meurent au cours de la vie embryonnaire, probablement due au rôle prédominant de Notch dans le développement, limitant ainsi les expériences réalisées (113). Les recherches actuelles indiquent qu'ADAM10 est une  $\alpha$ -sécrétase majeure dans de nombreux types de cellules. La fonction d'  $\alpha$ -sécrétase est donc très probablement exercée en majorité par l'enzyme constitutivement active ADAM10 (114).

Le clivage d'APP par l' $\alpha$ -sécrétase va ainsi produire les fragments sAPP $\alpha$  sécrété et soluble, ainsi que le  $\alpha$ CTF (C83) ancré à la membrane (voir figure 6 et 7). Ce clivage ayant lieu dans la séquence du peptide A $\beta$ , il est considéré comme non amyloïdogénique, et non pathologique. Globalement, le fragment produit suite au clivage par l' $\alpha$ -sécrétase, sAPP $\alpha$  est reconnu pour ses propriétés neurotrophiques et neuroprotectrices, pour sa capacité à renforcer la LTP, le peptide sAPP $\alpha$  est donc largement considéré comme ayant des effets bénéfiques (115–117). Il a récemment été montré que le fragment sAPP $\alpha$  était capable de lier le récepteur gabaergique, GABA<sub>B</sub>R1a, inhibant la libération des vésicules synaptiques et modulant ainsi la plasticité synaptique (118). Les récepteurs gabaergiques sont des acteurs clés de la plasticité synaptique, notamment au niveau de l'hippocampe (119). Le rôle du fragment  $\alpha$ CTF est moins

bien connu, néanmoins il semble qu'il soit capable d'inhiber partiellement l'activité de la  $\gamma$ -sécrétase (120).



**Figure 6 : Représentation schématique du métabolisme d'APP par l' $\alpha$   $\beta$  et  $\gamma$ -sécrétases.** Dans la voie non amyloïdogénique (à gauche), APP est clivé successivement par l' $\alpha$ -sécrétase et la  $\gamma$ -sécrétase pour donner les fragments sAPP $\alpha$  (*soluble APP $\alpha$* ), C83 (*C-terminal fragment 83*), P3 (*3 kDa peptide*) et AICD (domaine intracellulaire de la protéine précurseur amyloïde, *amyloid precursor protein intracellular domain*). Dans la voie amyloïdogénique (à droite), APP est clivé successivement par la  $\beta$ -sécrétase et la  $\gamma$ -sécrétase pour donner les fragments sAPP $\beta$  (*soluble APP $\beta$* ), C99 (*C-terminal fragment 99*), A $\beta$  et AICD (domaine intracellulaire de la protéine précurseur amyloïde, *amyloid precursor protein intracellular domain*).



**Figure 7 : Représentation schématique des clivages d'APP par l' $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  sécrétases.**

Les positions des différents clivages des sécrétases sont indiquées ainsi que les fragments produits (position relative à APP770). Les séquences des peptides A $\beta$  1-40 et ainsi qu'1-42 sont représentées.

*1.1.5.2 Clivage par la  $\beta$ -sécrétase*

L'enzyme capable de cliver APP entre les positions Met672 et Asp673 (relatif à APP770) est appelé  $\beta$ -sécrétase (voir figure 6 et 7). BACE1 est considérée comme la seule  $\beta$ -sécrétase. BACE1 appartient à la famille des protéases aspartiques analogues à la pepsine et une fraction de BACE1 est sécrétée à la surface des cellules après clivage, probablement par ADAM10 (121), mais BACE1 est aussi présente au niveau du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi et des endosomes (122). Les souris KO pour *BACE1* meurent pour certaines dans les premières semaines après la naissance et les souris survivantes sont plus petites, hyperactives, présentent une altération de l'inactivation des canaux sodiques voltage-dépendants et des défauts de myélinisation (123, 124). Une inactivation de BACE1 entraîne une diminution de la production de peptide A $\beta$  sur différents modèles de souris MA (125). Plusieurs études ont montré une augmentation de la protéine BACE1 et de son activité dans le cerveau de patients atteints de la MA (126, 127). Un inhibiteur de BACE1 a été testé sur le singe, permettant de diminuer les niveaux de peptide A $\beta$  dans le liquide céphalo-rachidien (128). En plus de cliver APP et les APLP, BACE1 est connue pour cliver plusieurs substrats, notamment la sialyltransférase ST6Gal I (129), le P-selectin glycoprotein ligand-1 PSGL-1 (130) la sous-unité  $\beta$  des canaux sodiques voltage-dépendant (131), et la protéine liée aux récepteurs des lipoprotéines de basse densité (*low-density lipoprotein receptor-related protein*) (132). BACE1 est aussi capable de cliver APP770 en position  $\beta'$  entre les résidus Tyr681 et Glu682, ce clivage semble cependant représenter entre 10 et 20% des clivages de la  $\beta$ -sécrétase (133–135).

Le clivage d'APP par la  $\beta$ -sécrétase va produire une forme sécrétée soluble d'APP (sAPP $\beta$ ) et un fragment C-terminal ancré à la membrane, le  $\beta$ CTF (C99) (voir figure 6 et 7). En opposition au fragment sAPP $\alpha$ , le fragment sAPP $\beta$  ne semble pas avoir les mêmes effets constatés pour sAPP $\alpha$  ce qui suggère que les 16 derniers acides aminés C-terminaux sont impliqués dans les effets bénéfiques du fragment sAPP $\alpha$  (136). Cependant, plus récemment, il a été montré que le fragment sAPP $\beta$  est capable de lier le récepteur de la mort 6 (*Death receptor 6*, DR6), l'activant (137). DR6 va alors activer NF-KB et MAPK8/JNK, et induire une dégénérescence des corps cellulaires via la caspase-3 et des axones via la caspase-6, ce mécanisme du développement a été proposé comme étant détourné dans la MA et responsable



en partie de la neurodégénérescence constatée (137). Il a récemment été montré que le fragment sAPP $\beta$ , comme le fragment sAPP $\alpha$  était capable lui aussi de lier le récepteur gabaergique, GABA $_B$ R1a (118).

### 1.1.5.3 Clivage par la $\gamma$ -sécrétase

L'enzyme capable de cliver APP et de libérer les peptides A $\beta$  est appelé  $\gamma$ -sécrétase (voir figure 6 et 7). Les études conduites sur des cellules neuronales dérivées d'embryons de souris KO pour la préséniline 1 (PS1) et/ou la préséniline 2 (PS2) ont montré que la quasi-totalité de l'activité  $\gamma$ -sécrétase dépend de PS1, car la perte de l'activité protéolytique de cette enzyme dans les neurones conduit à une perte presque complète (plus de 90%) de la génération du peptide A $\beta$  (138). Le reste de l'activité  $\gamma$ -sécrétase est médiée par la PS2, un homologue de PS1 (139). La préséniline est une protéase aspartique, mais nécessite l'association de trois protéines supplémentaires, la nicastrine, le pharynx antérieur défectueux (*anterior pharynx-defective 1*, APH-1) et l'activateur de préséniline (*presenilin enhancer 2*, PEN2) pour devenir protéolytiquement active et former le complexe  $\gamma$ -sécrétase (140–142). Il a été proposé que la nicastrine soit un « gardien » bloquant l'accès des substrats au site catalytique, PEN-2, quant à elle, est une petite protéine et son intégration dans le complexe est associée à un changement conformationnel majeur, entraînant le clivage de l'enzyme et la rendant active (143–145). Enfin, APH-1 est le composant le plus stable du complexe et pourrait servir d'échafaudage initial pour l'assemblage (146). Plus de 100 substrats différents ont été identifiés comme substrat de cette sécrétase, comme Notch et CD44 (147, 148). La sécrétase clive les domaines transmembranaires de nombreuses protéines de type I, avec une spécificité de séquence relativement faible (149). Mais surtout, la  $\gamma$ -sécrétase est responsable du clivage de la protéine APP et les mutations pathogènes de l'enzyme augmente le rapport entre le peptide A $\beta$  42/A $\beta$  40 (25, 150).

La  $\gamma$ -sécrétase va donc cliver les fragments  $\alpha$ CTF et  $\beta$ CTF d'APP (voir figure 6 et 7). Pour le fragment  $\alpha$ CTF, cela entraîne la libération du peptide P3 et de l'AICD pour le fragment  $\beta$ CTF le peptide A $\beta$  ainsi qu'AICD. Ces clivages successifs d'APP par les sécrétases pourraient s'effectuer en partie au sein d'un seul et même complexe macromoléculaire associant la  $\beta$  et la  $\gamma$ -sécrétase (151). Le clivage intramembranaire d'APP par la  $\gamma$ -sécrétase ne se limite pas à un seul site. Il semble que le domaine transmembranaire d'APP soit clivé plusieurs fois. Ces clivages successifs d'APP appelé  $\epsilon$  et  $\zeta$  et  $\gamma$  seraient séparés par trois acides aminés (voir figure 7) (152–156). Tout d'abord les clivages  $\epsilon$  prendraient place entre les résidus Thr719 et Leu720 ou Leu720 et Val721 (relatif à APP770) et pourraient donc générer deux AICD, AICD49 et

AICD50. Les clivages  $\zeta$  prendraient place eux entre les résidus Ile716 et Val717 ou Val717 et Ile718 (relatif à APP770). De la même manière, le clivage  $\gamma$  peut lui aussi prendre place entre les acides aminés Gly708 et Val715. Ce modèle séquentiel de clivage d'APP par la  $\gamma$ -sécrétase met en avant deux séries de clivage distinct permettant la production de peptide A $\beta$  (voir figure 7) (153, 154, 157) cependant il semble que certain substrat puisse parfois changé de série de clivage (158). Ces clivages sont donc responsables de la libération des différents peptides A $\beta$  pour le fragment  $\beta$ CTF. Bien que le peptide P3 puisse s'assembler en agrégats fibrillaires, ses propriétés hydrophobes le rendent incapable de rester sous formes oligomériques. Cela pourrait expliquer pourquoi le fragment P3 ne semble pas avoir d'impact sur la fonction synaptique (159). On le retrouve aussi au niveau des plaques amyloïdes chez les patients ; cependant, le rôle du peptide P3 n'est pas encore vraiment connu. Bien qu'en théorie le fragment intracellulaire AICD puisse être produit à la suite des clivages de l' $\alpha$ -sécrétase puis de la  $\gamma$ -sécrétase, il semble qu'une part importante de la production d'AICD dépende du clivage d'APP par la  $\beta$ -sécrétase puis la  $\gamma$ -sécrétase (160, 161). Cette observation est probablement due à la rapide dégradation d' $\alpha$ CTF, empêchant donc la formation d'AICD (162, 163). Bien que la fonction du fragment AICD ai été longtemps controversée, il semble que le fragment AICD puisse jouer un rôle de facteur de transcription comme pour les gènes *APP*, *GSK3 $\beta$*  ou encore *LRP1* (164–167).

#### 1.1.5.4 Clivage des APLP

Les protéines APLP1 et APLP2 sont elles aussi clivées par les  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ -sécrétases (168, 169). APLP1 et APLP2 ont été beaucoup moins étudiés comparés à APP en raison de son implication dans la MA et les produits métaboliques des APLP encore moins. Le clivage des APLP par l' $\alpha$  ou la  $\beta$ -sécrétase entraîne la génération de CTF liés à la membrane et d'ectodomains solubles. Les formes solubles des APLP n'ont que récemment été détectées dans le LCR humain (170). Bien que l'on connaisse l'implication de ces protéines dans plusieurs processus physiologiques, le rôle précis des formes solubles a été peu étudié. Néanmoins, les protéines de la famille d'APP affichent une certaine redondance dans leurs fonctions, par exemple, il avait été montré que les trois membres de la famille d'APP étaient capable de lier les récepteurs NMDA. Il est donc probable que certaines fonctions observées pour les formes solubles d'APP soient identiques pour les APLP. Par exemple, le fragment soluble d'APLP2 est lui aussi capable de lier le récepteur DR6 (137).

APLP1 et APLP2 sont aussi des substrats de la  $\gamma$ -sécrétase. Les CTF des APLP, les domaines intracellulaires d'APLP (*APLP intracellular domain*, ALID) peuvent aussi se lier à la protéine Fe65 et moduler l'expression génique (168). Cependant, le clivage d'APLP2 par la  $\gamma$ -sécrétase semble plus complexe que le clivage d'APP et d'APLP1, car plusieurs fragments C-terminaux de tailles variables ont été détectés (171). Bien que les trois protéines puissent être clivées par les sécrétases, seul APP comprend la séquence A $\beta$  qui est absente de la séquence des APLP, mais aussi chez les autres espèces. Seul APP contribue donc à la production de peptide A $\beta$  dans la MA, bien que les autres membres puissent produire aussi des produits de clivage de tailles similaires, ceux-ci semblent non pathologiques et ne forment pas d'agrégats dans le cerveau (172).

#### 1.1.6 Clivage de la famille APP par d'autres enzymes

Plusieurs autres enzymes ont été décrites comme pouvant cliver le peptide A $\beta$  ou APP. La fonction exacte de ces clivages n'est pas toujours connue.

##### *$\theta$ -sécrétase*

En plus de BACE1, une protéase homologue appelée BACE2 a été identifiée (173). La  $\beta$ 2 sécrétase (BACE2), homologue de BACE1, également appelée  $\theta$ -sécrétase clive APP dans la séquence du peptide A $\beta$  entre les résidus Phe690 et Phe691 (relatif à APP770) (174), empêchant ainsi la production du peptide (8, 175) (voir Figure 8). BACE2 n'est donc pas impliqué dans l'amyloïdogenèse et exerce plutôt un effet non amyloïdogenic dans les cellules non neuronales de manière similaire à l' $\alpha$ -sécrétase. Le clivage d'APP par la  $\theta$ -sécrétase génère donc un peptide A $\beta$  tronqué et un fragment  $\theta$ -CTF (C80) (174, 175). La co-expression d'APP et de la  $\theta$ -sécrétase n'augmente pas la concentration de peptide A $\beta$  dans le cerveau de souris modèle (176). Enfin, BACE1 est principalement exprimé au niveau des neurones, alors que l'expression de BACE2 est faible dans le cerveau (177, 178).

##### *$\eta$ -sécrétase*

Récemment, un autre clivage de la protéine APP a été décrit. Le clivage  $\eta$ , qui semble dépendre en partie des métalloprotéases matricielles liées à la membrane, telles que MT5-MMP, se produisant au niveau des acides aminés Asn579–Met580 (relatif à APP770) (voir Figure 8). Ce clivage génère les fragments sAPP $\eta$  ainsi que  $\eta$ -CTF (C191). sAPP $\eta$  comme les fragments sAPP $\alpha$  et sAPP $\beta$  est capable lui aussi de lier le récepteur gabaergique, GABA $_B$ R1a (118). Le

fragment  $\eta$ -CTF est par la suite clivé à son tour par les  $\alpha$  et  $\beta$ -sécrétases, conduisant à la production de deux fragments A  $\eta$ - $\alpha$  et A  $\eta$ - $\beta$  de 92 et 108 acides aminés. Ces fragments sont cinq à dix fois plus abondants que le peptide A $\beta$  dans les cerveaux normaux. Le plus long des peptides, A  $\eta$ - $\alpha$ , inhibe la plasticité synaptique *in vitro* ainsi que l'activité neuronale dans le cerveau de souris (179). L'implication de ce clivage et le rôle physiologique exacte de ces fragments, en particulier A  $\eta$ - $\beta$  restent à déterminer.

#### *$\delta$ -sécrétase*

La  $\delta$ -sécrétase, encore appelée legumain ou encore endopeptidase à asparagine (AEP), est une protéinase à cystéine soluble trouvée principalement dans les endo-lysosomes. Les souris dépourvues de l'enzyme développent une protéinurie, un taux de filtration glomérulaire diminué et accumulent des protéines dans les endosomes et les lysosomes des cellules tubulaires proximales du rein (180). La  $\delta$ -sécrétase clive APP à deux sites, au niveau des résidus Asn448 et Glu449 ainsi qu'au niveau des résidus Asn660 et Ile661 (181) (voir Figure 8). Ces deux clivages produisent donc trois fragments, le fragment 1-448, le fragment 449-660 et enfin le fragment 661-770. Le fragment soluble 1-448 induit de la mort cellulaire sur certains modèles *in vitro* contrairement au fragment 449-660 (181). Le fragment 661-770 est par la suite clivé par les  $\beta$  et  $\gamma$ -sécrétases conduisant à une production de peptide A $\beta$  augmenté (179).

#### *Méprine- $\beta$*

Un autre exemple est la métalloprotéase méprine  $\beta$ . La méprine- $\beta$  est une type I transmembrane métalloprotéinases. Dans le système nerveux, des études ont rapporté une augmentation des d'ARNm et de la protéine chez les patients atteints de MA par rapport aux individus sains (182). Il a été aussi démontré *in vitro* que la méprine- $\beta$  était capable de cliver APP au site de clivage de la  $\beta$ -sécrétase mais aussi après le premier et deuxième acide aminé du peptide A $\beta$  (formant ainsi les peptides A $\beta$ 2-X, A $\beta$ 3-X) (183) suggérant que la méprine- $\beta$  peut se comporter comme une  $\beta$ -sécrétase (Voir Figure 8). Il a été également démontré que la méprine- $\beta$  pouvait cliver APP proche de la position N-terminal et génère des fragments de 11 et 20 kDa (184). Ces fragments n'induisaient pas de toxicité dans des cultures cellulaires neuronales (184). Plus récemment il a été montré que la matriptase 2, un homologue de la matriptase était capable de cliver la pro-méprine  $\beta$  et ainsi l'activer (185).

#### *Rhomboid-Like Protein-4*

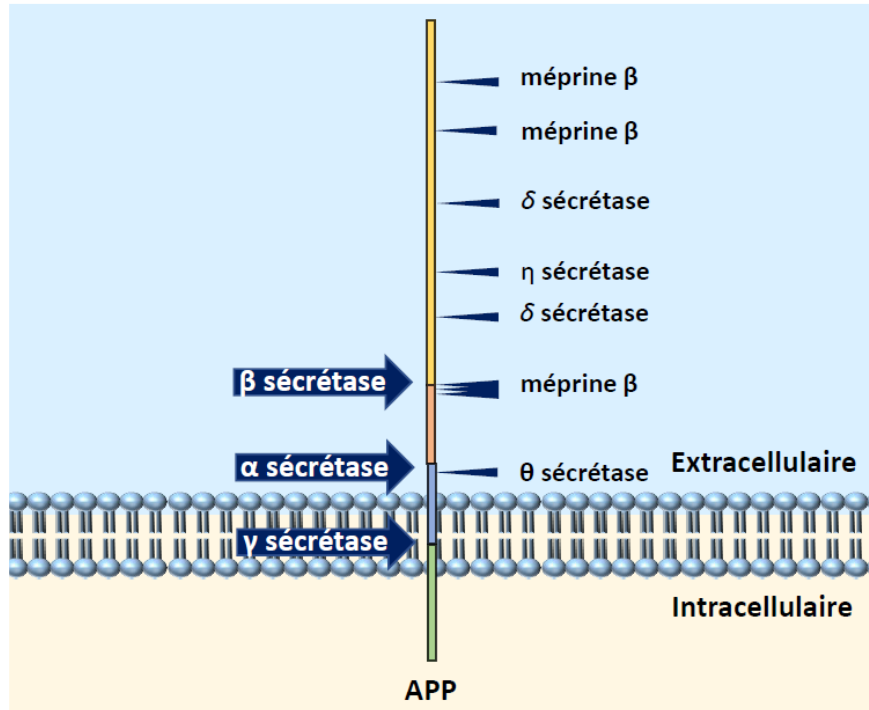
Les rhomboïdes sont des protéases à sérines intramembranaires (186) impliquées dans plusieurs processus cellulaires, comme l'inflammation, la migration et prolifération cellulaire, ainsi que l'homéostasie des mitochondries (187, 188). Plus récemment, il a été montré que la protéine de type rhomboïde (*Rhomboid-Like Protein-4, RHBDL1-4*) dans des cellules HEK exprimant APP clivait à plusieurs sites l'ectodomaine d'APP ainsi qu'APLP1 et APLP2 (figure 8). Ce clivage diminue la production de peptide A $\beta$  et les fragments générés N-terminaux et C-terminaux n'ont pas encore de fonction connue (189). Ces clivages pourraient être un mécanisme de remplacement de la dégradation des protéines associées au réticulum endoplasmique (190).

### *néprilysine*

La néprilysine (NEP) est considérée comme l'une des plus importantes pour le contrôle des niveaux d'A $\beta$  cérébraux. La NEP est une métalloprotéase à la surface cellulaire capable de dégrader le peptide A $\beta$ . Comme l'accumulation de peptide dans le cerveau des patients est plus due à une diminution de la clairance qu'une augmentation de la production de peptide, cette enzyme a été particulièrement étudiée. En effet, l'application d'inhibiteurs de la NEP dans le cerveau de rongeur entraîne une élévation importante de peptide A $\beta$  endogène, et du nombre de plaques (191, 192).

### *MMPS*

Plusieurs métalloprotéinase matricielles (*Matrix metalloproteinases, MMPs*) ont été identifiées comme pouvant cliver le peptide A $\beta$ . Les métalloprotéinases matricielles identifiées sont des endopeptidases contenant du zinc dépendante du calcium, appartenant à la superfamille metzincin des métalloprotéinases (193). Les enzymes MMP2 (194), MMP3 (195), MMP9 (194, 196), MMP14 (197), MMP16 (198) ont notamment été impliquées dans la dégradation du peptide A $\beta$  souvent à plusieurs sites et une augmentation de ces protéases est souvent retrouvée dans des échantillons de patients (199). Certaines de ces enzymes vont cliver le peptide A $\beta$  aux sites de clivage des sécrétases comme MMP2 et MMP9 qui vont cliver au site de l' $\alpha$ -sécrétase (200).



**Figure 8 : Représentation schématique de différents sites de clivage de la protéine APP.** Différents sites de clivages de la protéine APP sont indiqués par des flèches.

### 1.1.7 Le peptide A $\beta$

#### 1.1.7.1 Différentes formes

En 1984, il a été montré que le composant majoritaire des plaques amyloïdes est principalement un peptide d'environ 4,2 kDa de 40 ou 42 acides aminés (201), puis rapidement, après le clonage de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) en 1987, l'origine de ce peptide a été déterminée (202). De nombreux peptides A $\beta$  de différentes longueurs ont été identifiés chez l'être humain (203, 204). Canoniquement, à la suite du clivage séquentiel d'APP par les sécrétases, des peptides A $\beta$  de différentes longueurs sont produits. Les peptides diffèrent par leur extrémité C-terminale ou N-terminale selon la position du clivage des sécrétases (voir figure 7). À la suite du clivage de la protéine APP par la  $\beta$ -sécrétase aux sites  $\beta$  et  $\beta'$ , les peptides A $\beta$ 1-X et A $\beta$ 11-X vont être produits. À la suite des clivages de la  $\alpha$ -sécrétase les peptides A $\beta$ X-

37, A $\beta$ X-39, A $\beta$ X-40, A $\beta$ X-42, A $\beta$ X-43 sont produits. Le peptide A $\beta$  1-40 représente environ 90% des peptides A $\beta$  et le peptide A $\beta$  1-42 environ 10% les autres peptides étant très faiblement produit (148, 205, 206). Cependant d'autres peptides A $\beta$  ont été identifiés dans le plasma et le LCR de patients, comme le peptide A $\beta$  1-38 qui représente à lui seul aussi 10% des peptides A $\beta$  (207). La production de peptide A $\beta$  1-38 semble liée à des modulateurs de la  $\beta$ -sécrétase ainsi qu'à des anti-inflammatoires non stéroïdiens (29, 208). D'autres peptides comme les peptides A $\beta$ 2-X, A $\beta$ 3-X, A $\beta$ 4-X, A $\beta$  1-24, A $\beta$  1-34 ont aussi été détectés et leurs productions ainsi que leurs rôles physiologiques n'est pas encore bien compris et pourraient pour certains juste être des produits de dégradations (203–205). Les peptides les plus longs, en particulier A $\beta$  1-42, sont plus hydrophobes, ils ont donc une plus grande propension à s'agréger et sont conséquemment les principales espèces responsables de la formation des plaques dans le cerveau (209). Il existe de multiples formes agrégées, différents oligomères, formes solubles et dépôts insolubles de ces peptides.

Les formes oligomères solubles du peptide précèdent la formation des plaques, seraient les plus toxiques, responsables en partie des symptômes et du développement de la MA (13, 14).

#### *1.1.7.2 Rôle physiologique du peptide Amyloïde Beta*

À la suite du clivage d'APP, le peptide A $\beta$  est normalement sécrété dans l'espace extracellulaire. Selon les études, il existe une certaine variabilité de la quantité de peptide présent dans les cerveaux et dans le LCR, sans doute liée aux techniques utilisées ainsi qu'aux différentes formes que le peptide peut prendre en plus des variabilités individuelles de chaque patient. La concentration dans le LCR du peptide est de l'ordre du ng/mL pour un sujet sain, cette concentration augmente chez les sujets âgés et peut augmenter 10 fois environ ou plus chez les patients atteints de la MA (210–212). Le fait que le peptide soit libéré naturellement dans le milieu extracellulaire et que la séquence du gène soit conservée chez les vertébrés suggère qu'il doit conférer un avantage pour la survie des espèces. Plusieurs rôles ont ainsi été proposés pour le peptide A $\beta$  :

— Un rôle antimicrobien, comme beaucoup de protéines amyloïdes, A $\beta$  possède des propriétés antibactériennes, antifongiques et antivirales efficaces contre onze espèces de pathogènes testés à ce jour (213–215). Cette activité antimicrobienne serait due à la capacité de ces peptides à former des fibrilles qui s'insèrent dans les membranes et créer des pores,

entraînant la mort de ces cellules. Il a par ailleurs été montré récemment que seules les formes oligomériques du peptide A $\beta$  présentaient cette capacité détergente dans les membranes plasmiques (216). Fait intéressant qui supporte cette hypothèse est la présence de différents ADN microbiens détectés dans les plaques amyloïdes, entourées de microglies activées (215, 217).

— Un rôle de suppresseur tumoral, car il existe une relation inverse entre la MA et le cancer. En effet, les patients âgés avec un historique de cancer, tumeurs malignes ou tumeurs de tous types (218) sont moins susceptibles de développer la MA, alors que les patients diagnostiqués de la MA sont moins susceptibles de développer un cancer par rapport à leurs contrôles respectifs (219). Un des mécanismes d'action possibles en lien avec son rôle antimicrobien serait dans la capacité du peptide A $\beta$  circulant à intercepter les virus oncogènes qui représente environ 18% des cancers chez l'être humain (220). En outre, le traitement de cellules cancéreuses en culture avec un milieu contenant le peptide A $\beta$  réduit de manière significative la prolifération de glioblastome, adénocarcinome et mélanome, peut être en diminuant la néovascularisation ou en piégeant des nutriments nécessaires à la croissance des tumeurs (221).

— Un des rôles possibles du peptide qui a été proposé est que le peptide A $\beta$  protégerait des hémorragies. La barrière hématoencéphalique devient moins imperméable avec l'âge et « fuie », le peptide A $\beta$  lierait un certain nombre de molécules nocives pour le cerveau et les empêcherait de se propager dans le cerveau (molécules pro-inflammatoires et composés neuroactifs) (222). En effet, une grande partie des plaques A $\beta$  est étroitement associée aux vaisseaux sanguins, soutenant ainsi un lien de causalité entre les deux (223). A $\beta$  ralentirait aussi le saignement en formant des agrégats filamenteux au niveau des vaisseaux sanguins faisant ainsi office de « bouchon » et permettrait le rapprochement des parois des cellules endothéliales favorisant donc la réparation du tissu (224). Cette hypothèse est confortée par les résultats des immunothérapies en essais cliniques visant à piéger le peptide A $\beta$  avec des anticorps. Un des effets secondaires constatés est l'apparition d'anomalies d'imagerie liées aux amyloïdes (*Amyloid-Related Imaging Abnormalities*, ARIA) qui correspondent à des œdèmes ou des microhémorragies, conséquence de la disparition du peptide A $\beta$ . L'augmentation de la perméabilité de la barrière hématoencéphalique à la suite de la disparition du peptide A $\beta$  et l'apparition d'effet vasculaire a par la suite aussi été confirmée *in vivo* chez la souris (225).



— Un autre rôle lui aussi bien documenté qui a été aussi proposé pour le peptide A $\beta$  est un rôle protecteur, promouvant la récupération après une lésion cérébrale. En effet, après une lésion cérébrale traumatique, chez l'être humain, on constate rapidement une augmentation des niveaux de la protéine APP suivi d'une augmentation des niveaux de peptide A $\beta$  (226, 227). Cette augmentation de l'expression d'APP et de peptide A $\beta$  est transitoire en réponse au trauma (228). Ces observations ont été testées chez plusieurs modèles animaux de trauma dont les modèles animaux d'impacts corticaux contrôlés, de lésions de la moelle épinière, d'hypoxie et de maladies auto-immunes. De manière surprenante, l'injection de peptide A $\beta$  chez des souris BACE1 KO, mais pas la présence de la protéine APP elle-même, semble améliorer les symptômes des souris (229).

— Enfin, l'un des rôles documentés pour le peptide A $\beta$  est un rôle de régulateur de la fonction synaptique. Physiologiquement, lorsqu'il y a activité neuronale, APP est transporté de manière antérograde aux synapses, là où le peptide A $\beta$  est libéré ainsi que les neurotransmetteurs dans le milieu extracellulaire (230). Il a été montré que le peptide augmente la probabilité de libération de neurotransmetteur sur les neurones présynaptiques, en opposition à une déplétion de peptide A $\beta$  qui réduit la potentialisation à long terme (*long term potentiation*, LTP) ainsi que la mémoire à court et à long terme (231, 232). En revanche, l'injection de quantité de l'ordre du picomolaire chez les rongeurs améliore l'apprentissage et la mémoire (233).

Bien que différents rôles du peptide A $\beta$  ont été évoqués et possèdent pour certains un intérêt et une littérature en croissance, il n'existe pas à ce jour de consensus sur le rôle physiologique du peptide A $\beta$ . Finalement, il n'est pas exclu que le peptide A $\beta$  ne possède pas de rôle physiologique et ne soit qu'un produit de clivage.

### 1.1.7.3 Neurotoxicité du peptide Amyloïde Beta

#### Défauts extracellulaires

Le peptide A $\beta$  existe dans différentes formes à la suite de sa libération dans le milieu extracellulaire. Les formes oligomériques du peptide peuvent se lier aux membranes cellulaires et former des pores et donc des dommages neuronaux notamment en perturbant la signalisation calcique (234). L'observation de ces structures en forme de pore a été obtenue *in vitro* et dans la membrane cellulaire des cerveaux et de modèles murins (235). Il a aussi été montré que les formes oligomériques peuvent se lier à plusieurs protéines membranaires qui pourraient donc

jouer le rôle de récepteur pour le peptide A $\beta$  : récepteur des produits finis de glycation avancée (*receptor for advanced glycation endproducts*, RAGE), récepteur du N-méthyl-d-aspartate (NMDAr), récepteur  $\alpha$ 7-nicotinique de l'acétylcholine ( $\alpha$ 7 nAChR), protéine du prion cellulaire (PrPc), récepteur 2 de type B de l'éphrine, immunoglobuline G récepteur FC gamma IIb (Fc $\gamma$ RIIb) et le récepteur B (PirB) apparenté à l'immunoglobuline. (236–241).

La protéine RAGE lie les produits de glycation avancés et a des niveaux augmentés dans le cerveau des patients atteints de la MA, notamment autour des vaisseaux sanguins. Le traitement de souris MA avec des anticorps dirigés contre RAGE améliore la LTP et les fonctions cognitives, mais de plus bloque aussi l'entrée du peptide dans le cerveau (242, 243). Bloquer l'interaction du peptide avec RAGE diminue les niveaux de peptide A $\beta$  chez la souris, et c'est une approche thérapeutique actuellement en essai clinique de phase II pour l'être humain (244).

L'activité du système glutamatergique est connue pour être dérégulée dans la MA (245). En effet, plusieurs études ont rapporté l'interaction du peptide A $\beta$  avec les récepteurs NMDA. En liant les sous-unités GluN1 ou GluN2B le peptide A $\beta$  entraîne une activation ou une potentialisation de la signalisation du récepteur, conduisant à des dérégulations de l'homéostasie du calcium, une mort neuronale et des dysfonctionnements synaptiques (246, 247). Cet effet s'exercerait aussi en partie par une accumulation du glutamate dans les synapses en bloquant sa recapture, activant les récepteurs, et créant ainsi une écotoxicité et une perturbation des niveaux de calcium (248). Il avait été postulé qu'une part des effets de la MA soit liée à cette suractivation et a donc été une cible pour traiter la MA (voir traitement et prévention de la MA).

L'activité du système cholinergique est aussi connue pour être réduite dans la MA depuis plusieurs décennies (249, 250) et il a été postulé qu'une part importante des symptômes psychiatriques liés à la MA soit liée à cette altération (251, 252) et a donc été aussi une cible pour traiter la MA. Plus récemment, il a été montré que le peptide A $\beta$  liait aussi les récepteurs  $\alpha$ 7 nAChR activant ainsi les ERK et JNK et conduisant à la phosphorylation de tau (237, 253). Cependant, l'effet toxique de la liaison du peptide A $\beta$  avec le récepteur  $\alpha$ 7 nAChR n'est pas encore complètement élucidé, car dans certains modèles *in vivo* son effet était bénéfique (254, 255).

La protéine du prion cellulaire (PrPc) a une haute affinité pour le peptide A $\beta$  (239). En l'absence de PrPc, il a été montré que la mort cellulaire induite par les oligomères A $\beta$  ainsi que

les défauts de LTP observés sur les neurones disparaissent (239, 256). Sur des modèles de souris MA, l'absence de PrPc corrige les défauts de densité synaptique et déficits cognitifs (257, 258). Cependant, certaines publications semblent contredire le rôle de PrPc. En effet, il semble que PrPc ne soit pas nécessaire pour induire la dépression synaptique, la diminution de la densité synaptique et le blocage de la LTP (259). De plus, la suppression ou la surexpression de PrPc n'a pas d'effet sur la réduction de la plasticité synaptique dans l'hippocampe dans plusieurs modèles de la MA. Le rôle de PrPc dans la neurotoxicité dans la MA reste donc controversé (259, 260).

### Défauts intracellulaires

Le peptide A $\beta$  exerce aussi une toxicité intracellulaire que ce soit directement ou indirectement en s'accumulant dans l'espace intracellulaire. En effet, le peptide A $\beta$  serait majoritairement produit au niveau des endosomes et est par la suite libéré dans le milieu extracellulaire (261, 262). Certains mécanismes ont été identifiés favorisant son internalisation tel que la liaison aux radeaux lipidiques et l'endocytose clathrine-dépendante d'une part (263, 264), et la liaison active à certains récepteurs, notamment les récepteurs  $\alpha 7$  nAChRs, LRP1, et RAGE.

Les effets néfastes directs intracellulaires sont moins bien connus, mais semblent affecter les organites notamment en augmentant la surface ainsi que le nombre des éléments composant l'appareil de Golgi, les lysosomes ainsi que les corps de lipofuscine (265), entraînant en autres la libération de protéases lysosomales. De plus, on assiste aussi à une accumulation du peptide dans les corps multivésiculaires (MVB) entravant ainsi la voie de tri des MVB.

Le RE est capable de répondre au changement cellulaire et de contribuer au repliement des protéines par la *unfolded protein response* (UPR). L'effet de cette voie sur la pathogenèse de la MA est controversé, l'action du peptide A $\beta$  semblant l'affecter directement par la protéine FOXRED2, altérant ainsi aussi le protéasome (266). Cependant, des effets opposés ont été observés dans des modèles KO spécifiques (267). Cette dérégulation est aussi exacerbée par une augmentation de l'expression des récepteurs à la ryanodine 3 (RyR3), qui médient la libération de Ca<sup>2+</sup> induite par le Ca<sup>2+</sup>. Cette altération de l'expression des récepteurs est observée dans plusieurs modèles animaux (268, 269). Enfin, un autre facteur impliqué dans la neurotoxicité du peptide A $\beta$  au niveau du RE semble être lié à l'activation des caspases. Chez la souris, la caspase 12 entraîne l'activation des voies classique d'apoptose. En effet dans un cas de stress prolongé du RE (altération des niveaux de calcium et accumulation de protéine

mal repliée), la caspase 12 est activée (270). Chez l'être humain cet effet toxique du peptide A $\beta$  semble passer par la caspase 4 (271, 272).

Des défauts métaboliques et mitochondriaux sont souvent aussi retrouvés dans les neurones de patients atteints de MA ou dans des cellules neurales traitées à l'A $\beta$ . En effet, plusieurs enzymes impliquées dans le métabolisme du glucose et de la chaîne respiratoire ont une activité réduite, comme la pyruvate déshydrogénase (273). Cependant, une partie des défauts métaboliques observés sont aussi dus à l'altération du transport axonal qui altère l'acheminement des mitochondries et donc l'activité synaptique en général (274). D'autre part, un autre constat souvent observé dans les études est une diminution de la longueur des mitochondries qui serait due à une modulation de l'expression de protéines mitochondriales liées à la fusion ou la fission (275, 276).

Quel que soit l'hypothèse sur l'origine de la MA, les liens entre le peptide A $\beta$  et la protéine tau restent énigmatiques. Les mécanismes précis sous-jacents n'ont en effet pas été clairement établis. Cependant, une protéine ressort, la protéine glycogène synthase kinase 3 (*glycogen synthase kinase-3*, GSK3). Il a été montré que cette protéine serait impliquée dans la phosphorylation de la protéine tau, altérerait la production de peptide A $\beta$  et serait activée aussi à la suite de la liaison du peptide au récepteur NMDA (277, 278). La protéine GSK3 a été suggérée comme étant le lien entre le peptide A $\beta$  et la protéine tau et un des effets négatifs du peptide serait donc la suractivation de cette protéine et donc de l'hyperphosphorylation de la protéine tau (279).

### 1.1.8 L'hypothèse de la cascade amyloïde

De nombreuses hypothèses ont été formulées afin d'expliquer l'origine de la MA. L'un des tout premiers modèles à avoir été proposé est le modèle de l'hypothèse de la cascade amyloïde (voir figure 9), plaçant la protéine APP et le peptide A $\beta$  au centre de la pathologie (23). Cette hypothèse repose grandement sur deux constats : l'apparition de la pathologie chez des individus porteurs de mutations dans les gènes codant pour la protéine APP ou dans PSEN1/2 d'une part, et d'autre part, la grande proportion de patients atteints du syndrome de Down présentant des symptômes de la MA. De nombreuses preuves ont été apportées quant à la neurotoxicité du peptide A $\beta$  que ce soit sous forme soluble ou oligomérique renforçant cette hypothèse (280, 281). Dans ce modèle, l'hyperphosphorylation de la protéine tau serait un

événement secondaire induit par le peptide A $\beta$  et l'hyperphosphorylation de la protéine tau contribuerait à son tour à la neurotoxicité constatée dans la MA.

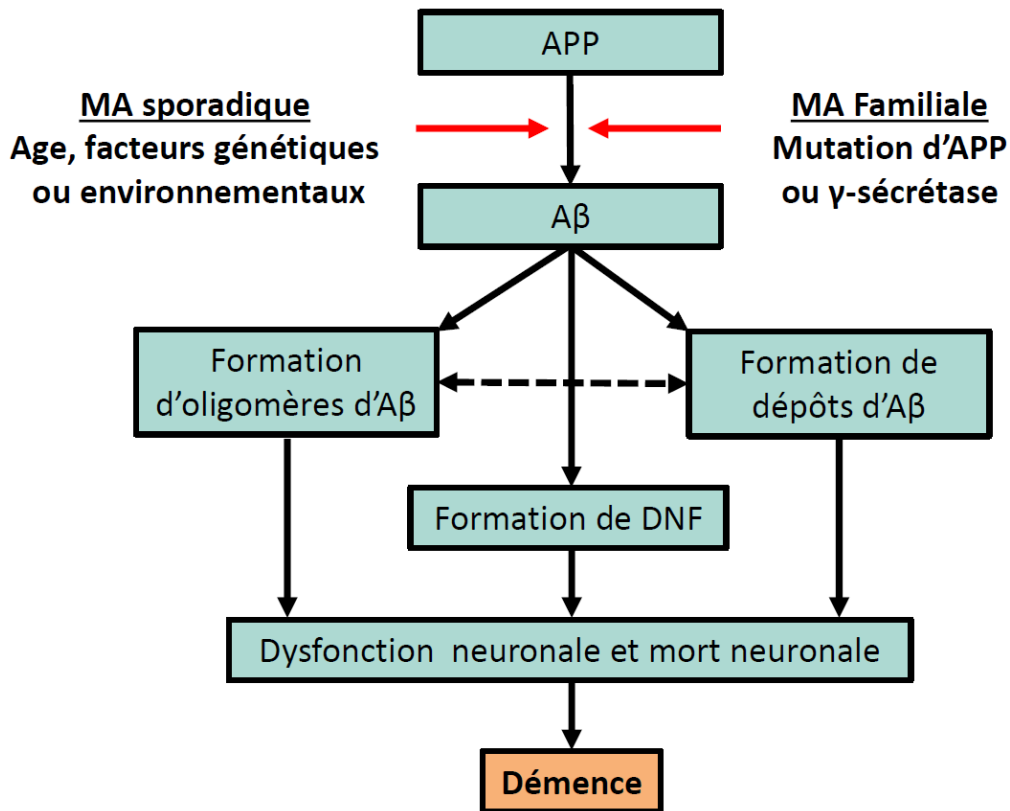
Cette hypothèse est controversée pour plusieurs raisons :

— L'apparition de symptômes chez les patients corrèle plus avec l'apparition de tau hyperphosphorylée dans les zones atteintes en comparaison avec l'apparition de plaques amyloïdes, bien que ce constat ne prenne pas en compte les formes solubles du peptide (282, 283).

— Bien que les formes sporadiques de la MA présentent elles aussi des plaques, l'événement initiateur de la maladie pourrait être différent de celle des formes familiales, et la protéine APP pourrait avoir un rôle de second plan dans les formes sporadiques (284).

— La validité des modèles animaux utilisés est souvent aussi remise en question. En effet, ces modèles utilisent des gènes mutés humains pour modéliser la maladie et sont de plus en plus remis en question quant à savoir s'ils représentent des modèles adéquats de la pathologie humaine (285).

La protéine tau pourrait être donc considérée comme initiatrice de la pathogenèse de la maladie et le principal responsable des symptômes observés. À l'heure actuelle, l'importance du peptide A $\beta$  et de la protéine tau dans la MA reste indiscutable et nécessite toujours une meilleure compréhension et des efforts de la communauté scientifique dans le but de comprendre comment ces deux protéines interagissent et agissent physiologiquement dans la MA.



**Figure 9 : Représentation schématique de l'hypothèse de la cascade amyloïde**

Les principales étapes de la cascade amyloïde sont décrites pour les formes sporadiques et les formes familiales de la maladie d'Alzheimer. Leurs impacts sur la dégénérescence neurofibrillaire et le processus conduisant à la démence sont aussi décrits. (MA : maladie d'Alzheimer ; APP : *amyloid precursor protein* ; DNF : dégénérescence neurofibrillaire).

## 1.2 Les Protéases

### 1.2.1 Le rôle des protéases dans la MA

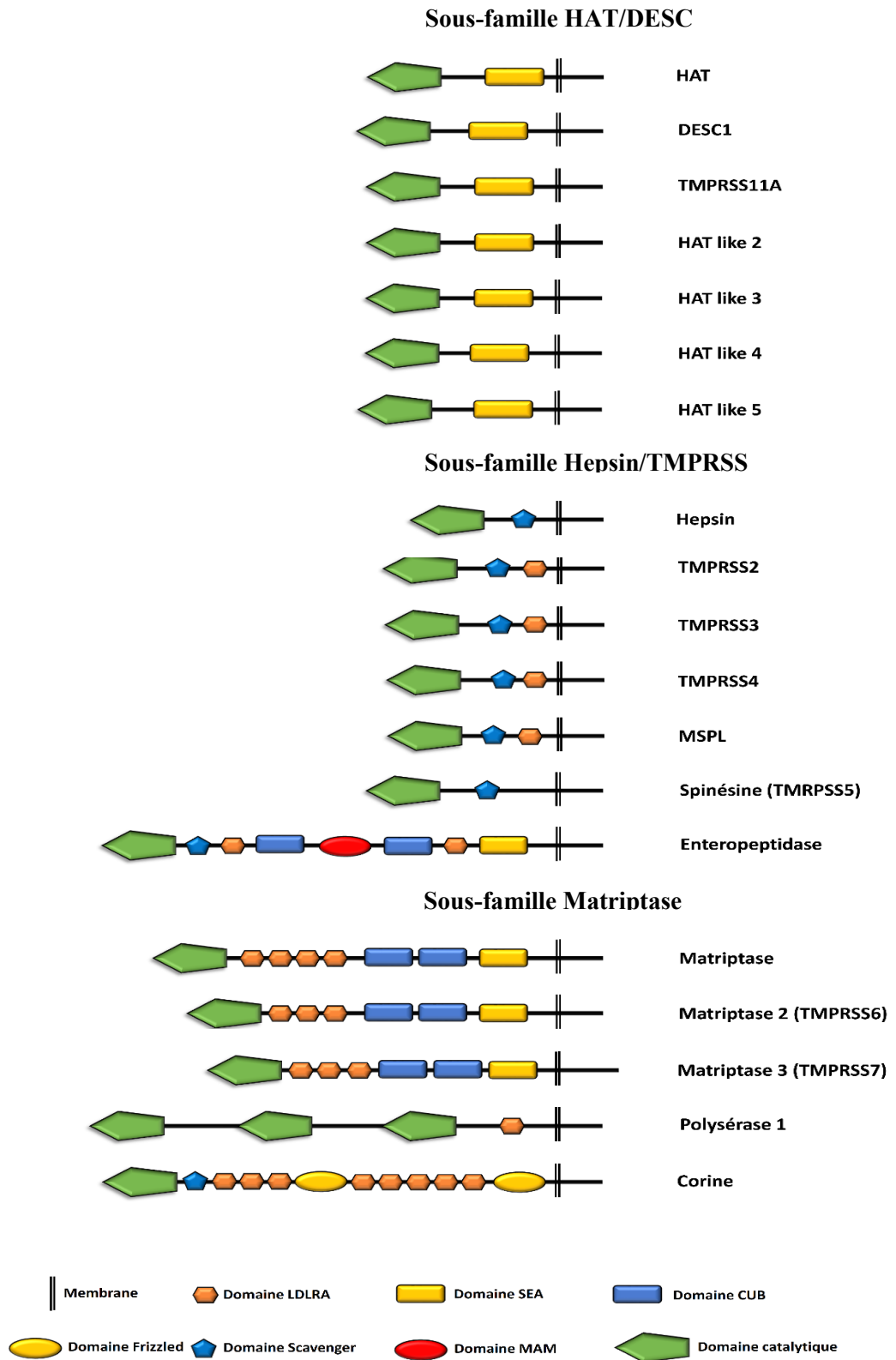
L'un des domaines de recherche de la MA cherche à découvrir des protéases capables de cliver APP altérant son métabolisme et pouvant modifier la production de peptide Aβ. Plusieurs protéases ont été décrites comme clivant soit APP soit le peptide Aβ. Dans la MA l'un des premiers constats fait concerne les protéases impliquées dans le métabolisme d'APP. En effet, il y a une accumulation d'autophagosomes, d'autolysosomes et de corps lysosomaux denses dans les neurites dystrophiques (286–288). Ce phénomène est observé même avant l'apparition de plaque suggérant qu'une altération du métabolisme et de la dégradation d'APP pourrait être un événement précoce dans la MA.

### 1.2.2 Les protéases à sérine

Les protéases à sérine possèdent une triade catalytique dont la sérine sert d'acide aminé nucléophile au site actif (289). Plus d'un tiers des enzymes référencées à ce jour sont des protéases à sérines (290), formant donc un groupe d'enzymes très diversifié et abondant (291, 292). Elles sont organisées en clans selon leurs mécanismes catalytiques et en familles selon leurs ancêtres communs (290). Les protéases du clan PA constituent la plus grande famille de protéases à sérine et l'une des mieux étudiées, comprenant en autres la trypsine et la chymotrypsine. La plupart de ces enzymes préfèrent un résidu arginine ou lysine en position P1 (289). L'une des sous-familles de ces protéases est les protéases S1 qui interviennent dans divers processus extracellulaires.

La plupart des protéases à sérine de type S1 sont des enzymes sécrétées ou larguées à partir de vésicules dans l'environnement extracellulaire. Un groupe important d'enzymes ancrées dans la membrane a été identifié et est constitué de protéases à sérine de type II (*type II transmembrane serine protease*, TTSP) (293) (voir figure 10). Ces enzymes possèdent un domaine transmembranaire qui maintient l'enzyme à la membrane plasmique. La famille des TTSP comporte à l'heure actuelle 19 membres (293). Toutes ces enzymes possèdent des domaines d'ancrage membranaire, des domaines catalytiques protéase à sérine conservés et des domaines extracellulaires supplémentaires qui sont essentiels aux fonctions biologiques et physiologiques attribuées à ces enzymes (294). Les protéases à sérine ancrées dans la membrane sont des composants importants du microenvironnement péricellulaire, avec plusieurs rôles essentiels dans le développement et le maintien de l'homéostasie (295). Les substrats protéiques endogènes ciblés par les protéases à sérine ancrées dans la membrane comprennent des hormones peptidiques, des facteurs de croissance et de différenciation, des récepteurs, des enzymes, des molécules d'adhésion et des protéines d'enveloppe virales (296). On retrouve l'expression des TTSP dans de nombreux organes comme le foie, le pancréas, le cœur, les poumons, au niveau de l'oreille interne, souvent dans des cellules épithéliales, mais aussi dans

des cellules hématopoïétiques, des hépatocytes, des cellules endothéliales ou encore des cardiomyocytes (293).





## Figure 10 : Représentation schématique des TTSP

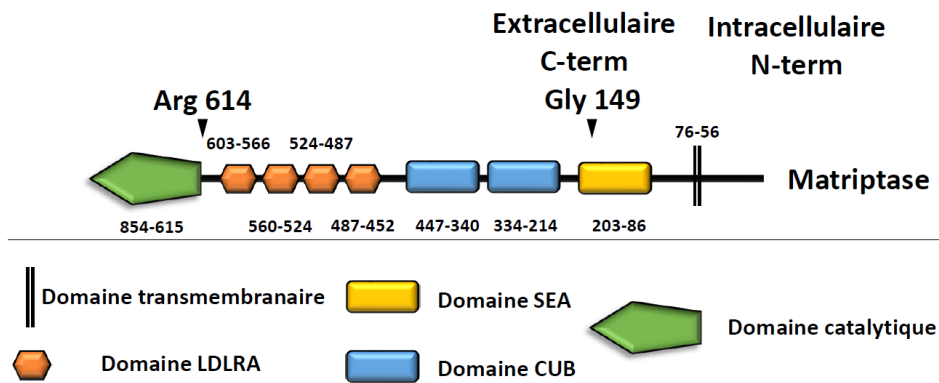
Les éléments structuraux sont décrits, notamment le domaine SEA (*sea urchin sperm protein, enteropeptidase, agrin*), les domaines CUB (*C1r/s, Uegf, bone morphogenic protein-1*), les domaines LDLRA (*low density lipoprotein receptor class A domains*), les domaines *scavenger*, les domaines *Frizzled* et enfin le domaine catalytique.

On retrouve l'implication des TTSP dans plusieurs pathologies, souvent dans les cancers, mais on connaît aussi leurs implications dans des défauts de l'appareil auditif, de la maturation du derme ou des troubles métaboliques liés au fer (293). Plusieurs protéases à sérine ont été décrites comme clivant soit APP soit le peptide A $\beta$ . Par exemple, les *High-temperature requirement A serine peptidase 1 et 2* (htrA 1 et 2) dégradent divers fragments d'APP, alors qu'un inhibiteur de HtrA1 provoque l'accumulation d'A $\beta$  dans des lignées cellulaires en culture, mais aussi que htrA 2 dégrade le peptide A $\beta$  au niveau des mitochondries (297, 298). Plus récemment, il a aussi été rapporté que la matriptase était capable de cliver le peptide A $\beta$  en Arg5, Lys16, et Lys28 (299).

### 1.2.1 La matriptase

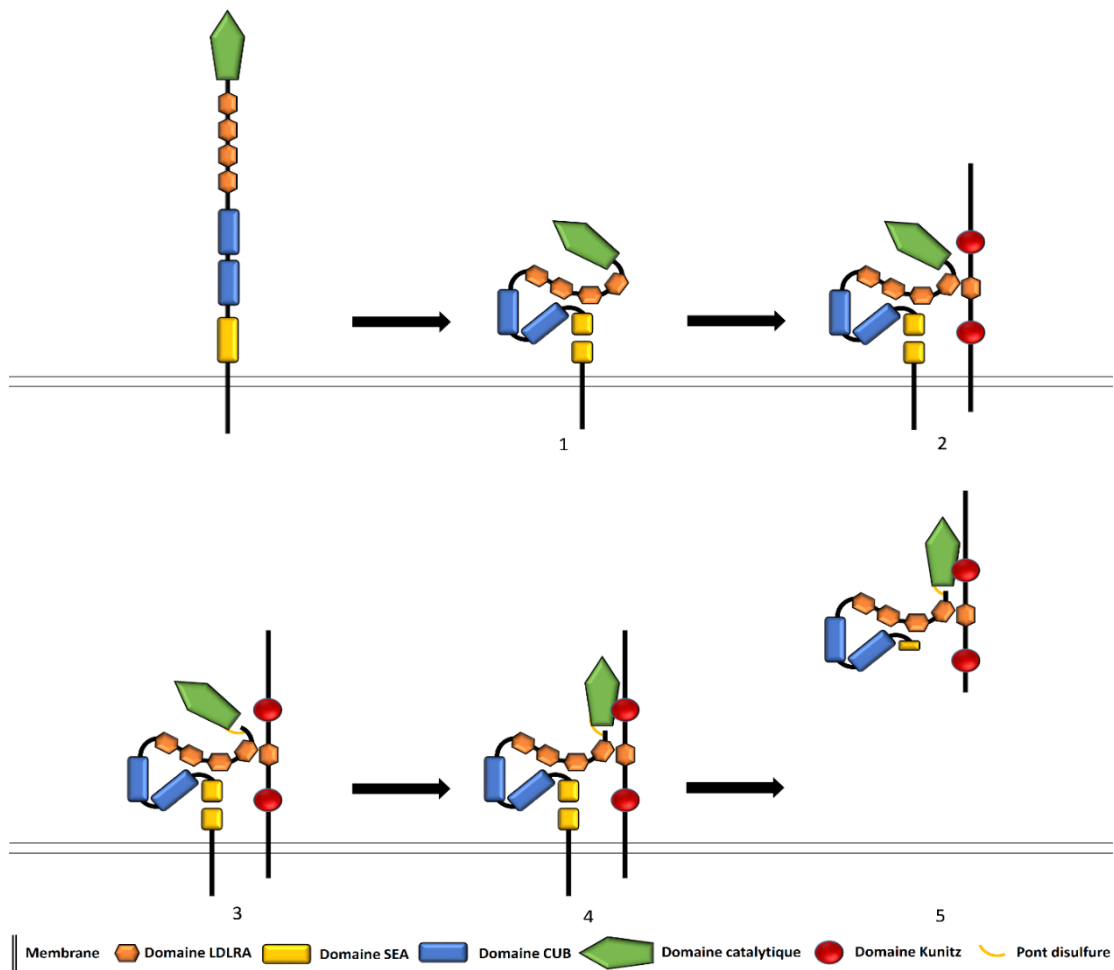
#### 1.2.1.1 Structure et maturation de la matriptase

La matriptase, codée par le gène *ST14* sur le chromosome 11, est une protéase à sérine transmembranaire de type II de 855 acides aminés (Voir figure 11) (300). La matriptase comporte plusieurs domaines extracellulaires : le domaine protéine de sperme d'oursin (*sea urchin sperm protein, enteropeptidase, agrin, SEA*), deux domaines *C1r/s, Uegf, bone morphogenic protein-1* (CUB), 4 domaines de classe A du récepteur des lipoprotéines de basse densité (*low density lipoprotein receptor class A domains, LDLRA*) ainsi qu'un domaine catalytique de type S1. Deux autres homologues de la matriptase ont été identifiés, la matriptase 2 (*TMPRSS6*) et la matriptase 3 (*TMPRSS7*), dont le domaine catalytique, comportent respectivement 45% et 47% d'identité de séquence avec celui de la matriptase (301, 302). Bien qu'elle suive un schéma classique d'activation, qui la clive en deux fragments, transformant la protéine zymogène en enzyme active, les étapes de son activation et de son largage dans le milieu extracellulaire sont complexes et ne sont pas encore totalement élucidées (voir figure 12).



### Figure 11 : Représentation schématique de la matriptase

Les éléments structuraux sont décrits, notamment le domaine SEA (*sea urchin sperm protein, enteropeptidase, agrin*), les domaines CUB (*Clr/s, Uegf, bone morphogenic protein-1*), les domaines LDLRA (*low density lipoprotein receptor class A domains*) et enfin le domaine catalytique. Les positions des acides aminés sont indiquées pour chaque région.



**Figure 12. Représentation schématique de la maturation de la matriptase et de HAI-1.** Les éléments structuraux sont décrits, notamment le domaine SEA (*sea urchin sperm protein, enteropeptidase, agrin*), les domaines CUB (*C1r/s, Uegf, bone morphogenic protein-1*), les domaines LDLRA (*low density lipoprotein receptor class A domains*), le domaine Kunitz et enfin le domaine catalytique. (1) Clivage du domaine SEA (2) Association avec HAI-1 (3) Activation de la matriptase (4) Inhibition du domaine catalytique (5) Libération dans le milieu extracellulaire.

Sommairement, la matriptase va subir un premier clivage au niveau du domaine SEA en position Gly149, les deux fragments vont rester liés par des interactions non covalentes (303). Sa maturation, son transport à la membrane et son activation sont très liés à son inhibiteur constitutif, la protéine inhibitrice de l'activateur du facteur de croissance des hépatocytes de type 1 (*hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1, HAI-1*), de ses différents domaines d'interactions protéine-protéine (CUB et LDLRA) et aussi de son domaine catalytique. Des

mutations dans ces domaines vont fortement diminuer son transport de l'appareil de Golgi à la membrane plasmique sous forme active, voir l'abolir si les mutations touchent la triade catalytique (H656 ; D711 ; S805) ou encore en absence de HAI-1 qui semble jouer un rôle de protéine chaperonne (304–306). À la membrane plasmique, la matriptase subit un deuxième clivage en position Arg614 dans son domaine d'activation RQAR-VVGG (306). Ce clivage semble être en partie une autoactivation de la matriptase, sans doute par une activité minimale du domaine catalytique immature. Les deux fragments de l'enzyme vont rester liés par un pont disulfure (307). La forme mature de la matriptase en complexe avec son inhibiteur HAI-1 peut être larguée dans le milieu extracellulaire par clivage protéolytique en position Lys189 ou Lys204 (307). La matriptase peut donc diffuser et interagir avec le milieu extracellulaire et les cellules adjacentes. HAI-1 est une protéine transmembranaire de type I de 441 acides aminés. Elle comporte plusieurs domaines extracellulaires : deux domaines KPI et un domaine LDLRA. Contrairement à la matriptase, elle suit un schéma classique de sécrétion à la membrane plasmique. Le domaine KPI-1 semble être celui responsable de l'inhibition de la matriptase (308). En effet, l'acide aminé arginine en position 318 de la séquence Kunitz canonique de HAI-1 a été identifié comme important à l'activité inhibitrice contre la matriptase (309). Le domaine LDLRA de HAI-I semble important pour l'interaction avec la matriptase, car lorsque ce domaine est muté, on observe une abolition du transport de la matriptase de l'appareil de Golgi à la membrane plasmique (304). Le largage de HAI-1 de la membrane plasmique se fait par clivage enzymatique près de la membrane (310).

#### *1.2.1.2 Expression de la matriptase*

L'expression de la matriptase a été documentée dans plusieurs tissus notamment au niveau du tractus gastro-intestinal (estomac, duodénum, intestin grêle, côlon, rectum) de l'épiderme, des bronchioles, et des alvéoles (311–313). Pendant longtemps, son expression était considérée comme exclusive aux cellules épithéliales ; cependant, un nombre croissant d'études au cours des dernières années ont aussi signalé une expression de la matriptase dans le cerveau, plus spécifiquement dans les neurones, les astrocytes et la microglie (314–318).

#### *1.2.1.3 Rôles physiologiques de la matriptase*

La matriptase appartient à la famille des peptidases de la famille S1. La séquence de clivage de la matriptase nécessite la reconnaissance de plusieurs résidus par la pochette catalytique. Il a été montré que la matriptase clivait préférentiellement après des résidus arginine en position P1 plutôt qu'après des acides aminés lysine et que des résidus basiques

étaient aussi préférés en position P3 et P4 (319). Plusieurs substrats de la matriptase sont connus, notamment le pro-hepatocyte growth factor (pro-HGF) (320), la pro-prostasin (321), la pro-urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA) (322), le protease activated receptor 2 (PAR-2) (322) et la molécule d'adhésion EpCAM (323). La matriptase et HAI-1 sont exprimés dans de nombreux tissus épithéliaux et jouent un rôle crucial au niveau de la barrière épidermique. En effet, les souris déficientes en matriptase se développent à terme, mais meurent dans les 48 h suivant la naissance à la suite de graves dysfonctions de la barrière épidermique qui conduisent à une déshydratation rapide et fatale (324, 325). La perte de la matriptase entrave également la croissance des follicules pileux et empêche la croissance des vibrisses chez la souris (325).

Au cours des dernières années, il a été démontré chez la souris que la perte d'inhibition de la matriptase perturbe la fermeture du tube neural, mais également que la matriptase favorise la migration et la différenciation neuronale et joue un rôle dans la régulation des niches vasculaires des cellules souches neurales (314–316). D'autres études ont aussi identifié une augmentation de l'expression de l'ARNm de la matriptase dans le cerveau de souris modèle de la MA, en particulier dans la microglie et les astrocytes activés autour des plaques amyloïdes (317, 318). La forme mature de la matriptase pouvant être larguée dans le milieu extracellulaire (307), la matriptase peut donc diffuser et interagir avec le milieu extracellulaire et les cellules adjacentes. L'expression de la matriptase dans un type cellulaire, comme les astrocytes, n'exclut donc pas une possible interaction avec des protéines sur la membrane plasmique d'un autre type cellulaire, comme les neurones.

#### *1.2.1.4 Rôles pathologiques de la matriptase*

L'expression conjointe de la matriptase et de HAI-1 est souvent retrouvée dans de nombreux cancers d'origine épithéliale et est souvent signe de mauvais pronostic (326). L'augmentation de l'activité de la matriptase serait responsable de son rôle dans les cancers, souvent par un déséquilibre de l'inhibition de la matriptase par HAI-1 (327). La matriptase a aussi été impliquée dans d'autres pathologies, par exemple, elle joue un rôle dans la dégradation de la matrice cartilagineuse dans l'arthrose (328), mais aussi active protéolytiquement le virus de la grippe et favorise la réplication multicyclique dans l'épithélium des voies respiratoires humaines (329).

## 2. HYPOTHESE ET OBJECTIFS

Bien que la matriptase ait été décrite initialement comme étant uniquement exprimée dans les cellules épithéliales, il a été démontré au cours des dernières années qu'elle était aussi exprimée au niveau du cerveau. Il a aussi été démontré qu'un autre membre de la famille des TTSP, la matriptase-2 en clivant la méprine- $\beta$ , altérerait indirectement le clivage d'APP par la méprine- $\beta$ . De plus le domaine KPI d'APP inhibe la matriptase-2. Ces constats ont mené à notre hypothèse : **la matriptase clive les membres de la famille APP et altère la production de peptide A $\beta$ .**

Nous nous sommes donc fixé plusieurs objectifs :

- 1) Confirmer l'expression de la matriptase dans le cerveau humain.
- 2) Confirmer qu'une interaction est possible entre la matriptase et les membres de la famille APP.
- 3) Evaluer l'impact de la matriptase sur les membres de la famille APP ainsi que la production de peptide A $\beta$ .

### **Article 1. Étude de l'interaction de la matriptase sur le clivage d'APP et ses conséquences sur la production de peptide A $\beta$ .**

Dans cet article nous caractériserons l'expression de la matriptase dans le cerveau humain, et nous étudierons le clivage de la protéine APP par la matriptase et l'impact sur la production de peptide A $\beta$ .

### **Article 2. Étude de l'interaction de la matriptase sur le clivage des APLP et les conséquences sur la dimérisation des APLP**

Dans cet article nous étudierons le clivage des protéines APLP par la matriptase et l'impact sur les interactions dimériques des APLP.

### 3. ARTICLE 1

#### *Processing of the Amyloid Precursor Protein by the type II transmembrane serine protease matriptase*

**Auteurs de l'article:** Erwan Lanchec, Antoine Désilets, François Béliveau, Anthony Flamier, Shaimaa Mahmoud, Gilbert Bernier, Denis Gris, Richard Leduc et Christine Lavoie

**Statut de l'article:** publié, Lanchec, E., Désilets, A., Béliveau, F., Flamier, A., Mahmoud, S., Bernier, G., Gris, D., Leduc, R., and Lavoie, C. (2017) *The type II transmembrane serine protease matriptase cleaves the amyloid precursor protein and reduces its processing to  $\beta$ -amyloid peptide*. J. Biol. Chem. 292, 20669–20682

**Avant-propos:** La matriptase étant initialement connu pour être exprimée exclusivement dans les cellules épithéliales nous avons tout d'abord voulu valider son expression dans le cerveau humain, par la suite, confirmer qu'une interaction entre la matriptase et APP était possible puis enfin déterminer l'effet de la matriptase sur la biosynthèse d'APP et la production de peptide A $\beta$ . E.L. a conçu l'étude, planifié et réalisé la plupart des expériences, collecté et analysé les données, fait toutes les figures et rédigé le manuscrit. A.D. et F.B., ont effectué des expériences, fourni des conseils expérimentaux et révisé le manuscrit. AF, GB, SM, DG, ont effectué des expériences et révisé le manuscrit. C.L. et R.L. ont conçu l'étude, apporté des conseils, participé à l'interprétation des données et révisé le manuscrit.

**Résumé :** Des études récentes ont indiqué que de nombreuses protéases, autres que les  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ -sécrétases canoniques, clivent la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) et modulent la production de A $\beta$ . De plus, des isoformes spécifiques de l'APP contiennent des domaines d'inhibiteur de protéase Kunitz (KPI), connus pour réguler l'activité protéolytique des protéases à sérine. Cela nous a amenés à étudier le rôle de la matriptase, un membre de la famille des protéases à sérine transmembranaires de type II, dans le métabolisme d'APP. En utilisant la qRT-PCR, nous avons détecté l'ARNm de la matriptase dans différentes régions du cerveau humain, avec un enrichissement dans les neurones. Les données d'ARN-seq du cortex préfrontal dorsolatéral humain ont également montré des taux relativement élevés d'ARNm de la matriptase chez les sujets jeunes, tandis que des taux inférieurs étaient détectés chez les sujets âgés. Nous démontrons que la matriptase et l'APP interagissent directement et que l'APP est

clivée *in vitro* et *in cellulo* par la matriptase à un résidu arginine spécifique (position 102). La mutagenèse dirigée de ce site de clivage (Arg à Ala) a aboli le clivage d'APP par la matriptase. De plus, nous avons observé la forme soluble d'APP endogène clivée par la matriptase dans les cellules SH-SY5Y et que ce clivage a réduit de manière significative la production d'A $\beta$ 40. Cette étude identifie la matriptase comme une nouvelle enzyme de clivage de l'APP qui pourrait avoir des conséquences importantes sur le profil de biosynthétique de A $\beta$  dans la pathologie de la maladie d'Alzheimer.



## **Processing of the Amyloid Precursor Protein by the type II transmembrane serine protease matriptase**

**Erwan Lanchec<sup>1</sup>, Antoine Désilets<sup>1</sup>, François Béliveau<sup>1</sup>, Anthony Flamier<sup>2</sup>, Shaimaa Mahmoud<sup>3</sup>, Gilbert Bernier<sup>2,4</sup>, Denis Gris<sup>3</sup>, Richard Leduc<sup>1,5</sup> and Christine Lavoie<sup>1,5</sup>**

<sup>1</sup>Department of Pharmacology-Physiology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada J1H5N4

<sup>2</sup> Stem Cell and Developmental Biology Laboratory, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, 5415 Boul. l'Assomption, Montréal, Canada, H1T 2M4.

<sup>3</sup>Department of pediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada J1H5N4

<sup>4</sup> Department of Neurosciences, Université de Montréal, Montréal, Canada

Running title: *APP processing by matriptase*

<sup>5</sup> Both authors should be considered as corresponding authors.

**Keywords:** Alzheimer Disease, Amyloid Precursor Protein (APP), amyloid-beta (AB), Extracellular Matrix protein, serine protease, enzyme processing, matriptase, *ST14*, brain.

## ABSTRACT

Recent studies have reported that many proteases, other than the canonical  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases, cleave the amyloid precursor protein (APP) and modulate A $\beta$  production. Moreover, specific isoforms of APP contain Kunitz protease inhibitor (KPI) domains, known to regulate the proteolytic activity of serine proteases. This led us to investigate the role of matriptase, a member of the type II transmembrane serine protease family, in APP processing. Using qRT-PCR, we detected matriptase mRNA in different regions of human brain, with an enrichment in neurons. RNA-seq data of human dorsolateral prefrontal cortex also showed relatively high levels of matriptase RNA in young individuals while lower levels were detected in aged individuals. We demonstrate that matriptase and APP directly interact, and that APP is cleaved *in vitro* and *in cellulo* by matriptase at a specific arginine residue (position 102). Site-directed mutagenesis of this cleavage site (Arg to Ala) abolished APP processing by matriptase. Moreover, we observed that a soluble, shed form of matriptase cleaved endogenous APP in SH-SY5Y cells and that this cleavage significantly reduced APP processing into A $\beta$ 40. This study identifies matriptase as a novel APP cleaving enzyme that could have important consequences on the biosynthetic profile of A $\beta$  and in Alzheimer's disease pathology.

## INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is characterized by a progressive degeneration of neurons, which results in cognitive disturbances. One of the main hallmarks found in the brains of AD patients is the presence of amyloid plaques, mainly composed of the amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) peptide generated through processing of the Amyloid Precursor Protein (APP) (1). There are different isoforms of APP, the major ones in the brain being APP770, APP751 and APP695 (2). These isoforms differ by the presence of an OX-2 domain of 19 amino acids, which has similarities with the OX-2 antigen of lymphoid cells, and of a Kunitz protease inhibitory domain (KPI) of 56 amino acids, known for its ability to inhibit serine proteases (2–4). The longest isoform, APP770, contains both KPI and OX-2 domains while APP751 only contains the KPI domain. In contrast, the shortest and neuronal specific isoform, APP695, lacks both KPI and OX-2 domains. In AD, there is an increase of APP770 and APP751 mRNA, but no increase of APP695 mRNA (5). It has been suggested that this increased expression of APP mRNA

containing the KPI domain could play an important role in protecting the protein from proteolysis (6).

The three APP isoforms undergo proteolytic cleavage by several compartmentalized secretases (1). In the amyloidogenic pathway, APP is initially processed by  $\beta$ -secretase to produce a soluble secreted form of APP (sAPP $\beta$ ) and a C-terminal fragment ( $\beta$ -CTF). The subsequent cleavage of  $\beta$ -CTF by  $\gamma$ -secretase yields the A $\beta$  peptide and the amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). In the non-amyloidogenic pathway, APP is first cleaved by  $\alpha$ -secretase within the A $\beta$  sequence to generate the soluble secreted sAPP $\alpha$  fragment and the membrane-tethered  $\alpha$ -CTF. This is followed by  $\gamma$ -secretase cleavage of  $\alpha$ -CTF, resulting in release of the P3 peptide and AICD. Many other enzymes are capable of proteolytically processing APP, for example,  $\beta$ 2-secretase (also called  $\theta$ -secretase) cleaves APP within the A $\beta$  peptide, thus preventing A $\beta$  peptide production (7). Also, serine proteases such as high temperature requirement A (htrA) 1 and 2, contribute to APP and A $\beta$  degradation (8, 9). Therefore, APP processing proteases are the subject of an increasing number of studies related to AD.

Within the extracellular space in vertebrates, several proteases act as essential modulators of development and tissue remodeling (10). One of these, matriptase, is a member of the type II transmembrane serine protease family (TTSP) that is encoded by the suppression of tumorigenicity-14 (*ST14*) gene (11). Matriptase is mostly expressed in epithelial cells (12) and involved in development and maintenance of epithelial barrier integrity, such as in the skin and gut (11). This protease is a cell surface glycoprotein that undergoes catalytic autoactivation and is released from the cell surface as a soluble, shed form to the pericellular environment (13). Indeed, matriptase had initially been identified in the culture medium of breast cancer cells and detected in human milk (12, 14, 15). This shed form of matriptase can thus interact with proteins located at the cell surface or in extracellular matrix. Numerous matriptase substrates have been identified, including hepatocyte growth factor (pro-HGF) (16), prostasin (17), urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA) (18), protease activated receptor 2 (PAR-2) (18) and the adhesion molecule EpCAM (19). The serine protease catalytic activity of matriptase is physiologically controlled by interaction with hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 and 2 (HAI-1 and HAI-2) through their KPI domain (20). This regulation is essential for proper function of matriptase in adult and embryonic tissues (12, 21).

Although matriptase was originally described as solely expressed in epithelial cells, it was shown that loss of inhibition of matriptase disrupts neural tube closure in mice (21),

suggesting that it plays a role in neurogenesis. A recent report also demonstrated that matriptase is expressed in mouse neural progenitor cells and promotes cell migration and neuron differentiation (22), while another study revealed the presence of matriptase in human glioblastoma multiform cells where it regulates the neuronal channel ASIC1 (23). Moreover, a member of the TTSP family, matriptase-2 almost exclusively expressed in hepatocytes, was shown to alter APP cleavage either indirectly through the activation of the metalloprotease Meprin- $\beta$ , which cleaves APP695 (24) or directly through an interaction with the KPI domain of APP770, which reportedly inhibits matriptase-2 enzymatic activity and protects APP from being processed by this enzyme (25).

Together, these reports led us to investigate whether matriptase is also an APP cleaving enzyme. Here we show that matriptase is expressed in human brain and neuronal tissues and that the enzyme directly interacts with and cleaves the three APP isoforms at a specific residue in their ectodomains. Furthermore, exogenous addition of matriptase alters A $\beta$  production in neuronal SH-SY5Y cells. These events can have important consequences to the overall processing profile of APP in normal conditions as well as in AD.

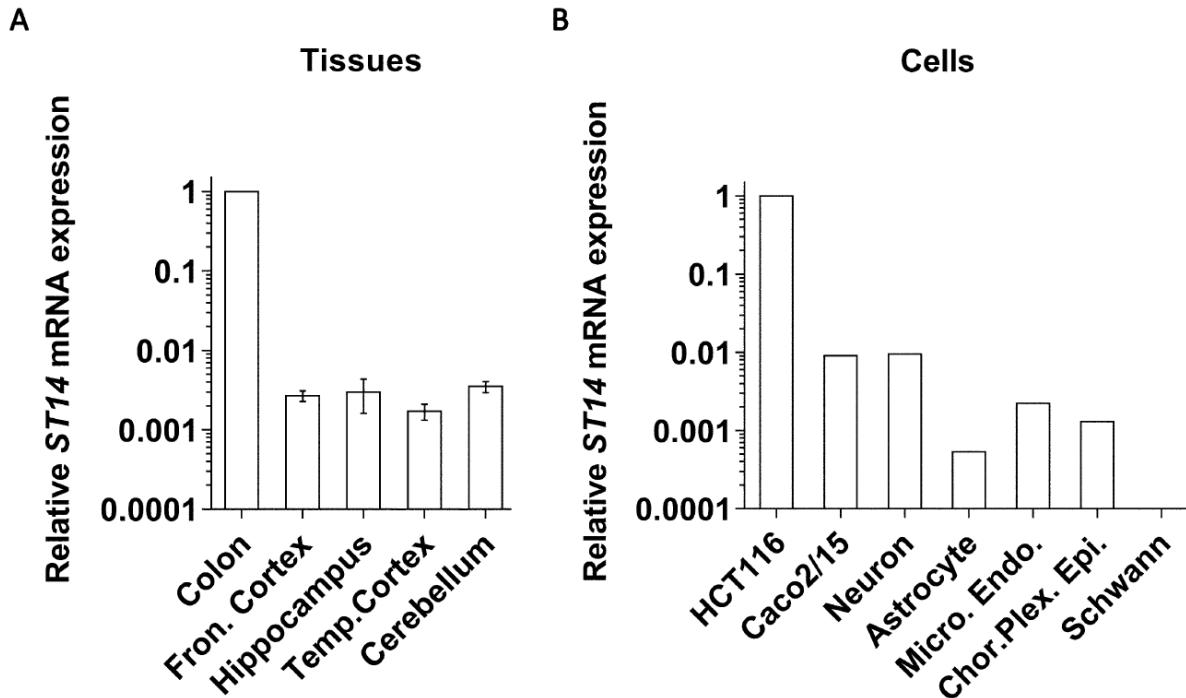
## RESULTS

### *Matriptase is expressed in the human brain.*

To investigate matriptase expression in the human brain, RT-qPCR analysis was performed on post-mortem human brain tissues (mean age at death was  $73.8 \pm 12.2$  years) (Fig. 1A). mRNA levels of matriptase (*ST14* gene) were measured in human frontal cortex, hippocampus, temporal cortex and cerebellum tissue. Given that matriptase expression in epithelial cells of intestinal and especially of colon tissue is high (26), the level of matriptase mRNA in the brain region were expressed relative to its expression in the colon. Matriptase transcripts were clearly detectable in the frontal cortex, hippocampus, temporal cortex and cerebellum with no significant difference between the regions tested but at much lower levels than in the colon tissue (Fig. 1A).

To ascertain in which cells of the human nervous system matriptase is expressed, RT-qPCR was next performed on total human mRNA from different cell types (Fig. 1B). Levels of *ST14* transcripts in these cells were expressed relative to those of human colon carcinoma cells HCT116, (27). Matriptase mRNA was detected in neurons, astrocytes, microvascular endothelial cells and choroid plexus epithelial cells while no matriptase mRNA was detected in

Schwann cells. Interestingly, the mRNA level in neurons was similar to that for human epithelial colorectal adenocarcinoma Caco-2/15 cells. Together, these results reveal matriptase expression in different cell types of the human brain and are in agreement with previous data obtained from mice brain (22).

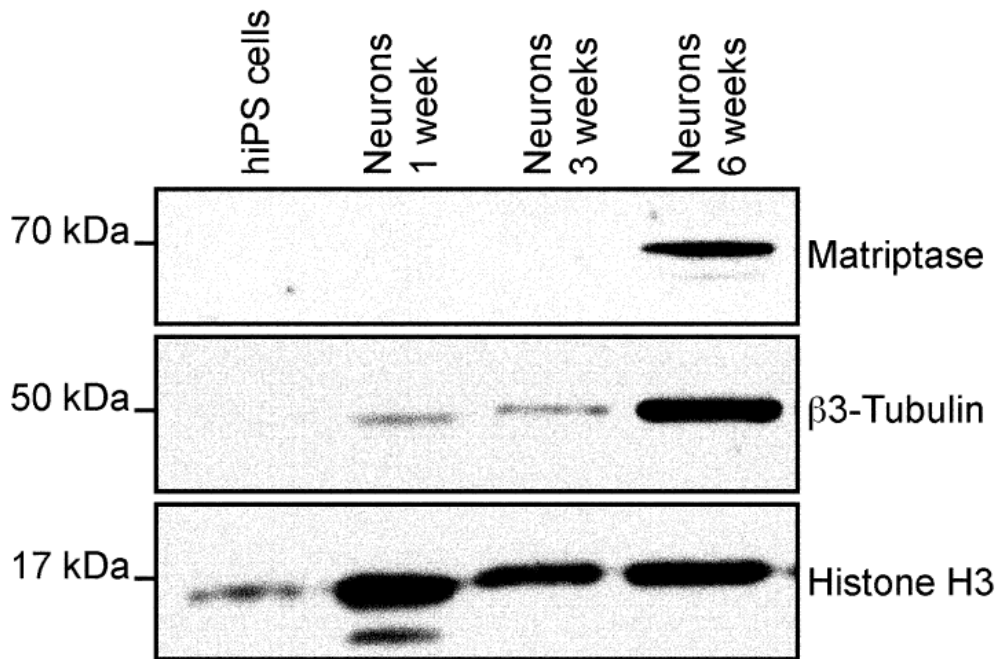


**FIGURE 1. Matriptase (*ST14*) mRNA relative expression in human brains and nervous system cells.**

(A) Levels of *ST14* mRNA were analyzed in the human frontal cortex (n=18), temporal cortex (n=8), hippocampus (n=5) and cerebellum (n=7) and expressed relative to that in the human colon tissue (n=3). The difference between the different brain regions was not significant (student's t-test,  $p > 0.05$ ). (B) The levels of *ST14* mRNA were analyzed in human neurons, astrocytes, microvascular endothelial cells, choroid plexus epithelial cells, Schwann cells and epithelial colorectal adenocarcinoma Caco-2/15 cells and expressed relative to human colon carcinoma HCT116 cells (triplicate analysis were performed on each samples).

Since matriptase was shown to be expressed in mouse differentiating neural progenitor cells (22), we used human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) at different stages of neuronal differentiation (0, 1, 3 and 6 weeks) to analyze matriptase protein expression (Fig. 1C). From the pluripotent state (hiPSCs) to up to 3 weeks, matriptase is not detected, but a 70 kDa immunoreactive band was detected after 6 weeks of neuronal differentiation. Neuronal differentiation was confirmed by validating the expression of the neuronal markers GABA, vGLUT, NeuN and  $\beta$ 3-Tubulin by immunofluorescence (Supplemental Fig. S1). The expression of matriptase in differentiated hiPSCs are in line with its detection in mice neural progenitor cells (22).

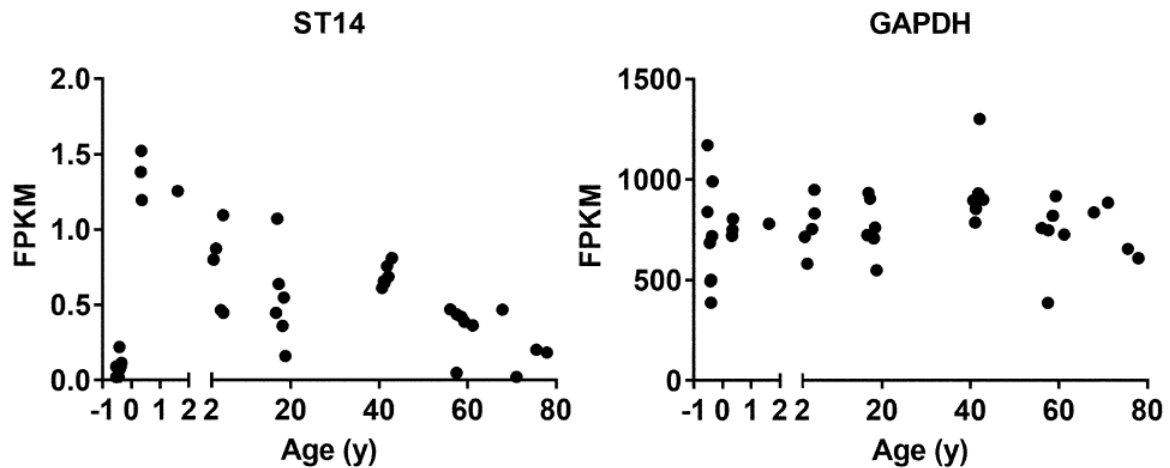
C



**FIGURE 1. Matriptase (*ST14*) mRNA relative expression in human brains and nervous system cells.** (C) Expression of matriptase (immunoblot) at different stages of neuronal differentiation (0, 1, 3 and 6 weeks) of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs).  $\beta$ 3-Tubulin was used as neuronal marker and Histone H3 as loading control.

On the basis of matriptase expression in mice brain during development (21, 22), we investigated its ontogeny in the developing human brain. Publicly available RNA sequencing (RNA-Seq) datasets of human dorsolateral prefrontal cortex (DLPC) from fetus, newborns, children, adults and elderly subjects were retrieved for analysis (28) (Fig. 1D). Very low levels of matriptase RNA were detected *in utero* but much higher levels were found soon after birth. Furthermore, while relatively high levels of matriptase mRNA were found in young brains (age <20 years), they were significantly lower in brains of older individuals with a constant decrease over lifetime. Interestingly, these data show a statistically significant negative correlation between age groups (starting after birth) and matriptase RNA levels ( $p < 0.001$ ), whereas no correlation was observed for the housekeeping gene GAPDH. Taken together, these results confirm matriptase expression in the human brain and highlight the temporal and spatial modulation of its expression through lifetime.

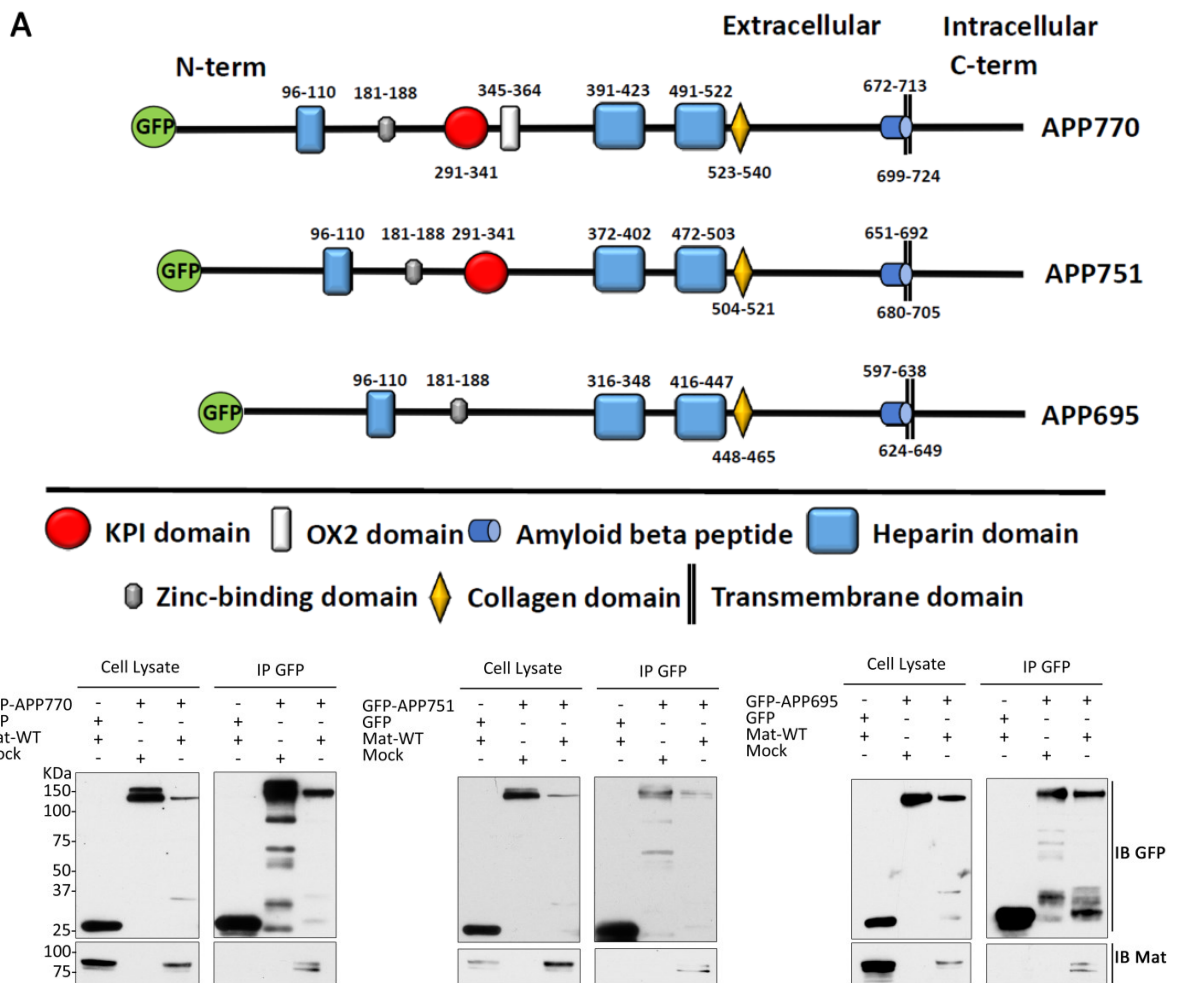
D



**FIGURE 1. Matriptase (*ST14*) mRNA relative expression in human brains and nervous system cells.** (D) Expression levels of *ST14* and *GAPDH* mRNAs across development in the dorsolateral prefrontal cortex (DLPC), as measured by fragments per kilobase of exon per million fragments mapped (FPKM) value. Each dot represents data from an individual brain. Negative correlation between ages after birth and *ST14* was significant (Spearman's correlation coefficient ( $r = -0.73$ ,  $p < 0.001$ ) ( $n=39$ )).

#### *Matriptase directly interacts with APP*

To investigate whether matriptase can interact with the three major APP isoforms, immunoprecipitations were performed on HEK293 cells transfected with wild-type (WT) matriptase together with GFP-tagged APP770, APP751, APP695 or GFP (Fig. 2A). Matriptase co-immunoprecipitated with GFP-APP770, 751 and 695 but not with GFP alone (Fig. 2B), suggesting that matriptase interacts with all three APP isoforms. Since matriptase associated with GFP-APP695, we conclude that the KPI domain found in isoforms APP770 and APP751 is not required for interaction with the enzyme.

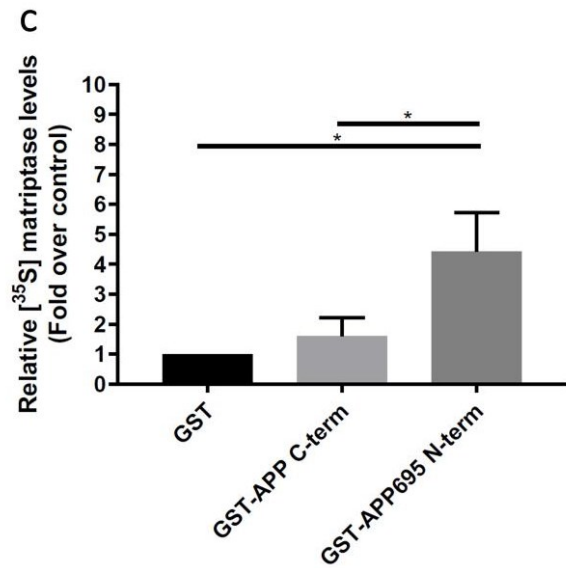
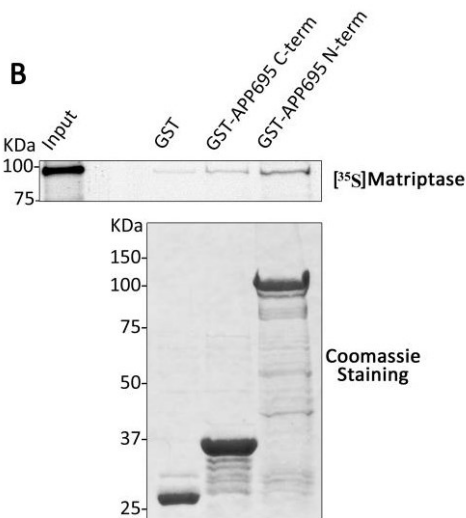


**FIGURE 2. Matriptase interacts with APP770, APP751 and APP695.** (A) Schematic representation of the GFP-tagged isoforms of APP. The structural elements of APP are depicted, including the heparin, Kunitz protease inhibitory (KPI), OX-2, zinc-binding, collagen, amyloid beta and transmembrane domains. (B) Lysate of HEK293 cells transfected with matriptase and GFP-tagged APP770 (left panel), APP751 (middle panel), APP695 (right panel) or GFP were immunoprecipitated with GFP-Trap beads and then immunoblotted with anti-matriptase or anti-GFP antibodies to detect matriptase and APP isoforms, respectively (n=3 for each APP isoforms).

GST pull-down assays were next used to verify the *in vitro* interaction between matriptase and the extracellular region of APP695 (GST-APP695 N-term) and/or the cytoplasmic region of APP695 (GST-APP695 C-term) (Fig. 3A). [35S]-labeled *in vitro*-translated matriptase co-precipitated with GST-APP695 N-term but very weakly with GST-APP695 C-term or GST alone (Fig. 3B). Densitometric analysis statistically supports the difference between GST and GST-APP695 N-term and between GST-APP695-C-term and GST-APP695 N-term ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3C). These results indicate that matriptase interacts directly and predominantly with the N-terminal ectodomain of APP695.



A

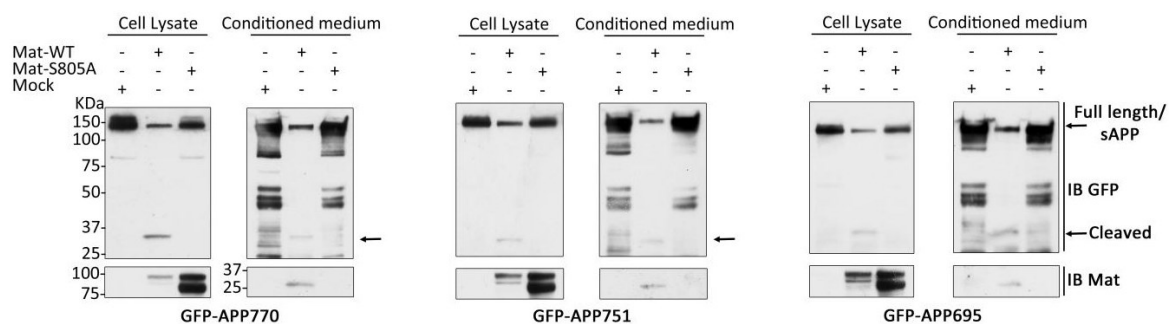


**FIGURE 3. *In vitro* interaction of matriptase with the ectodomain of APP695.** (A) Schematic representation of the GST-tagged APP695 deletion mutants used to determine the matriptase binding domain. (B) APP695 mutants and GST protein (10  $\mu$ g) were immobilized on glutathione beads and incubated with *in vitro* translated <sup>35</sup>S-labeled matriptase. Bound proteins were separated by SDS-PAGE and detected by autoradiography. GST proteins were detected with Coomassie blue staining. Input = 2.5% of the total *in vitro* translated product (n=6). (C) A Kruskal-Wallis test on the densitometric analysis of Fig. 3B was applied. There is a statistical difference between GST alone and GST-APP695 N-term but also between GST-APP695 C-term and GST-APP695 N-term ( $p < 0.05$ ).

*Matriptase cleaves APP*

When performing immunoprecipitation with GFP-tagged APP and matriptase, we detected a GFP-APP fragment of 35 kDa in cell lysates (Fig. 2B), suggesting cleavage of APP by matriptase. This 35 kDa fragment would correspond to the GFP tag (25 kDa) and a portion of the APP extracellular N-terminus (10 kDa). To confirm the role of matriptase in the cleavage of APP and the formation of this APP fragment, HEK293 cells were transfected with GFP-tagged APP770, APP751 and APP695 together with WT matriptase or a catalytically inactive matriptase mutant S805A, where the catalytic serine of the active site is replaced with alanine (29) (Fig. 4). Given that the cleavage is expected to occur on the extracellular domain of APP, we also attempted to detect the presence of APP fragments in the culture medium. The GFP-tagged APP fragment of 35 kDa was detected in both cell lysates and conditioned medium of cells transfected with WT matriptase, but not with cells transfected with matriptase S805A, for all three APP isoforms (Fig. 4A). In concordance, the levels of GFP-tagged full-length APP (band at 130-150 kDa in cell lysates) or soluble APP (band at 130-150 kDa in medium) were reduced in cells expressing WT matriptase compared to control cells or cells expressing the catalytically inactive matriptase suggesting conversion of the precursor form into smaller fragments (Fig. 4A). Moreover, no cleavage of GFP-APP695 was observed when HEK293 cells were transfected with matriptase and HAI-1, the physiological inhibitor of matriptase (Supplemental Fig. S2) or with matriptase-2 (TMPRSS6), a close member of the matriptase subfamily (Supplemental Fig. S3). Moreover, only the extracellular region of APP is involved in matriptase processing event since a chimeric construct in which the transmembrane and cytoplasmic domains of APP695 (residues 624-695) was replaced with an equivalent domain of the unrelated type I membrane-bound protein LRP10 (residues 441-713) was also cleaved (Supplemental Fig. S4B). These results support the exclusive role of the extracellular domain of APP in its processing by matriptase.

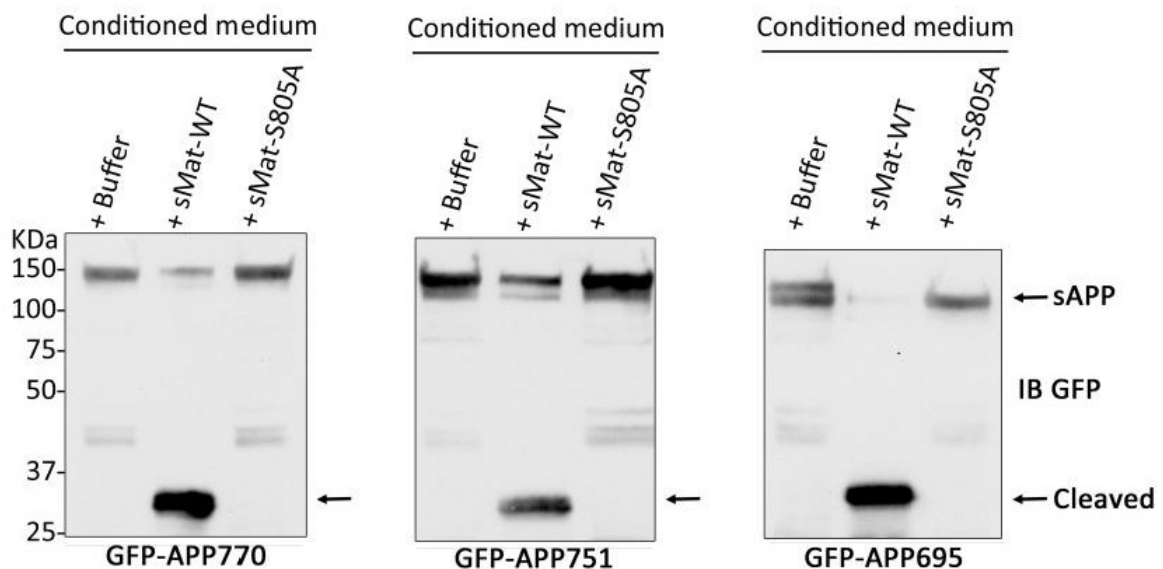
**A**



**FIGURE 4. Matriptase cleaves APP770, APP751 and APP695 *in cellulo* and *in vitro*.** (A) HEK293 cells were transfected with WT matriptase, a catalytically inactive matriptase mutant (S805A) or empty vector (mock) together with GFP-tagged APP770 (left panel), APP751 (middle panel), APP695 (right panel). Lysates and conditioned media of these cells were immunoblotted with anti-matriptase or anti-GFP antibody to detect matriptase, APP isoforms and APP fragments (n=3 for each isoform). Note the GFP-tagged APP fragment (cleaved) of 35 kDa in cell lysate and medium (arrow).

Given that active matriptase exists as a membrane-bound as well as a soluble shed entity (30), we next investigated whether an active soluble matriptase form could be involved in APP cleavage. Purified soluble matriptase or inactive S805A forms were exogenously added to the culture medium of HEK293 cells overexpressing GFP-tagged APP770, APP751 or APP695. A GFP-tagged APP fragment of 35 kDa was detected in the conditioned medium of all cells incubated with recombinant WT matriptase but not with matriptase S805A (Fig. 4B). Concentration-dependent curves indicated that the cleavage of GFP-APP695 occurs at a concentration as low as 1 nM of soluble matriptase (Supplemental Fig. S5). These results suggest that soluble active matriptase can cleave APP isoforms in the pericellular space.

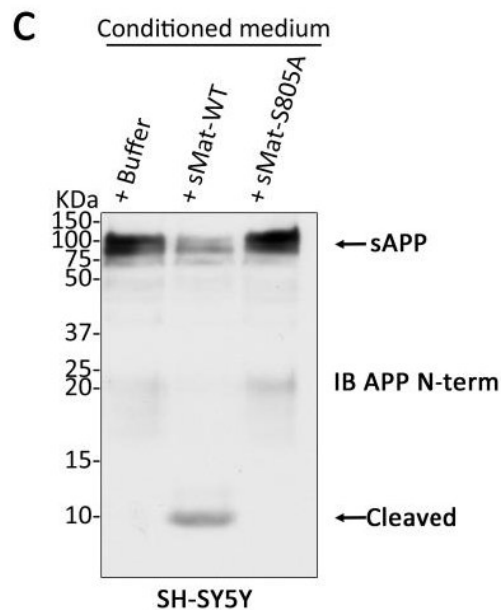
**B**



**FIGURE 4. Matriptase cleaves APP770, APP751 and APP695 *in cellulo* and *in vitro*.** (B) HEK293 cells transfected GFP-tagged APP770 (left panel), APP751 (middle panel), APP695 (right panel) were incubated without (buffer) or with 5 nM of recombinant WT matriptase (sMat-WT) or catalytically inactive matriptase mutant (sMat-S805A). Conditioned media were immunoblotted as described in (A)

The physiological relevance of APP processing by matriptase was next analyzed with the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line which expresses endogenous APP695, APP751 and APP770 (31) but not matriptase (data not shown). SH-SY5Y cells were incubated with

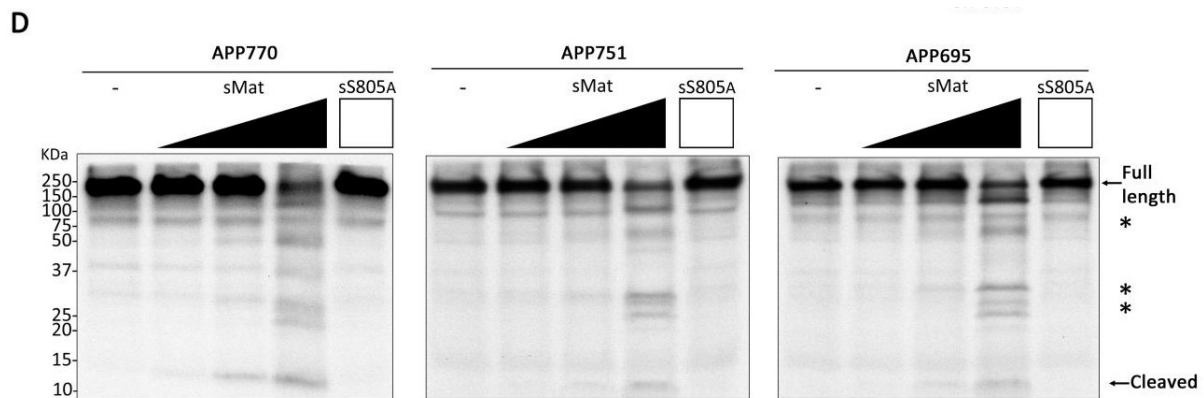
exogenous soluble WT matriptase or matriptase S805A, as described above (Fig. 4C). Interestingly, a 10 kDa APP fragment was detected in the conditioned medium by immunoblot using an antibody against the N-terminus of APP when cells were incubated with WT matriptase but not with the inactive recombinant matriptase S805A. This 10 kDa fragment would correspond to the portion of the APP extracellular N-terminus fused to GFP (25 kDa) to form the 35 kDa fragment detected in the previous assays. This result confirms that soluble matriptase can cleave endogenous APP on SH-SY5Y cells.



**FIGURE 4. Matriptase cleaves APP770, APP751 and APP695 *in cellulo* and *in vitro*.** (C) SH-SY5Y cells expressing endogenous APP were incubated without (buffer) or with 5 nM of recombinant WT matriptase (sMat-WT) or catalytically inactive matriptase mutant (sMat-S805A). Conditioned media were immunoblotted with anti-APP N-terminal antibody (22C11) to detect APP and APP fragments in the medium (n=3). Note the APP fragment (cleaved) of 10 kDa.

To determine whether APP cleavage is due to a direct action of matriptase on APP and not from an indirect action of matriptase on another APP-cleaving enzyme, *in vitro* cleavage assays were performed with <sup>35</sup>S-labeled *in vitro*-translated APP770, APP751 and APP695 and purified soluble WT matriptase or matriptase S805A (Fig. 4D). After an incubation with increasing concentration of purified soluble WT matriptase for 1h at 37°C, a reduction in the amount of full-length APP isoforms and an increased amount of APP fragments of around 50 kDa, 27 kDa, 20 kDa and 10 kDa were detected by autoradiography. The higher molecular weight forms may correspond to intermediate processing fragments but the 10 kDa fragment would correspond to the N-terminal APP fragment described in Fig. 4C. In contrast, no APP fragments were detected in the presence of inactive matriptase S805A (Fig. 4D). Together, these

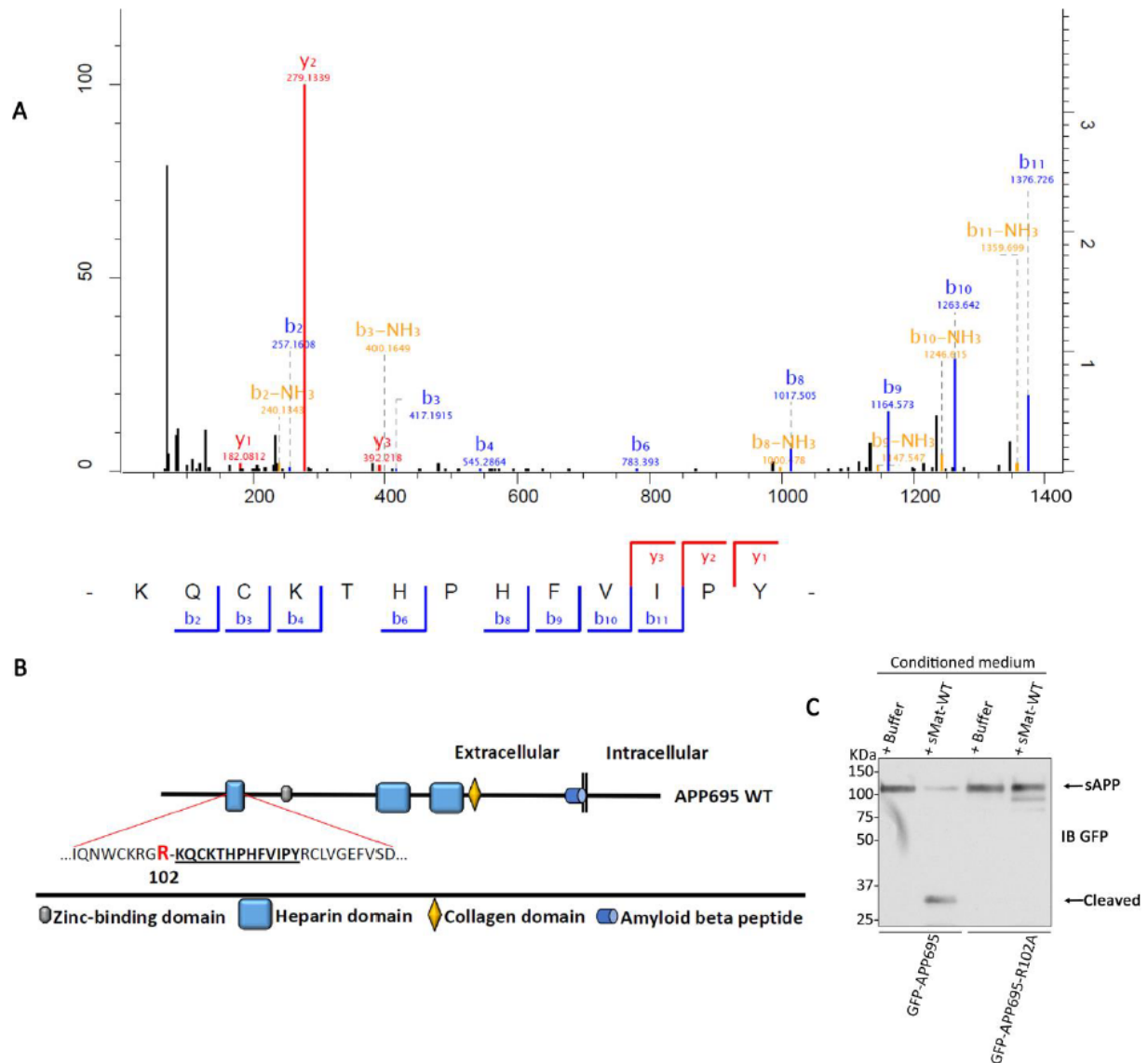
results suggest that matriptase directly cleaves the different APP isoforms and is not inhibited by the KPI domain of APP.



**FIGURE 4. Matriptase cleaves APP770, APP751 and APP695 *in cellulo* and *in vitro*.** (D) *In vitro* translated 35S labelled APP770 (left panel), APP751 (middle panel) and APP695 (right panel) were incubated with different concentrations (0, 1, 10, 100 nM) of recombinant WT matriptase (sMat-WT) or 100 nM of catalytically inactive matriptase mutant (sMat-S805A) for 1 hr at 37°C. Reaction products were separated by SDS-PAGE and detected by autoradiography (n=3). Note the APP fragment (cleaved) of 10 kDa (arrow) and other higher molecular weight fragments (asterisks) in the presence of sMat-WT.

#### *Identification of the precise matriptase cleavage site on APP*

To identify the precise matriptase cleavage site on the APP extracellular domain, mass spectrometry (MS) analysis was performed on the APP fragments generated following the *in vitro* incubation of purified GST-APP695 N-terminus with or without soluble recombinant WT matriptase. Isolated GST-APP695 fragments were digested with chymotrypsin to produce several overlapping peptides and analysed by HPLC coupled to an Orbitrap MS and compared to purified GST-APP695 N-terminus alone (Fig. 5A). A main cleavage site for matriptase was identified at Arg102 located on the first heparin domain of APP695 (Fig. 5B). This cleavage site is conserved in the different APP isoforms and would yield N-terminal fragment with a predicted molecular weight of 12 kDa, consistent with the low MW (10kDa) APP fragment detected by immunoblot and autoradiography when APP695, APP751 and APP770 were incubated with matriptase (see Fig. 4). To confirm this cleavage site, Arg102 was mutated to Ala (R102A) in GFP-tagged APP695. HEK293 cells expressing either GFP-tagged APP695 WT or R102A were incubated for 16 h with purified soluble WT matriptase (Fig. 5C). Expressing the R102A mutant abolished the formation of the 35 kDa GFP-APP695 fragment indicating that this mutant is resistant to cleavage by matriptase. Together, these results indicate that Arg102 is the main matriptase cleavage site in the ectodomain of APP.

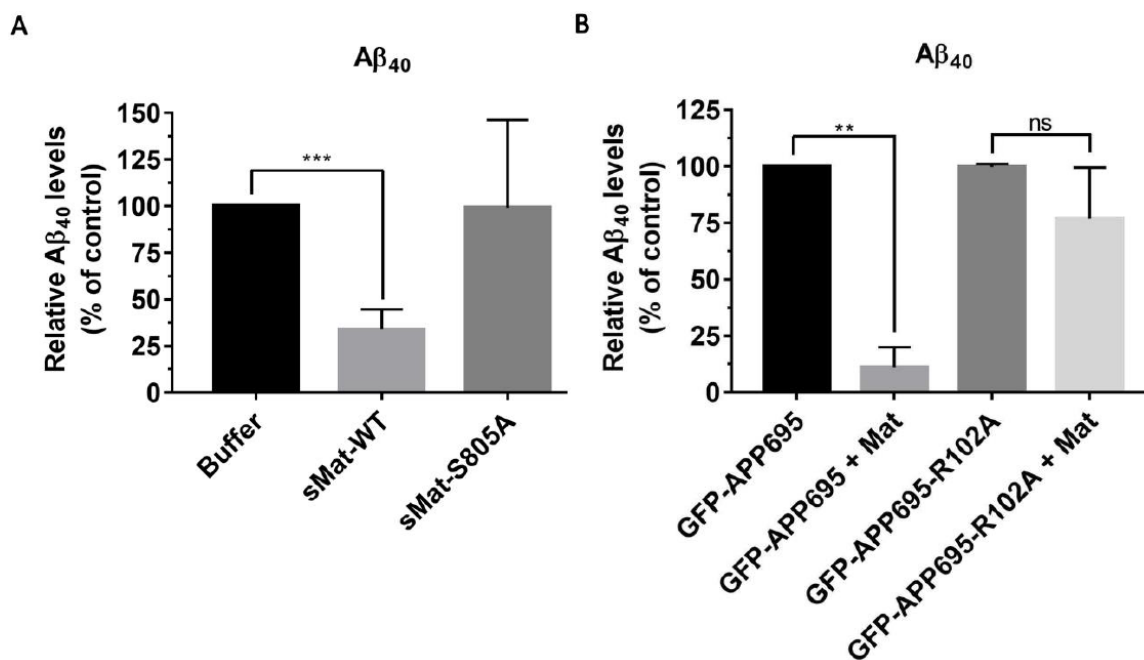


**FIGURE 5. Matriptase cleaves APP at Arginine 102.** (A) Tandem mass spectrometry spectra from peptide ion trap CID fragmentation for the peptide KQCKT...IPY identified after *in vitro* digestion and LC-MS/MS analysis of GST-APP695 ectodomain fragments generated by matriptase cleavage. Shown is a representative annotated MS/MS fragmentation spectrum with the identified matched amino terminus-containing ions (b ions) in blue and the carboxyl terminus-containing ions (y ions) in red. Peptide intensities were summarized per amino acid residue and plotted in relation to each other. The detected peptide sequences indicate that Arg102 is the main cleavage site. (B) Schematic representation of the position of the Arg cleaved by matriptase in the ectodomain of APP695 tagged to GST that was used to determine matriptase cleavage site in (A). (C) HEK293 cells transfected with GFP-tagged APP695 wild-type or in which Arg102 was mutated to Ala (APP695-R102A) were incubated without (buffer) or with 5 nM of recombinant WT matriptase (sMat-WT). Conditioned media were immunoblotted with anti-GFP antibody to detect soluble APP (sAPP) and APP fragments (n=3). Note the absence of the GFP-tagged APP fragment (cleaved) of 35 kDa in the GFP-APP695-R102A lanes.

### *Matriptase processing of APP alters A $\beta$ 40 production*

Given that the cleavage of APP by proteases has been previously shown to result in an alteration of A $\beta$  peptide formation (32, 33), we next determined whether matriptase cleavage

has an effect on the endogenous APP processing pathway leading to A $\beta$  formation (Fig. 6). SH-SY5Y cells were incubated with or without exogenous, purified soluble WT matriptase or matriptase S805A for 36 h and ELISA assays were performed on the culture media to specifically quantify the accumulation of A $\beta$ 40 peptide. A 72% decrease ( $p < 0.001$ ) in A $\beta$ 40 levels was observed in cell incubated with WT matriptase compared to control cells (without matriptase) or cells incubated with matriptase S805A (Fig. 6A). These results suggest that matriptase cleavage reduces APP processing into A $\beta$ 40 in SH-SY5Y cells. To determine whether the alteration of A $\beta$ 40 production involved the Arg102 matriptase cleavage site in APP, A $\beta$ 40 levels were measured in the culture media of HEK293 cells transfected with GFP-tagged APP695 WT or APP695-R102A mutant with or without matriptase (Fig. 6B). As observed in SH-SY5Y incubated with exogenous purified soluble WT matriptase (Fig. 6A), a 90% decrease of A $\beta$ 40 levels ( $p < 0.01$ ) was quantified in HEK293 cells expressing APP695 with matriptase (Fig. 6B). In contrast, the level of A $\beta$ 40 was not altered in cells expressing APP695-R102A with or without matriptase compared to cells expressing APP695 WT without matriptase (Fig. 6B). These results suggest that the cleavage of APP at Arg102 by matriptase affect the processing of APP by secretases in turn to reduce A $\beta$ 40 production.



**FIGURE 6. Matriptase cleavage of APP at Arg102 alters A $\beta$ 40 production.** (A) SH-SY5Y cells were incubated without (buffer) and with 5 nM of recombinant WT matriptase (sMat-WT) or catalytically inactive matriptase mutant (sMat-S805A). Conditioned media were collected after 36 h and A $\beta$ 40 levels were analyzed by ELISA. Results are expressed as means  $\pm$  SD ( $n = 3$ ) and are normalised to the media protein concentration. \*\*\*,  $p < 0.001$ . (B) HEK293 cells transfected with GFP-tagged APP695 wild-type or in which Arg102 was mutated to Ala (APP695-R102A) and without or with

matriptase (Mat). A $\beta$ 40 levels in the condition media were analyzed by ELISA as described in (A). \*\*,  $p < 0.05$ .

## DISCUSSION

Recent advances have reinforced the hypothesis that accumulation of A $\beta$  is the main initiator of Alzheimer's disease (AD). Therefore, identifying factors that influence/regulate APP processing into A $\beta$  is crucial in understanding AD pathogenesis and in designing novel therapeutic strategies. In this study, we have identified matriptase as a novel protease expressed in human brain tissue that cleaves APP in its ectodomain, which causes a significant reduction in the production of A $\beta$ 40. Importantly, this suggests a potential neuroprotective role of matriptase in the APP processing events leading to A $\beta$  production.

Matriptase, one of the best characterized TTSPs, is known to be mostly expressed in epithelial cells where it carries out essential functions in development, differentiation and maintenance of epithelial barrier integrity (27). Interestingly, matriptase has been recently reported to be expressed in non-epithelial cells, more specifically in mice neural stem/progenitor cells and neurons as well as in mice cortex, hippocampus, striatum and subventricular zone. Its expression has also been associated with mice neuronal development, migration and differentiation (21, 22). In this study, we demonstrate for the first time that matriptase mRNA is present in the frontal and temporal cortex, hippocampus and cerebellum of the human brain. The expression levels of matriptase mRNA observed between the different human brain regions tested were similar to those detected in mice brain regions (22). By analysis of whole transcriptome datasets deposited in the European Nucleotide Archive (ENA), we found very low levels of matriptase mRNA in human foetal brains but a sharp increase in levels was observed in the DLPC of young individuals followed by a constant decrease during aging. The DLPC is an area of the brain involved in executive functions that undergoes the greatest amount of post-natal development which lasts until adulthood (34–36). Thus, matriptase expression pattern in this brain area potentially follows a specific temporal pattern during brain development and neurogenesis and may explain why low matriptase mRNA levels were detected in older individuals.

Interestingly, of all brain cells tested, neurons showed the highest level of matriptase mRNA which was similar to that found in human epithelial colorectal adenocarcinoma Caco-2/15 cells, a low invasive colon cancer cell line, but that level was 100 times less than levels found in HCT116 cells, a highly invasive colon cancer cell line. This data indicates that human



neurons express matriptase mRNA and supports the idea that matriptase has important physiological functions in these cells.

Our attempts to detect matriptase protein expression in human brain tissues or neurons from adult/elderly individuals were unsuccessful which may be due to antibody sensitivity, but also because there is a temporal regulation of matriptase expression with transcripts at their highest expression levels soon after birth and significantly lower in brains of older individuals (Fig. 1D). However, we detected matriptase protein expression in hiPSCs after 6 weeks of neuronal differentiation but not in undifferentiated cells. The detection of matriptase in human neuronal cells derived from iPSCs is novel and is in accordance with previous results obtained by others with mice neuronal progenitor cells (22) and by our group in mouse astrocytes (Supplemental Fig. S6). Overall, although matriptase levels may be low and particularly difficult to detect in adult brain tissues, they could be sufficient for physiological relevance. The presence of matriptase in human brain cells could also have pathophysiological effect such as in cancer progression. In many tumors, matriptase RNA/protein levels are up-regulated and there is a positive correlation between matriptase expression and tumor grade (37–40). Additionally, the expression of HAI-1, matriptase's endogenous inhibitor whose expression in the human brain is well documented (41, 42), is often deregulated in human cancer (39). Indeed, overexpression of HAI-1 has been reported to suppress the *in vitro* invasive capability of human glioblastoma cells (41). Therefore, identification of the different proteolytic substrates of matriptase in brain cells will help delineate its basic function in the central nervous system and its implication in various neurological diseases.

We found that matriptase interacts with and cleaves all three major APP isoforms, indicating that the KPI domain found in APP751 and APP770 is not crucial for this interaction and does not inhibit matriptase. These results differ from those reported for matriptase-2 (also named TMPRSS6), a close member of the matriptase subfamily. The intact KPI domain of APP770 and APP751 was shown to be important for the interaction with matriptase-2 and to inhibit its enzymatic activity (25). Taken together, these results may be explained by the differences in the catalytic domain of matriptase and matriptase-2 (45% homology) and in their protein-protein domains of interaction, which are key for their respective activity and substrate specificities (43). Moreover, the amino acid sequence of APP's KPI domain also differs from that of the KPI domain of HAI-1. The canonical active site of HAI-1, which interacts with the second negatively charged binding site in matriptase's catalytic domain, was identified as Arg258 and Arg260 (44). Comparison of the Kunitz sequences of APP770/751 and HAI-1

indicates that Arg258 of HAI-1 is replaced by a proline in the APP Kunitz domain which could significantly hinder its interaction with matriptase's active site.

Matriptase hydrolyzes peptide bonds C-terminal to specific basic amino acids with a clear preference for Arg over Lys in P1 position and basic amino acids in P3 position (18, 43). Accordingly, mass spectrometry analysis identified Arg102 within the sequence KRGR↓KQCK in the first heparin domain of the extracellular region of APP as the main matriptase cleaving site. The three-dimensional structure of residues 18 to 123 of this heparin domain (PDB:1MWP) reveals that Arg102 is well exposed at the surface of the protein and, thus, accessible for cleavage by a protease. To our knowledge, this specific Arg has never been identified as a cleavage site for other proteases. Interestingly, the residues that form the structural network in the heparin domain are conserved between the E1 domain of APP and amyloid precursor-like protein 2 (APLP2) but not APLP1 (45), suggesting that APLP2 may also be a potential matriptase substrate.

Enzymatically active matriptase exists as a membrane bound as well as an extracellular soluble, shed form (46, 47). Consequently, both forms can interact with APP and cleave its ectodomain. Using purified soluble matriptase applied on SH-SY5Y cells (which do not express matriptase), we showed that endogenous APP is cleaved, suggesting that shed matriptase originating either from homologous expressing or adjacent cells can process APP and therefore impact the physiological function of APP. Recent evidence suggests that the ectodomain of APP and its proteolytic fragments are important for its biological role, such as cell growth, cell adhesion and motility, neurite outgrowth and cell survival (48, 49). For example, the first heparin domain in the APP N-terminus, which contains the Arg102 matriptase cleavage site, interacts with the extracellular matrix through heparan sulfate proteoglycans, and is involved in the regulation of neurite outgrowth (50). Moreover, both APP and matriptase activity were reported to be involved in the migration and differentiation of mice neuronal precursor (22, 51). Whether matriptase cleavage alters these different APP functions will need to be elucidated.

N-terminal processing of APP may influence the cleavage efficiency toward A $\beta$  production. In the last few years, many proteases (other than  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretases) have been reported to cleave APP ectodomain and alter A $\beta$  production. These include the matrix metalloproteinase MT5-MMP, referred to as  $\eta$ -secretase, which cleaves APP at residue 504 (APP695 numbering) and releases a long truncated ectodomain (sAPP $\eta$ ) as well as a membrane-bound CTF $\eta$  that is further cleaved by  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretases, releasing A $\eta$  peptides altering neuronal activity and plasticity (52). The asparagine endopeptidase AEP has also been reported

to act as a novel  $\delta$ -secretase by cleaving APP at Asn373 and Asn585 residues, selectively influencing the rate of  $\beta$ -secretase cleavage and promoting A $\beta$  production (33). In a similar way, we showed that matriptase cleaves APP at Arg102 causing a significant decrease (>70%) of A $\beta$ 40 levels, which was completely abolished when Arg102 was replaced by Ala (APP-R102A), indicating that the matriptase specific cleavage affects APP processing by secretases in turn to reduce A $\beta$ 40 production. Interestingly, the matriptase cleavage site is located in a highly flexible loop region (residues 98-105) shown to be important for APP dimerization and processing into A $\beta$  (53, 54). Indeed, biochemical data revealed that addition of a synthetic peptide corresponding to this loop region interferes with APP dimerization and decreases the generation of sAPP $\beta$  and A $\beta$  when added to neuroblastoma SH-SY5Y cells (54), indicating a direct or indirect influence of dimerization on APP processing by  $\beta$ -secretases. On this basis, we propose that matriptase proteolytically cleaves the APP ectodomain, potentially impairing APP dimerization and interaction with secretases, which would reduce the rate of A $\beta$  production.

Despite large-scale efforts to therapeutically target putative disease mechanisms in AD, neuroprotective treatments are still lacking. Presently,  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases are prime therapeutic targets under development, but many concerns have been recently raised as to how effective these particular enzymes are as therapeutic targets (55, 56). Therefore, there is growing consensus that gaining a better understanding of the regulation of APP processing is crucial for identifying new potential therapies to reduce A $\beta$  accumulation and combat AD. Our findings describe a new cleavage of APP by matriptase that reduces the production of A $\beta$  peptide probably by altering the processing by secretases. These observations suggest that matriptase would have a neuroprotective role in controlling the levels of A $\beta$  peptide. Conversely, low levels of matriptase observed in aging brain, as well as impaired matriptase activity or HAI-1 levels, could accelerate the formation of amyloid plaque and the progression of the disease. Our findings highlight a previously unappreciated role of matriptase in human brain and future studies will aim at clarifying its role in physiological and pathophysiological functions of APP.

In conclusion, this study identifies matriptase as a novel APP cleaving protease that may protect against amyloidogenic processing of APP. Consequently, matriptase activity could impact the overall processing profile of APP isoforms in physiological conditions as well as in AD.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### *Antibodies and reagents*

Anti-GFP rabbit polyclonal antibodies (pAbs) were purchased from Clontech Molecular Probes (Eugene, OR, USA), anti-human matriptase pAbs from Bethyl Laboratories (Montgomery, TX), and anti-APP N-terminal 22C11 mAbs from EMD Millipore (Billerica, MA)

### *DNA constructs*

Mammalian expression vectors GFP-APP695 and GST-APP695 C-terminus (residues 647–695) were kindly provided by Dr. Ritva Tikkanen (University Clinic of Frankfurt, Germany). The APP695 fragment containing the N-terminus (residues 20–612) was subcloned in pET41a (Novagen). Recombinant matriptase (residues 596–855) construction used for bacterial expression (pQE30 vector, Qiagen, Mississauga, ON, Canada) and S805A-matriptase-pcDNA3.1 have been described previously (29, 57). Human APP770 was kindly provided by Dr. Christian Haass (Ludwig-Maximilians University Munich, Germany) and APP751 purchased from SinoBiological Inc (BDA, Beijing, P.R. China), and were both subcloned in pcDNA3.1 and PCMV5-GFP. All constructs were sequenced before being used.

### *Cell culture*

HEK293 and Caco-2/15 cells were kindly provided by Dr. Alexandra Newton (University of California, San Diego, CA, USA) and Dr. Jean-Francois Beaulieu (Université de Sherbrooke), respectively. HEK293 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's high glucose medium (Invitrogen) containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA), 2 mM L-glutamine, 50 IU/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin (Wisent, St-Bruno, QC, Canada). HEK293 cells were transfected with Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen), according to the manufacturers' instructions. HCT 116 cells (ATCC CCL-247) were from American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA) were grown in McCoy's 5A medium (Invitrogen) containing 10% FBS and 2 mM L-glutamine, 50 IU/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin. Caco-2/15 cells were grown in EMEM (Invitrogen) with 20% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 50 IU/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin. SH-SY5Y cells were purchased from ATCC (ATCC CRL-2266) and were grown in MEM:Ham's F12 (1:1) (Invitrogen) containing 10% FBS, 2 mM sodium pyruvate (Invitrogen), 2 mM L-glutamine, 50 IU/mL penicillin and 50 µg/ml streptomycin.

### *Co-immunoprecipitation*

HEK293 cells were plated in 60-mm culture dishes and transfected with the indicated constructs. After 48 h, the cells were washed twice with phosphate buffered saline and lysed in 50 mM Tris buffer (pH 7.4) containing 150 mM NaCl, 1% triton x-100, and protease inhibitors for 1 h at 4°C and were then centrifuged at 15,000 g for 20 min. The cleared supernatants were incubated with GFP-Trap®\_A (Chromotek, Germany) overnight at 4 °C and washed with 10 mM Tris/HCl pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.5 mM EDTA buffer three times. Bound immune complexes were boiled in Laemmli sample buffer and analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting.

### *Immunoblotting*

The protein samples were separated on 10% or 16% SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gels and transferred to 0.45 µm diameter pore-size nitrocellulose membranes (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). The membranes were blocked in Tris-buffered saline (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl) containing 0.1% Tween 20 and 5% non-fat dry milk and were incubated with primary antibodies for 1h at room temperature and subsequently incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse IgG for 1h at RT (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and enhanced using a chemiluminescence detection reagent (Pierce Chemical, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

### *Glutathione S-transferase pull-down assays.*

GST fusion proteins were expressed in Escherichia coli BL21 and purified on glutathione-Sepharose 4B beads (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA) according to the manufacturer's instructions. The 35S-labelled *in vitro* translation products of pcDNA3.1-human APP770, APP751, APP695 and matriptase were prepared using the TNT T7 rabbit reticulocyte Quick Coupled Transcription/Translation system (Promega, San Luis Obispo, CA, USA) in the presence of [35S] EasyTag EXPRESS labelling mix (73% Met/22% Cys; 41,000 Ci/mmol, Perkin Elmer). A total of 5-10 mg of purified GST or GST-fusion protein was incubated with the *in vitro* translated products in 20 mM Tris–HCl buffer (pH 7.4) containing 150 mM NaCl, 1% triton x-100, protease inhibitors for 2h at 4°. Beads were washed four times with the same buffer. Bound proteins were eluted with Laemmli buffer, resolved by SDS–PAGE and visualized by autoradiography.

### *In vitro cleavage assays*

The production of WT matriptase (residues 596–855) or S805A were purified as previously described (57). The 35S-labelled *in vitro* translation products of pcDNA3.1-human APP770, APP751, APP695 were prepared as described in the section “Glutathione S-transferase pull-down assays”. Enzymatic assays were performed in a final volume of 100  $\mu$ L in 100 mM Tris-HCl (pH 8.5) containing 500  $\mu$ g/mL BSA. *In vitro* translated 35S labelled APP isoforms (0.5  $\mu$ L) were incubated with 0, 1, 10 and 100 nM of recombinant WT matriptase or 100 nM of inactive matriptase S805A for 1 hour at 37°C. Enzymatic reactions were stopped by the addition of 30  $\mu$ L of Laemmli buffer, resolved by SDS–PAGE and visualized by autoradiography.

#### *Treatment of cells with Recombinant Matriptase*

Culture medium of HEK293 or SH-SY5Y was removed and replaced with 2 mL of serum-free HCELL-100 medium (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) containing different concentrations (0 to 100 nM) of recombinant soluble human WT matriptase or mutant S805A. After a 36h incubation, the conditioned medium was collected and either concentrated with Amicon Ultra Centrifugal filters 3,000 NMWL (Merck Millipore Ltd., T., C., Co Cork IRL) for immunoblotting or directly used for ELISA analysis. Cells were lysed in 50 mM Tris buffer (pH 7.4) containing 150 mM NaCl, 1% triton x-100, and protease inhibitors for 1h at 4°C. Both conditioned medium and cell lysate were boiled in Laemmli sample buffer and analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting.

#### *ELISA quantification of A $\beta$ 40*

For ELISA assays, SH-SY5Y cell were seeded at a density of 2x10<sup>6</sup> cells in 60-mm culture dishes and allowed to grow to >75% confluency. HEK293 cells were seeded at a density of 1.5x10<sup>6</sup> cells in 60-mm culture dishes and transfected as described in "Co-immunoprecipitation". When the cells have reached the desired density, the medium was removed and replaced with conditioned medium containing matriptase WT or S805, as described in the previous section “Treatment of cells with Recombinant Matriptase”. After a 48h incubation, the supernatants were harvested and A $\beta$ 40 levels were quantified using Amyloid beta 40 Human ELISA kit (KHB3481, Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. An Infinite M200 Plate reader (Tecan) was used to detect the signal. The A $\beta$ 40 concentrations were determined by comparison with the standard curve and normalised to total protein concentration in the media.

### *Human brain tissues and human cell total RNA*

Human frontal cortex, temporal, hippocampal and cerebellum samples were obtained from the Douglas Hospital Brain Bank in Montreal, Quebec, Canada. The mean age at death was  $73.8 \pm 12.1$  years. The post-mortem interval was  $22.3 \pm 7.4$  h. Control cases had a clinical diagnosis of non-demented elderly patients. Total RNA from human neuron, astrocyte, microvascular endothelial cell, choroid plexus epithelial cell and Schwann cell were purchased at 3H Biomedical (AB Dag Hammarskjölds väg, Uppsala, Sweden).

### *Tissue RNA isolation and Quantitative real-time RT-PCR*

Total RNA extractions were performed on cell pellets using TRIzol (Invitrogen) with chloroform, following the manufacturer's protocol. The aqueous layer was recovered, mixed with one volume of 70% ethanol and applied directly to a RNeasy Mini Kit column (Qiagen). DNase treatment on the column and total RNA recovery were performed as per the manufacturer's protocol. RNA quality and presence of contaminating genomic DNA was verified as previously described (58). RNA integrity was assessed with an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Reverse transcription was performed on 1.1  $\mu\text{g}$  total RNA with Transcriptor reverse transcriptase, random hexamers, dNTPs (Roche Diagnostics), and 10 units of RNaseOUT (Invitrogen) following the manufacturer's protocol in a total volume of 10  $\mu\text{l}$ . All forward and reverse primers were individually resuspended to 20–100  $\mu\text{M}$  stock solution in Tris- EDTA buffer (IDT) and diluted as a primer pair to 1  $\mu\text{M}$  in RNase DNase-free water (IDT). Real-Time Quantitative PCR (qPCR) reactions were performed in 10  $\mu\text{l}$  in 96-well plates on a CFX-96 thermocycler (BioRad) with 5  $\mu\text{L}$  of 2X iTaq Universal SYBR Green Supermix (BioRad), 10 ng (3  $\mu\text{l}$ ) cDNA, and 200 nM final (2  $\mu\text{l}$ ) primer pair solutions. The following cycling conditions were used: 3 min at 95°C; 50 cycles: 15 secs at 95°C, 30 secs at 60°C, 30 secs at 72°C. Relative expression levels were calculated using the qBASE framework (59) and the housekeeping genes YWHAZ, GAPDH and SDHA for human cDNA. Primer design and validation was evaluated as described elsewhere (58). In every qPCR run, a no-template control was performed for each primer pair and these were consistently negative. All primer sequences are available in Supplemental Table 1.

### *Differentiation of human induced pluripotent stem cells into cortical neurons*

The differentiation protocol was based on a previous study (60). However, the Noggin agonist LDN193189 was used to reduce recombinant Noggin concentration. The hiPS cell line were

dissociated using Accutase (Innovative Cell Technology, San Diego, CA) and plated on growth factor reduced matrigel (Corning) in PeproGrow hES cell media (PeproTech) supplemented with 10  $\mu$ M ROCK inhibitor (Y-27632;10 $\mu$ M, Cayman Chemical). When reaching 70% cell confluency, the media was changed to defined default medium (DDM, (61) supplemented with B27 (1X final), 10 ng/mL Noggin (10 ng/ml, PeproTech,) and 0.5  $\mu$ M LDN193189 (0.5 $\mu$ M; Sigma) supplemented with B27 (1X final), Noggin (10 ng/ml, PeproTech) and LDN193189 (0.5 $\mu$ M; Sigma). The medium was changed every day. After 16 days of differentiation, the medium was changed to DDM/B27 and replenished every day. At day 24, neural progenitors were manually detached from the plate and plated on growth factor reduced matrigel coated plates or chamber slides (LabTek). Five days after the dissociation, half of the medium was changed for Neurobasal A media supplemented with B27 (1X final) and changed again every three days.

#### *Analysis of public RNA-seq datasets*

RNA-seq sequences were obtained from a previously published study on human brain development (28). Briefly, sequences from deep-frozen post-mortem brain tissues from 39 individuals without neurological or psychiatric illnesses were retrieved from the European Nucleotide Archive (ENA; <http://www.ebi.ac.uk/ena>). All samples are from prefrontal cortex (DLPC) gray matter (BA 9/46) spanning from fetal life to the eighth decade of life. Fetal tissue was taken from the prefrontal region, over the dorsal convexity of the frontal lobe just anterior to the temporal pole. Run accession numbers used are listed in Supplemental Table 2. The obtained paired-end reads from RNA-seq datasets were aligned to the human reference genome GRCh37/hg19 using HISAT2 (version 2.03) (62). The number of reads mapping to each gene was calculated with featureCount version 1.4.6.p5 (63) using annotated transcriptome from ENSEMBL ([ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-75/gtf/homo\\_sapiens](ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-75/gtf/homo_sapiens)). Normalization of gene expression was obtained by calculating FPKM (fragments per kilobase of exon per million fragments mapped) values for each RNA-seq sample (Supplemental Table 2).

#### *Mass spectrometry analysis*

GST fusion proteins were expressed in Escherichia coli BL21 and purified on glutathione-Sepharose 4B beads (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA) according to the manufacturer's instructions. Bound proteins were incubated for 2 hours at 37 °C in a volume of 100  $\mu$ L of 100 mM Tris-HCl (pH 8.5) containing or not 100 nM of recombinant soluble WT matriptase. The



supernatant was then collected, lyophilised and suspended in 25  $\mu$ l of 10mM HEPES/KOH (pH7.5). Proteins were reduced with 3.24 mM DTT and alkylated with 13.5 mM iodoacetamide. The urea concentration was lowered to 1M with the addition of 50mM ammonium bicarbonate ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), 1mM  $\text{CaCl}_2$  and digested with chymotrypsin (Thermo scientific, catalog number 90056). Digested samples were desalted with C18 tips (Thermo scientific, catalog number 87764), lyophilised and resuspended in 1% formic acid prior to mass spectrometry analysis. Chymotrypsin digested peptides were separated using a Dionex Ultimate 3000 nanoHPLC system. Ten microliters of sample (a total of 2  $\mu$ g) in 1% (v/v) formic acid was loaded with a constant flow of 4  $\mu$ l/min onto an Acclaim PepMap100 C18 column (0.3 mm id x 5 mm, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA). After trap enrichment peptides were eluted off onto a PepMap C18 nano column (75  $\mu$ m x 50 cm, Dionex Corporation) with a linear gradient of 5–35% solvent B (90% acetonitrile with 0.1% formic acid) over 240 min with a constant flow of 200 nl/min. The HPLC system was coupled to an Orbitrap QExactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific Inc) via an EasySpray source. The spray voltage was set to 2.0 kV and the temperature of the column was set to 40 °C. Full scan MS survey spectra ( $m/z$  350–1600) in profile mode were acquired in the Orbitrap with a resolution of 70,000 after accumulation of 1,000,000 ions. The ten most intense peptide ions from the preview scan in the Orbitrap were fragmented by collision-induced dissociation (normalized collision energy 35% and resolution of 17,500) after the accumulation of 50,000 ions. Maximal filling times were 250 ms for the full scans and 60 ms for the MS/MS scans. Precursor ion charge state screening was enabled and all unassigned charge states as well as singly, seven and eight charged species were rejected. The dynamic exclusion list was restricted to a maximum of 500 entries with a maximum retention period of 40 s and a relative mass window of 10 ppm. The lock mass option was enabled for survey scans to improve mass accuracy. Data were acquired using the Xcalibur software. Data were processed, searched, and quantified using the MaxQuant software package version 1.5.2.8 employing the Human Uniprot database (16/07/2013, 88,354 entries).

#### *Quantification and Bioinformatics Analysis*

The settings used for the MaxQuant analysis were: 5 miscleavages were allowed; Trypsin (K/R not before P) and chymotrypsin (L/F/W/Y not before P) were used; variable modifications included in the analysis were methionine oxidation and protein N-terminal acetylation. A mass tolerance of 7 ppm was used for precursor ions and a tolerance of 20 ppm was used for fragment ions. To achieve reliable identifications, all proteins were accepted based on the criteria that the

number of forward hits in the database was at least 95-fold higher than the number of reverse database hits, thus resulting in a false discovery rate (FDR) of less than 5%.

### *Statistical analysis*

Experiments were performed at least in triplicate and results are expressed as means  $\pm$  SD. The statistical significance of differences between samples was assessed using an unpaired two tailed student t-test, Kruskal Wallis or an two-tailed Spearman non parametric correlation. A  $p < 0.05$  was considered significant.

**Acknowledgements:** We thank Dr. Ritva Tikkanen (University of Giessen, Germany) for the generous gift of GFP-APP695 and GST-APP695-C-term constructions and Dr Christian Haass (Ludwig-Maximilians-University Munich, Germany) for APP751 cDNA. We also thank the Douglas Hospital Brain Bank for providing human brain tissues, the Laboratoire de Génomique Fonctionnelle de l'Université de Sherbrooke and the Plateforme de Protéomique de l'Université de Sherbrooke for RT-qPCR and MS analysis, respectively. We are grateful to Sébastien Dion for the purification of soluble matriptase and to Dr. Jean-François Beaulieu (Université de Sherbrooke) for the Caco2/15 cells.

**Conflict of interest:** The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

**Authors contributions:** E.L. planned and performed most of the experiments, collected and analysed the data, made all the figures and drafted the manuscript. A.D. and F.B., performed experiments, provided experimental advice and revised the manuscript. AF, GB, SM, DG, performed experiments and revised the manuscript. C.L. and R.L. designed the study, brought intellectual feedback, participated in interpretation of data and revised the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work.

**Processing of the Amyloid Precursor Protein by the type II transmembrane serine protease matriptase**

**Erwan Lanchec, Antoine Désilets, François Béliveau, Anthony Flamier, Shaimaa Mahmoud, Gilbert Bernier, Denis Gris, Richard Leduc and Christine Lavoie.**

**Supplemental information**

**Table of contents:**

**FIGURE S1. Immunofluorescence of hiPSCs -derived neurons**

**FIGURE S2. Matriptase cleavage of APP695 is inhibited by HAI-1**

**FIGURE S3. Matriptase 2 does not cleave APP695**

**FIGURE S4. Matriptase cleaves the chimera GFP-APP695-LRP10 *in cellulo***

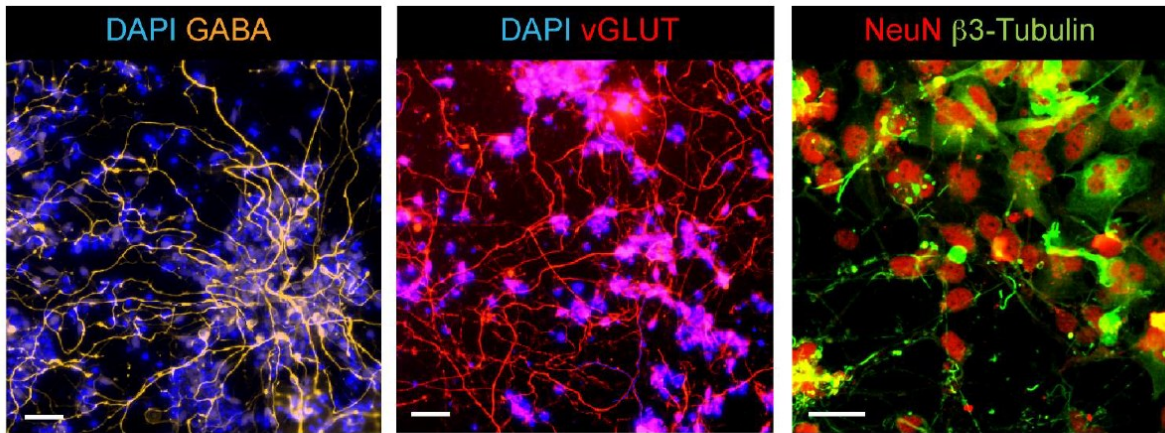
**FIGURE S5. Cleavage of APP695 by increasing concentrations of recombinant matriptase**

**FIGURE S6. Matriptase protein levels in mouse astrocyte**

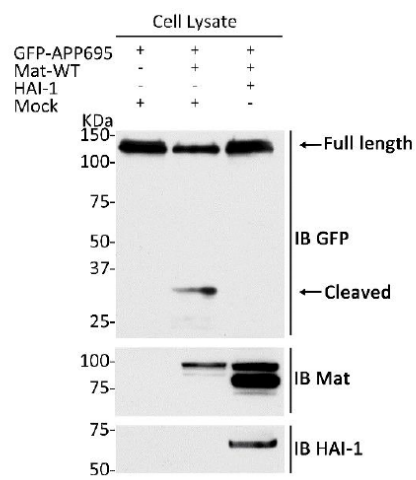
**TABLE S1. Primer used**

**TABLE S2. RNA-Seq-samples**

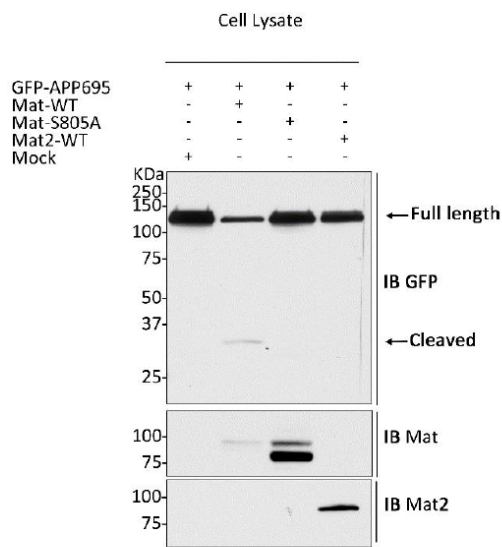
**SUPPLEMENTARY METHOD**



**FIGURE S1. Immunofluorescence of hiPSC -derived neurons.** After 3 weeks of maturation, cells were fixed, permeabilized, and immunostained with anti- GABA, vGLUT, NeuN and  $\beta$ 3-Tubulin. The labeled cells were examined by confocal fluorescence microscopy and show neuronal markers.

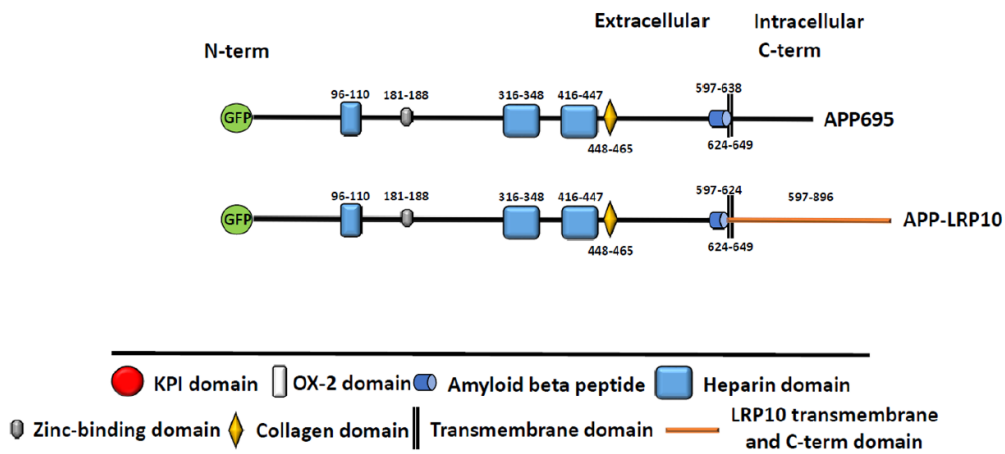


**FIGURE S2. Matriptase cleavage of APP695 is inhibited by HAI-1.** Lysate of HEK293 cells transfected with GFP-tagged APP695 and matriptase together with HAI-1 or empty vector (mock) were immunoblotted with anti-matriptase, anti-HAI-1 and anti-GFP antibody to detect matriptase, HAI-1, APP695 full-length and APP695 fragments (n=3).

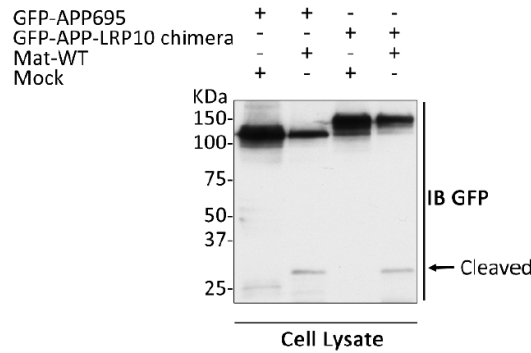


**FIGURE S3. Matriptase-2 does not cleave APP695.** Lysate of HEK293 cells transfected with GFP-tagged APP695 together with wild-type (WT) matriptase (Mat-WT), a catalytically inactive matriptase mutant (Mat-S805A), V5-tagged matriptase 2 (Mat2-WT) or empty vector (mock) were immunoblotted with anti-matriptase, anti-V5 or anti-GFP antibodies to detect matriptase, matriptase-2, and APP695 full-length/fragment, respectively (n=3).

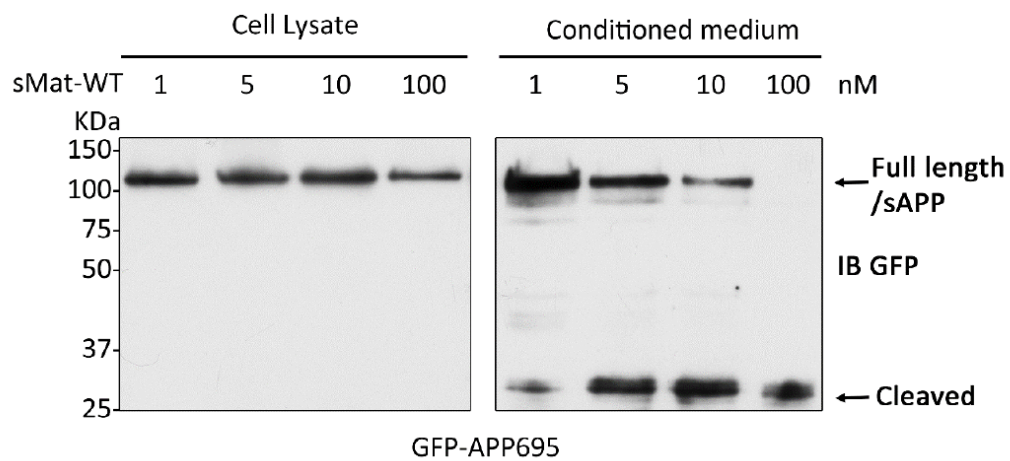
A



B

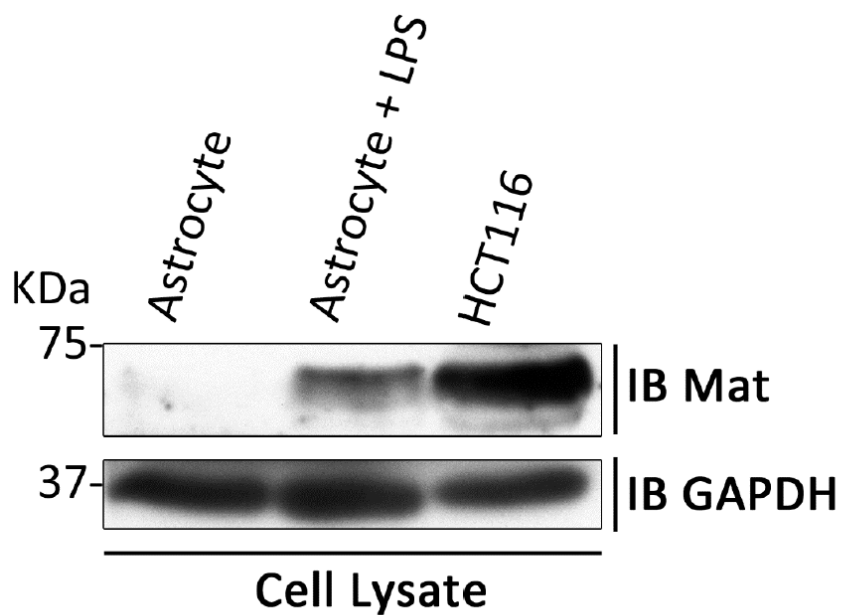


**FIGURE S4. Matriptase cleaves the chimera GFP-APP695-LRP10 in cellulo.** (A) Schematic representation of the GFP-tagged APP695 and the GFP-APP695-LRP10 chimera used. (B) HEK293 cells were transfected with empty vector (mock), WT matriptase together with GFP-tagged APP695 or GFP-APP695-LRP10. Cell lysates were immunoblotted with anti-GFP antibody to detect, APP695 constructions and fragments (n=3). Note the GFP-tagged APP695 fragment (cleaved) of 35 kDa in cell lysate for APP695-WT and the chimera (arrow).



**FIGURE S5. Cleavage of APP695 by increasing concentrations of recombinant matriptase.** HEK293 cells expressing GFP-APP695 were incubated with 1, 5, 10 and 100 nM of recombinant WT matriptase (sMat-WT) for 16 hrs. Cell lysates and conditioned media were immunoblotted with anti-GFP antibody to detect APP695 full-length, soluble APP (sAPP) and APP695 fragments (cleaved) (n=1).





**FIGURE S6. Mouse astrocytes express matriptase.** Mice astrocyte cells were plated in 100 mm dishes and after optimal growth were treated or not with LPS 100 ng/mL. After 24h, cells were collected, lysed and proteins were immunoblotted with anti-matriptase and anti-GAPDH (n=3). HCT116 cells served as positive control cells for matriptase expression.

**TABLE S1. Primer used.**

<b>Primer</b>	<b>Sequence</b>
ST14	For: 5'-TGCCCAACAACCAGCATGTGAA-3'
	Rev: 5'-TGGTGACGACGAACTGGGACC-3'
YWHAZ	For: 5'-TCCCAATGCTTCACAAGCAGA-3'
	Rev: 5'-TCTTGTCATCACCAGCGGCAA-3'
GAPDH	For: 5'-GTGAAGGTCGGAGTCAACGGATTT-3'
	Rev: 5'-TGCCATGGGTGGAATCATATTGGA-3'
SDHA	For: 5'-TGTTGATGGGAACAAGAGGGCA-3'
	Rev: 5'-GCCTACCACCACTGCATCAAAT-3'

TABLE S2. RNA-Seq-Samples.

Age (year)	Sex	Run	Mapped fragments (M)	ST14 (3.539 kb)		GAPDH (2.218 kb)	
				Fragments	FPKM	Fragments	FPKM
-0,52	F	SRR3625894	55,697	4	0,020	98573	798
-0,52	M	SRR3626524	78,407	25	0,090	203798	1172
-0,44	F	SRR3626528	25,517	2	0,022	38829	686
-0,42	M	SRR3626529	67,941	53	0,220	74510	494
-0,40	F	SRR3626531	118,013	33	0,076	101447	388
-0,40	M	SRR3626530	66,506	18	0,079	73956	501
-0,36	F	SRR3627973	78,950	27	0,097	126046	720
-0,35	M	SRR3626532	95,490	39	0,115	209884	991
0,33	M	SRR2071360	79,886	391	1,383	127681	721
0,35	M	SRR3627951	98,562	531	1,522	164203	751
0,36	M	SRR3627952	103,748	439	1,196	184967	804
1,62	F	SRR2071363	110,274	490	1,256	190873	780
2,49	F	SRR2071354	62,074	176	0,801	98499	715
3,05	M	SRR2071356	103,072	319	0,875	132947	582
4,14	M	SRR2071375	62,572	103	0,465	104651	754
4,65	M	SRR2071376	140,327	544	1,095	295555	950
4,71	M	SRR2071353	84,461	134	0,448	155856	832
16,65	F	SRR3627953	122,663	194	0,447	197061	724
16,93	M	SRR3627954	67,742	257	1,072	140398	934
17,24	F	SRR3627955	129,386	293	0,640	259792	905
18,12	M	SRR3627956	69,579	89	0,361	109344	709
18,42	M	SRR3627957	64,364	125	0,549	108722	762
18,76	F	SRR3627958	119,693	68	0,161	145977	550
40,61	F	SRR3627937	63,167	137	0,613	125679	897
41,04	M	SRR3627959	53,302	124	0,657	92978	786
41,20	F	SRR3627947	70,469	161	0,646	133492	854
41,78	M	SRR3627898	72,427	194	0,757	149607	931
42,07	M	SRR3627960	68,217	166	0,688	196990	1302
42,84	M	SRR3627961	79,460	228	0,811	158707	901
56,09	M	SRR3627962	36,624	61	0,471	61725	760
57,48	F	SRR3627970	73,917	13	0,050	63422	387
57,63	M	SRR3627966	35,619	55	0,436	59081	748
58,61	M	SRR3628383	57,834	86	0,420	105246	820
59,26	F	SRR3628385	48,546	67	0,390	98917	919
61,17	M	SRR3627971	61,953	80	0,365	99913	727
67,87	M	SRR2071370	92,846	154	0,469	172349	837
71,11	F	SRR3627972	50,127	4	0,023	103745	933
75,57	F	SRR3627991	39,032	28	0,203	56795	656
77,99	M	SRR3627995	50,845	33	0,183	68752	610

## Supplementary Method

### *DNA constructs*

The chimeric construct APP-LRP10 was obtained by replacing the C-terminal domain (residues 624-695) of APP695 with the transmembrane and cytoplasmic domains of the unrelated type I transmembrane protein LRP10 (residues 441-713) in the GFP-APP695 backbone. The plasmids containing human matriptase and HAI-1 cDNAs cloned in pcDNA3.1 were generous gifts from Dr. Chen-Yong Lin (Georgetown University, Washington, D. C.).

### *Antibodies and reagents*

Polyclonal goat anti-human HAI-1 antibody from R&D Systems (Minneapolis, MN), V5 Epitope Tag monoclonal antibodies (mAbs) and GAPDH Polyclonal Antibody, HRP conjugated from Thermo Scientific (Burlington, ON).

### *Mice astrocyte extraction and treatment.*

All animal work was approved by the institutional Animal Care and Use Committee at the Université de Sherbrooke according to the Canadian Council on Animal Care. Primary astrocyte cultures were prepared from 1-2 days old pups of C57/BL6J mice as previously described (64, 65). Pups were sacrificed by decapitation, brains were harvested and placed on 100 mm culture plate. After removing the meninges, brain tissue was suspended in complete DMEM/F12 medium (Wisent Inc, St. Bruno, QC, Canada) containing 10% Fetal bovine serum (Wisent Inc, St. Bruno, QC, Canada), 2mM L-glutamine (Wisent Inc, St. Bruno, QC, Canada), 1% MEM amino acid (Wisent Inc, St. Bruno, QC, Canada), 1% sodium pyruvate (Wisent Inc, St. Bruno, QC, Canada) and 1% penicillin-streptomycin and amphotericin B (Wisent Inc, St. Bruno, QC, Canada). Then, brain tissue was dissociated mechanically by trituration using 10 ml pipette. Dissociated tissue was passed through 70 µm cell strainer to remove tissue debris. Astrocyte cells were plated in 100 mm cell culture plate (Corning Inc, USA) with DMEM/F12 complete medium and incubated in 5% CO<sub>2</sub>, 95% Air in 37°C. After 24 hrs, culture medium was changed to remove non-adherent cells. Cells were incubated for 21 days. Medium was changed every 2-3 days and cells were reseeded once 90% confluency was reached. After 21 days, 100 ng/ml of bacterial lipopolysaccharides (LPS) (Sigma) was applied to the medium to activate astrocytes. After 24 hrs, LPS treated and non-treated astrocytes were collected and used in experiments.

## REFERENCES

1. Chiang, P. K., Lam, M. A., and Luo, Y. (2008) The many faces of amyloid beta in Alzheimer's disease. *Curr. Mol. Med.* **8**, 580–584
2. Arai, H., Lee, V. M., Messinger, M. L., Greenberg, B. D., Lowery, D. E., and Trojanowski, J. Q. (1991) Expression patterns of beta-amyloid precursor protein (beta-APP) in neural and nonneural human tissues from Alzheimer's disease and control subjects. *Ann. Neurol.* **30**, 686–693
3. Kitaguchi, N., Takahashi, Y., Tokushima, Y., Shiojiri, S., and Ito, H. (1988) Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature.* **331**, 530–532
4. Schmaier, A. H., Dahl, L. D., Rozemuller, A. J., Roos, R. A., Wagner, S. L., Chung, R., and Van Nostrand, W. E. (1993) Protease nexin-2/amyloid beta protein precursor. A tight-binding inhibitor of coagulation factor IXa. *J. Clin. Invest.* **92**, 2540–2545
5. Preece, P., Virley, D. J., Costandi, M., Coombes, R., Moss, S. J., Mudge, A. W., Jazin, E., and Cairns, N. J. (2004) Amyloid precursor protein mRNA levels in Alzheimer's disease brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **122**, 1–9
6. Johnson, S. A., McNeill, T., Cordell, B., and Finch, C. E. (1990) Relation of neuronal APP-751/APP-695 mRNA ratio and neuritic plaque density in Alzheimer's disease. *Science.* **248**, 854–857
7. Sun, X., He, G., and Song, W. (2006) BACE2, as a novel APP theta-secretase, is not responsible for the pathogenesis of Alzheimer's disease in Down syndrome. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **20**, 1369–1376
8. Grau, S., Baldi, A., Bussani, R., Tian, X., Stefanescu, R., Przybylski, M., Richards, P., Jones, S. A., Shridhar, V., Clausen, T., and Ehrmann, M. (2005) Implications of the serine protease HtrA1 in amyloid precursor protein processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 6021–6026
9. Park, H.-J., Kim, S.-S., Seong, Y.-M., Kim, K.-H., Goo, H. G., Yoon, E. J., Min, D. S., Kang, S., and Rhim, H. (2006) Beta-amyloid precursor protein is a direct cleavage target of HtrA2 serine protease. Implications for the physiological function of HtrA2 in the mitochondria. *J. Biol. Chem.* **281**, 34277–34287
10. Lu, P., Takai, K., Weaver, V. M., and Werb, Z. (2011) Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 10.1101/cshperspect.a005058

11. Antalis, T. M., Bugge, T. H., and Wu, Q. (2011) Membrane-anchored serine proteases in health and disease. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **99**, 1–50
12. Shi, Y. E., Torri, J., Yieh, L., Wellstein, A., Lippman, M. E., and Dickson, R. B. (1993) Identification and characterization of a novel matrix-degrading protease from hormone-dependent human breast cancer cells. *Cancer Res.* **53**, 1409–1415
13. Benaud, C., Dickson, R. B., and Lin, C. Y. (2001) Regulation of the activity of matriptase on epithelial cell surfaces by a blood-derived factor. *Eur. J. Biochem.* **268**, 1439–1447
14. Lin, C. Y., Anders, J., Johnson, M., Sang, Q. A., and Dickson, R. B. (1999) Molecular cloning of cDNA for matriptase, a matrix-degrading serine protease with trypsin-like activity. *J. Biol. Chem.* **274**, 18231–18236
15. Lin, C. Y., Anders, J., Johnson, M., and Dickson, R. B. (1999) Purification and characterization of a complex containing matriptase and a Kunitz-type serine protease inhibitor from human milk. *J. Biol. Chem.* **274**, 18237–18242
16. Lee, S. L., Dickson, R. B., and Lin, C. Y. (2000) Activation of hepatocyte growth factor and urokinase/plasminogen activator by matriptase, an epithelial membrane serine protease. *J. Biol. Chem.* **275**, 36720–36725
17. Netzel-Arnett, S., Currie, B. M., Szabo, R., Lin, C.-Y., Chen, L.-M., Chai, K. X., Antalis, T. M., Bugge, T. H., and List, K. (2006) Evidence for a matriptase-prostasin proteolytic cascade regulating terminal epidermal differentiation. *J. Biol. Chem.* **281**, 32941–32945
18. Takeuchi, T., Harris, J. L., Huang, W., Yan, K. W., Coughlin, S. R., and Craik, C. S. (2000) Cellular localization of membrane-type serine protease 1 and identification of protease-activated receptor-2 and single-chain urokinase-type plasminogen activator as substrates. *J. Biol. Chem.* **275**, 26333–26342
19. Wu, C.-J., Feng, X., Lu, M., Morimura, S., and Udey, M. C. (2017) Matriptase-mediated cleavage of EpCAM destabilizes claudins and dysregulates intestinal epithelial homeostasis. *J. Clin. Invest.* **127**, 623–634
20. Lai, C.-H., Lai, Y.-J. J., Chou, F.-P., Chang, H.-H. D., Tseng, C.-C., Johnson, M. D., Wang, J.-K., and Lin, C.-Y. (2016) Matriptase Complexes and Prostasin Complexes with HAI-1 and HAI-2 in Human Milk: Significant Proteolysis in Lactation. *PloS One.* **11**, e0152904
21. Szabo, R., Hobson, J. P., Christoph, K., Kosa, P., List, K., and Bugge, T. H. (2009) Regulation of cell surface protease matriptase by HAI2 is essential for placental development, neural tube closure and embryonic survival in mice. *Dev. Camb. Engl.* **136**, 2653–2663

22. Fang, J.-D., Chou, H.-C., Tung, H.-H., Huang, P.-Y., and Lee, S.-L. (2011) Endogenous expression of matriptase in neural progenitor cells promotes cell migration and neuron differentiation. *J. Biol. Chem.* **286**, 5667–5679
23. Clark, E. B., Jovov, B., Rooj, A. K., Fuller, C. M., and Benos, D. J. (2010) Proteolytic cleavage of human acid-sensing ion channel 1 by the serine protease matriptase. *J. Biol. Chem.* **285**, 27130–27143
24. Jäckle, F., Schmidt, F., Wichert, R., Arnold, P., Prox, J., Mangold, M., Ohler, A., Pietrzik, C. U., Koudelka, T., Tholey, A., Gütschow, M., Stirnberg, M., and Becker-Pauly, C. (2015) Metalloprotease meprin  $\beta$  is activated by transmembrane serine protease matriptase-2 at the cell surface thereby enhancing APP shedding. *Biochem. J.* **470**, 91–103
25. Beckmann, A.-M., Glebov, K., Walter, J., Merkel, O., Mangold, M., Schmidt, F., Becker-Pauly, C., Gütschow, M., and Stirnberg, M. (2016) The intact Kunitz domain protects the amyloid precursor protein from being processed by matriptase-2. *Biol. Chem.* **397**, 777–790
26. Oberst, M., Anders, J., Xie, B., Singh, B., Ossandon, M., Johnson, M., Dickson, R. B., and Lin, C. Y. (2001) Matriptase and HAI-1 are expressed by normal and malignant epithelial cells in vitro and in vivo. *Am. J. Pathol.* **158**, 1301–1311
27. Buzza, M. S., Netzel-Arnett, S., Shea-Donohue, T., Zhao, A., Lin, C.-Y., List, K., Szabo, R., Fasano, A., Bugge, T. H., and Antalis, T. M. (2010) Membrane-anchored serine protease matriptase regulates epithelial barrier formation and permeability in the intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 4200–4205
28. Hwang, T., Park, C.-K., Leung, A. K. L., Gao, Y., Hyde, T. M., Kleinman, J. E., Rajpurohit, A., Tao, R., Shin, J. H., and Weinberger, D. R. (2016) Dynamic regulation of RNA editing in human brain development and disease. *Nat. Neurosci.* **19**, 1093–1099
29. Désilets, A., Béliveau, F., Vandal, G., McDuff, F.-O., Lavigne, P., and Leduc, R. (2008) Mutation G827R in matriptase causing autosomal recessive ichthyosis with hypotrichosis yields an inactive protease. *J. Biol. Chem.* **283**, 10535–10542
30. Lee, M.-S., Tseng, I.-C., Wang, Y., Kiyomiya, K., Johnson, M. D., Dickson, R. B., and Lin, C.-Y. (2007) Autoactivation of matriptase in vitro: requirement for biomembrane and LDL receptor domain. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **293**, C95-105
31. Brodeur, J., Thériault, C., Lessard-Beaudoin, M., Marcil, A., Dahan, S., and Lavoie, C. (2012) LDLR-related protein 10 (LRP10) regulates amyloid precursor protein (APP) trafficking and processing: evidence for a role in Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* **7**, 31

32. Ledesma, M. D., Da Silva, J. S., Crassaerts, K., Delacourte, A., De Strooper, B., and Dotti, C. G. (2000) Brain plasmin enhances APP alpha-cleavage and Abeta degradation and is reduced in Alzheimer's disease brains. *EMBO Rep.* **1**, 530–535
33. Zhang, Z., Song, M., Liu, X., Su Kang, S., Duong, D. M., Seyfried, N. T., Cao, X., Cheng, L., Sun, Y. E., Ping Yu, S., Jia, J., Levey, A. I., and Ye, K. (2015) Delta-secretase cleaves amyloid precursor protein and regulates the pathogenesis in Alzheimer's disease. *Nat. Commun.* **6**, 8762 *APP processing by matriptase* 14
34. Toga, A. W., Thompson, P. M., and Sowell, E. R. (2006) Mapping brain maturation. *Trends Neurosci.* **29**, 148–159
35. Paus, T. (2005) Mapping brain maturation and cognitive development during adolescence. *Trends Cogn. Sci.* **9**, 60–68
36. Gogtay, N., Giedd, J. N., Lusk, L., Hayashi, K. M., Greenstein, D., Vaituzis, A. C., Nugent, T. F., Herman, D. H., Clasen, L. S., Toga, A. W., Rapoport, J. L., and Thompson, P. M. (2004) Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 8174–8179
37. Kawaguchi, M., and Kataoka, H. (2014) Mechanisms of hepatocyte growth factor activation in cancer tissues. *Cancers.* **6**, 1890–1904
38. Uhland, K. (2006) Matriptase and its putative role in cancer. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.* **63**, 2968–2978
39. List, K., Bugge, T. H., and Szabo, R. (2006) Matriptase: potent proteolysis on the cell surface. *Mol. Med. Camb. Mass.* **12**, 1–7
40. List, K. (2009) Matriptase: a culprit in cancer? *Future Oncol. Lond. Engl.* **5**, 97–104
41. Miyata, S., Fukushima, T., Kohama, K., Tanaka, H., Takeshima, H., and Kataoka, H. (2007) Roles of Kunitz domains in the anti-invasive effect of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 in human glioblastoma cells. *Hum. Cell.* **20**, 100–106
42. Koivuniemi, R., Mäkelä, J., Hokkanen, M.-E., Bruelle, C., Ho, T. H., Ola, R., Korhonen, L., Schröder, J., Kataoka, H., and Lindholm, D. (2013) Hepatocyte growth factor activator inhibitor-1 is induced by bone morphogenetic proteins and regulates proliferation and cell fate of neural progenitor cells. *PLoS One.* **8**, e56117
43. Béliveau, F., Désilets, A., and Leduc, R. (2009) Probing the substrate specificities of matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1 with internally quenched fluorescent peptides. *FEBS J.* **276**, 2213–2226



44. Kirchhofer, D., Peek, M., Li, W., Stamos, J., Eigenbrot, C., Kadkhodayan, S., Elliott, J. M., Corpuz, R. T., Lazarus, R. A., and Moran, P. (2003) Tissue expression, protease specificity, and Kunitz domain functions of hepatocyte growth factor activator inhibitor-1B (HAI-1B), a new splice variant of HAI-1. *J. Biol. Chem.* **278**, 36341–36349
45. Kaden, D., Munter, L. M., Reif, B., and Multhaup, G. (2012) The amyloid precursor protein and its homologues: structural and functional aspects of native and pathogenic oligomerization. *Eur. J. Cell Biol.* **91**, 234–239
46. Hung, R.-J., Hsu, I.-W. J., Dreiling, J. L., Lee, M.-J., Williams, C. A., Oberst, M. D., Dickson, R. B., and Lin, C.-Y. (2004) Assembly of adherens junctions is required for sphingosine 1-phosphate-induced matriptase accumulation and activation at mammary epithelial cell-cell contacts. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **286**, C1159-1169
47. Jin, X., Hirotsaki, T., Lin, C.-Y., Dickson, R. B., Higashi, S., Kitamura, H., and Miyazaki, K. (2005) Production of soluble matriptase by human cancer cell lines and cell surface activation of its zymogen by trypsin. *J. Cell. Biochem.* **95**, 632–647
48. O'Brien, R. J., and Wong, P. C. (2011) Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* **34**, 185–204
49. Ludewig, S., and Korte, M. (2016) Novel Insights into the Physiological Function of the APP (Gene) Family and Its Proteolytic Fragments in Synaptic Plasticity. *Front. Mol. Neurosci.* **9**, 161
50. Small, D. H., Nurcombe, V., Reed, G., Clarris, H., Moir, R., Beyreuther, K., and Masters, C. L. (1994) A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **14**, 2117–2127
51. Nicolas, M., and Hassan, B. A. (2014) Amyloid precursor protein and neural development. *Dev. Camb. Engl.* **141**, 2543–2548
52. Willem, M., Tahirovic, S., Busche, M. A., Ovsepian, S. V., Chafai, M., Kootar, S., Hornburg, D., Evans, L. D. B., Moore, S., Daria, A., Hampel, H., Müller, V., Giudici, C., Nuscher, B., Wenninger-Weinzierl, A., Kremmer, E., Heneka, M. T., Thal, D. R., Giedraitis, V., Lannfelt, L., Müller, U., *APP processing by matriptase* 15 Livesey, F. J., Meissner, F., Herms, J., Konnerth, A., Marie, H., and Haass, C. (2015)  $\eta$ -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature.* **526**, 443–447
53. Rossjohn, J., Cappai, R., Feil, S. C., Henry, A., McKinstry, W. J., Galatis, D., Hesse, L., Multhaup, G., Beyreuther, K., Masters, C. L., and Parker, M. W. (1999) Crystal structure of the

N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 327–331

54. Kaden, D., Munter, L.-M., Joshi, M., Treiber, C., Weise, C., Bethge, T., Voigt, P., Schaefer, M., Beyermann, M., Reif, B., and Multhaup, G. (2008) Homophilic interactions of the amyloid precursor protein (APP) ectodomain are regulated by the loop region and affect beta-secretase cleavage of APP. *J. Biol. Chem.* **283**, 7271–7279

55. Barão, S., Moechars, D., Lichtenthaler, S. F., and De Strooper, B. (2016) BACE1 Physiological Functions May Limit Its Use as Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Trends Neurosci.* **39**, 158–169

56. De Strooper, B. (2014) Lessons from a failed  $\gamma$ -secretase Alzheimer trial. *Cell.* **159**, 721–726

57. Désilets, A., Longpré, J.-M., Beaulieu, M.-E., and Leduc, R. (2006) Inhibition of human matriptase by eglin c variants. *FEBS Lett.* **580**, 2227–2232

58. Brosseau, J.-P., Lucier, J.-F., Lapointe, E., Durand, M., Gendron, D., Gervais-Bird, J., Tremblay, K., Perreault, J.-P., and Elela, S. A. (2010) High-throughput quantification of splicing isoforms. *RNA N. Y. N.* **16**, 442–449

59. Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., and Vandesompele, J. (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* **8**, R19

60. Espuny-Camacho, I., Michelsen, K. A., Gall, D., Linaro, D., Hasche, A., Bonnefont, J., Bali, C., Orduz, D., Bilheu, A., Herpoel, A., Lambert, N., Gaspard, N., Péron, S., Schiffmann, S. N., Giugliano, M., Gaillard, A., and Vanderhaeghen, P. (2013) Pyramidal neurons derived from human pluripotent stem cells integrate efficiently into mouse brain circuits in vivo. *Neuron.* **77**, 440–456

61. Gaspard, N., Bouschet, T., Herpoel, A., Naeije, G., van den Aemele, J., and Vanderhaeghen, P. (2009) Generation of cortical neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat. Protoc.* **4**, 1454–1463

62. Kim, D., Langmead, B., and Salzberg, S. L. (2015) HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat. Methods.* **12**, 357–360

63. Liao, Y., Smyth, G. K., and Shi, W. (2014) featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **30**, 923–930

## 4. ARTICLE 2

### Processing of APLP1 and APLP2 by the type II transmembrane serine protease matriptase

**Auteurs de l'article:** Erwan Lanchec, Antoine Désilets, François Béliveau, Richard Leduc and Christine Lavoie

**Statut de l'article:** soumis à scientific report. Ref: Submission ID 7348113e-184e-4d21-b0b9-daeaca2d9bac.

**Avant-propos:** Nous avons tout d'abord voulu confirmer qu'une interaction entre la matriptase et les APLP était possible puis déterminer l'effet de la matriptase sur la biosynthèse des APLP et un son effet sur l'homodimérisation. E.L. a planifié et conçu l'étude, effectué la plupart des expériences, collecté et analysé les données, fait toutes les figures, rédigé le manuscrit, participé à l'interprétation des données et révisé le manuscrit. F.B. a réalisé des expériences de BRET, fourni des conseils expérimentaux, apporté des commentaires intellectuels, participé à l'interprétation des données et révisé le manuscrit. A.D. a réalisé des expériences, apporté des conseils, participé à l'interprétation des données et révisé le manuscrit. C.L. et R.L. ont conçu l'étude, apporté des conseils, participé à l'interprétation des données et révisé le manuscrit.

**Résumé :** Le peptide bêta-amyloïde (A $\beta$ ) est dérivé de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) par clivage par les sécrétases. L'APP est également clivée par de nombreuses autres protéases ayant des conséquences sur la production de A $\beta$ . Nous avons montré dans notre premier article (330) que la matriptase est non seulement exprimée dans le cerveau humain, mais qu'en plus la matriptase interagit et clive APP réduisant ainsi la production de peptide A $\beta$  40. APP possède deux protéines homologues appartenant à la même famille, APLP1 et APLP2 (*amyloid beta precursor like protein 1 et 2*). APLP1 et APLP2 possèdent une structure identique avec APP et leurs domaines E1 et E2. Les interactions entre APP, APLP1 et APLP2 modulent leur métabolisme par les sécrétases et modifient la production du peptide A $\beta$ . Cela nous a amenés à étudier le rôle de la matriptase dans le métabolisme d'APLP1 et d'APLP2. Dans cet article, nous montrons que la matriptase interagit et clive APLP1 et APLP2. Nous avons aussi observé que la matriptase réduit les interactions homodimériques d'APLP1 et d'APLP2. Ces

études identifient la matriptase comme une nouvelle enzyme capable de cliver la famille d'APP qui pourrait avoir des conséquences importantes sur le profil de production d'A $\beta$  dans des conditions physiologiques, mais aussi dans la pathologie de la MA.

# **Matriptase processing of APLP1 ectodomain alters its homodimerization**

**Erwan Lanchec<sup>1</sup>, Antoine Désilets<sup>1,+</sup>, François Béliveau<sup>1,+</sup>, Richard Leduc<sup>1\*</sup> and Christine Lavoie<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Department of Pharmacology-Physiology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada J1H5N4.+Both authors contributed equally

## **ABSTRACT**

The amyloid beta peptide (A $\beta$ ) is derived from the amyloid precursor protein (APP) by secretase processing. APP is also cleaved by numerous other proteases with consequences on the production of A $\beta$  such as the type II transmembrane serine protease matriptase that cleaves APP, leading to a reduction of secreted A $\beta$  levels. Because the APP homolog proteins amyloid-like protein 1 (APLP1) share similarities with APP, we sought to determine if matriptase also plays a role in its processing. Here, we demonstrate that matriptase directly interacts with APLP1 and that APLP1 is cleaved in cellulo by matriptase in its E1 ectodomains at arginine 124. Replacing Arg124 with Ala abolished APLP1 processing by matriptase. Using a bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assay we observed that matriptase reduces APLP1 homodimeric interactions in cellulo. This study identifies matriptase as the first protease cleaving in the APLP dimerization domains, potentially altering the multiple functions associated with dimer formation..

## **Introduction**

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by a progressive and accelerated loss of neurons, leading to cognitive disorders and is currently the most common dementia<sup>1</sup>. Accumulation of extracellular amyloid beta (A $\beta$ ) whether in the form of plaques, oligomers or soluble monomers is a fundamental hallmark of AD <sup>2,3</sup>. In the pathogenic amyloidogenic pathway, successive APP cleavage by  $\beta$  and  $\gamma$  secretase results in the production of A $\beta$  <sup>4</sup>. Recent treatment strategies targeting elements of the amyloidogenic pathway have failed so far to slow the progression of symptoms. Therefore, a better understanding of the mechanisms involved in AD is needed and several teams have focused on the physiological role and biosynthesis/processing of APP family members.

Amyloid-like protein 1 (APLP1) is part of the same family and is homologous to APP 5. APP and APLP1 are type I transmembrane proteins sharing conserved luminal E1 and E2 domains 5. The E1 domain, rich in cysteines, is comprised of two subdomains, a growth factor-like subdomain (GFLD) that binds heparin and that stimulates neurite growth, as well as a CuBD subdomain that binds Cu and Zn ions 6. The E2 domain forms an antiparallel dimer and binds to heparin in its dimeric form 7. Finally, the C-terminal domains of these proteins have a YENPTY motif that serves as an endocytosis signal 8. Although both proteins can be cleaved by secretases, the A $\beta$  sequence is only found in APP 9,10. APP and APLP1 are involved in neuronal differentiation, synaptogenesis, neurite growth, and synaptic plasticity 11–13. According to the Human Protein Atlas 14,15, APLP1, while not restricted to, is enriched in the human brain while APP is ubiquitously expressed consistent with data obtained in mice 16.

APP and APLP1 are known to form homo- and heterodimers 17, which are in part dependent on the conserved E1 domain 18. These dimeric interactions occur at the plasma membrane on a single cell (cis interaction) but also occur between transmembrane proteins of adjacent cells (trans interaction) 19–21. APP/APLP1 interactions promote cell adhesion in a homo- and heteromeric fashion 17. This process is triggered by heparin binding to the E1 domain followed by induction of E2 domain dimerization. When the ability of APP to form dimers is impaired, it influences the ability of BACE1 secretase to cleave APP, resulting in decreased A $\beta$  peptide production 22–25.

Proteases present at the plasma membrane as well as in the extracellular space play important roles in development, homeostasis and tissue remodeling 26. The plasma membrane/extracellular enzyme matriptase is a type II transmembrane serine protease (TTSP) encoded by the suppression of tumorigenicity-14 gene (ST14) 27. This protease undergoes autoactivation at the plasma membrane where it can cleave various substrates 9,28–31 or be released into the extracellular medium as a shed and enzymatically active form 32. Although the expression of matriptase was documented to occur predominantly in epithelial cells of different organs, a growing number of studies have reported expression of matriptase in the brain and/or suggest a role for matriptase in the central nervous system (CNS) 33–37. Indeed, unregulated matriptase activity disrupts neural tube closure in embryonic mice 33 while its expression in neuronal progenitor cells promotes cell migration and neuronal differentiation 34. Other studies observed an increase of matriptase transcript levels in a mouse model of AD, especially in activated microglia around amyloid plaques 36,37.

We have recently shown that matriptase mRNA is expressed in different regions of human brain, with an enrichment in neurons and that it is also present at the protein level in differentiated neurons derived from human induced pluripotent stem cells (hiPSCs)<sup>38</sup>. Moreover we showed that matriptase cleaves the three APP isoforms in the E1 domain at residue 102<sup>38</sup>. This cleavage, although distant from the A $\beta$  sequence, alters the production of A $\beta$  peptide in cellular assays. Since the E1 domain is conserved among members of the APP family and is important for dimerization, we have investigated the possibility that matriptase cleaves APLP1 and alters the dimerization/heterodimerization process.

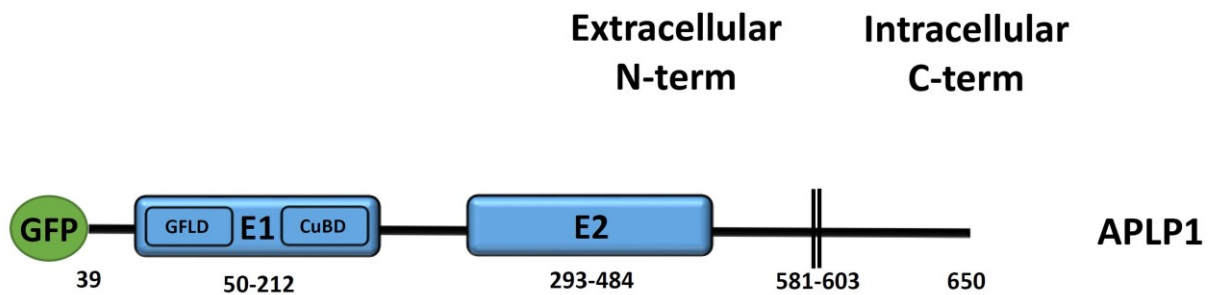
In this study, we show that matriptase interacts with and cleaves APLP1 at specific residue in its E1 ectodomains. Using a BRET-based assay, we show that addition of matriptase to cells expressing APLP1 disrupts the proteins ability to form homodimers. These events may have important consequences on the physiological and pathological functions of APP family members.

## **Results**

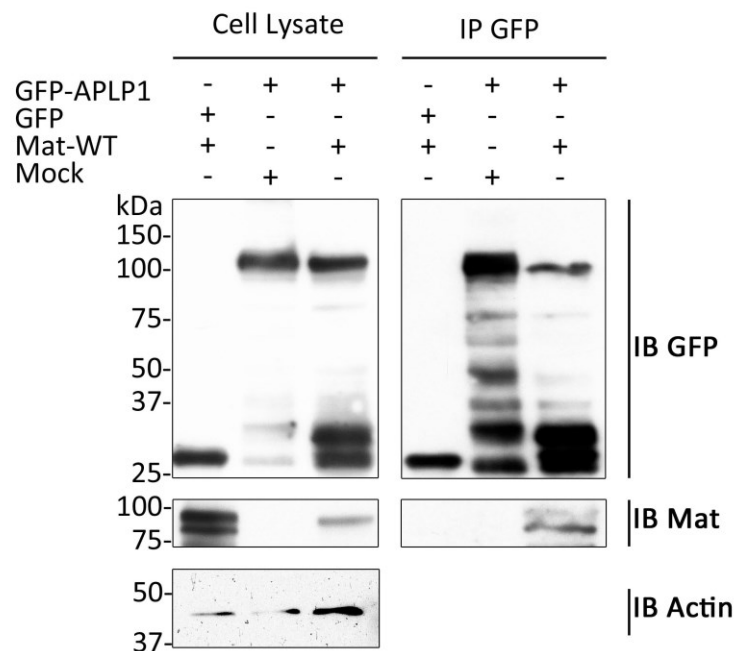
### **Matriptase interacts with APLPs.**

In order to explore the possibility that matriptase interacts with APLP1, GFP-tagged APLP construct containing a mannose-6-phosphate signal peptide were expressed in HEK293 cells (Figure 1A). Immunoblot (IB) analysis of cell lysates reveals that GFP-APLP1 is detected as a major 120 kDa form (Figure 1B, and supplementary Information 1). Furthermore, matriptase co-immunoprecipitates with GFP-APLP1 but does not co-immunoprecipitate with GFP alone. As previously described, matriptase is detected as a doublet, which reflects the presence of the full-length 855 amino acid protein and a constitutively processed form at glycine 149<sup>38-40</sup>. The specificity of this interaction was also confirmed by using VAMP8-GFP a transmembrane protein with a GFP C-Terminus. When a GFP-Trap precipitation is performed, matriptase co-precipitate weakly with VAMP8-GFP and strongly with GFP-APLP1 (supplementary Information 2). These results indicate that matriptase interacts in cellulo with APLP1.

**A**



**B**



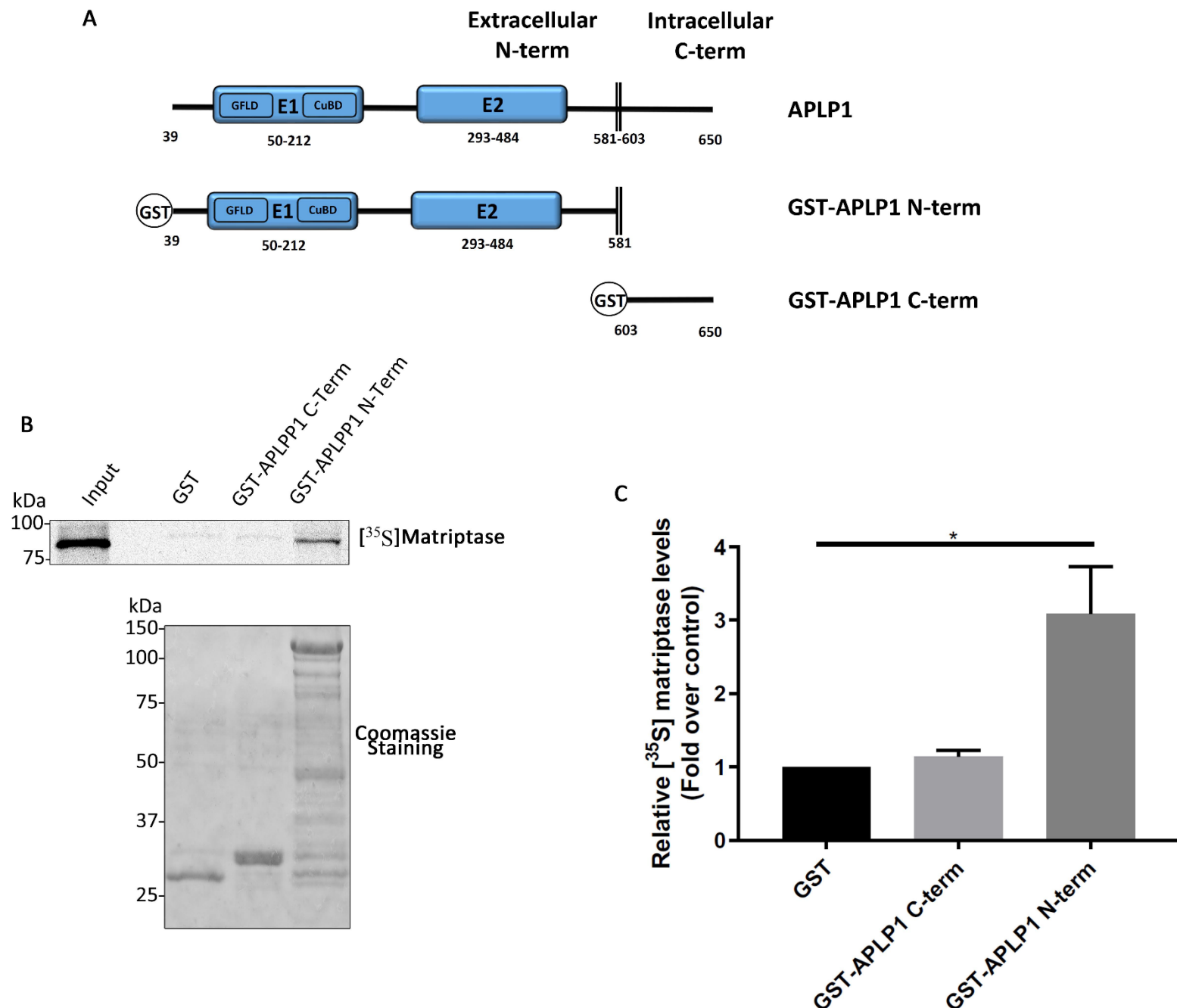
**Figure 1.** Matriptase interacts with APLP1. (A) Schematic representation of the GFP-tagged isoforms of APLP1. The elements constituting APLP1 are shown, including the E1 and E2. (B) Lysate of HEK293 cells transfected with matriptase and GFP-tagged APLP1 or GFP alone were immunoprecipitated (IP) with GFP-Trap beads and then immunoblotted (IB) with anti-matriptase, anti-GFP, or anti-actin antibodies to detect matriptase, APLP1 or actin, respectively (n=3).

To confirm that the co-immunoprecipitation observed between APLP1 and matriptase is a consequence of direct interactions, we then performed *in vitro* GST pull-down experiments (Figure 2 and supplementary Information 3). N-terminal GST chimeric construct corresponding to the extracellular or intracellular domains of APLP1 (Figure 2A) were expressed in bacteria. The purified recombinant GST proteins were then incubated with *in vitro* translated, <sup>35</sup>S-labeled matriptase and GST-bound proteins were detected by autoradiography. A robust signal was obtained when matriptase was incubated with the GST-APLP1 N-term protein while a



weak signal was detected with GST alone or with GST-APLP1 C-term (Figure 2B). Densitometric analysis revealed a statistically significant difference using GST-APLP1 N-term protein when compared to GST alone (Figure 2C). These results demonstrate that a direct interaction occurs between matriptase and the ectodomain of APLP1 but not with GST-APLP1 C-term.

**FIGURE 2**



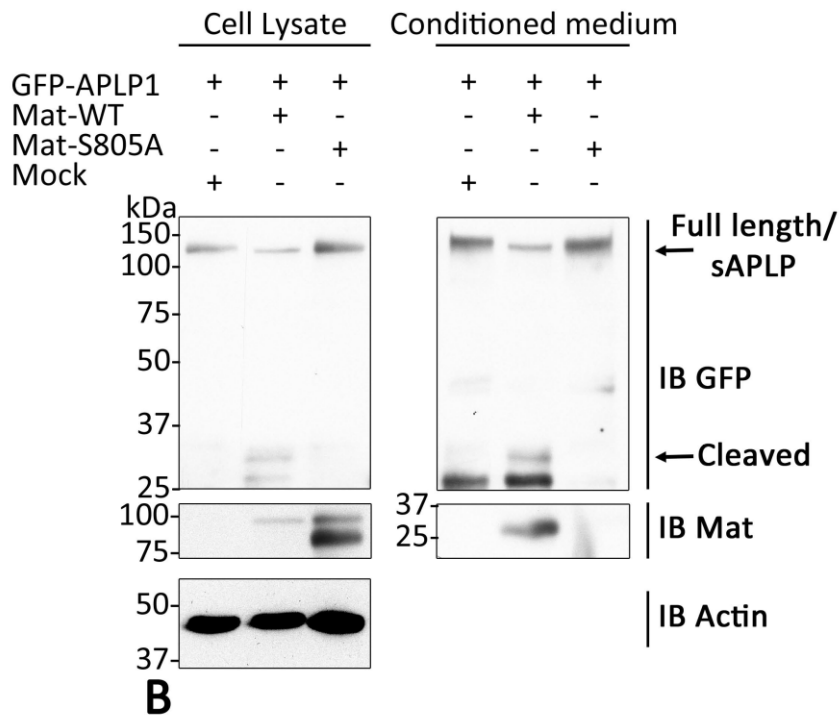
**Figure 2.** *In vitro* interaction of matriptase with the ectodomain of APLP1. (A) Schematic representation of the GST-tagged APLP1 deletion mutants used to determine the matriptase binding domain. (B) APLP1 mutants and

GST protein (10 µg) were immobilized on glutathione beads and incubated with *in vitro* translated <sup>35</sup>S-labeled matriptase. Bound proteins were separated by SDS-PAGE and detected by autoradiography. GST proteins were detected with Coomassie blue staining. Input = 2.5% of the total *in vitro* translated product (n=3). (C) A one sample T test with a hypothetical value set to 1 on the densitometric analysis of figure 2B was applied. There is a statistical difference between GST alone and GST-APLP1 N-term but not between GST alone and GST-APLP1 C-term (p<0.05).

#### In cellulo cleavage of APLP1 by matriptase.

When APLP1 was co-transfected with matriptase, the detection of a fragment migrating in the 30-35 kDa range suggested cleavage product corresponding to the GFP tag (25 kDa) and a fragment of the N-terminal domain of APLP1 (5-10 kDa figure 1B). To further characterize cleavage of APLP1 by matriptase, HEK293 cells were transfected with GFP-APLP1 and in combination with matriptase or with a catalytically inactive matriptase (S805A). Physiologically, substrate cleavage by matriptase occurs at the plasma membrane or in the extracellular medium [32,41]. Therefore, cell lysates and culture medium were harvested to detect APLP1 cleavage products. When GFP-APLP1 construct is co-transfected with matriptase, cleaved product is detected in the cell lysates as well as in the conditioned medium but not when it's transfected with the inactive matriptase (Figure 3A and supplementary Information 4). This result demonstrates that APLP1 is processed by catalytically active matriptase into soluble forms found in the media of transfected cells. This cleavage by catalytically active matriptase was also validated by co-expressing with HAI-1, the physiological inhibitor of matriptase. Indeed, no cleavage products are detected when APLP1 and matriptase are co-transfected with HAI-1 (Supplementary Information 5). Finally, when matriptase-2, a protease closely related to matriptase, is co-expressed with APLP1, no cleavage products are observed (Supplementary Information 6).

**A**



**Figure 3.** Matriptase cleaves APLP1 *in cellulo*. (A) HEK293 cells were transfected with WT matriptase, a catalytically inactive matriptase mutant (S805A) or empty vector (mock) together with GFP-tagged APLP1. Lysates and conditioned media were immunoblotted with anti-matriptase, anti-GFP or anti-actin antibody to detect matriptase, actin, APLP1 and APLP1 fragments (n=3 for each APLPs). The GFP-tagged APLP1 fragment (cleaved) in cell lysate and medium are shown (arrow). (B) HEK293 cells transfected with GFP-tagged APLP1 were incubated without (buffer) or with 5 nM of recombinant WT matriptase (sMat-WT) or catalytically inactive matriptase mutant (sMat-S805A). Conditioned media were immunoblotted as described in (A) (n=3).

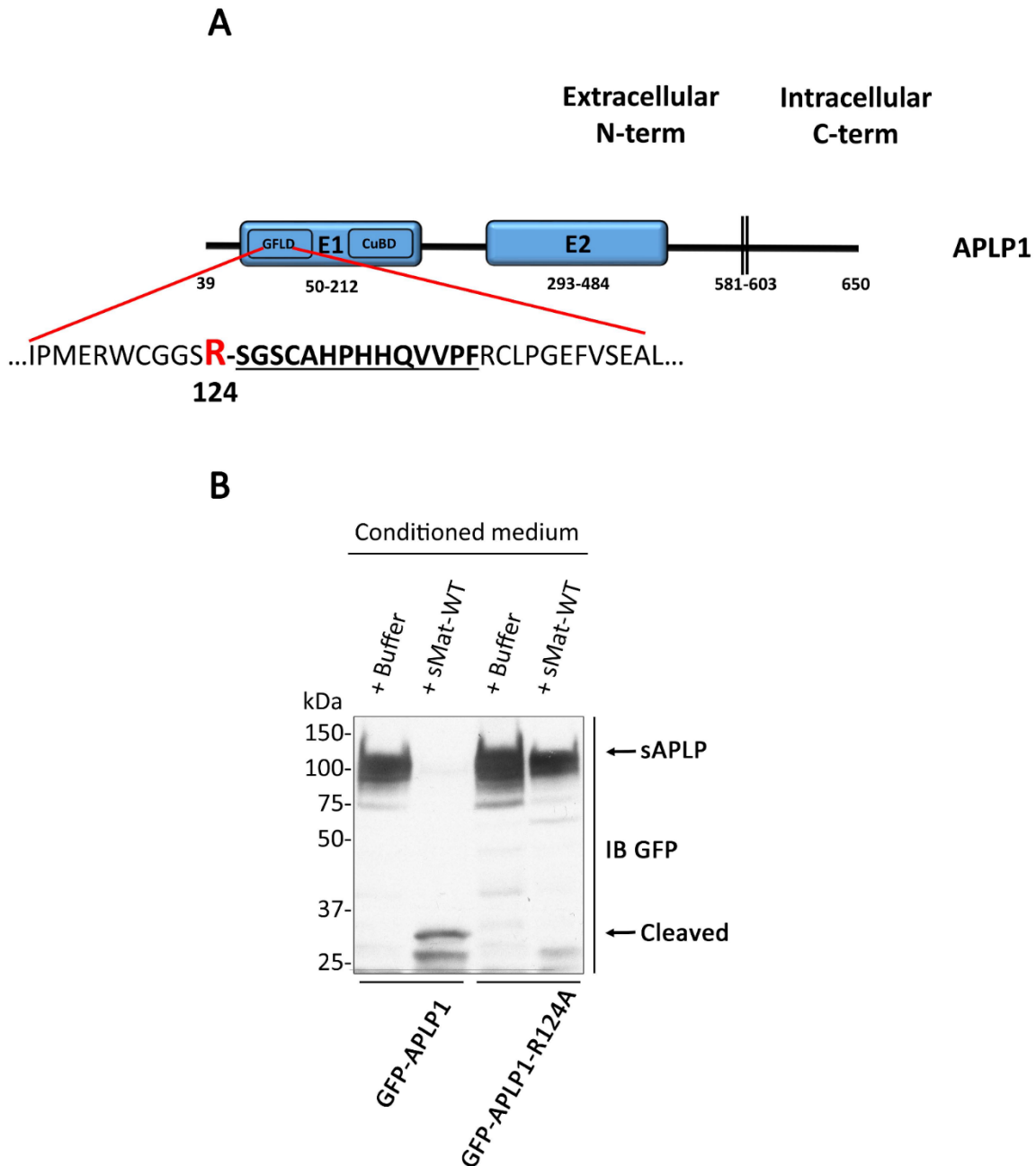
Because matriptase is shed in the extracellular space as a soluble form, 32,41 we investigated whether exogenous addition of an enzymatically active soluble form of matriptase cleaves GFP-

APLP1 in HEK293 cells. We detected cleavage product in the conditioned culture medium of GFP-APLP1 expressing cells incubated with active matriptase but not with the inactive matriptase S805A (Figure 3B). Altogether, these results suggest that active matriptase can cleave GFP-APLP1 at the plasma membrane to generate soluble APLP1 forms.

Identifying matriptase cleavage sites on APLP1.

To identify the precise matriptase cleavage sites within APLP1, mass spectrometry (MS) analysis were performed on APLP1 fragments generated following in vitro incubation of purified GST-APLP1 ectodomains with or without recombinant soluble matriptase. A major cleavage site was found at arginine 124 of APLP1 (Figure 4A and Supplementary Information 7). This cleavage site is predicted to yield N-terminal fragments with molecular weights of 9.6 kDa for APLP1. Taking into account the molecular weight of the N-terminal GFP tag (25 kDa), this is consistent with the molecular weights of the fragments observed in figure 3 (30-35 kDa). Interestingly, like APP 38, the matriptase cleavage sites were found in the E1 domain of APLP1. In order to confirm this cleavage site, Arg-124 was mutated to Ala (R124A) in GFP-tagged APLP1. HEK293 cells expressing either wild-type GFP-APLP1, GFP-APLP1 (R124A) were then incubated with (or without) soluble matriptase and analyzed for the presence of APLP cleavage products in the conditioned medium (Figure 4B). Expression of the R124A mutant completely abolished the formation of the GFP-APLP1 cleaved fragment indicating that this mutant is resistant to cleavage by matriptase. These results confirmed the R124 residue as the primary matriptase cleavage site in APLP1. Taken together, these results indicate that, similarly to APP, matriptase cleaves in the E1 domain of APLP1.

FIGURE 4

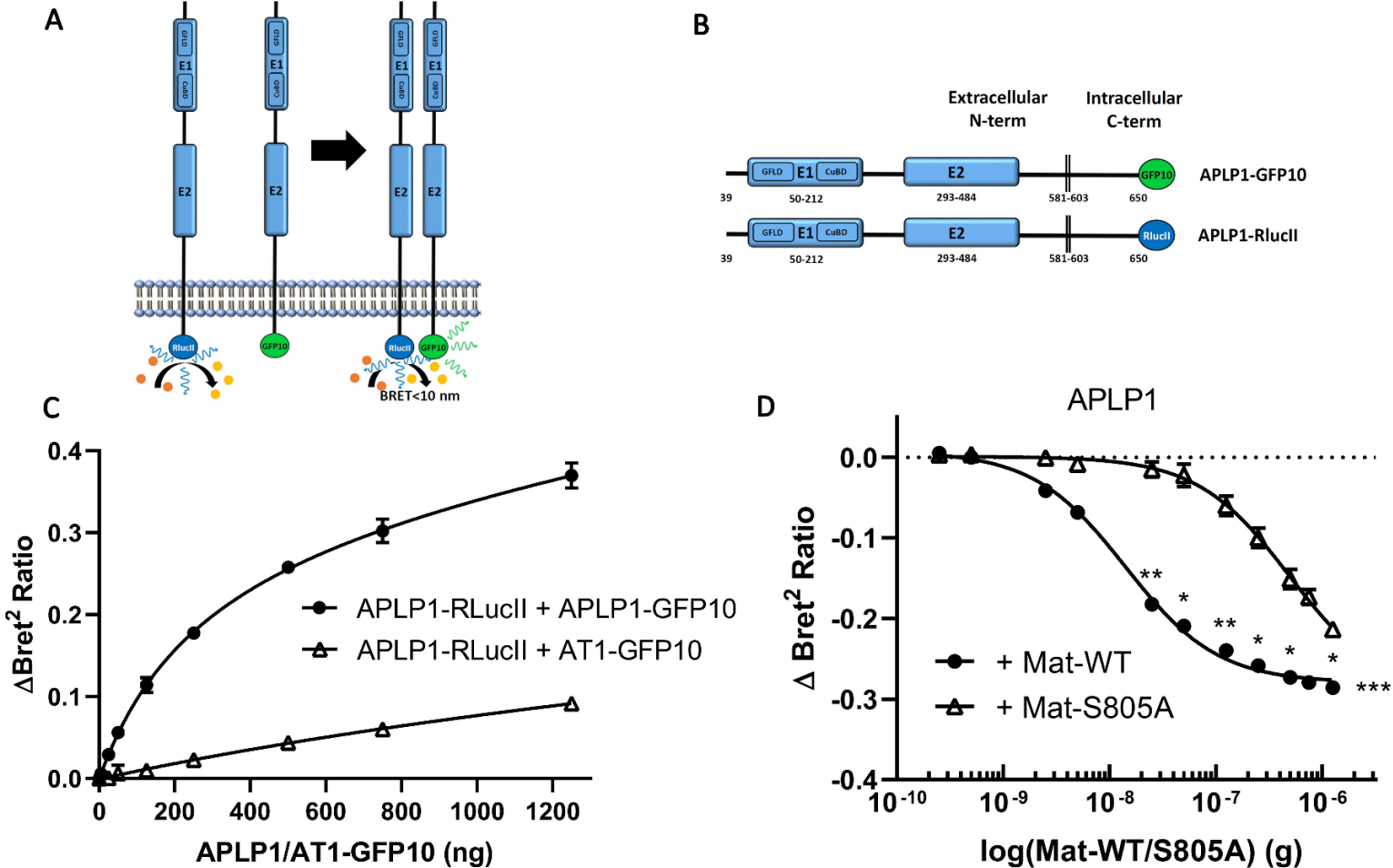


**Figure 4.** Matriptase cleaves APLP1 at Arginine 124. (A) Schematic representation of the position of the Arg and Lys cleaved by matriptase in the ectodomain of APLP1 tagged to GST that was used to determine matriptase cleavage site (Supplemental information S3 and S4). (B) HEK293 cells transfected with GFP-tagged APLP1 wild-type or in which Arg124 was mutated to Ala (APLP1-R124A) were incubated without (buffer) or with 5 nM of recombinant WT matriptase (sMat-WT). Conditioned media were immunoblotted with anti-GFP antibody to detect soluble APLP1 (sAPLP) and APLP1 fragments(n=3). Note the absence of the GFP-tagged APLP1 fragment (cleaved) in the GFP-APLP1-R124A lanes.

Matriptase processing of APLP1 alters its homodimerization.

APP family members can form homotypic and heterotypic cis and trans dimers mainly through their N-terminal E1 domains 17. Given that we defined the matriptase cleavage site in the E1 domain of APLP1 (Figure 4), we next examined whether this cleavage impairs its dimerization. We set up a novel Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET2) assay to quantify APLP1 cis-homodimerization 42. In this assay, when GFP10 (acceptor molecule) is in close vicinity to RlucII (donor molecule) in the presence of its substrate, a BRET2 signal is generated and can be measured (Figure 5A). To detect APLP homodimerization, GFP10 and RLucII moieties were fused to the C terminus of APLP1 (Figure 5B). The BRET2 pair, APLP1-GFP10/-RLucII exhibits a saturation curve for a fixed concentration of donor (RLucII) and an increasing concentration of GFP10 (Figure 5C). This result reflects a typical saturation profile consistent with a specific interaction between APLP1 monomers. On the other hand, this saturation plateau is not reached using an increasing concentration of the plasma membrane expressed angiotensin II type 1 receptor, (AT1R-GFP10) that does not interact with APLP1. These results confirm the homodimeric interaction for APLP1 proteins and validate our BRET2 approach to monitor dimerization.

**FIGURE 5**



**Figure 5.** Matriptase disturbs APLP1 homodimeric interaction. (A) Schematic representation of the BRET biosensors (GFP10 and RLucII) used for the experiments. (B) Schematic representation of the couples constructs GFP10 and RLucII used to study homodimeric interactions of APLP1. (C) HEK293 cells transfected with RLucII-tagged APLP1(100ng) and an increasing DNA quantity of GFP10-tagged APLP1 or GFP10-tagged AT1R1 and RLucII-tagged where incubated with coelenterazine and signals were measured with a plate reader (n=3 for each curve) (D) HEK293 cells transfected with GFP10-tagged APLP1 and RLucII-tagged APLP1 where co transfected either with an increasing DNA quantity of matriptase (Mat-WT) or matriptase S805A (Mat-S805A). Cell where incubated with coelenterazine and signals were measured with a plate reader (n=3 for each curve). A two-way ANOVA with a Sidak's multiple comparisons test was applied on the data set of each curve. There is a statistical difference between Mat-WT and Mat-S805A ( $p=0.0003$ ).

We then assessed the impact of matriptase cleavage on the homodimeric interaction of APLP1 by expressing fixed concentrations of the APLP1 BRET constructs with increasing concentration of transfected active (WT) or inactive (S805A) matriptase. BRET2 signal reduction is expected if dimerization is impaired. Indeed, a BRET2 signal decrease was detected with increasing concentrations of active (WT) or inactive (S805A) matriptase for APLP1 homodimers (figure 5C). This suggests that interaction between matriptase and APLP1 affects the ability of APLP1 to remain as dimers. Effect on dimerization seen with active and inactive matriptase is in accordance with co-immunoprecipitation assays demonstrating an interaction between APLP1 and both matriptase forms (figure 1 and 2). Furthermore, analyzing the dose dependent BRET2 response curves, we observed a leftward shift of the curves generated with active matriptase compared to the inactive protease. These results suggest that the catalytically active matriptase was more potent in disrupting APLP1 homodimers than inactive matriptase, probably due to its ability to cleave the E1 domain of APLP1. Statistical analysis of the data set of each curve show a statistical difference between the two curves.

## Discussion

For several years, research efforts have focused on the general understanding of the pathophysiology of AD and on APP processing for the development of therapeutic approaches. In this context, several novel proteases have been recently identified to cleave APP and to alter A $\beta$  production 43. However, much less is known on the processing of APP homolog APLP1 and whether their proteolytic fragments have biological functions in the CNS or in peripheral tissues. Here, we identify matriptase as a novel protease that cleaves APLP1 at specific residue in its E1 ectodomains, which impacts its ability to form homodimers, a key molecular event regulating its functions.

Matriptase is one of the most studied TTSP and its expression was considered exclusive to epithelial cells. However, several recent studies have shown it is expressed in human brain

regions 38, neuronal progenitor cells 34, microglia, activated astrocytes around amyloid plaque and neuronal IPSC cells 36–38,44. We and others previously showed that matriptase cleaves APP 38,45, a new potential substrate for matriptase. Here, we find that matriptase interacts with and cleaves APLP1. Physiologically, this interaction and cleavage could occur in the brain where expression of matriptase is low but expression of APLP1 is high as well as in peripheral tissues, such as pancreas, where all both proteins are expressed 14.

We observed that matriptase interacts with APLP1 in cellulo. Interaction with matriptase has been confirmed in vitro for APLP1 ectodomain. This latter result suggests that this interaction is weak or requires post-translational modifications or other factors/partners that were not present in the in vitro assay 46.

Matriptase hydrolyzes peptide bonds C-terminal to specific basic amino acids with a clear preference for Arg over Lys in the P1 position and basic amino acids in the P3 position 30,47. Accordingly, mass spectrometry analysis and mutagenesis studies have identified Arg124 within the sequence GSRR□SGSC in the E1 domain of the extracellular region of APLP1 as the major matriptase cleavage site. To our knowledge, this specific arginine has never been identified as a processing site by other proteases. Interestingly, we previously reported that matriptase cleaves at Arg102 of APP's E1 domain 38. Sequence alignment of matriptase cleavage sites of APP, APLP1 highlighted their location at the same position in the GFLD region of their E1 domains (Supplementary Information 8), indicating that this well-exposed region is favorable for matriptase processing. In summary we report that two APP family members are cleaved by matriptase in a conserved region of their E1 domains.

Compared to APP, much less is known about the proteolytic cleavage of APLP1 and the functional consequence of processing. APLP1, like APP, undergo shedding of their ectodomain by  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretases, followed by  $\gamma$ -secretase-mediated intramembrane proteolysis 46,48,49. Although the physiological role of the shed forms of APP is starting to emerge, the function of shed APLP1 is less well defined. However, different forms of soluble APLP have been detected in human cerebrospinal fluid 50–52 and it has been shown that a soluble N-terminal fragment of the closely related member APLP2 binds Death receptor 6 (DR6) 53. In addition to secretases, another protease, rhomboid protease RHBDL4, cleaves multiple sites within APLP ectodomains resulting in several N- and C-terminal fragments 54. However, these cleavages occur in the lumen of the endoplasmic reticulum and regulate cell surface APLP levels 54. Matriptase is thus one of the few proteases reported to cleave APLP ectodomains, potentially



generating fragments that can have biological activities or altering processing by other proteases.

We report here that inactive matriptase can alter APLP1 dimerization and furthermore, that the active form is even more potent at disrupting this dimer. This suggests that modulation of APLP1 dimerization involves two distinct mechanisms i.e. through direct protein-protein interaction and proteolytic cleavage in the E1 domain. The E1 domain of APP family members has been previously reported to mediate homo- and heterophilic interaction of APP/APLPs 23,55. Deleting the GFLDs of APP and APLP2 inhibited cis homo- and hetero-dimerization of APP and APLP2 but only marginally affected APLP1 dimerization 23, suggesting that the E2 domain is crucial for initiating APLP1 interaction 21. The BRET homodimerization assay indicated that cleavage by matriptase in the GFLD region reduces the capacity of APLP1 to form cis homodimers. Although mass spectrometry analysis indicates that the main cleavage by matriptase occurs in the GFLD domain, we cannot exclude cleavage at other sites or that indirect effects of matriptase activity are also involved in this inhibition of APLPs cis interaction. Moreover, given that the E1 domain is also a key interface for APP/APLPs trans dimerization 55, we expect that matriptase cleavage would affect trans interaction of APP family members. Cis and trans homo- and hetero-dimerization of APP family members have been involved in multiple functions including cell signaling 56, neurite outgrowth 57, neuronal cell adhesion 21, trans-cellular adhesion 55, synapse formation and function 12,58,59, as well as A $\beta$  peptides production 22,23,25. Thus, membrane-bound or soluble matriptase cleavage of APP family members could regulate their functions by altering their capacity to dimerize in the brain or in peripheral tissues.

In conclusion, this study identifies matriptase as a novel APLP1 cleaving protease altering its ability to form dimers, an important feature that is known to affect functions. Importantly, evaluating the impact of those events in a physiological context would provide novel insights into how APLPs function is regulated in vivo and to which extent this regulation could influence pathological states.

## **Methods**

### **Antibodies and reagents**

Anti-GFP rabbit polyclonal antibodies (pAbs) and anti-human matriptase pAbs were purchased from Clontech Molecular Probes (Eugene, OR, USA), and Bethyl Laboratories (Montgomery, TX) respectively and were used as described previously <sup>42</sup>.

### **BRET-based biosensor assays**

HEK293 cells were transfected with indicated constructs and plated in 96-well white plates (50,000 cells/well). After 48 h, cells were then washed with buffer (10 mM Hepes, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 4.2 mM KCl, 146 mM NaCl, 5.5 mM glucose, pH 7.4) and incubated with 5 μM coelenterazine 400A for 10 minutes. Using a TECAN M1000 fluorescence plate reader, signals were measured. BRET ratio was calculated as the GFP10 emission over RLucII luminescence emission.

### **Cell culture**

HEK293 cells were kindly provided by Dr. Alexandra Newton (University of California, San Diego, CA, USA) and were grown in Dulbecco's modified Eagle's high glucose medium (Invitrogen) with 10% fetal bovine serum (FBS) (Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA), 2 mM L-glutamine, 50 IU/mL penicillin and 50 μg/mL streptomycin (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) as previously described<sup>42</sup>. HEK293 cells were transfected with Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen), according to the manufacturers' instructions

### **Co-immunoprecipitation and immunoblotting**

HEK293 cells were plated in 60-mm culture dishes and transfected with indicated constructs and co-immunoprecipitation assays were performed as previously described<sup>42</sup>. Briefly, after 48 h, cells were washed twice with PBS and lysed in 50 mM Tris buffer (pH 7.4) containing 150 mM NaCl, 1% triton x-100, and protease inhibitors for 1 h at 4°C and were then centrifuged 20 min at 15,000 g. Supernatants were incubated with GFP-Trap®\_A (Chromotek, Germany) overnight at 4 °C, washed with 50 mM Tris buffer (pH 7.4) containing 150 mM NaCl, 1% triton x-100, and protease inhibitors three times. Bound immune complexes were boiled in Laemmli sample buffer and proteins separated by SDS-PAGE. Immunoblotting was performed as described previously<sup>42</sup>.

### **DNA constructs**

Mammalian expression vectors APLP1 and APLP2 were kindly provided by Dr. Gerd Multhaup (Mc Gill University, Montreal). APLP1 and APLP2 were subcloned in pCMV5-M6P-GFP vector as previously described<sup>42,65</sup> to produce a fusion protein containing a N-terminal mannose-6-phosphate signal peptide followed by GFP and APLPs amino acid

sequences. APLP1 and APLP2 containing the N-terminus (residues 39-581 and 32-691 respectively) and C-terminus (residues 597-650 and 709-763 respectively) coding sequences were subcloned in pET41a (Novagen). APLP1 and APLP2 coding sequence was inserted upstream of GFP10 and RLucII in a pIRES-Hygromycin backbone using the NEBuilder HiFi DNA Assembly cloning kit as recommend by the manufacturer's instructions (New England Biolabs, MA, USA). Recombinant matriptase (residues 596–855) construction used for bacterial expression (pQE30 vector, Qiagen, Mississauga, ON, Canada) and S805A-matriptase-pcDNA3.1 have been described previously<sup>43,66</sup>. All constructs were sequenced before being used.

### **Glutathione S-transferase pull-down assays.**

GST pull down assays were performed as described previously<sup>42</sup>. GST fusion proteins expressed in *Escherichia coli* BL21 were purified on glutathione-Sepharose 4B beads (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA) according to the manufacturer's instructions. Using the TNT T7 rabbit reticulocyte Quick Coupled Transcription/Translation system (Promega, San Luis Obispo, CA, USA), the <sup>35</sup>S-labelled *in vitro* translation products of pcDNA3.1-human APLP1, APLP2 and matriptase were prepared in the presence of [<sup>35</sup>S] EasyTag EXPRESS labelling mix (73% Met/22% Cys; 41,000 Ci/mmol, Perkin Elmer). The *in vitro* translated products were incubated with 10 µg of purified GST or GST-fusion protein in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 150 mM NaCl, 1% triton x-100, protease inhibitors for 2h at 4°. Beads were washed four times with the same buffer. Bound proteins were eluted with Laemmli buffer, resolved by SDS-PAGE and visualized by autoradiography.

### ***In vitro* cleavage assays**

The production of WT matriptase (residues 596–855) or S805A were purified as previously described<sup>66</sup>. The <sup>35</sup>S-labelled *in vitro* translation products of pcDNA3.1-human APLP1 and APLP2 were prepared as described in the section “Glutathione S-transferase pull-down assays”. In a volume of 100 µL of 100 mM Tris-HCl (pH 8.5) containing 500 µg/mL BSA enzymatic assays were performed. For 1 hour at 37°C, <sup>35</sup>S labelled APLP1 and APLP2 (0.25 µL) *in vitro* translated were incubated with 0, 1, 10 and 100 nM of recombinant WT matriptase or 100 nM of inactive matriptase S805A, as described previously<sup>42</sup>. 30 µL of Laemmli buffer were used to stop enzymatic reactions, resolved by SDS-PAGE and visualized by autoradiography.

### **Mass spectrometry analysis**

GST fusion proteins were expressed in *Escherichia coli* BL21 and purified on glutathione-Sepharose 4B beads (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA) according to the manufacturer's instructions. For 2 hours at 37 °C, bound proteins were incubated in 100 µL of 100 mM Tris-HCl (pH 8.5) containing or not 100 nM of recombinant soluble WT matriptase. The supernatant was then collected, lyophilised and suspended in 25 µL of 10mM HEPES/KOH (pH7.5). As previously described <sup>42</sup>, Mass spectrometry analysis was performed using an Orbitrap QExactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) and data were processed, searched, analyzed, and quantified using the MaxQuant software package version 1.5.2.8 employing the Human Uniprot database (16/07/2013, 88,354 entries).

### **Treatment of cells with Recombinant Matriptase**

Cleavage assays *in cellulo* using purified recombinant matriptase were performed as described previously <sup>42</sup>. Briefly, culture medium of HEK293 was removed and replaced with 2 mL of serum-free HCELL-100 medium (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) containing 5 nM of recombinant soluble human WT matriptase or mutant S805A. The conditioned medium was collected after 36h incubation and concentrated with Amicon Ultra Centrifugal filters 3,000 NMWL (Merck Millipore Ltd., T., C., Co Cork IRL). Both cell lysates and concentrated conditioned medium were then analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting.

### **Statistical analysis**

Experiments were performed at least three times and a one sample t test with a hypothetical value set to 1 for GST alone was used for GST-Pull Down quantification analysis.

# Matriptase processing of APLP1 ectodomains alter its homodimerization

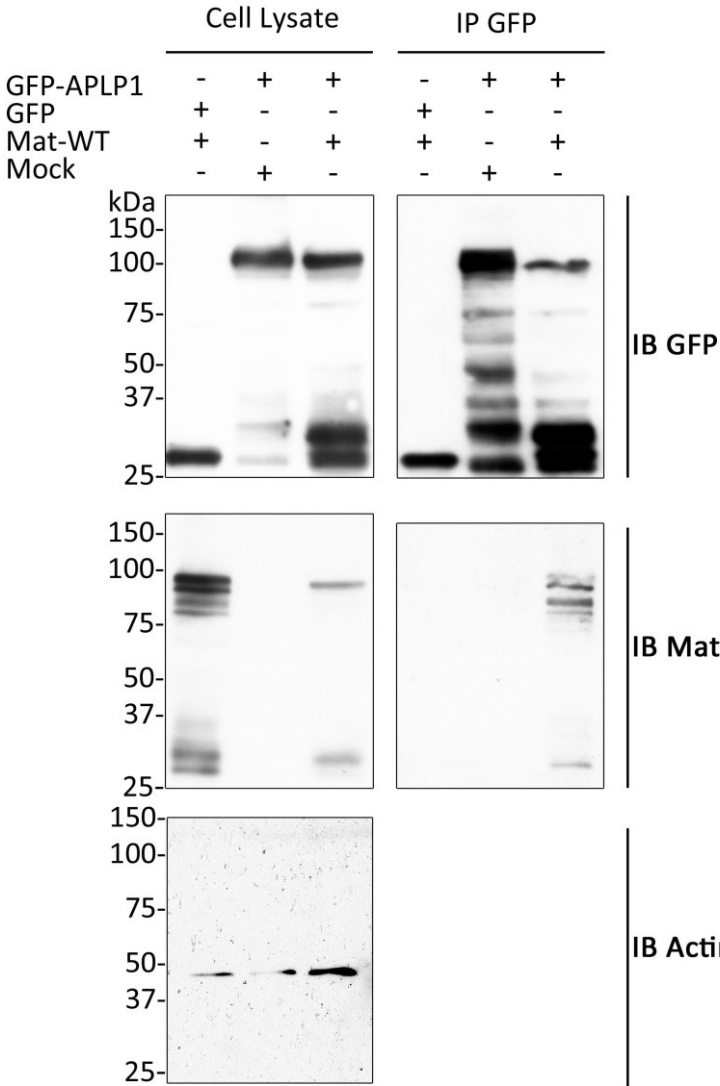
Erwan Lanchec<sup>1</sup>, Antoine Désilets<sup>1</sup>, François Béliveau<sup>1</sup>, Richard Leduc<sup>1\*</sup> and Christine Lavoie<sup>1\*</sup>

## Supplementary Information

Table of contents:

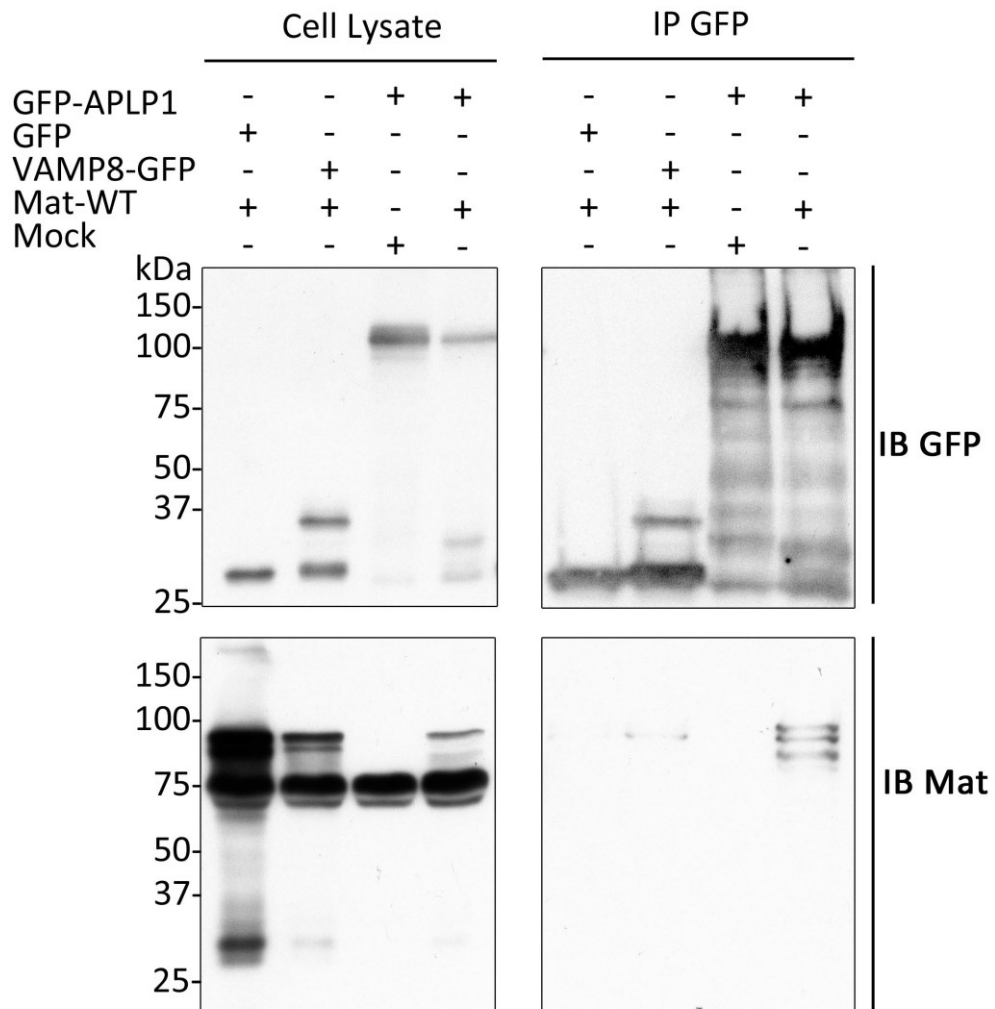
FIGURE S1. Matriptase interacts with APLP1.	p2
FIGURE S2. Matriptase interacts with APLP1.	p3
FIGURE S3. In vitro interaction of matriptase with the ectodomain of APLP1	p4
FIGURE S4. Matriptase cleaves APLP1 in cellulo	p5
FIGURE S5. Matriptase cleavage of APLP1 is inhibited by HAI-1	p6
FIGURE S6. Matriptase-2 does not cleave APLP1	p7
FIGURE S7. Matriptase cleaves APLP1 at arginine 124	p8
FIGURE S8. Sequence alignment of APP and APLP1	p9

**Supplementary Information 1**



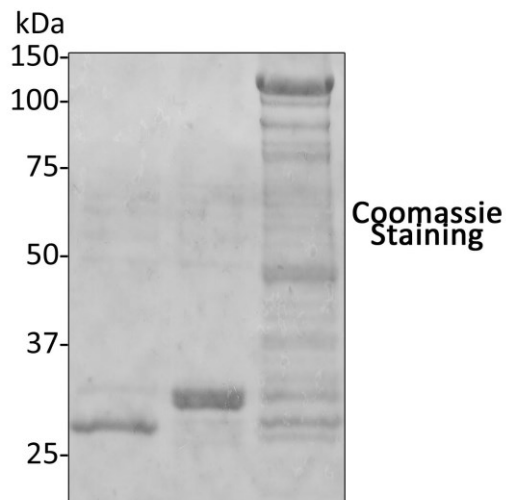
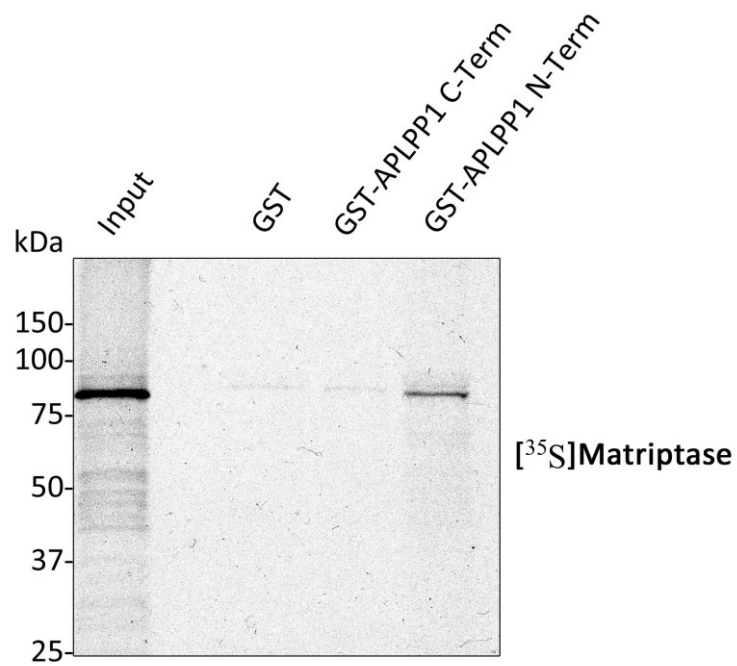
**Supplementary Information 1. Matriptase interacts with APLP1.** Lysate of HEK293 cells transfected with matriptase and GFP-tagged APLP1 or GFP alone were immunoprecipitated (IP) with GFP-Trap beads and then immunoblotted (IB) with anti-matriptase, anti-GFP or anti-actin antibodies to detect matriptase, actin and APLP1, respectively (n=3).

## Supplementary Information 2



**Supplementary Information 2. Matriptase interacts with APLP1.** Lysate of HEK293 cells transfected with matriptase and GFP-tagged APLP1, GFP alone or VAMP8-GFP were immunoprecipitated (IP) with GFP-Trap beads and then immunoblotted (IB) with anti-matriptase or anti-GFP antibodies to detect matriptase, GFP, VAMP8 and APLP1, respectively (n=1).

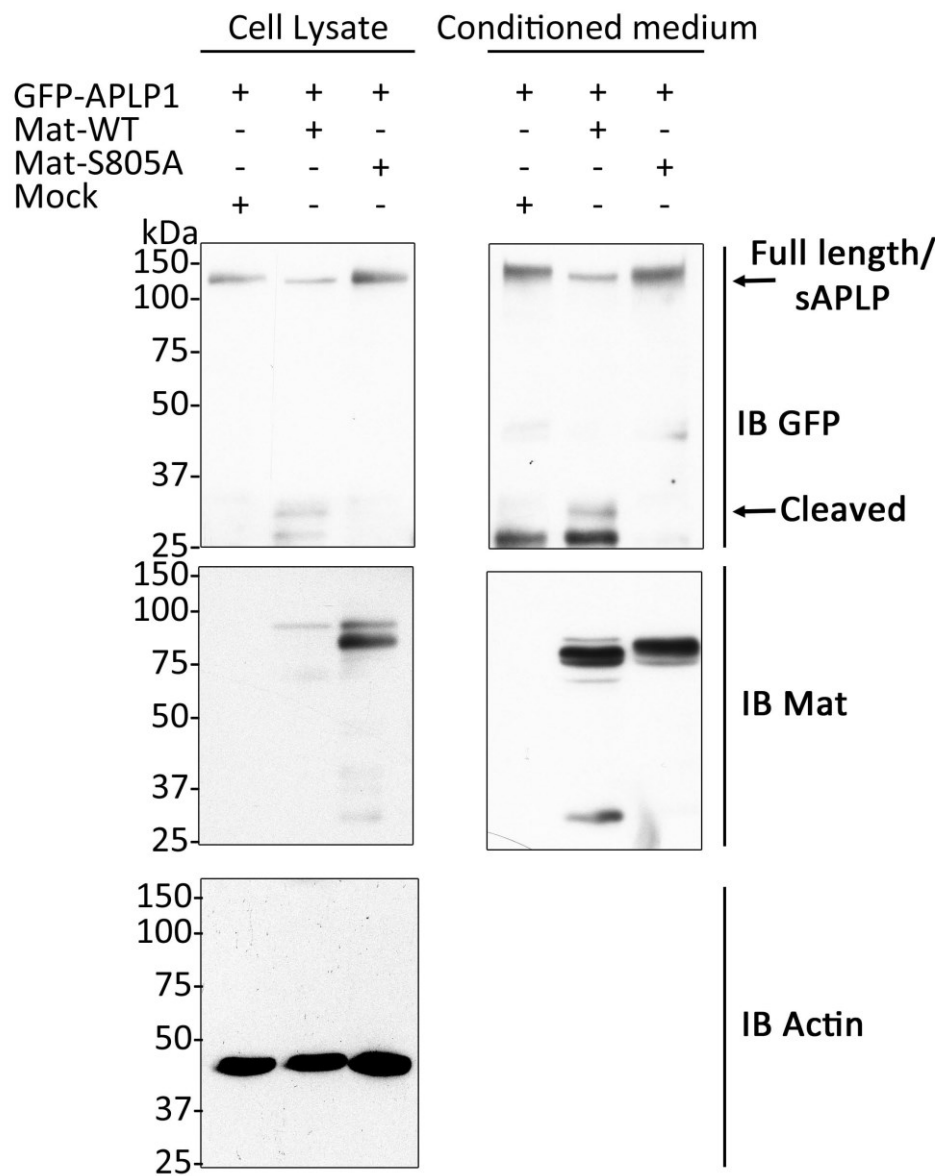
### Supplementary Information 3



**Supplementary Information 3.** *In vitro* interaction of matriptase with the ectodomain of APLP1. APLP1 mutants and GST protein (10  $\mu\text{g}$ ) were immobilized on glutathione beads and incubated with *in vitro* translated  $^{35}\text{S}$ -labeled matriptase. Bound proteins were separated by SDS-PAGE and detected by autoradiography. GST proteins were detected with Coomassie blue staining. Input = 2.5% of the total *in vitro* translated product (n=3).

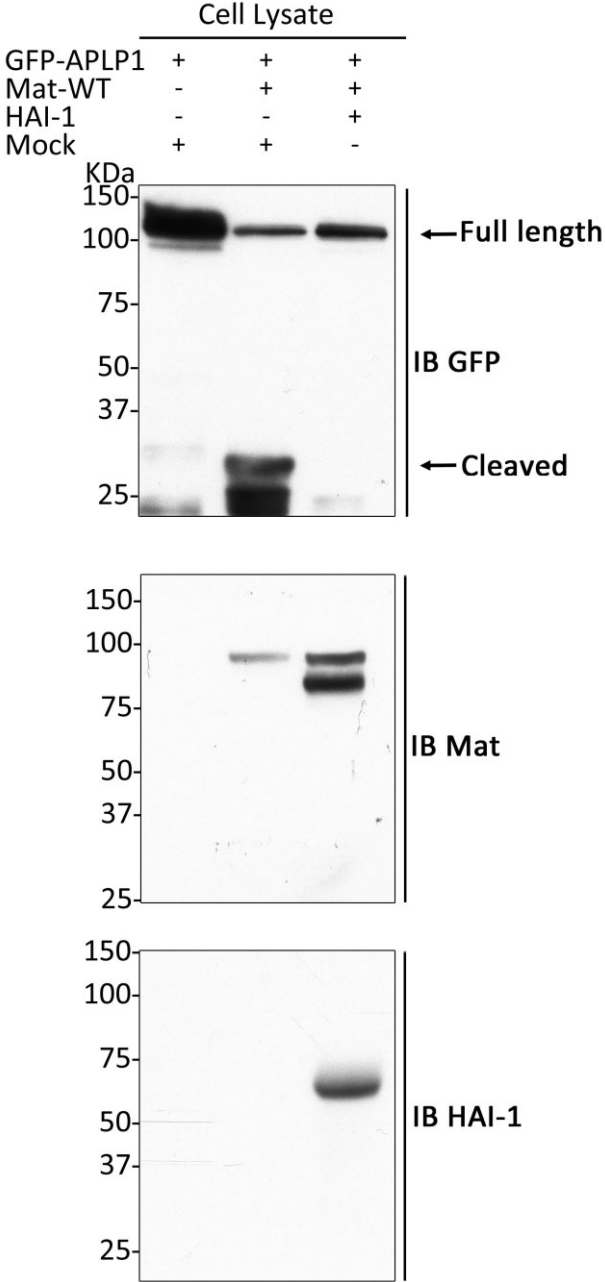


## Supplementary Information 4



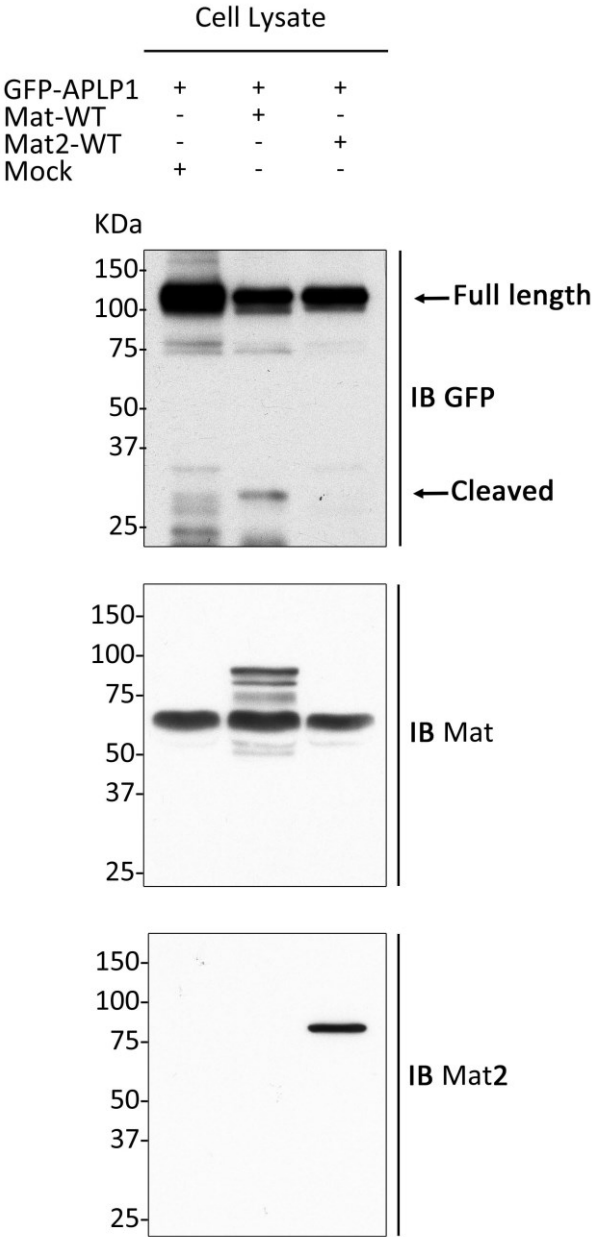
**Supplementary Information 4.** Matriptase cleaves APLP1 *in cellulo*. HEK293 cells were transfected with WT matriptase, a catalytically inactive matriptase mutant (S805A) or empty vector (mock) together with GFP-tagged APLP1. Lysates and conditioned media were immunoblotted with anti-matriptase, anti-GFP, anti-actin antibody to detect matriptase, actin, APLP1 and APLP1 fragments (n=3 for each APLPs). The GFP-tagged APLP1 fragment (cleaved) of 33 kDa in cell lysate and medium are shown (arrow).

**Supplementary Information 5**



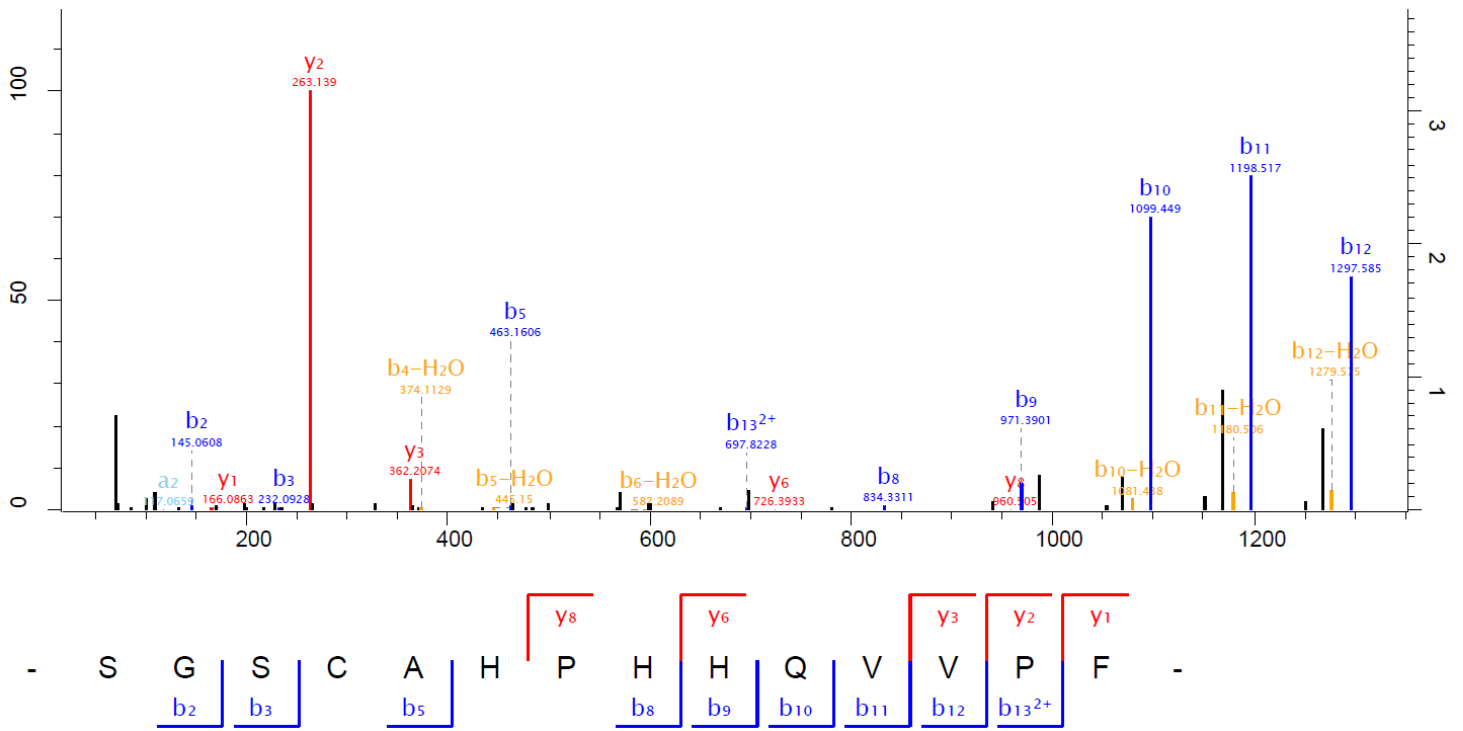
**Supplementary Information 5.** Matriptase cleavage of APLP1 is inhibited by HAI-1. Lysate of HEK293 cells transfected with GFP-tagged APLP1 and matriptase together with HAI-1 or empty vector (mock) were immunoblotted with anti-matriptase, anti-HAI-1 and anti-GFP antibody to detect matriptase, HAI-1, APLP1 full-length and APLP1 fragments (n=3).

**Supplementary Information 6**



**Supplementary Information 6.** Matriptase-2 does not cleave APLP1. Lysate of HEK293 cells transfected with GFP-tagged APLP1 together with wild-type (WT) matriptase (Mat-WT), a catalytically inactive matriptase mutant (Mat-S805A), V5-tagged matriptase 2 (Mat2-WT) or empty vector (mock) were immunoblotted with anti-matriptase, anti-V5 or anti-GFP antibodies to detect matriptase, matriptase-2, and APLP1 full-length/fragment, respectively (n=3).

# Supplementary Information 7



### Supplementary Information 8

```
APP      93  TIQNWCKRGRKQCKTHPHF 111
          ++ WC      R      HPH
APLP1    115 PMERWCGGSRSGSCAHPHH 133
```

**Supplementary Information 8.** Sequence alignment of the cleavage sequence in the E1 domain of APP, APLP1.

## References

1. Ferri, C. P. *et al.* Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *The Lancet* **366**, 2112–2117 (2005).
2. Zhao, L. N., Long, H., Mu, Y. & Chew, L. Y. The toxicity of amyloid  $\beta$  oligomers. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 7303–7327 (2012).
3. Shankar, G. M. *et al.* Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* **14**, 837–842 (2008).
4. Chiang, P. K., Lam, M. A. & Luo, Y. The many faces of amyloid beta in Alzheimer's disease. *Curr. Mol. Med.* **8**, 580–584 (2008).
5. Coulson, E. J., Paliga, K., Beyreuther, K. & Masters, C. L. What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. *Neurochem. Int.* **36**, 175–184 (2000).
6. Small, D. H. *et al.* A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **14**, 2117–2127 (1994).
7. Hoefgen, S. *et al.* Heparin induced dimerization of APP is primarily mediated by E1 and regulated by its acidic domain. *J. Struct. Biol.* **187**, 30–37 (2014).
8. Kitaguchi, N., Takahashi, Y., Tokushima, Y., Shiojiri, S. & Ito, H. Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature* **331**, 530–532 (1988).
9. Schmaier, A. H. *et al.* Protease nexin-2/amyloid beta protein precursor. A tight-binding inhibitor of coagulation factor IXa. *J. Clin. Invest.* **92**, 2540–2545 (1993).
10. Gu nette, S., Strecker, P. & Kins, S. APP Protein Family Signaling at the Synapse: Insights from Intracellular APP-Binding Proteins. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, (2017).
11. Sprecher, C. A. *et al.* Molecular cloning of the cDNA for a human amyloid precursor protein homolog: evidence for a multigene family. *Biochemistry* **32**, 4481–4486 (1993).
12. Wasco, W. *et al.* 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**, 10758–10762 (1992).
13. Coronel, R. *et al.* Neuronal and Glial Differentiation of Human Neural Stem Cells Is Regulated by Amyloid Precursor Protein (APP) Levels. *Mol. Neurobiol.* **56**, 1248–1261 (2019).

14. Wang, Z. *et al.* Presynaptic and postsynaptic interaction of the amyloid precursor protein promotes peripheral and central synaptogenesis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **29**, 10788–10801 (2009).
15. Billnitzer, A. J., Barskaya, I., Yin, C. & Perez, R. G. APP independent and dependent effects on neurite outgrowth are modulated by the receptor associated protein (RAP). *J. Neurochem.* **124**, 123–132 (2013).
16. Uhlén, M. *et al.* Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* **347**, 1260419 (2015).
17. The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/>.
18. Lorent, K. *et al.* 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**, 1009–1025 (1995).
19. von Koch, C. S. *et al.* Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol. Aging* **18**, 661–669 (1997).
20. Heber, S. *et al.* Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **20**, 7951–7963 (2000).
21. Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16193067>.
22. Dahms, S. O. *et al.* Structure and biochemical analysis of the heparin-induced E1 dimer of the amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 5381–5386 (2010).
23. Dunsing, V., Mayer, M., Liebsch, F., Multhaup, G. & Chiantia, S. Direct evidence of amyloid precursor-like protein 1 trans interactions in cell-cell adhesion platforms investigated via fluorescence fluctuation spectroscopy. *Mol. Biol. Cell* **28**, 3609–3620 (2017).
24. Mayer, M. C. *et al.* Amyloid precursor-like protein 1 (APLP1) exhibits stronger zinc-dependent neuronal adhesion than amyloid precursor protein and APLP2. *J. Neurochem.* **137**, 266–276 (2016).
25. Mayer, M. C. *et al.* Novel zinc-binding site in the E2 domain regulates amyloid precursor-like protein 1 (APLP1) oligomerization. *J. Biol. Chem.* **289**, 19019–19030 (2014).

26. Kaden, D. *et al.* Homophilic Interactions of the Amyloid Precursor Protein (APP) Ectodomain Are Regulated by the Loop Region and Affect  $\beta$ -Secretase Cleavage of APP. *J. Biol. Chem.* **283**, 7271–7279 (2008).
27. Kaden, D. *et al.* Subcellular localization and dimerization of APLP1 are strikingly different from APP and APLP2. *J. Cell Sci.* **122**, 368–377 (2009).
28. Munter, L.-M. *et al.* GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of Abeta42. *EMBO J.* **26**, 1702–1712 (2007).
29. Eggert, S., Midthune, B., Cottrell, B. & Koo, E. H. Induced dimerization of the amyloid precursor protein leads to decreased amyloid-beta protein production. *J. Biol. Chem.* **284**, 28943–28952 (2009).
30. Lu, P., Takai, K., Weaver, V. M. & Werb, Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, (2011).
31. Antalis, T. M., Bugge, T. H. & Wu, Q. Membrane-anchored serine proteases in health and disease. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **99**, 1–50 (2011).
32. Lee, S.-L., Dickson, R. B. & Lin, C.-Y. Activation of Hepatocyte Growth Factor and Urokinase/Plasminogen Activator by Matriptase, an Epithelial Membrane Serine Protease. *J. Biol. Chem.* **275**, 36720–36725 (2000).
33. Netzel-Arnett, S. *et al.* Evidence for a matriptase-prostasin proteolytic cascade regulating terminal epidermal differentiation. *J. Biol. Chem.* **281**, 32941–32945 (2006).
34. Takeuchi, T. *et al.* Cellular localization of membrane-type serine protease 1 and identification of protease-activated receptor-2 and single-chain urokinase-type plasminogen activator as substrates. *J. Biol. Chem.* **275**, 26333–26342 (2000).
35. Wu, C.-J., Feng, X., Lu, M., Morimura, S. & Udey, M. C. Matriptase-mediated cleavage of EpCAM destabilizes claudins and dysregulates intestinal epithelial homeostasis. *J. Clin. Invest.* **127**, 623–634 (2017).
36. Benaud, C., Dickson, R. B. & Lin, C. Y. Regulation of the activity of matriptase on epithelial cell surfaces by a blood-derived factor. *Eur. J. Biochem.* **268**, 1439–1447 (2001).
37. Szabo, R. *et al.* Regulation of cell surface protease matriptase by HAI2 is essential for placental development, neural tube closure and embryonic survival in mice. *Dev. Camb. Engl.* **136**, 2653–2663 (2009).
38. Fang, J.-D., Chou, H.-C., Tung, H.-H., Huang, P.-Y. & Lee, S.-L. Endogenous Expression of Matriptase in Neural Progenitor Cells Promotes Cell Migration and Neuron Differentiation. *J. Biol. Chem.* **286**, 5667–5679 (2011).



39. Tung, H.-H. & Lee, S.-L. Physical Binding of Endothelial MCAM and Neural Transmembrane Protease Matriptase—Novel Cell Adhesion in Neural Stem cell Vascular Niche. *Sci. Rep.* **7**, 4946 (2017).
40. Yin, Z. *et al.* Immune hyperreactivity of A $\beta$  plaque-associated microglia in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **55**, 115–122 (2017).
41. Wirz, K. T. S. *et al.* Cortical beta amyloid protein triggers an immune response, but no synaptic changes in the APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> Alzheimer's disease mouse model. *Neurobiol. Aging* **34**, 1328–1342 (2013).
42. Lanchec, E. *et al.* The type II transmembrane serine protease matriptase cleaves the amyloid precursor protein and reduces its processing to  $\beta$ -amyloid peptide. *J. Biol. Chem.* **292**, 20669–20682 (2017).
43. Désilets, A. *et al.* Mutation G827R in Matriptase Causing Autosomal Recessive Ichthyosis with Hypotrichosis Yields an Inactive Protease. *J. Biol. Chem.* **283**, 10535–10542 (2008).
44. Oberst, M. D., Williams, C. A., Dickson, R. B., Johnson, M. D. & Lin, C.-Y. The activation of matriptase requires its noncatalytic domains, serine protease domain, and its cognate inhibitor. *J. Biol. Chem.* **278**, 26773–26779 (2003).
45. Shi, Y. E. *et al.* Identification and characterization of a novel matrix-degrading protease from hormone-dependent human breast cancer cells. *Cancer Res.* **53**, 1409–1415 (1993).
46. Béliveau, F., Désilets, A. & Leduc, R. Probing the substrate specificities of matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1 with internally quenched fluorescent peptides. *FEBS J.* **276**, 2213–2226 (2009).
47. Bhuckory, S., Kays, J. C. & Dennis, A. M. In Vivo Biosensing Using Resonance Energy Transfer. *Biosensors* **9**, (2019).
48. Grau, S. *et al.* Implications of the serine protease HtrA1 in amyloid precursor protein processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 6021–6026 (2005).
49. Keren-Shaul, H. *et al.* A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell* **169**, 1276-1290.e17 (2017).
50. Chen, L.-M. & Chai, K. X. Matriptase cleaves the amyloid-beta peptide 1-42 at Arg-5, Lys-16, and Lys-28. *BMC Res. Notes* **12**, 5 (2019).
51. Kirchofer, D. *et al.* Tissue expression, protease specificity, and Kunitz domain functions of hepatocyte growth factor activator inhibitor-1B (HAI-1B), a new splice variant of HAI-1. *J. Biol. Chem.* **278**, 36341–36349 (2003).

52. Eggert, S. *et al.* The proteolytic processing of the amyloid precursor protein gene family members APLP-1 and APLP-2 involves alpha-, beta-, gamma-, and epsilon-like cleavages: modulation of APLP-1 processing by n-glycosylation. *J. Biol. Chem.* **279**, 18146–18156 (2004).
53. Li, Q. & Südhof, T. C. Cleavage of amyloid-beta precursor protein and amyloid-beta precursor-like protein by BACE 1. *J. Biol. Chem.* **279**, 10542–10550 (2004).
54. Schauenburg, L. *et al.* APLP1 is endoproteolytically cleaved by  $\gamma$ -secretase without previous ectodomain shedding. *Sci. Rep.* **8**, 1916 (2018).
55. Webster, M. T. *et al.* A novel protein, amyloid precursor-like protein 2, is present in human brain, cerebrospinal fluid and conditioned media. *Biochem. J.* **310 ( Pt 1)**, 95–99 (1995).
56. Paliga, K. *et al.* Human amyloid precursor-like protein 1--cDNA cloning, ectopic expression in COS-7 cells and identification of soluble forms in the cerebrospinal fluid. *Eur. J. Biochem.* **250**, 354–363 (1997).
57. Yanagida, K. *et al.* The 28-amino acid form of an APLP1-derived Abeta-like peptide is a surrogate marker for Abeta42 production in the central nervous system. *EMBO Mol. Med.* **1**, 223–235 (2009).
58. Nikolaev, A., McLaughlin, T., O’Leary, D. D. M. & Tessier-Lavigne, M. APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* **457**, 981–989 (2009).
59. Paschkowsky, S., Hamzé, M., Oestereich, F. & Munter, L. M. Alternative Processing of the Amyloid Precursor Protein Family by Rhomboid Protease RHBDL4. *J. Biol. Chem.* **291**, 21903–21912 (2016).
60. Soba, P. *et al.* Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *EMBO J.* **24**, 3624–3634 (2005).
61. Copenhaver, P. F. & Kögel, D. Role of APP Interactions with Heterotrimeric G Proteins: Physiological Functions and Pathological Consequences. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, 3 (2017).
62. Luu, L. *et al.* Amyloid Precursor Protein Dimerisation Reduces Neurite Outgrowth. *Mol. Neurobiol.* **56**, 13–28 (2019).
63. Schilling, S. *et al.* APLP1 Is a Synaptic Cell Adhesion Molecule, Supporting Maintenance of Dendritic Spines and Basal Synaptic Transmission. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **37**, 5345–5365 (2017).
64. Stahl, R. *et al.* Shedding of APP limits its synaptogenic activity and cell adhesion properties. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 410 (2014).

65. Icking, A., Amaddii, M., Ruonala, M., Höning, S. & Tikkanen, R. Polarized Transport of Alzheimer Amyloid Precursor Protein Is Mediated by Adaptor Protein Complex AP1-1B. *Traffic* **8**, 285–296 (2007).
66. Désilets, A., Longpré, J.-M., Beaulieu, M.-E. & Leduc, R. Inhibition of human matriptase by eglin c variants. *FEBS Lett.* **580**, 2227–2232 (2006).

### **Acknowledgements**

We thank Dr. Gerhard Multhaup (Mc Gill University, Montreal) for the APLP1 and APLP2 cDNA. We also thank the Plateforme de Protéomique de l'Université de Sherbrooke for RT-qPCR and MS analysis. This work was supported by Pfizer-Fonds de Recherche du Québec-Santé Innovation Funds for Alzheimer Disease and Related Disorders and the Canadian Society of Alzheimer.

### **Authors contributions**

E.L. planned designed the study, performed most of the experiments, collected and analysed the data, made all the figures, drafted the manuscript, brought intellectual feedback, participated in interpretation of data and revised the manuscript. F.B, performed BRET experiments, provided experimental advice, designed the study, brought intellectual feedback, participated in interpretation of data and revised the manuscript. A.D. performed experiments, designed the study, brought intellectual feedback, participated in interpretation of data and revised the manuscript. C.L. and R.L. designed the study, brought intellectual feedback, participated in interpretation of data and revised the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work.

### **Additional information**

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

## 5. DISCUSSION

La matriptase est une protéase à sérine appartenant à la famille des TTSP qui est principalement connue pour ses rôles physiologiques dans les cellules épithéliales et son implication dans les cancers d'origine épithéliale. Ce n'est que récemment que l'expression de la matriptase dans d'autres cellules et organes a commencé à être documentée notamment chez la souris. Nous avons caractérisé l'expression des ARNm de la matriptase au niveau du cerveau humain dans les neurones et les astrocytes, mais aussi dans les cellules endothéliales microvasculaires et les cellules épithéliales du plexus choroïde. Pour les cellules épithéliales du plexus choroïde ce résultat peut s'expliquer en partie par la présence de cellules endothéliales dans lequel l'expression de la matriptase avait déjà été documentée (331, 332), mais par pour les neurones et les astrocytes. L'origine embryonnaire des neurones et de la glie provient de l'ectoderme et par la suite du neuroectoderme. L'ectoderme au cours de l'embryogenèse donnera entre autres des cellules épithéliales de la peau. Les cellules composant le neuroectoderme et participant à la formation des cellules souches dans le cerveau sont aussi souvent appelées cellules neuroépithéliales du fait qu'elles conservent des marqueurs de cellules épithéliales comme leur orientation et l'expression de plusieurs protéines spécifiques à ces cellules (333). Ces marqueurs disparaissent en partie au cours de leurs différenciations en neurone et en cellules de la glie. Ces observations expliqueraient en partie l'implication de la matriptase dans la fermeture du tube neural à partir du neuroectoderme (314) (qui deviendra par la suite les ventricules du cerveau) et l'implication de la matriptase dans la différenciation des cellules progénitrices de neurones et leur migration (315, 316).

Nous avons aussi observé une expression des ARNm de la matriptase dans le cortex frontal à la naissance, expression qui décroît progressivement avec l'âge. L'expression des ARNm de la matriptase semble donc suivre une régulation spatiale et temporelle. Le cortex frontal subit de nombreuses modifications au cours de la croissance des individus et de l'apprentissage jusqu'à la fin du développement neuronal vers 21 ans (334). De manière intéressante, l'expression d'APP695 suit un profile similaire (335, 336) à celui de la matriptase au cours du développement des individus au niveau du cortex frontal, en adéquation avec son rôle dans la différenciation neuronale, la synaptogenèse, la croissance des neurites et la plasticité synaptique. La matriptase, en clivant APP et les APLP, pourrait donc avoir elle aussi un rôle dans ces fonctions physiologiques en agissant comme régulateur de leurs activités que ce soit en clivant ces protéines à la membrane ou les formes soluble dans le milieu extracellulaire.

Nous avons aussi montré que la matriptase interagissait avec APP, APLP1 et APLP2 *in cellulo*. Ces interactions ont aussi été observées *in vitro* pour l'ectodomaine d'APP, d'APLP1 mais pas pour APLP2. Étant donné l'identité de séquence des membres de la famille, mais aussi l'homologie de structure de ces protéines, cela semble logique d'observer cette interaction pour les trois membres de la famille APP. Cependant, cette interaction est relativement faible pour la partie N-terminale d'APP et APLP1 et presque identique au contrôle pour APLP2 *in vitro*. Ce résultat peut en partie s'expliquer par le fait que les protéines ont été traduites *in vitro* et qu'une partie de la machinerie nécessaire à la maturation des protéines est absente, comme celle de la glycosylation, importante pour le domaine extracellulaire des protéines (171), modifications post-traductionnelles retrouvées dans les cellules. Le plus intrigant est la différence avec APLP2 comparé aux autres membres de la famille APP, qui, malgré l'identité de séquence et l'homologie de structure avec APP et APLP1, ne semble pas directement interagir avec la matriptase dans ces expériences. Néanmoins, une interaction directe entre la matriptase et APLP2 ne peut pas être complètement exclue, en partie à cause des biais de l'expérience (traduction *in vitro* sans glycosylation, expression des protéines recombinantes dans un système bactérien), de précipitation à la GST, mais aussi pas les résultats de BRET obtenus. En effet, lorsqu'une quantité fixe d'APLP2-GFP10 et une quantité fixe d'APLP2-RlucII sont co-transfectés avec la matriptase S805A, on observe une diminution du signal BRET (Article 2, figure 5A), correspondant à une diminution des interactions entre APLP2-GFP10 et APLP2-RLuc. Cette diminution n'est pas due à l'activité de la matriptase S805A catalytiquement inactive, mais bien due à l'interaction de la matriptase avec les deux protéines. Le signal BRET se produisant lorsque les deux protéines sont à une distance de moins de 100 Å, cela indique une interaction proche, voire directe, entre la matriptase et APLP2, soutenant l'idée d'une interaction directe entre APLP2 et la matriptase.

Le clivage d'APP, d'APLP1 et d'APLP2 par la matriptase se produit dans une boucle conservée chez les trois protéines. Plus précisément, la séquence P4 à P4' du site de clivage d'APLP2 possède 7 acides aminés similaires avec la séquence P4-P4', d'APP et la séquence P4 à P4' d'APLP1 quant à elle possède seulement un acide aminé identique avec APP (voir figure 13).

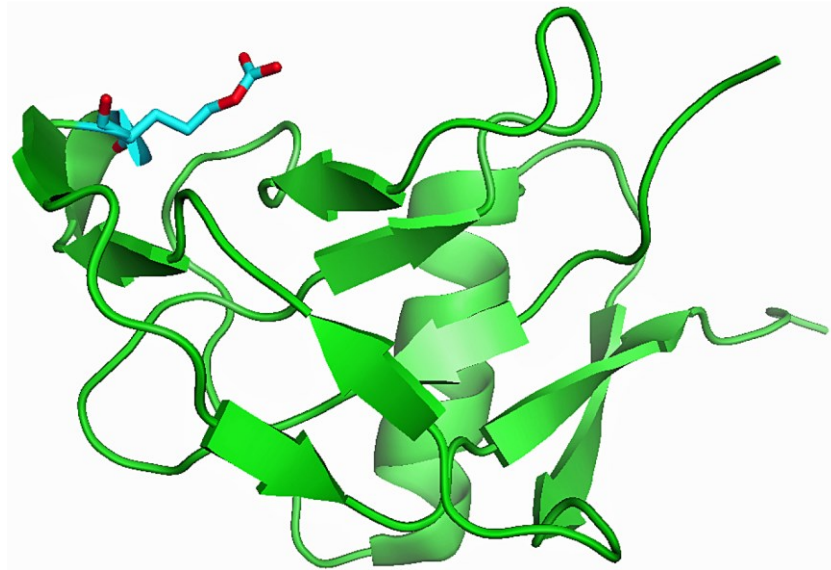
APP	93	TIQNWCKRGRKQCKTHPHF	111
		++ WC R HPH	
APLP1	115	PMERWCGGSRSGSCAHPHH	133
APP	93	TIQNWCKRGRKQCKTHPHF	111
		+I NWC+R +KQCK+ F	
APLP2	111	SIDNWCRRDKKQCKSR--F	127

**Figure 13. Alignement de la séquence P4 à P4' du site de clivage dans le domaine E1 d'APP, APLP1 et APLP2.** La séquence P4 à P4' est encadrée.

Il a été montré que la matriptase clivait préférentiellement après des résidus arginine en position P1 plutôt qu'après des acides aminés lysine (337) et que des résidus basiques étaient aussi préférés en position P3 et P4 (319). Vis-à-vis de la préférence de substrat, APP semble donc un bon substrat pour la matriptase pour les positions P1, P3 et P4. De plus, pour les résidus basiques en position P3 et P4, APLP2 présente aussi une bonne affinité pour la matriptase, contrairement à APLP1. Néanmoins, APLP2 ne semble pas être un bon substrat. Ce résultat peut en partie s'expliquer par la présence d'un résidu lysine à la place de l'arginine en position P1 en comparaison avec APP et APLP1. De plus, la présence d'un acide aminé acide aspartique en position P2 gêne probablement l'association de l'enzyme avec ce substrat. En effet, la présence d'un acide glutamique en position P2, P3 ou P1' réduit grandement l'activité de la matriptase (319). Ce résultat pourrait aussi s'expliquer par la présence d'un domaine Kunitz dans le domaine extracellulaire d'APLP2 comme APP751 et APP770, qui pourrait inhiber le site catalytique de la matriptase malgré la substitution d'une arginine par une proline au résidu P1 de la séquence Kunitz d'APP/APLP2 (résidus 299 et 318, respectivement), par rapport au domaine Kunitz de HAI - 1 (309). Un autre facteur pourrait expliquer la différence de clivage d'APLP2. Les protéines APP, APLP1, APLP2 ont des localisations cellulaires différentes : APLP2 est moins exprimé à la membrane plasmique comparativement à APLP1 et colocalise plus avec les compartiments intracellulaires comme les endosomes, l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique (56). La matriptase quant à elle se rend à la membrane plasmique, où elle peut être larguée dans le milieu extracellulaire (307, 338). Ces observations suggèrent qu'APLP2 pourrait ne pas être un substrat physiologique de la matriptase.

Le site de clivage des membres de la famille d'APP par la matriptase est situé dans une boucle reliant deux sous-domaines du domaine E1 et est important pour le maintien de sa

structure tridimensionnelle (39) (voir figure 14).



**Figure 14 : Structure cristalline du domaine N-terminal GFLD du domaine extracellulaire E1 de la protéine APP. Les résidus 18 à 123 sont représentés et le résidu Arg102 est représenté (PDB 1MWP (339)).**

Cette structure est très similaire pour les trois membres de la famille APP et est importante pour former des homo- ou hétéro-dimères. Une fois clivé, ce domaine perd sa structure tridimensionnelle et la capacité des membres de la famille d'APP à former des homo- ou hétérodimères est altérée (40). En effet, lors de l'étude de la structure de ces domaines, une digestion tryptique partielle conduisait à un clivage en position R102 d'APP (39). Ce clivage était inhibé lorsque le domaine E1 était associé à l'héparine, suggérant, en tout cas pour APP, que la matriptase clive probablement les formes monomériques d'APP que ce soit à la membrane ou que ce soit les formes solubles dans le milieu extracellulaire. Aux vues de la similarité de structure et du site de clivage des membres de la famille APP par la matriptase, cette hypothèse peut être aussi faite pour APLP1 et APLP2.

Plusieurs sites de clivage dans le domaine extracellulaire d'APP et des APLP ont été décrits. Pour certains de ces sites, aucune fonction biologique n'a été découverte pour les peptides sécrétés. Cependant, plusieurs de ces formes solubles ont été décrites comme capables de se lier à des protéines, ou des récepteurs (118, 237), ou encore d'exercer globalement un rôle physiologique sur les synapses ou la transmission sans pour autant que le mécanisme précis ne soit identifié (137). Ces sites de clivage d'APP et des APLP se situent souvent à des résidus proches de la membrane plasmique, et rarement proches de l'extrémité N-terminale. En

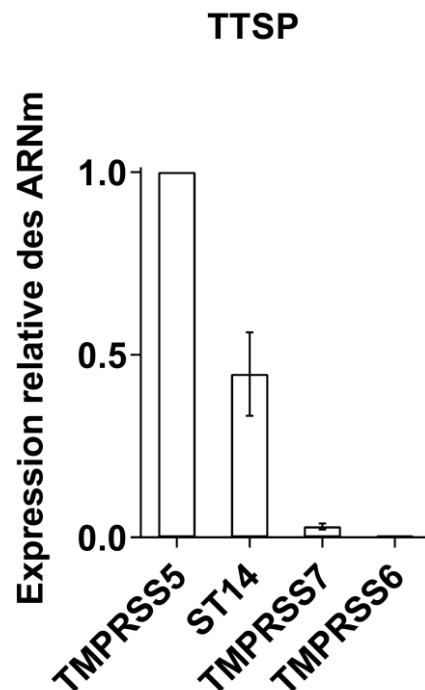
comparaison, les sites de clivage d'APP et des APLP par la matriptase sont plus éloignés de la membrane plasmique, presque à l'extrémité N-terminale des protéines. Les peptides libérés dans l'espace péricellulaire sont donc aussi de petite taille, environ 7-10 kDa chaque. Nous n'avons pas détecté ces peptides dans les échantillons de cerveau humain contrôles ou de patients atteints de la MA, par spectrométrie de masse. Cependant, il semble que ces résultats puissent être liés à des problèmes techniques car les peptides APP étaient peu abondants comparativement aux autres peptides de protéines identifiés (épitopes des anticorps testés sur les échantillons, difficulté à extraire des protéines du tissu cérébral). Aussi, il est possible que les peptides N-terminaux soit rapidement métabolisés dans des conditions physiologiques, et en conséquence difficilement détectables. Les clivages de la famille d'APP par la matriptase dans le domaine E1 laissent supposer que la fonction principale de ce clivage serait donc d'altérer son rôle physiologique. Cependant, il est possible que les peptides sécrétés aient des fonctions physiologiques eux-mêmes.

Au cours des expériences *in vitro* d'essais de clivage en présence de méthionine radioactive, mais aussi des analyses de spectrométrie de masse, plusieurs sites de clivages secondaires ont été identifiés. Après la mutagenèse du site principal de clivage pour APP et APLP1, bien que le produit de clivage majoritaire détecté *in cellulo* disparaisse, les protéines semblent toujours partiellement clivées par la matriptase. Pour APLP2, même après mutagenèse du site de clivage, la protéine est toujours clivée. Ce résultat s'explique en partie par la présence de ces sites de clivages secondaires. Le site de clivage principal n'étant plus disponibles des sites de clivage secondaires peuvent devenir plus accessible pour l'enzyme. Il est possible que la séquence de clivage puisse devenir alors plus favorable pour l'enzyme ou encore que l'enzyme elle-même ne soit plus occupé par le site de clivage principal. Cependant, il est possible que certains de ces sites aient une importance physiologique dans certaines conditions et aient échappé à nos analyses. Les sites de clivages que nous observons sont liés aux anticorps ainsi qu'aux étiquettes utilisées pour détecter les protéines par immunobuvardage de type western. Certains clivages peuvent donc ne pas être détectables par cette technique, de plus le métabolisme rapide de certains fragments d'APP peut rendre l'observation de fragments difficile dans nos conditions expérimentales. De plus, dans le cas des analyses de spectrométrie de masse, seuls l'ectodomaine des protéines APP, APLP1 et APLP2 ont été utilisés. Il est donc possible que certains sites de clivage proches de la membrane plasmique n'aient pas pu être observés de par la petite taille des fragments générés. Cela expliquerait pourquoi d'autres groupes ont observé des clivages dans la séquence du peptide A $\beta$  de la protéine APP que nous



n'avons pas remarqués en spectrométrie de masse (299).

Nous n'avons pas observé le clivage des membres de la famille d'APP par la matriptase 2 *in cellulo* et ceci malgré l'identité de séquence du site catalytique et une activité catalytique similaire (319) avec la matriptase et la similarité des domaines d'interaction des deux protéines (la matriptase possède un domaine LDLRA supplémentaire comparé à la matriptase 2). Néanmoins, la matriptase et la matriptase 2 sont connues pour posséder des substrats différents et la matriptase 2 est majoritairement exprimée au niveau du foie (340). Nous n'avons pas pu tester la matriptase 3, un autre membre de la famille de la matriptase en raison de la difficulté à identifier les transcrits exprimés au niveau du cerveau (340, 341). Cependant, nos échantillons de tissus cérébraux humains testés par RT-qPCR indiquaient des niveaux d'expression très faible pour la matriptase 3 voire inexistants pour la matriptase 2 (voir figure 15). Lorsqu'on observe l'expression de l'ARNm de ces enzymes dans des banques d'ARNm (336, 340), la matriptase 3 semble avoir des niveaux d'expression plus importants que ce que nous avons observé. L'expression de la matriptase suit une régulation spatiale et temporelle, il n'est pas exclu qu'une telle régulation s'applique aussi à la matriptase 2 et la matriptase 3 expliquant le fait que nous ne soyons pas capables de les détecter dans le cerveau humain âgé. Un autre constat est que d'autres TTSP sont exprimées dans le cerveau humain, comme *TMPRSS5*. *TMPRSS5* a une expression plus ubiquitaire et constante dans le temps comparé à la matriptase (336, 340).



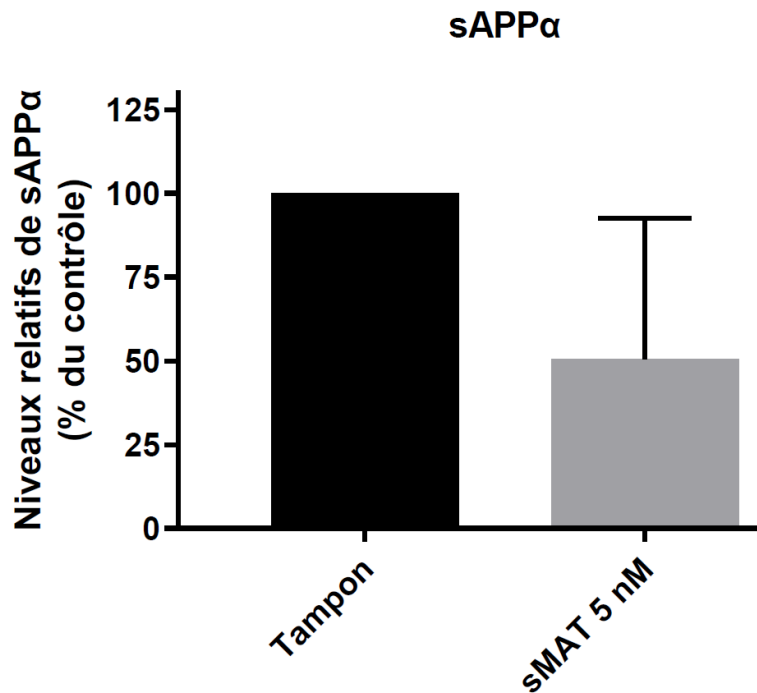
**Figure 15. Expression relative des ARNm de plusieurs TTSP dans le cerveau humain.**

Les niveaux d'ARNm de *TMPRSS5*, *ST14*, *TMPRSS6* et *TEMPRSS7* ont été analysés dans le

cortex frontal humain (n = 5) de patients contrôles, et exprimés par rapport au niveau d'expression de TMPRSS5. Banque de cerveaux de l'Hôpital Douglas à Montréal, Québec, Canada. L'âge moyen du décès était de  $73,8 \pm 12,1$  ans. L'intervalle post mortem pour les prélèvements était de  $22,3 \pm 7,4$  h. Les patients contrôles avaient un diagnostic clinique de patients âgés non déments.

Nous avons observé une diminution de la production de peptide A $\beta$  lorsque la matriptase clive APP. Étant donné que ce clivage est situé dans une partie N-terminale éloignée du peptide A $\beta$ , nous avons émis l'hypothèse que ce clivage altérerait les interactions homo- et hétéromériques de la protéine APP impliquant le domaine E1. En effet, la protéine APP étant toujours en grande partie intacte, les sites de clivage des  $\beta$  et  $\gamma$ -sécrétases sont toujours accessibles et le clivage par la matriptase ne devrait pas altérer la maturation par ces sécrétases. Cette diminution de la production de peptide A $\beta$  pourrait être due à une augmentation du métabolisme de la protéine APP par l' $\alpha$ -sécrétase ; cependant, nous n'avons pas mesuré de différence significative dans la production de sAPP $\alpha$  par ELISA (voir figure 16). Ce résultat renforce l'idée que la diminution du peptide A $\beta$  n'est pas liée aux interactions avec les sécrétases, mais plus liée aux interactions de la protéine APP avec d'autres partenaires comme il a déjà été montré précédemment pour d'autres protéines (342, 343). Cette observation suggère aussi que la diminution de la production de peptide A $\beta$  pourrait être due en partie à une augmentation de la clairance de la protéine APP à la membrane plasmique par exemple, et ce, sans métabolisme par les  $\beta$  et  $\gamma$ -sécrétases (198, 200). De plus, il est aussi possible que la diminution de peptide A $\beta$  soit liée à un clivage direct de la matriptase dans la séquence du peptide. Bien que nous n'ayons pas observé de clivage dans la séquence du peptide, d'autres groupes ont observé des clivages dans la séquence du peptide A $\beta$  de la protéine APP (297). Nous avons aussi observé une diminution des interactions d'APLP1 et APLP2 testées en BRET en présence de matriptase. Là aussi, bien que le clivage des APLP survienne dans le domaine E1, il n'est pas exclu que ce résultat corresponde plus à une augmentation du métabolisme des protéines APLP plutôt qu'à une perte de la capacité de ces protéines à faire des interactions homodimériques. Les résultats obtenus semblent indiquer que la protéine APLP2 interagirait faiblement avec la matriptase et ne serait peut-être pas un bon substrat. Cependant, le gène *APLP2* ainsi que le gène de la matriptase, *ST14*, sont situés au même *locus* sur le chromosome 11 et sont seulement séparés de 9 kb (344). Bien que cette proximité ne garantisse pas une interaction fonctionnelle, cela nous indique que les cellules qui expriment APLP2,

exprime aussi probablement la matriptase (345).



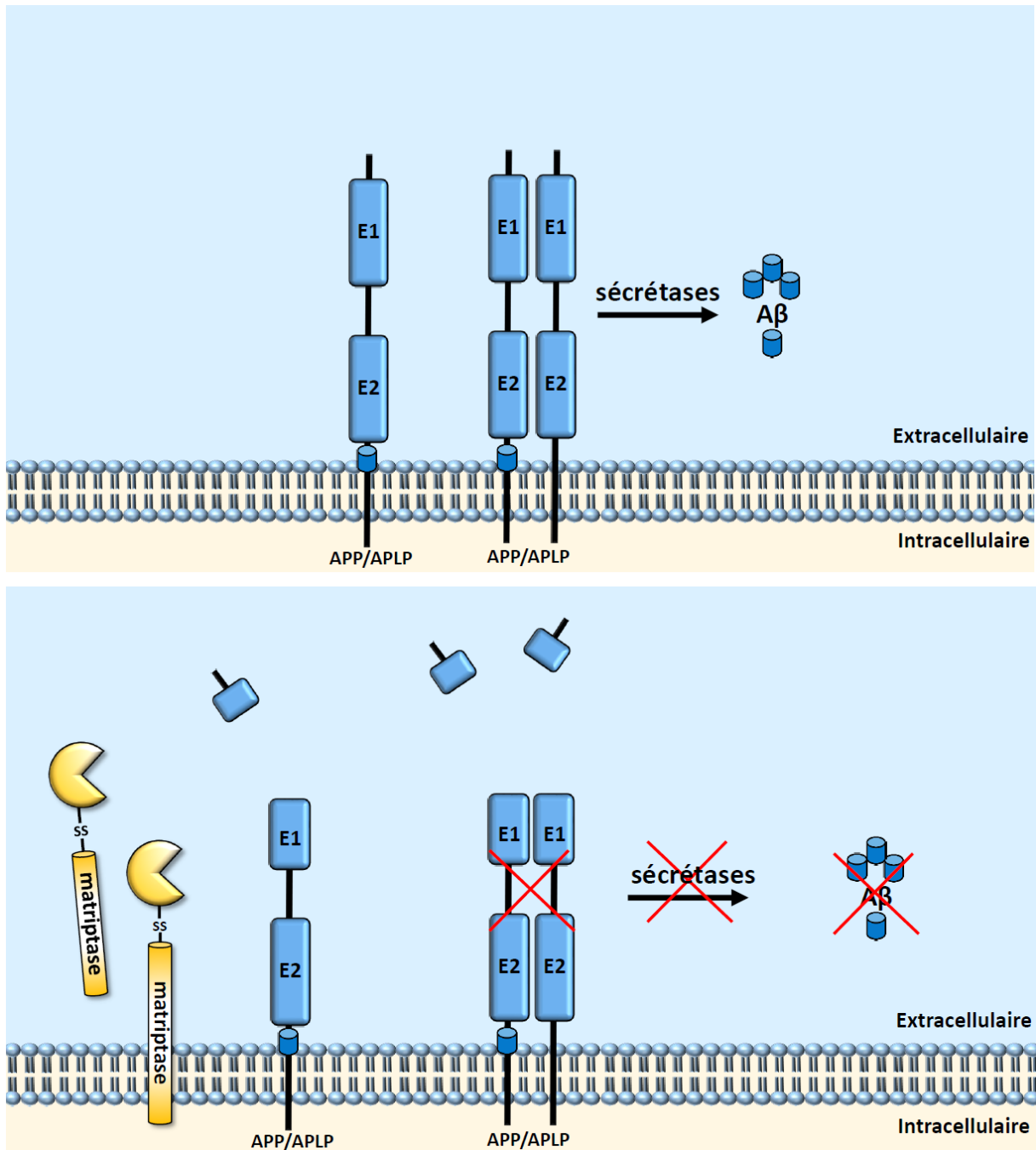
**Figure 16. Niveau relatif de sAPP $\alpha$ .**

Des cellules SH-SY5Y ont été incubées 36 heures en présence ou non de 5 nM de matriptase soluble (sMAT). Le milieu extracellulaire des cellules a été analysés par ELISA selon le protocole du fabricant.

Aux vues des résultats obtenus, essayer d'augmenter l'activité de la matriptase dans le cerveau de patient atteint de la MA pourrait être une stratégie de traitement envisageable. Il a été démontré que la sphingosine 1-phosphate (S1P) active la matriptase dans les cellules épithéliales (346). Cependant le récepteur de SP1, le *Sphingosine 1-phosphate receptor 1* (S1PR1) est connu pour son rôle dans l'inflammation et le cancer (347, 348). L'action de la S1P ne serait donc pas spécifique à la matriptase. De plus, les effets secondaires seraient probablement problématiques étant donné la forte implication de la matriptase dans les cancers. Plusieurs inhibiteurs de la matriptase ont été testés, pour certains avec une spécificité relativement bonne pour la matriptase comparée à d'autres protéase à sérines comme la matriptase 2 (349, 350). Cependant, la libération de ces médicaments au niveau du cerveau reste problématique et probablement que les doses utilisées inhiberaient d'autres membres de la famille des protéases à sérine dans le corps et au niveau du cerveau.

Physiologiquement APP, APLP1 et APLP2 se retrouvent en partie à la membrane plasmique, mais aussi au niveau de l'appareil de Golgi, du réticulum endoplasmique et des

endosomes (56–58). Les membres de la famille d'APP forment des homo- ou hétérodimères en *cis* avec d'autres partenaires, ou en *trans*, avec des partenaires des cellules adjacentes. La formation d'homo ou hétéro-dimères se fait grâce à plusieurs domaines, dont le domaine E1 qui y joue un rôle prépondérant. Il a été montré que le fait de former des dimères, influence les interactions des membres de la famille d'APP et altère la production de peptide A $\beta$  (87). Les formes monomériques ou dimériques peuvent être alors clivées par les sécrétases, soit majoritairement à la membrane plasmique par l' $\alpha$ -sécrétase puis par la  $\gamma$ -sécrétase au niveau des endosomes, ou directement à la membrane plasmique par la  $\beta$ -sécrétase puis par la  $\gamma$ -sécrétase au niveau des endosomes (351, 352). À l'heure actuelle, notre hypothèse de travail est que la matriptase, que ce soit sous forme liée à la membrane ou sous forme soluble, clive les membres de la famille d'APP, probablement monomériques, dans leurs domaines E1 (en position R102 pour APP, R124 pour APLP1 et K120 pour APLP2) (voir Figure 17). Ce clivage altère la structure tridimensionnelle des domaines E1 empêchant alors la formation de dimère des membres de la famille d'APP clivés. Cet état monomérique imposé des membres de la famille d'APP altère leur métabolisme par les sécrétases, altérant la production de peptide A $\beta$  pour APP mais aussi le rôle physiologique de la dimérisation des membres de la famille APP, que ce soit en altérant les interactions *trans* avec d'autres cellules, par exemple dans la synaptogénèse (37) ou bien en altérant la signalisation intracellulaire (102). Aux vues du profil d'expression spatiale et temporelle de la matriptase, ce processus a lieu probablement au cours de la différenciation et la maturation des cellules progénitrices neuronales. Ces événements prennent place dans des zones du cerveau importantes pour l'apprentissage, notamment le cortex frontal principalement après la naissance jusqu'à l'âge adulte, période où le cerveau subit le plus de transformations.



**Figure 17 : Représentation schématique du métabolisme de la famille d'APP par la matricinase.** Les membres de la famille d'APP à la membrane plasmique vont pouvoir former des dimères ou être métabolisés par les sécrétases et produire le peptide A $\beta$  que ce soit sous forme monomérique ou dimérique (Haut). Le clivage du domaine E1 des membres de la famille d'APP par la matricinase gêne la formation des dimères et altère donc la production de peptide A $\beta$  (Bas).

## 6. CONCLUSION

La présente étude a permis de mettre en lumière un nouveau rôle potentiel de la protéase matriptase. Trois nouveaux substrats de la matriptase ont été ainsi identifiés (APP, APLP1 et APLP2), affectant la production de peptide A $\beta$  et la formation d'homodimère. À notre connaissance, la matriptase est l'une des rares enzymes identifiées clivant dans le site de dimérisation E1 des membres de la famille APP et l'une des rares enzymes décrites clivant dans l'ectodomaine d'APLP1 et d'APLP2. Afin d'approfondir notre compréhension du rôle de la matriptase avec le métabolisme d'APP, différentes approches sont envisageables.

Dans un premier temps il serait intéressant de valider la présence de la matriptase (au niveau protéine) dans le cerveau humain. Pour cela différentes approches sont envisageables. Au vu de l'expression temporelle de la matriptase, l'utilisation d'échantillon de patients non âgés (entre 0 et 20 ans) faciliterait la détection de la protéine. Ensuite des expériences complémentaires et plus sensibles de spectrométrie de masse pourraient être réalisées (comme l'Acquisition séquentielle des fenêtres de tous les spectres de masse théoriques, *Sequential Window Acquisition of All Theoretical Mass Spectra*, SWATH-MS (353)). Enfin de manière alternative, des ELISA pourraient être effectuées sur ces échantillons.

Ensuite, il sera aussi important de déterminer le rôle physiologique de la matriptase dans le développement du cortex frontal après la naissance et dans la MA. Étant donné que les souris KO pour la matriptase ne survivent pas après la naissance, l'un des moyens de tester l'implication de la matriptase serait d'utiliser des souris KO conditionnelles. Cela permettrait de tester l'impact de l'absence de matriptase au cours de l'apprentissage, ainsi que sur la neurogenèse chez la souris.

Cela permettrait aussi de suivre la production de peptide A $\beta$  que ce soit en condition normale ou sûr des modèles de souris de la MA (comme les souris 5xFAD). Différentes expériences pourraient être réalisées à ces fins : tests comportementaux pour tester la mémoire et l'apprentissage (comme le labyrinthe de Morris, labyrinthe en t ou Y, ou encore les tests de reconnaissance d'objet), ainsi que des mesures de la LTP et LTD des neurones de ces souris. Là aussi, l'utilisation de souris KO pour APP, APLP1 ou APLP2 permettrait de déterminer l'impact du clivage de chaque membre de la famille APP par la matriptase.

Les interactions entre la matriptase et la protéine APLP2 pourraient elles aussi être approfondies afin de confirmer que l'interaction entre la matriptase et APLP2 est bien une interaction directe. Cette vérification pourrait être faite en utilisant dans un premier temps des

trousses de glycosylations pour la traduction *in vitro* dans les expériences de précipitation avec la GST. En améliorant les modifications post traductionnelles, on pourrait constater une amélioration des interactions entre la matriptase et la construction GST-APLP2 N-terminal. Cette technique présente l'avantage d'utiliser des protéines purifiées et donc de s'affranchir de la possibilité d'une interaction indirecte. Bien que les expériences BRET que nous avons réalisées avec APLP2 et la matriptase sont en soit elles même un contrôle confirmant cette interaction, d'autres techniques pourraient être aussi utilisées comme la technique de résonance plasmon de surface, ou encore de test de protéine coupée (*Split protein assays*).

Étant donné que la diminution de la production de peptide A $\beta$  pourrait être due au métabolisme d'APP qui ne serait pas clivé par les sécrétases plutôt qu'à une perte de structure du domaine E1 empêchant la formation d'homo- ou hétérodimères, différentes expériences pourraient être réalisées. Des mutants de délétion des membres de la famille d'APP pourraient être réalisés correspondant aux sites de clivage (par exemple, APP695  $\Delta$ L18-R102, APLP1  $\Delta$ S39-R124 ou APLP2  $\Delta$ S32-K120). Ces constructions ne devraient plus former d'homodimères et la co-expression du mutant de délétion APLP1  $\Delta$ S39-R124, par exemple avec APP, devrait diminuer la production de peptide A $\beta$  en comparaison avec leurs contrôles.

Les expériences de clivage d'APLP1 et d'APLP2 ont principalement été réalisées dans des systèmes de surexpression, de la même manière que nous l'avons testé pour APP (330), l'effet de la matriptase soluble sur les protéines APLP endogènes pourrait être effectué en utilisant les cellules SH-SY5Y afin de détecter les fragments N-terminaux clivés.

Afin de déterminer l'effet du clivage de la matriptase sur les protéines de la famille APP, la synthèse des fragments N-terminaux d'APP L18-R102, d'APLP1 S39-R124 et d'APLP2 S32-K120 permettrait de tester leurs effets. L'incubation des peptides N-terminaux sur des cellules en culture comme les SH-SY5Y ou encore sûrs des tranches de cerveau de souris permettrait d'identifier les effets potentiels de ces peptides sur la LTP/LTD ou encore les synapses comme cela a déjà été réalisé pour les fragments sAPP $\alpha$  et sAPP $\beta$  (115–117, 137, 354, 355) notamment. Là aussi l'utilisation de souris KO pour APP, APLP1 ou APLP2 permettrait de déterminer l'impact des fragments N-terminaux de chaque membre de la famille APP par la matriptase.

Les interactions *trans* et *cis* de la famille d'APP étant impliquées dans la signalisation cellulaire ainsi que dans les interactions entre cellules comme la formation de synapses, différentes expériences pourront être réalisées pour tester l'impact du clivage sur ces fonctions soit en utilisant les mutants de délétion (APP695  $\Delta$ L18-R102, APLP1  $\Delta$ S39-R124 ou APLP2

$\Delta$ S32-K120), ou en incubant des tranches de cerveau de souris avec de la matriptase recombinante.

Des études complémentaires seront nécessaires afin de caractériser l'expression d'autres TTSP, comme la TMPRSS5 dans le cerveau humain, et d'analyser leur rôle physiologique dans le cerveau humain, mais aussi leur possible implication dans le métabolisme des membres de la famille d'APP. Finalement l'expression d'APP et d'APLP2 étant ubiquitaire et l'expression de la matriptase étant retrouvée elle aussi dans d'autres organes avec des niveaux d'expression plus élevés (340), il pourrait être intéressant d'étudier l'effet du clivage de ces deux protéines par la matriptase au niveau du tractus digestif par exemple.

En conclusion, dans ces études sont démontrés l'expression des ARNm la matriptase dans le cerveau humain et l'implication de la matriptase dans le métabolisme des membres de la famille d'APP. Ce métabolisme pourrait avoir un impact sur les membres de la famille d'APP dans des conditions physiologiques, mais aussi dans la MA.



## **7. REMERCIEMENTS**

Je tiens à remercier mes deux directeurs de thèse pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe pour leur présence, et leurs enseignements tout au long de mon parcours et de m'avoir guidé dans ce projet.

De plus, je souhaite remercier les différents membres de mes deux laboratoires respectifs pour nos nombreuses discussions, débats animés, bon moment et fou rire. Plus particulièrement, je souhaite remercier Antoine Désilet, François Béliveau et Sébastien Dion pour leurs contributions, soutien, et pour leur implication dans mes projets de recherche, mais aussi pour leurs conseils personnels.

Ensuite, j'aimerais remercier spécialement ma famille proche et éloignée pour leurs encouragements, leur support et la patience dont ils ont fait preuve au cours de ces dernières années

En terminant, je tiens aussi à remercier les professeurs Jean-Bernard Denault, Xavier Roucou et Sébastien Hébert pour avoir accepté de réviser ce mémoire de thèse.

## 8. LISTE DES REFERENCES

1. Brookmeyer, R., Corrada, M. M., Curriero, F. C., and Kawas, C. (2002) Survival following a diagnosis of Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* **59**, 1764–1767
2. Burns, A., and Iliffe, S. (2009) Alzheimer’s disease. *BMJ.* **338**, b158
3. Chambers, L. W., Bancej, C., and McDowell, I. Prevalence and Monetary Costs of Dementia in Canada
4. Prince, M., Guerchet, M., and Prina, M. (2015) *The Epidemiology and Impact of Dementia - Current State and Future Trends. WHO Thematic Briefing*
5. Alzheimer, A., Stelzmann, R. A., Schnitzlein, H. N., and Murtagh, F. R. (1995) An English translation of Alzheimer’s 1907 paper, “Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde.” *Clin. Anat. N. Y. N.* **8**, 429–431
6. Blessed, G., Tomlinson, B. E., and Roth, M. (1968) The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Br. J. Psychiatry J. Ment. Sci.* **114**, 797–811
7. Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y. C., Zaidi, M. S., and Wisniewski, H. M. (1986) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* **261**, 6084–6089
8. Chiang, P. K., Lam, M. A., and Luo, Y. (2008) The many faces of amyloid beta in Alzheimer’s disease. *Curr. Mol. Med.* **8**, 580–584
9. Chételat, G., La Joie, R., Villain, N., Perrotin, A., de La Sayette, V., Eustache, F., and Vandenberghe, R. (2013) Amyloid imaging in cognitively normal individuals, at-risk populations and preclinical Alzheimer’s disease. *NeuroImage Clin.* **2**, 356–365
10. Crary, J. F., Trojanowski, J. Q., Schneider, J. A., Abisambra, J. F., Abner, E. L., Alafuzoff, I., Arnold, S. E., Attems, J., Beach, T. G., Bigio, E. H., Cairns, N. J., Dickson, D. W., Gearing, M., Grinberg, L. T., Hof, P. R., Hyman, B. T., Jellinger, K., Jicha, G. A., Kovacs, G. G., Knopman, D. S., Kofler, J., Kukull, W. A., Mackenzie, I. R., Masliah, E., McKee, A., Montine, T. J., Murray, M. E., Neltner, J. H., Santa-Maria, I., Seeley, W. W., Serrano-Pozo, A., Shelanski, M. L., Stein, T., Takao, M., Thal, D. R., Toledo, J. B., Troncoso, J.

- C., Vonsattel, J. P., White, C. L., Wisniewski, T., Woltjer, R. L., Yamada, M., and Nelson, P. T. (2014) Primary age-related tauopathy (PART): a common pathology associated with human aging. *Acta Neuropathol. (Berl.)*. **128**, 755–766
11. Niikura, T., Tajima, H., and Kita, Y. (2006) Neuronal cell death in Alzheimer's disease and a neuroprotective factor, humanin. *Curr. Neuropharmacol.* **4**, 139–147
  12. Kril, J. J., Patel, S., Harding, A. J., and Halliday, G. M. (2002) Neuron loss from the hippocampus of Alzheimer's disease exceeds extracellular neurofibrillary tangle formation. *Acta Neuropathol. (Berl.)*. **103**, 370–376
  13. Zhao, L. N., Long, H., Mu, Y., and Chew, L. Y. (2012) The toxicity of amyloid  $\beta$  oligomers. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 7303–7327
  14. Shankar, G. M., Li, S., Mehta, T. H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N. E., Smith, I., Brett, F. M., Farrell, M. A., Rowan, M. J., Lemere, C. A., Regan, C. M., Walsh, D. M., Sabatini, B. L., and Selkoe, D. J. (2008) Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* **14**, 837–842
  15. Hanseeuw, B. J., Betensky, R. A., Jacobs, H. I. L., Schultz, A. P., Sepulcre, J., Becker, J. A., Cosio, D. M. O., Farrell, M., Quiroz, Y. T., Mormino, E. C., Buckley, R. F., Papp, K. V., Amariglio, R. A., Dewachter, I., Ivanoiu, A., Huijbers, W., Hedden, T., Marshall, G. A., Chhatwal, J. P., Rentz, D. M., Sperling, R. A., and Johnson, K. (2019) Association of Amyloid and Tau With Cognition in Preclinical Alzheimer Disease: A Longitudinal Study. *JAMA Neurol.* 10.1001/jamaneurol.2019.1424
  16. Pascoal, T. A., Mathotaarachchi, S., Kang, M. S., Mohaddes, S., Shin, M., Park, A. Y., Parent, M. J., Benedet, A. L., Chamoun, M., Therriault, J., Hwang, H., Cuello, A. C., Mistic, B., Soucy, J.-P., Aston, J. A. D., Gauthier, S., and Rosa-Neto, P. (2019) A $\beta$ -induced vulnerability propagates via the brain's default mode network. *Nat. Commun.* **10**, 2353
  17. Kosciuk, R. L., Betthausen, T. J., Jonaitis, E. M., Allison, S. L., Clark, L. R., Hermann, B. P., Cody, K. A., Engle, J. W., Barnhart, T. E., Stone, C. K., Chin, N. A., Carlsson, C. M., Asthana, S., Christian, B. T., and Johnson, S. C. (2019) Amyloid duration is associated with preclinical cognitive decline and tau PET. *bioRxiv*. 10.1101/778415
  18. Braak, H., and Braak, E. (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol. (Berl.)*. **82**, 239–259
  19. Thal, D. R., Rüb, U., Orantes, M., and Braak, H. (2002) Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*. **58**, 1791–1800
  20. Piaceri, I., Nacmias, B., and Sorbi, S. (2013) Genetics of familial and sporadic

Alzheimer's disease. *Front. Biosci. Elite Ed.* **5**, 167–177

21. Dorszewska, J., Prendecki, M., Oczkowska, A., Dezor, M., and Kozubski, W. (2016) Molecular Basis of Familial and Sporadic Alzheimer's Disease. *Curr. Alzheimer Res.* **13**, 952–963
22. Lahiri, D. K., and Maloney, B. (2010) The “LEARn” (Latent Early-life Associated Regulation) model integrates environmental risk factors and the developmental basis of Alzheimer's disease, and proposes remedial steps. *Exp. Gerontol.* **45**, 291–296
23. Hardy, J. A., and Higgins, G. A. (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* **256**, 184–185
24. Mutations | ALZFORUM [online] <https://www.alzforum.org/mutations> (Accessed October 22, 2019)
25. Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T. D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D., and Younkin, S. (1996) Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat. Med.* **2**, 864–870
26. Eckman, C. B., Mehta, N. D., Crook, R., Perez-tur, J., Prihar, G., Pfeiffer, E., Graff-Radford, N., Hinder, P., Yager, D., Zenk, B., Refolo, L. M., Prada, C. M., Younkin, S. G., Hutton, M., and Hardy, J. (1997) A new pathogenic mutation in the APP gene (I716V) increases the relative proportion of A beta 42(43). *Hum. Mol. Genet.* **6**, 2087–2089
27. De Jonghe, C., Esselens, C., Kumar-Singh, S., Craessaerts, K., Serneels, S., Checler, F., Annaert, W., Van Broeckhoven, C., and De Strooper, B. (2001) Pathogenic APP mutations near the gamma-secretase cleavage site differentially affect Abeta secretion and APP C-terminal fragment stability. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 1665–1671
28. Bruni, A. C., Bernardi, L., Colao, R., Rubino, E., Smirne, N., Frangipane, F., Terni, B., Curcio, S. a. M., Mirabelli, M., Clodomiro, A., Di Lorenzo, R., Maletta, R., Anfossi, M., Gallo, M., Geracitano, S., Tomaino, C., Muraca, M. G., Leotta, A., Lio, S. G., Pinessi, L., Rainero, I., Sorbi, S., Nee, L., Milan, G., Pappatà, S., Postiglione, A., Abbamondi, N., Forloni, G., St George Hyslop, P., Rogaeva, E., Bugiani, O., Giaccone, G., Foncin, J. F., Spillantini, M. G., and Puccio, G. (2010) Worldwide distribution of PSEN1 Met146Leu mutation: a large variability for a founder mutation. *Neurology.* **74**, 798–806
29. Page, R. M., Baumann, K., Tomioka, M., Pérez-Revuelta, B. I., Fukumori, A., Jacobsen,

- H., Flohr, A., Luebbbers, T., Ozmen, L., Steiner, H., and Haass, C. (2008) Generation of Abeta38 and Abeta42 is independently and differentially affected by familial Alzheimer disease-associated presenilin mutations and gamma-secretase modulation. *J. Biol. Chem.* **283**, 677–683
30. Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberburg, I., Rommens, J., Kim, S., Schenk, D., Fraser, P., St George Hyslop, P., and Selkoe, D. J. (1997) Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat. Med.* **3**, 67–72
  31. Van Nostrand, W. E., and Cunningham, D. D. (1987) Purification of protease nexin II from human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **262**, 8508–8514
  32. Meier, R., Spreyer, P., Ortmann, R., Harel, A., and Monard, D. (1989) Induction of glia-derived nexin after lesion of a peripheral nerve. *Nature.* **342**, 548–550
  33. Zurn, A. D., Nick, H., and Monard, D. (1988) A glia-derived nexin promotes neurite outgrowth in cultured chick sympathetic neurons. *Dev. Neurosci.* **10**, 17–24
  34. Van Nostrand, W. E., Wagner, S. L., Suzuki, M., Choi, B. H., Farrow, J. S., Geddes, J. W., Cotman, C. W., and Cunningham, D. D. (1989) Protease nexin-II, a potent antichymotrypsin, shows identity to amyloid beta-protein precursor. *Nature.* **341**, 546–549
  35. Coulson, E. J., Paliga, K., Beyreuther, K., and Masters, C. L. (2000) What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. *Neurochem. Int.* **36**, 175–184
  36. Shariati, S. A. M., and De Strooper, B. (2013) Redundancy and divergence in the amyloid precursor protein family. *FEBS Lett.* **587**, 2036–2045
  37. Wang, Z., Wang, B., Yang, L., Guo, Q., Aithmitti, N., Songyang, Z., and Zheng, H. (2009) Presynaptic and postsynaptic interaction of the amyloid precursor protein promotes peripheral and central synaptogenesis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **29**, 10788–10801
  38. Small, D. H., Nurcombe, V., Reed, G., Clarris, H., Moir, R., Beyreuther, K., and Masters, C. L. (1994) A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **14**, 2117–2127
  39. Dahms, S. O., Hoefgen, S., Roeser, D., Schlott, B., Gührs, K.-H., and Than, M. E. (2010)

- Structure and biochemical analysis of the heparin-induced E1 dimer of the amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 5381–5386
40. Hoefgen, S., Coburger, I., Roeser, D., Schaub, Y., Dahms, S. O., and Than, M. E. (2014) Heparin induced dimerization of APP is primarily mediated by E1 and regulated by its acidic domain. *J. Struct. Biol.* **187**, 30–37
  41. Wang, Y., and Ha, Y. (2004) The X-ray structure of an antiparallel dimer of the human amyloid precursor protein E2 domain. *Mol. Cell.* **15**, 343–353
  42. Guénette, S., Strecker, P., and Kins, S. (2017) APP Protein Family Signaling at the Synapse: Insights from Intracellular APP-Binding Proteins. *Front. Mol. Neurosci.* 10.3389/fnmol.2017.00087
  43. Nishimoto, I., Okamoto, T., Matsuura, Y., Takahashi, S., Okamoto, T., Murayama, Y., and Ogata, E. (1993) Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o). *Nature.* **362**, 75–79
  44. Sprecher, C. A., Grant, F. J., Grimm, G., O'Hara, P. J., Norris, F., Norris, K., and Foster, D. C. (1993) Molecular cloning of the cDNA for a human amyloid precursor protein homolog: evidence for a multigene family. *Biochemistry.* **32**, 4481–4486
  45. Wasco, W., Bupp, K., Magendantz, M., Gusella, J. F., Tanzi, R. E., and Solomon, F. (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**, 10758–10762
  46. Chun, Y. S., Park, Y., Oh, H. G., Kim, T.-W., Yang, H. O., Park, M. K., and Chung, S. (2015) O-GlcNAcylation promotes non-amyloidogenic processing of amyloid- $\beta$  protein precursor via inhibition of endocytosis from the plasma membrane. *J. Alzheimers Dis. JAD.* **44**, 261–275
  47. Jacobsen, K., and Iverfeldt, K. (2013) O-GlcNAcylation increases non-amyloidogenic processing of the amyloid- $\beta$  precursor protein (APP). *Mol. Neurodegener.* **8**, P21
  48. Muresan, V., and Muresan, Z. (2012) A persistent stress response to impeded axonal transport leads to accumulation of amyloid- $\beta$  in the endoplasmic reticulum, and is a probable cause of sporadic Alzheimer's disease. *Neurodegener. Dis.* **10**, 60–63
  49. Oliveira, J. M., Henriques, A. G., Martins, F., Rebelo, S., and da Cruz e Silva, O. A. B. (2015) Amyloid- $\beta$  Modulates Both A $\beta$ PP and Tau Phosphorylation. *J. Alzheimers Dis. JAD.* **45**, 495–507
  50. Weidemann, A., König, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J. M., Masters, C. L., and

- Beyreuther, K. (1989) Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell*. **57**, 115–126
51. Bhattacharyya, R., Barren, C., and Kovacs, D. M. (2013) Palmitoylation of amyloid precursor protein regulates amyloidogenic processing in lipid rafts. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **33**, 11169–11183
52. Morel, E., Chamoun, Z., Lasiecka, Z. M., Chan, R. B., Williamson, R. L., Vetanovetz, C., Dall'Armi, C., Simoes, S., Point Du Jour, K. S., McCabe, B. D., Small, S. A., and Di Paolo, G. (2013) Phosphatidylinositol-3-phosphate regulates sorting and processing of amyloid precursor protein through the endosomal system. *Nat. Commun.* **4**, 2250
53. Watanabe, T., Hikichi, Y., Willuweit, A., Shintani, Y., and Horiguchi, T. (2012) FBL2 regulates amyloid precursor protein (APP) metabolism by promoting ubiquitination-dependent APP degradation and inhibition of APP endocytosis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **32**, 3352–3365
54. Zhang, Y.-Q., and Sarge, K. D. (2008) Sumoylation of amyloid precursor protein negatively regulates Abeta aggregate levels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **374**, 673–678
55. UniProt [online] <https://www.uniprot.org/> (Accessed January 14, 2020)
56. Kaden, D., Voigt, P., Munter, L.-M., Bobowski, K. D., Schaefer, M., and Multhaup, G. (2009) Subcellular localization and dimerization of APLP1 are strikingly different from APP and APLP2. *J. Cell Sci.* **122**, 368–377
57. Schauenburg, L., Liebsch, F., Eravci, M., Mayer, M. C., Weise, C., and Multhaup, G. (2018) APLP1 is endoproteolytically cleaved by  $\gamma$ -secretase without previous ectodomain shedding. *Sci. Rep.* **8**, 1916
58. Kuan, Y.-H., Gruebl, T., Soba, P., Eggert, S., Nesic, I., Back, S., Kirsch, J., Beyreuther, K., and Kins, S. (2006) PAT1a modulates intracellular transport and processing of amyloid precursor protein (APP), APLP1, and APLP2. *J. Biol. Chem.* **281**, 40114–40123
59. Arai, H., Lee, V. M., Messinger, M. L., Greenberg, B. D., Lowery, D. E., and Trojanowski, J. Q. (1991) Expression patterns of beta-amyloid precursor protein (beta-APP) in neural and nonneural human tissues from Alzheimer's disease and control subjects. *Ann. Neurol.* **30**, 686–693
60. Kitaguchi, N., Takahashi, Y., Tokushima, Y., Shiojiri, S., and Ito, H. (1988) Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature*. **331**, 530–532

61. Schmaier, A. H., Dahl, L. D., Rozemuller, A. J., Roos, R. A., Wagner, S. L., Chung, R., and Van Nostrand, W. E. (1993) Protease nexin-2/amyloid beta protein precursor. A tight-binding inhibitor of coagulation factor IXa. *J. Clin. Invest.* **92**, 2540–2545
62. Lorent, K., Overbergh, L., Moechars, D., De Strooper, B., Van Leuven, F., and Van den Berghe, H. (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**, 1009–1025
63. Rohan de Silva, H. A., Jen, A., Wickenden, C., Jen, L.-S., Wilkinson, S. L., and Patel, A. J. (1997) Cell-specific expression of  $\beta$ -amyloid precursor protein isoform mRNAs and proteins in neurons and astrocytes. *Mol. Brain Res.* **47**, 147–156
64. Zheng, H., Jiang, M., Trumbauer, M. E., Sirinathsinghji, D. J., Hopkins, R., Smith, D. W., Heavens, R. P., Dawson, G. R., Boyce, S., Conner, M. W., Stevens, K. A., Slunt, H. H., Sisoda, S. S., Chen, H. Y., and Van der Ploeg, L. H. (1995) beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell.* **81**, 525–531
65. Li, Z. W., Stark, G., Götz, J., Rüllicke, T., Gschwind, M., Huber, G., Müller, U., and Weissmann, C. (1996) Generation of mice with a 200-kb amyloid precursor protein gene deletion by Cre recombinase-mediated site-specific recombination in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 6158–6162
66. Perez, R. G., Zheng, H., Van der Ploeg, L. H., and Koo, E. H. (1997) The beta-amyloid precursor protein of Alzheimer's disease enhances neuron viability and modulates neuronal polarity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **17**, 9407–9414
67. Steinbach, J. P., Müller, U., Leist, M., Li, Z. W., Nicotera, P., and Aguzzi, A. (1998) Hypersensitivity to seizures in beta-amyloid precursor protein deficient mice. *Cell Death Differ.* **5**, 858–866
68. Tremml, P., Lipp, H. P., Müller, U., Ricceri, L., and Wolfner, D. P. (1998) Neurobehavioral development, adult openfield exploration and swimming navigation learning in mice with a modified beta-amyloid precursor protein gene. *Behav. Brain Res.* **95**, 65–76
69. Magara, F., Müller, U., Li, Z. W., Lipp, H. P., Weissmann, C., Stagljar, M., and Wolfner, D. P. (1999) Genetic background changes the pattern of forebrain commissure defects in transgenic mice underexpressing the beta-amyloid-precursor protein. *Proc. Natl. Acad.*



70. White, A. R., Zheng, H., Galatis, D., Maher, F., Hesse, L., Multhaup, G., Beyreuther, K., Masters, C. L., and Cappai, R. (1998) Survival of cultured neurons from amyloid precursor protein knock-out mice against Alzheimer's amyloid-beta toxicity and oxidative stress. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **18**, 6207–6217
71. Dawson, G. R., Seabrook, G. R., Zheng, H., Smith, D. W., Graham, S., O'Dowd, G., Bowery, B. J., Boyce, S., Trumbauer, M. E., Chen, H. Y., Van der Ploeg, L. H., and Sirinathsinghji, D. J. (1999) Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience.* **90**, 1–13
72. Seabrook, G. R., Smith, D. W., Bowery, B. J., Easter, A., Reynolds, T., Fitzjohn, S. M., Morton, R. A., Zheng, H., Dawson, G. R., Sirinathsinghji, D. J., Davies, C. H., Collingridge, G. L., and Hill, R. G. (1999) Mechanisms contributing to the deficits in hippocampal synaptic plasticity in mice lacking amyloid precursor protein. *Neuropharmacology.* **38**, 349–359
73. Ring, S., Weyer, S. W., Kilian, S. B., Waldron, E., Pietrzik, C. U., Filippov, M. A., Herms, J., Buchholz, C., Eckman, C. B., Korte, M., Wolfer, D. P., and Müller, U. C. (2007) The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **27**, 7817–7826
74. Heber, S., Herms, J., Gajic, V., Hainfellner, J., Aguzzi, A., Rüllicke, T., von Kretschmar, H., von Koch, C., Sisodia, S., Tremml, P., Lipp, H. P., Wolfer, D. P., and Müller, U. (2000) Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **20**, 7951–7963
75. von Koch, C. S., Zheng, H., Chen, H., Trumbauer, M., Thinakaran, G., van der Ploeg, L. H., Price, D. L., and Sisodia, S. S. (1997) Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol. Aging.* **18**, 661–669
76. Wang, P., Yang, G., Mosier, D. R., Chang, P., Zaidi, T., Gong, Y.-D., Zhao, N.-M., Dominguez, B., Lee, K.-F., Gan, W.-B., and Zheng, H. (2005) Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **25**, 1219–1225
77. Yang, G., Gong, Y.-D., Gong, K., Jiang, W.-L., Kwon, E., Wang, P., Zheng, H., Zhang,

- X.-F., Gan, W.-B., and Zhao, N.-M. (2005) Reduced synaptic vesicle density and active zone size in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-like protein 2. *Neurosci. Lett.* **384**, 66–71
78. Herms, J., Anliker, B., Heber, S., Ring, S., Fuhrmann, M., Kretzschmar, H., Sisodia, S., and Müller, U. (2004) Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *EMBO J.* **23**, 4106–4115
79. Li, H., Wang, B., Wang, Z., Guo, Q., Tabuchi, K., Hammer, R. E., Südhof, T. C., and Zheng, H. (2010) Soluble amyloid precursor protein (APP) regulates transthyretin and Klotho gene expression without rescuing the essential function of APP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 17362–17367
80. Coronel, R., Lachgar, M., Bernabeu-Zornoza, A., Palmer, C., Domínguez-Alvaro, M., Revilla, A., Ocaña, I., Fernández, A., Martínez-Serrano, A., Cano, E., and Liste, I. (2019) Neuronal and Glial Differentiation of Human Neural Stem Cells Is Regulated by Amyloid Precursor Protein (APP) Levels. *Mol. Neurobiol.* **56**, 1248–1261
81. Billnitzer, A. J., Barskaya, I., Yin, C., and Perez, R. G. (2013) APP independent and dependent effects on neurite outgrowth are modulated by the receptor associated protein (RAP). *J. Neurochem.* **124**, 123–132
82. Soba, P., Eggert, S., Wagner, K., Zentgraf, H., Siehl, K., Kreger, S., Löwer, A., Langer, A., Merdes, G., Paro, R., Masters, C. L., Müller, U., Kins, S., and Beyreuther, K. (2005) Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *EMBO J.* **24**, 3624–3634
83. Dunsing, V., Mayer, M., Liebsch, F., Multhaup, G., and Chiantia, S. (2017) Direct evidence of amyloid precursor-like protein 1 trans interactions in cell-cell adhesion platforms investigated via fluorescence fluctuation spectroscopy. *Mol. Biol. Cell.* **28**, 3609–3620
84. Mayer, M. C., Schauenburg, L., Thompson-Steckel, G., Dunsing, V., Kaden, D., Voigt, P., Schaefer, M., Chiantia, S., Kennedy, T. E., and Multhaup, G. (2016) Amyloid precursor-like protein 1 (APLP1) exhibits stronger zinc-dependent neuronal adhesion than amyloid precursor protein and APLP2. *J. Neurochem.* **137**, 266–276
85. Mayer, M. C., Kaden, D., Schauenburg, L., Hancock, M. A., Voigt, P., Roeser, D., Barucker, C., Than, M. E., Schaefer, M., and Multhaup, G. (2014) Novel zinc-binding site in the E2 domain regulates amyloid precursor-like protein 1 (APLP1) oligomerization. *J. Biol. Chem.* **289**, 19019–19030

86. Kaden, D., Munter, L.-M., Joshi, M., Treiber, C., Weise, C., Bethge, T., Voigt, P., Schaefer, M., Beyermann, M., Reif, B., and Multhaup, G. (2008) Homophilic Interactions of the Amyloid Precursor Protein (APP) Ectodomain Are Regulated by the Loop Region and Affect  $\beta$ -Secretase Cleavage of APP. *J. Biol. Chem.* **283**, 7271–7279
87. Eggert, S., Midthune, B., Cottrell, B., and Koo, E. H. (2009) Induced dimerization of the amyloid precursor protein leads to decreased amyloid-beta protein production. *J. Biol. Chem.* **284**, 28943–28952
88. Munter, L.-M., Voigt, P., Harmeier, A., Kaden, D., Gottschalk, K. E., Weise, C., Pipkorn, R., Schaefer, M., Langosch, D., and Multhaup, G. (2007) GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of Abeta42. *EMBO J.* **26**, 1702–1712
89. August, A., Schmidt, N., Klingler, J., Baumkötter, F., Lechner, M., Klement, J., Eggert, S., Vargas, C., Wild, K., Keller, S., and Kins, S. (2019) Copper and zinc ions govern the trans-directed dimerization of APP family members in multiple ways. *J. Neurochem.* 10.1111/jnc.14716
90. Decock, M., El Haylani, L., Stanga, S., Dewachter, I., Octave, J.-N., Smith, S. O., Constantinescu, S. N., and Kienlen-Campard, P. (2015) Analysis by a highly sensitive split luciferase assay of the regions involved in APP dimerization and its impact on processing. *FEBS Open Bio.* **5**, 763–773
91. Wahi, K., Bochter, M. S., and Cole, S. E. (2016) The many roles of Notch signaling during vertebrate somitogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **49**, 68–75
92. Guruharsha, K. G., Kankel, M. W., and Artavanis-Tsakonas, S. (2012) The Notch signalling system: recent insights into the complexity of a conserved pathway. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 654–666
93. Huppert, S. S., Le, A., Schroeter, E. H., Mumm, J. S., Saxena, M. T., Milner, L. A., and Kopan, R. (2000) Embryonic lethality in mice homozygous for a processing-deficient allele of Notch1. *Nature.* **405**, 966–970
94. Lowell, S., Benchoua, A., Heavey, B., and Smith, A. G. (2006) Notch promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells. *PLoS Biol.* **4**, e121
95. Lorenzo, A., Yuan, M., Zhang, Z., Paganetti, P. A., Sturchler-Pierrat, C., Staufenbiel, M., Mautino, J., Vigo, F. S., Sommer, B., and Yankner, B. A. (2000) Amyloid beta interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* **3**, 460–464

96. Ramaker, J. M., and Copenhaver, P. F. (2017) Amyloid Precursor Protein family as unconventional G<sub>o</sub>-coupled receptors and the control of neuronal motility. *Neurogenesis Austin Tex.* **4**, e1288510
97. Iijima, K., Ando, K., Takeda, S., Satoh, Y., Seki, T., Itohara, S., Greengard, P., Kirino, Y., Nairn, A. C., and Suzuki, T. (2000) Neuron-specific phosphorylation of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein by cyclin-dependent kinase 5. *J. Neurochem.* **75**, 1085–1091
98. Kimberly, W. T., Zheng, J. B., Town, T., Flavell, R. A., and Selkoe, D. J. (2005) Physiological regulation of the beta-amyloid precursor protein signaling domain by c-Jun N-terminal kinase JNK3 during neuronal differentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **25**, 5533–5543
99. Muresan, Z., and Muresan, V. (2005) c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase-interacting protein-3 facilitates phosphorylation and controls localization of amyloid-beta precursor protein. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **25**, 3741–3751
100. Koo, E. H. (2002) The beta-amyloid precursor protein (APP) and Alzheimer's disease: does the tail wag the dog? *Traffic Cph. Den.* **3**, 763–770
101. King, G. D., and Scott Turner, R. (2004) Adaptor protein interactions: modulators of amyloid precursor protein metabolism and Alzheimer's disease risk? *Exp. Neurol.* **185**, 208–219
102. Copenhaver, P. F., and Kögel, D. (2017) Role of APP Interactions with Heterotrimeric G Proteins: Physiological Functions and Pathological Consequences. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, 3
103. Luu, L., Ciccotosto, G. D., Vella, L. J., Cheng, L., Roisman, L. C., Multhaup, G., Hill, A. F., Munter, L.-M., and Cappai, R. (2019) Amyloid Precursor Protein Dimerisation Reduces Neurite Outgrowth. *Mol. Neurobiol.* **56**, 13–28
104. Schilling, S., Mehr, A., Ludewig, S., Stephan, J., Zimmermann, M., August, A., Strecker, P., Korte, M., Koo, E. H., Müller, U. C., Kins, S., and Eggert, S. (2017) APLP1 Is a Synaptic Cell Adhesion Molecule, Supporting Maintenance of Dendritic Spines and Basal Synaptic Transmission. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **37**, 5345–5365
105. Stahl, R., Schilling, S., Soba, P., Rupp, C., Hartmann, T., Wagner, K., Merdes, G., Eggert, S., and Kins, S. (2014) Shedding of APP limits its synaptogenic activity and cell adhesion properties. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 410
106. Asai, M., Hattori, C., Szabó, B., Sasagawa, N., Maruyama, K., Tanuma, S., and Ishiura, S. (2003) Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase.

107. Tanabe, C., Hotoda, N., Sasagawa, N., Sehara-Fujisawa, A., Maruyama, K., and Ishiura, S. (2007) ADAM19 is tightly associated with constitutive Alzheimer's disease APP alpha-secretase in A172 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **352**, 111–117
108. Weskamp, G., Cai, H., Brodie, T. A., Higashiyama, S., Manova, K., Ludwig, T., and Blobel, C. P. (2002) Mice lacking the metalloprotease-disintegrin MDC9 (ADAM9) have no evident major abnormalities during development or adult life. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 1537–1544
109. Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J., and Cerretti, D. P. (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature.* **385**, 729–733
110. Postina, R., Schroeder, A., Dewachter, I., Bohl, J., Schmitt, U., Kojro, E., Prinzen, C., Endres, K., Hiemke, C., Blessing, M., Flamez, P., Dequenne, A., Godaux, E., van Leuven, F., and Fahrenholz, F. (2004) A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J. Clin. Invest.* **113**, 1456–1464
111. Schroeder, A., Fahrenholz, F., and Schmitt, U. (2009) Effect of a dominant-negative form of ADAM10 in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD.* **16**, 309–314
112. Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., and Fahrenholz, F. (1999) Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 3922–3927
113. Hartmann, D., de Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., Lübke, T., Lena Illert, A., von Figura, K., and Saftig, P. (2002) The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2615–2624
114. Kuhn, P.-H., Wang, H., Dislich, B., Colombo, A., Zeitschel, U., Ellwart, J. W., Kremmer, E., Rossner, S., and Lichtenthaler, S. F. (2010) ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J.* **29**, 3020–3032

115. Mattson, M. P., Cheng, B., Culwell, A. R., Esch, F. S., Lieberburg, I., and Rydel, R. E. (1993) Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron*. **10**, 243–254
116. Ishida, A., Furukawa, K., Keller, J. N., and Mattson, M. P. (1997) Secreted form of beta-amyloid precursor protein shifts the frequency dependency for induction of LTD, and enhances LTP in hippocampal slices. *Neuroreport*. **8**, 2133–2137
117. Mattson, M. P. (1997) Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol. Rev.* **77**, 1081–1132
118. Rice, H. C., de Malmazet, D., Schreurs, A., Frere, S., Van Molle, I., Volkov, A. N., Creemers, E., Vertkin, I., Nys, J., Ranaivoson, F. M., Comoletti, D., Savas, J. N., Remaut, H., Balschun, D., Wierda, K. D., Slutsky, I., Farrow, K., De Strooper, B., and de Wit, J. (2019) Secreted amyloid- $\beta$  precursor protein functions as a GABABR1a ligand to modulate synaptic transmission. *Science*. 10.1126/science.aao4827
119. Vertkin, I., Styr, B., Slomowitz, E., Ofir, N., Shapira, I., Berner, D., Fedorova, T., Laviv, T., Barak-Broner, N., Greitzer-Antes, D., Gassmann, M., Bettler, B., Lotan, I., and Slutsky, I. (2015) GABAB receptor deficiency causes failure of neuronal homeostasis in hippocampal networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E3291-3299
120. Tian, Y., Crump, C. J., and Li, Y.-M. (2010) Dual role of alpha-secretase cleavage in the regulation of gamma-secretase activity for amyloid production. *J. Biol. Chem.* **285**, 32549–32556
121. Hussain, I., Hawkins, J., Shikotra, A., Riddell, D. R., Faller, A., and Dingwall, C. (2003) Characterization of the ectodomain shedding of the beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 (BACE1). *J. Biol. Chem.* **278**, 36264–36268
122. Yan, R., Han, P., Miao, H., Greengard, P., and Xu, H. (2001) The Transmembrane Domain of the Alzheimer's  $\beta$ -Secretase (BACE1) Determines Its Late Golgi Localization and Access to  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein (APP) Substrate. *J. Biol. Chem.* **276**, 36788–36796
123. Hu, X., Hicks, C. W., He, W., Wong, P., Macklin, W. B., Trapp, B. D., and Yan, R. (2006) Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat. Neurosci.* **9**, 1520–1525
124. Willem, M., Garratt, A. N., Novak, B., Citron, M., Kaufmann, S., Rittger, A., DeStrooper, B., Saftig, P., Birchmeier, C., and Haass, C. (2006) Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science*. **314**, 664–666

125. Luo, Y., Bolon, B., Kahn, S., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Denis, P., Fan, W., Kha, H., Zhang, J., Gong, Y., Martin, L., Louis, J. C., Yan, Q., Richards, W. G., Citron, M., and Vassar, R. (2001) Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat. Neurosci.* **4**, 231–232
126. Fukumoto, H., Cheung, B. S., Hyman, B. T., and Irizarry, M. C. (2002) Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* **59**, 1381–1389
127. Hansel, D. E., Rahman, A., Wehner, S., Herzog, V., Yeo, C. J., and Maitra, A. (2003) Increased expression and processing of the Alzheimer amyloid precursor protein in pancreatic cancer may influence cellular proliferation. *Cancer Res.* **63**, 7032–7037
128. Sankaranarayanan, S., Holahan, M. A., Colussi, D., Crouthamel, M.-C., Devanarayan, V., Ellis, J., Espeseth, A., Gates, A. T., Graham, S. L., Grego, A. R., Hazuda, D., Hochman, J. H., Holloway, K., Jin, L., Kahana, J., Lai, M., Lineberger, J., McGaughey, G., Moore, K. P., Nantermet, P., Pietrak, B., Price, E. A., Rajapakse, H., Stauffer, S., Steinbeiser, M. A., Seabrook, G., Selnick, H. G., Shi, X.-P., Stanton, M. G., Swestock, J., Tugusheva, K., Tyler, K. X., Vacca, J. P., Wong, J., Wu, G., Xu, M., Cook, J. J., and Simon, A. J. (2009) First demonstration of cerebrospinal fluid and plasma A beta lowering with oral administration of a beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 inhibitor in nonhuman primates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **328**, 131–140
129. Sugimoto, I., Futakawa, S., Oka, R., Ogawa, K., Marth, J. D., Miyoshi, E., Taniguchi, N., Hashimoto, Y., and Kitazume, S. (2007) Beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase I cleavage by BACE1 enhances the sialylation of soluble glycoproteins. A novel regulatory mechanism for alpha2,6-sialylation. *J. Biol. Chem.* **282**, 34896–34903
130. Lichtenthaler, S. F., Dominguez, D.-I., Westmeyer, G. G., Reiss, K., Haass, C., Saftig, P., De Strooper, B., and Seed, B. (2003) The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE1. *J. Biol. Chem.* **278**, 48713–48719
131. Wong, H.-K., Sakurai, T., Oyama, F., Kaneko, K., Wada, K., Miyazaki, H., Kurosawa, M., De Strooper, B., Saftig, P., and Nukina, N. (2005) beta Subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE1) and gamma-secretase. *J. Biol. Chem.* **280**, 23009–23017
132. von Arnim, C. A. F., Kinoshita, A., Peltan, I. D., Tangredi, M. M., Herl, L., Lee, B. M., Spoelgen, R., Hshieh, T. T., Ranganathan, S., Battey, F. D., Liu, C.-X., Bacskai, B. J., Sever, S., Irizarry, M. C., Strickland, D. K., and Hyman, B. T. (2005) The low density

- lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a novel beta-secretase (BACE1) substrate. *J. Biol. Chem.* **280**, 17777–17785
133. Näslund, J., Schierhorn, A., Hellman, U., Lannfelt, L., Roses, A. D., Tjernberg, L. O., Silberring, J., Gandy, S. E., Winblad, B., and Greengard, P. (1994) Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 8378–8382
134. Huse, J. T., Liu, K., Pijak, D. S., Carlin, D., Lee, V. M.-Y., and Doms, R. W. (2002) Beta-secretase processing in the trans-Golgi network preferentially generates truncated amyloid species that accumulate in Alzheimer's disease brain. *J. Biol. Chem.* **277**, 16278–16284
135. Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J. C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., and Citron, M. (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science.* **286**, 735–741
136. Chasseigneaux, S., and Allinquant, B. (2012) Functions of A $\beta$ , sAPP $\alpha$  and sAPP $\beta$ : similarities and differences. *J. Neurochem.* **120 Suppl 1**, 99–108
137. Nikolaev, A., McLaughlin, T., O'Leary, D. D. M., and Tessier-Lavigne, M. (2009) APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature.* **457**, 981–989
138. De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K., and Van Leuven, F. (1998) Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature.* **391**, 387–390
139. Herreman, A., Serneels, L., Annaert, W., Collen, D., Schoonjans, L., and De Strooper, B. (2000) Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* **2**, 461–462
140. Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J. T., Pesold, B., Steiner, H., and Haass, C. (2003) Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat. Cell Biol.* **5**, 486–488
141. Kimberly, W. T., LaVoie, M. J., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Wolfe, M. S., and Selkoe, D. J. (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**, 6382–6387
142. Takasugi, N., Tomita, T., Hayashi, I., Tsuruoka, M., Niimura, M., Takahashi, Y., Thinakaran, G., and Iwatsubo, T. (2003) The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature.* **422**, 438–441



143. Lichtenthaler, S. F., Wang, R., Grimm, H., Uljon, S. N., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1999) Mechanism of the cleavage specificity of Alzheimer's disease gamma-secretase identified by phenylalanine-scanning mutagenesis of the transmembrane domain of the amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 3053–3058
144. Bammens, L., Chávez-Gutiérrez, L., Tolia, A., Zwijsen, A., and De Strooper, B. (2011) Functional and topological analysis of Pen-2, the fourth subunit of the gamma-secretase complex. *J. Biol. Chem.* **286**, 12271–12282
145. Ahn, K., Shelton, C. C., Tian, Y., Zhang, X., Gilchrist, M. L., Sisodia, S. S., and Li, Y.-M. (2010) Activation and intrinsic gamma-secretase activity of presenilin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 21435–21440
146. Fortna, R. R., Crystal, A. S., Morais, V. A., Pijak, D. S., Lee, V. M.-Y., and Doms, R. W. (2004) Membrane topology and nicastrin-enhanced endoproteolysis of APH-1, a component of the gamma-secretase complex. *J. Biol. Chem.* **279**, 3685–3693
147. Haapasalo, A., and Kovacs, D. M. (2011) The many substrates of presenilin/ $\gamma$ -secretase. *J. Alzheimers Dis. JAD.* **25**, 3–28
148. Steiner, H., Fukumori, A., Tagami, S., and Okochi, M. (2018) Making the final cut: pathogenic amyloid- $\beta$  peptide generation by  $\gamma$ -secretase. *Cell Stress.* **2**, 292–310
149. Struhl, G., and Adachi, A. (2000) Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins. *Mol. Cell.* **6**, 625–636
150. Borchelt, D. R., Thinakaran, G., Eckman, C. B., Lee, M. K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C. M., Kim, G., Seekins, S., Yager, D., Slunt, H. H., Wang, R., Seeger, M., Levey, A. I., Gandy, S. E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Price, D. L., Younkin, S. G., and Sisodia, S. S. (1996) Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron.* **17**, 1005–1013
151. Liu, L., Ding, L., Rovere, M., Wolfe, M. S., and Selkoe, D. J. (2019) A cellular complex of BACE1 and  $\gamma$ -secretase sequentially generates A $\beta$  from its full-length precursor. *J. Cell Biol.* **218**, 644–663
152. Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., and Sisodia, S. (2012) Trafficking and Proteolytic Processing of APP. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 10.1101/cshperspect.a006270
153. Takami, M., Nagashima, Y., Sano, Y., Ishihara, S., Morishima-Kawashima, M., Funamoto, S., and Ihara, Y. (2009) gamma-Secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of beta-carboxyl terminal fragment. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **29**, 13042–13052

154. Qi-Takahara, Y., Morishima-Kawashima, M., Tanimura, Y., Dolios, G., Hirotsu, N., Horikoshi, Y., Kametani, F., Maeda, M., Saido, T. C., Wang, R., and Ihara, Y. (2005) Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **25**, 436–445
155. Morishima-Kawashima, M. (2014) Molecular mechanism of the intramembrane cleavage of the  $\beta$ -carboxyl terminal fragment of amyloid precursor protein by  $\gamma$ -secretase. *Front. Physiol.* **5**, 463
156. Zhao, G., Cui, M.-Z., Mao, G., Dong, Y., Tan, J., Sun, L., and Xu, X. (2005) gamma-Cleavage is dependent on zeta-cleavage during the proteolytic processing of amyloid precursor protein within its transmembrane domain. *J. Biol. Chem.* **280**, 37689–37697
157. Bolduc, D. M., Montagna, D. R., Seghers, M. C., Wolfe, M. S., and Selkoe, D. J. (2016) The amyloid-beta forming tripeptide cleavage mechanism of  $\gamma$ -secretase. *eLife*. 10.7554/eLife.17578
158. Okochi, M., Tagami, S., Yanagida, K., Takami, M., Kodama, T. S., Mori, K., Nakayama, T., Ihara, Y., and Takeda, M. (2013)  $\gamma$ -secretase modulators and presenilin 1 mutants act differently on presenilin/ $\gamma$ -secretase function to cleave A $\beta$ 42 and A $\beta$ 43. *Cell Rep.* **3**, 42–51
159. Dulin, F., Léveillé, F., Ortega, J. B., Mornon, J.-P., Buisson, A., Callebaut, I., and Colloc'h, N. (2008) P3 peptide, a truncated form of A beta devoid of synaptotoxic effect, does not assemble into soluble oligomers. *FEBS Lett.* **582**, 1865–1870
160. Goodger, Z. V., Rajendran, L., Trutzel, A., Kohli, B. M., Nitsch, R. M., and Konietzko, U. (2009) Nuclear signaling by the APP intracellular domain occurs predominantly through the amyloidogenic processing pathway. *J. Cell Sci.* **122**, 3703–3714
161. Passer, B., Pellegrini, L., Russo, C., Siegel, R. M., Lenardo, M. J., Schettini, G., Bachmann, M., Tabaton, M., and D'Adamio, L. (2000) Generation of an apoptotic intracellular peptide by gamma-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid beta protein precursor. *J. Alzheimers Dis. JAD.* **2**, 289–301
162. Venugopal, C., Pappolla, M. A., and Sambamurti, K. (2007) Insulysin cleaves the APP cytoplasmic fragment at multiple sites. *Neurochem. Res.* **32**, 2225–2234
163. Nunan, J., Shearman, M. S., Checler, F., Cappai, R., Evin, G., Beyreuther, K., Masters, C. L., and Small, D. H. (2001) The C-terminal fragment of the Alzheimer's disease amyloid protein precursor is degraded by a proteasome-dependent mechanism distinct from gamma-secretase. *Eur. J. Biochem.* **268**, 5329–5336

164. von Rotz, R. C., Kohli, B. M., Bosset, J., Meier, M., Suzuki, T., Nitsch, R. M., and Konietzko, U. (2004) The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *J. Cell Sci.* **117**, 4435–4448
165. Kim, H.-S., Kim, E.-M., Lee, J.-P., Park, C. H., Kim, S., Seo, J.-H., Chang, K.-A., Yu, E., Jeong, S.-J., Chong, Y. H., and Suh, Y.-H. (2003) C-terminal fragments of amyloid precursor protein exert neurotoxicity by inducing glycogen synthase kinase-3 $\beta$  expression. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **17**, 1951–1953
166. Liu, Q., Zerbinatti, C. V., Zhang, J., Hoe, H.-S., Wang, B., Cole, S. L., Herz, J., Muglia, L., and Bu, G. (2007) Amyloid precursor protein regulates brain apolipoprotein E and cholesterol metabolism through lipoprotein receptor LRP1. *Neuron.* **56**, 66–78
167. Pardossi-Piquard, R., and Checler, F. (2012) The physiology of the  $\beta$ -amyloid precursor protein intracellular domain AICD. *J. Neurochem.* **120 Suppl 1**, 109–124
168. Scheinfeld, M. H., Ghersi, E., Laky, K., Fowlkes, B. J., and D’Adamio, L. (2002) Processing of beta-amyloid precursor-like protein-1 and -2 by gamma-secretase regulates transcription. *J. Biol. Chem.* **277**, 44195–44201
169. Li, Q., and Südhof, T. C. (2004) Cleavage of amyloid-beta precursor protein and amyloid-beta precursor-like protein by BACE 1. *J. Biol. Chem.* **279**, 10542–10550
170. Cuchillo-Ibañez, I., Lopez-Font, I., Boix-Amorós, A., Brinkmalm, G., Blennow, K., Molinuevo, J.-L., and Sáez-Valero, J. (2015) Heteromers of amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid. *Mol. Neurodegener.* **10**, 2
171. Eggert, S., Paliga, K., Soba, P., Evin, G., Masters, C. L., Weidemann, A., and Beyreuther, K. (2004) The proteolytic processing of the amyloid precursor protein gene family members APLP-1 and APLP-2 involves alpha-, beta-, gamma-, and epsilon-like cleavages: modulation of APLP-1 processing by n-glycosylation. *J. Biol. Chem.* **279**, 18146–18156
172. Yanagida, K., Okochi, M., Tagami, S., Nakayama, T., Kodama, T. S., Nishitomi, K., Jiang, J., Mori, K., Tatsumi, S.-I., Arai, T., Ikeuchi, T., Kasuga, K., Tokuda, T., Kondo, M., Ikeda, M., Deguchi, K., Kazui, H., Tanaka, T., Morihara, T., Hashimoto, R., Kudo, T., Steiner, H., Haass, C., Tsuchiya, K., Akiyama, H., Kuwano, R., and Takeda, M. (2009) The 28-amino acid form of an APLP1-derived Abeta-like peptide is a surrogate marker for Abeta42 production in the central nervous system. *EMBO Mol. Med.* **1**, 223–235
173. Vassar, R. (2004) BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer’s disease. *J. Mol. Neurosci. MN.* **23**, 105–114

174. Sun, X., He, G., and Song, W. (2006) BACE2, as a novel APP theta-secretase, is not responsible for the pathogenesis of Alzheimer's disease in Down syndrome. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **20**, 1369–1376
175. Liu, X., Wang, Z., Wu, Y., Wang, J., and Song, W. (2013) BACE2 degradation mediated by the macroautophagy-lysosome pathway. *Eur. J. Neurosci.* **37**, 1970–1977
176. Azkona, G., Levannon, D., Groner, Y., and Dierssen, M. (2010) In vivo effects of APP are not exacerbated by BACE2 co-overexpression: behavioural characterization of a double transgenic mouse model. *Amino Acids.* **39**, 1571–1580
177. Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Loeloff, R., Louis, J. C., Curran, E., Citron, M., and Vassar, R. (2000) Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. *J. Biol. Chem.* **275**, 20647–20651
178. Marcinkiewicz, M., and Seidah, N. G. (2000) Coordinated expression of beta-amyloid precursor protein and the putative beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 in mouse and human brain. *J. Neurochem.* **75**, 2133–2143
179. Willem, M., Tahirovic, S., Busche, M. A., Ovsepijan, S. V., Chafai, M., Kootar, S., Hornburg, D., Evans, L. D. B., Moore, S., Daria, A., Hampel, H., Müller, V., Giudici, C., Nuscher, B., Wenninger-Weinzierl, A., Kremmer, E., Heneka, M. T., Thal, D. R., Giedraitis, V., Lannfelt, L., Müller, U., Livesey, F. J., Meissner, F., Herms, J., Konnerth, A., Marie, H., and Haass, C. (2015)  $\eta$ -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature.* **526**, 443–447
180. Morita, Y., Araki, H., Sugimoto, T., Takeuchi, K., Yamane, T., Maeda, T., Yamamoto, Y., Nishi, K., Asano, M., Shirahama-Noda, K., Nishimura, M., Uzu, T., Hara-Nishimura, I., Koya, D., Kashiwagi, A., and Ohkubo, I. (2007) Legumain/asparaginyl endopeptidase controls extracellular matrix remodeling through the degradation of fibronectin in mouse renal proximal tubular cells. *FEBS Lett.* **581**, 1417–1424
181. Zhang, Z., Song, M., Liu, X., Su Kang, S., Duong, D. M., Seyfried, N. T., Cao, X., Cheng, L., Sun, Y. E., Ping Yu, S., Jia, J., Levey, A. I., and Ye, K. (2015) Delta-secretase cleaves amyloid precursor protein and regulates the pathogenesis in Alzheimer's disease. *Nat. Commun.* **6**, 8762
182. Bien, J., Jefferson, T., Čaušević, M., Jumpertz, T., Munter, L., Multhaup, G., Weggen, S., Becker-Pauly, C., and Pietrzik, C. U. (2012) The Metalloprotease Meprin  $\beta$  Generates Amino Terminal-truncated Amyloid  $\beta$  Peptide Species. *J. Biol. Chem.* **287**, 33304–33313
183. Becker-Pauly, C., and Pietrzik, C. U. (2016) The Metalloprotease Meprin  $\beta$  Is an

Alternative  $\beta$ -Secretase of APP. *Front. Mol. Neurosci.* **9**, 159

184. Jefferson, T., Čaušević, M., auf dem Keller, U., Schilling, O., Isbert, S., Geyer, R., Maier, W., Tschickardt, S., Jumpertz, T., Weggen, S., Bond, J. S., Overall, C. M., Pietrzik, C. U., and Becker-Pauly, C. (2011) Metalloprotease meprin beta generates nontoxic N-terminal amyloid precursor protein fragments in vivo. *J. Biol. Chem.* **286**, 27741–27750
185. Jäckle, F., Schmidt, F., Wichert, R., Arnold, P., Prox, J., Mangold, M., Ohler, A., Pietrzik, C. U., Koudelka, T., Tholey, A., Gütschow, M., Stirnberg, M., and Becker-Pauly, C. (2015) Metalloprotease meprin  $\beta$  is activated by transmembrane serine protease matriptase-2 at the cell surface thereby enhancing APP shedding. *Biochem. J.* **470**, 91–103
186. Urban, S., and Wolfe, M. S. (2005) Reconstitution of intramembrane proteolysis in vitro reveals that pure rhomboid is sufficient for catalysis and specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 1883–1888
187. Paschkowsky, S., Hsiao, J. M., Young, J. C., and Munter, L. M. (2019) The discovery of proteases and intramembrane proteolysis 1. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* **97**, 265–269
188. Düsterhöft, S., Künzel, U., and Freeman, M. (2017) Rhomboid proteases in human disease: Mechanisms and future prospects. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1864**, 2200–2209
189. Paschkowsky, S., Hamzé, M., Oestereich, F., and Munter, L. M. (2016) Alternative Processing of the Amyloid Precursor Protein Family by Rhomboid Protease RHBDL4. *J. Biol. Chem.* **291**, 21903–21912
190. Recinto, S. J., Paschkowsky, S., and Munter, L. M. (2018) An alternative processing pathway of APP reveals two distinct cleavage modes for rhomboid protease RHBDL4. *Biol. Chem.* **399**, 1399–1408
191. Dolev, I., and Michaelson, D. M. (2004) A nontransgenic mouse model shows inducible amyloid-beta (A $\beta$ ) peptide deposition and elucidates the role of apolipoprotein E in the amyloid cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 13909–13914
192. Nisemblat, Y., Belinson, H., Dolev, I., and Michaelson, D. M. (2008) Activation of the amyloid cascade by intracerebroventricular injection of the protease inhibitor phosphoramidon. *Neurodegener. Dis.* **5**, 166–169
193. Verma, R. P., and Hansch, C. (2007) Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 2223–2268

194. Hernandez-Guillamon, M., Mawhirt, S., Blais, S., Montaner, J., Neubert, T. A., Rostagno, A., and Ghiso, J. (2015) Sequential Amyloid- $\beta$  Degradation by the Matrix Metalloproteases MMP-2 and MMP-9. *J. Biol. Chem.* **290**, 15078–15091
195. White, A. R., Du, T., Laughton, K. M., Volitakis, I., Sharples, R. A., Xilinas, M. E., Hoke, D. E., Holsinger, R. M. D., Evin, G., Cherny, R. A., Hill, A. F., Barnham, K. J., Li, Q.-X., Bush, A. I., and Masters, C. L. (2006) Degradation of the Alzheimer disease amyloid beta-peptide by metal-dependent up-regulation of metalloprotease activity. *J. Biol. Chem.* **281**, 17670–17680
196. Liu, C.-C., Hu, J., Zhao, N., Wang, J., Wang, N., Cirrito, J. R., Kanekiyo, T., Holtzman, D. M., and Bu, G. (2017) Astrocytic LRP1 Mediates Brain A $\beta$  Clearance and Impacts Amyloid Deposition. *J. Neurosci.* **37**, 4023–4031
197. Liao, M.-C., and Van Nostrand, W. E. (2010) Degradation of soluble and fibrillar amyloid beta-protein by matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in vitro. *Biochemistry.* **49**, 1127–1136
198. Ahmad, M., Takino, T., Miyamori, H., Yoshizaki, T., Furukawa, M., and Sato, H. (2006) Cleavage of amyloid-beta precursor protein (APP) by membrane-type matrix metalloproteinases. *J. Biochem. (Tokyo)*. **139**, 517–526
199. Rivera, S., García-González, L., Khrestchatisky, M., and Baranger, K. (2019) Metalloproteinases and their tissue inhibitors in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.* **76**, 3167–3191
200. García-González, L., Pilat, D., Baranger, K., and Rivera, S. (2019) Emerging Alternative Proteinases in APP Metabolism and Alzheimer's Disease Pathogenesis: A Focus on MT1-MMP and MT5-MMP. *Front. Aging Neurosci.* **11**, 244
201. Glenner, G. G., and Wong, C. W. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **120**, 885–890
202. Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Müller-Hill, B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature.* **325**, 733–736
203. Moore, B. D., Chakrabarty, P., Levites, Y., Kukar, T. L., Baine, A.-M., Moroni, T., Ladd, T. B., Das, P., Dickson, D. W., and Golde, T. E. (2012) Overlapping profiles of A $\beta$  peptides in the Alzheimer's disease and pathological aging brains. *Alzheimers Res. Ther.* **4**, 18

204. Wildburger, N. C., Esparza, T. J., LeDuc, R. D., Fellers, R. T., Thomas, P. M., Cairns, N. J., Kelleher, N. L., Bateman, R. J., and Brody, D. L. (2017) Diversity of Amyloid-beta Proteoforms in the Alzheimer's Disease Brain. *Sci. Rep.* **7**, 9520
205. Dunys, J., Valverde, A., and Checler, F. (2018) Are N- and C-terminally truncated A $\beta$  species key pathological triggers in Alzheimer's disease? *J. Biol. Chem.* **293**, 15419–15428
206. Jarrett, J. T., Berger, E. P., and Lansbury, P. T. (1993) The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry.* **32**, 4693–4697
207. Wiltfang, J., Esselmann, H., Bibl, M., Smirnov, A., Otto, M., Paul, S., Schmidt, B., Klafki, H.-W., Maler, M., Dyrks, T., Bienert, M., Beyermann, M., R  ther, E., and Kornhuber, J. (2002) Highly conserved and disease-specific patterns of carboxyterminally truncated Abeta peptides 1-37/38/39 in addition to 1-40/42 in Alzheimer's disease and in patients with chronic neuroinflammation. *J. Neurochem.* **81**, 481–496
208. Weggen, S., Eriksen, J. L., Das, P., Sagi, S. A., Wang, R., Pietrzik, C. U., Findlay, K. A., Smith, T. E., Murphy, M. P., Bulter, T., Kang, D. E., Marquez-Sterling, N., Golde, T. E., and Koo, E. H. (2001) A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature.* **414**, 212–216
209. Selkoe, D. J. (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* **81**, 741–766
210. Ida, N., Hartmann, T., Pantel, J., Schröder, J., Zerfass, R., F  rstl, H., Sandbrink, R., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1996) Analysis of heterogeneous A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive Western blot assay. *J. Biol. Chem.* **271**, 22908–22914
211. Mo, J.-A., Lim, J.-H., Sul, A.-R., Lee, M., Youn, Y. C., and Kim, H.-J. (2015) Cerebrospinal fluid  $\beta$ -amyloid1-42 levels in the differential diagnosis of Alzheimer's disease--systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* **10**, e0116802
212. Lue, L. F., Kuo, Y. M., Roher, A. E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, J. H., Rydel, R. E., and Rogers, J. (1999) Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **155**, 853–862
213. Kagan, B. L., Jang, H., Capone, R., Teran Arce, F., Ramachandran, S., Lal, R., and Nussinov, R. (2012) Antimicrobial Properties of Amyloid Peptides. *Mol. Pharm.* **9**, 708–717

214. Bishop, G. M., and Robinson, S. R. (2004) Physiological roles of amyloid-beta and implications for its removal in Alzheimer's disease. *Drugs Aging*. **21**, 621–630
215. Brothers, H. M., Gosztyla, M. L., and Robinson, S. R. (2018) The Physiological Roles of Amyloid- $\beta$  Peptide Hint at New Ways to Treat Alzheimer's Disease. *Front. Aging Neurosci.* **10**, 118
216. Bode, D. C., Freeley, M., Nield, J., Palma, M., and Viles, J. H. (2019) Amyloid- $\beta$  oligomers have a profound detergent-like effect on lipid membrane bilayers, imaged by atomic force and electron microscopy. *J. Biol. Chem.* **294**, 7566–7572
217. Wozniak, M. A., Mee, A. P., and Itzhaki, R. F. (2009) Herpes simplex virus type 1 DNA is located within Alzheimer's disease amyloid plaques. *J. Pathol.* **217**, 131–138
218. Yarchoan, M., James, B. D., Shah, R. C., Arvanitakis, Z., Wilson, R. S., Schneider, J., Bennett, D. A., and Arnold, S. E. (2017) Association of Cancer History with Alzheimer's Disease Dementia and Neuropathology. *J. Alzheimers Dis.* **56**, 699–706
219. Shi, H., Tang, B., Liu, Y.-W., Wang, X.-F., and Chen, G.-J. (2015) Alzheimer disease and cancer risk: a meta-analysis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **141**, 485–494
220. Parkin, D. M. (2006) The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int. J. Cancer.* **118**, 3030–3044
221. Pourmand, N., and Pettersson, I. (1998) The Zn<sup>2+</sup> binding domain of the human Ro 52 kDa protein is a target for conformation-dependent autoantibodies. *J. Autoimmun.* **11**, 11–17
222. Bishop, G. M., and Robinson, S. R. (2002) The amyloid hypothesis: let sleeping dogmas lie? *Neurobiol. Aging.* **23**, 1101–1105
223. White, M. R., Kandel, R., Hsieh, I.-N., De Luna, X., and Hartshorn, K. L. (2018) Critical role of C-terminal residues of the Alzheimer's associated  $\beta$ -amyloid protein in mediating antiviral activity and modulating viral and bacterial interactions with neutrophils. *PLoS One.* **13**, e0194001
224. Atwood, C. S., Bowen, R. L., Smith, M. A., and Perry, G. (2003) Cerebrovascular requirement for sealant, anti-coagulant and remodeling molecules that allow for the maintenance of vascular integrity and blood supply. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **43**, 164–178
225. Blockx, I., Einstein, S., Guns, P.-J., Van Audekerke, J., Guglielmetti, C., Zago, W., Roose, D., Verhoye, M., Van der Linden, A., and Bard, F. (2016) Monitoring Blood-Brain Barrier Integrity Following Amyloid- $\beta$  Immunotherapy Using Gadolinium-Enhanced MRI in a



- PDAPP Mouse Model. *J. Alzheimers Dis. JAD.* **54**, 723–735
226. McKenzie, K. J., McLellan, D. R., Gentleman, S. M., Maxwell, W. L., Gennarelli, T. A., and Graham, D. I. (1996) Is beta-APP a marker of axonal damage in short-surviving head injury? *Acta Neuropathol. (Berl.)*. **92**, 608–613
227. Roberts, G. W., Gentleman, S. M., Lynch, A., Murray, L., Landon, M., and Graham, D. I. (1994) Beta amyloid protein deposition in the brain after severe head injury: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. **57**, 419–425
228. Macfarlane, D. P., Nicoll, J. A., Smith, C., and Graham, D. I. (1999) APOE epsilon4 allele and amyloid beta-protein deposition in long term survivors of head injury. *Neuroreport*. **10**, 3945–3948
229. Mannix, R. C., Zhang, J., Berglass, J., Qui, J., and Whalen, M. J. (2013) Beneficial effect of amyloid beta after controlled cortical impact. *Brain Inj.* **27**, 743–748
230. Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., Sisodia, S., and Malinow, R. (2003) APP processing and synaptic function. *Neuron*. **37**, 925–937
231. Fedele, E., Rivera, D., Marengo, B., Pronzato, M. A., and Ricciarelli, R. (2015) Amyloid  $\beta$ : Walking on the dark side of the moon. *Mech. Ageing Dev.* **152**, 1–4
232. Garcia-Osta, A., and Alberini, C. M. (2009) Amyloid beta mediates memory formation. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N.* **16**, 267–272
233. Morley, J. E., Farr, S. A., Banks, W. A., Johnson, S. N., Yamada, K. A., and Xu, L. (2010) A physiological role for amyloid-beta protein: enhancement of learning and memory. *J. Alzheimers Dis. JAD.* **19**, 441–449
234. Demuro, A., Mina, E., Kaye, R., Milton, S. C., Parker, I., and Glabe, C. G. (2005) Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J. Biol. Chem.* **280**, 17294–17300
235. Bhatia, R., Lin, H., and Lal, R. (2000) Fresh and globular amyloid beta protein (1-42) induces rapid cellular degeneration: evidence for AbetaP channel-mediated cellular toxicity. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **14**, 1233–1243
236. Cowburn, R. F., Wiehager, B., Trief, E., Li-Li, M., and Sundström, E. (1997) Effects of beta-amyloid-(25-35) peptides on radioligand binding to excitatory amino acid receptors and voltage-dependent calcium channels: evidence for a selective affinity for the glutamate and glycine recognition sites of the NMDA receptor. *Neurochem. Res.* **22**, 1437–1442

237. Wang, H. Y., Lee, D. H., D'Andrea, M. R., Peterson, P. A., Shank, R. P., and Reitz, A. B. (2000) beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J. Biol. Chem.* **275**, 5626–5632
238. Yan, S. D., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H., Roher, A., Slattery, T., Zhao, L., Nagashima, M., Morser, J., Migheli, A., Nawroth, P., Stern, D., and Schmidt, A. M. (1996) RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature.* **382**, 685–691
239. Laurén, J., Gimbel, D. A., Nygaard, H. B., Gilbert, J. W., and Strittmatter, S. M. (2009) Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature.* **457**, 1128–1132
240. Cissé, M., Halabisky, B., Harris, J., Devidze, N., Dubal, D. B., Sun, B., Orr, A., Lotz, G., Kim, D. H., Hamto, P., Ho, K., Yu, G.-Q., and Mucke, L. (2011) Reversing EphB2 depletion rescues cognitive functions in Alzheimer model. *Nature.* **469**, 47–52
241. Kam, T.-I., Song, S., Gwon, Y., Park, H., Yan, J.-J., Im, I., Choi, J.-W., Choi, T.-Y., Kim, J., Song, D.-K., Takai, T., Kim, Y.-C., Kim, K.-S., Choi, S.-Y., Choi, S., Klein, W. L., Yuan, J., and Jung, Y.-K. (2013) FcγRIIb mediates amyloid-β neurotoxicity and memory impairment in Alzheimer's disease. *J. Clin. Invest.* **123**, 2791–2802
242. Deane, R., Singh, I., Sagare, A. P., Bell, R. D., Ross, N. T., LaRue, B., Love, R., Perry, S., Paquette, N., Deane, R. J., Thiagarajan, M., Zarcone, T., Fritz, G., Friedman, A. E., Miller, B. L., and Zlokovic, B. V. (2012) A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid β-mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* **122**, 1377–1392
243. Deane, R., Du Yan, S., Subramanian, R. K., LaRue, B., Jovanovic, S., Hogg, E., Welch, D., Manness, L., Lin, C., Yu, J., Zhu, H., Ghiso, J., Frangione, B., Stern, A., Schmidt, A. M., Armstrong, D. L., Arnold, B., Liliensiek, B., Nawroth, P., Hofman, F., Kindy, M., Stern, D., and Zlokovic, B. (2003) RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat. Med.* **9**, 907–913
244. Galasko, D., Bell, J., Mancuso, J. Y., Kupiec, J. W., Sabbagh, M. N., van Dyck, C., Thomas, R. G., Aisen, P. S., and Alzheimer's Disease Cooperative Study (2014) Clinical trial of an inhibitor of RAGE-Aβ interactions in Alzheimer disease. *Neurology.* **82**, 1536–1542
245. Wang, R., and Reddy, P. H. (2017) Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis. JAD.* **57**, 1041–1048

246. Alberdi, E., Sánchez-Gómez, M. V., Cavaliere, F., Pérez-Samartín, A., Zugaza, J. L., Trullas, R., Domercq, M., and Matute, C. (2010) Amyloid beta oligomers induce Ca<sup>2+</sup> dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors. *Cell Calcium*. **47**, 264–272
247. Shankar, G. M., Bloodgood, B. L., Townsend, M., Walsh, D. M., Selkoe, D. J., and Sabatini, B. L. (2007) Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **27**, 2866–2875
248. Zott, B., Simon, M. M., Hong, W., Unger, F., Chen-Engerer, H.-J., Frosch, M. P., Sakmann, B., Walsh, D. M., and Konnerth, A. (2019) A vicious cycle of  $\beta$  amyloid-dependent neuronal hyperactivation. *Science*. **365**, 559–565
249. Wilcock, G. K., Esiri, M. M., Bowen, D. M., and Smith, C. C. (1982) Alzheimer's disease. Correlation of cortical choline acetyltransferase activity with the severity of dementia and histological abnormalities. *J. Neurol. Sci.* **57**, 407–417
250. Geula, C., and Mesulam, M. M. (1995) Cholinesterases and the pathology of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **9 Suppl 2**, 23–28
251. Rosenberg, P. B., Nowrangi, M. A., and Lyketsos, C. G. (2015) Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: What might be associated brain circuits? *Mol. Aspects Med.* **43–44**, 25–37
252. Martorana, A., and Koch, G. (2014) Is dopamine involved in Alzheimer's disease? *Front. Aging Neurosci.* **6**, 252
253. Wang, H.-Y., Li, W., Benedetti, N. J., and Lee, D. H. S. (2003) Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors mediate beta-amyloid peptide-induced tau protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **278**, 31547–31553
254. Dziewczapolski, G., Glogowski, C. M., Masliah, E., and Heinemann, S. F. (2009) Deletion of the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor gene improves cognitive deficits and synaptic pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **29**, 8805–8815
255. Hernandez, C. M., Kaye, R., Zheng, H., Sweatt, J. D., and Dineley, K. T. (2010) Loss of alpha7 nicotinic receptors enhances beta-amyloid oligomer accumulation, exacerbating early-stage cognitive decline and septohippocampal pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **30**, 2442–2453
256. Kudo, W., Lee, H.-P., Zou, W.-Q., Wang, X., Perry, G., Zhu, X., Smith, M. A., Petersen,

- R. B., and Lee, H. (2012) Cellular prion protein is essential for oligomeric amyloid- $\beta$ -induced neuronal cell death. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 1138–1144
257. Gimbel, D. A., Nygaard, H. B., Coffey, E. E., Gunther, E. C., Laurén, J., Gimbel, Z. A., and Strittmatter, S. M. (2010) Memory impairment in transgenic Alzheimer mice requires cellular prion protein. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **30**, 6367–6374
258. Chung, E., Ji, Y., Sun, Y., Kacsak, R. J., Kacsak, R. B., Mehta, P. D., Strittmatter, S. M., and Wisniewski, T. (2010) Anti-PrPC monoclonal antibody infusion as a novel treatment for cognitive deficits in an Alzheimer's disease model mouse. *BMC Neurosci.* **11**, 130
259. Kessels, H. W., Nguyen, L. N., Nabavi, S., and Malinow, R. (2010) The prion protein as a receptor for amyloid-beta. *Nature.* **466**, E3-4; discussion E4-5
260. Cissé, M., Sanchez, P. E., Kim, D. H., Ho, K., Yu, G.-Q., and Mucke, L. (2011) Ablation of cellular prion protein does not ameliorate abnormal neural network activity or cognitive dysfunction in the J20 line of human amyloid precursor protein transgenic mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **31**, 10427–10431
261. Nixon, R. A. (2017) Amyloid precursor protein and endosomal-lysosomal dysfunction in Alzheimer's disease: inseparable partners in a multifactorial disease. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **31**, 2729–2743
262. Arbo, B. D., Cechinel, L. R., Palazzo, R. P., and Siqueira, I. R. (2019) Endosomal dysfunction impacts extracellular vesicle release: Central role in A $\beta$  pathology. *Ageing Res. Rev.* **58**, 101006
263. Kanekiyo, T., Zhang, J., Liu, Q., Liu, C.-C., Zhang, L., and Bu, G. (2011) Heparan sulphate proteoglycan and the low-density lipoprotein receptor-related protein 1 constitute major pathways for neuronal amyloid-beta uptake. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **31**, 1644–1651
264. Singh, T. D., Park, S.-Y., Bae, J., Yun, Y., Bae, Y.-C., Park, R.-W., and Kim, I.-S. (2010) MEGF10 functions as a receptor for the uptake of amyloid- $\beta$ . *FEBS Lett.* **584**, 3936–3942
265. Lopez, E. M., Bell, K. F. S., Ribeiro-da-Silva, A., and Cuellar, A. C. (2004) Early changes in neurons of the hippocampus and neocortex in transgenic rats expressing intracellular human a-beta. *J. Alzheimers Dis. JAD.* **6**, 421–431; discussion 443-449
266. Shim, S., Lee, W., Chung, H., and Jung, Y.-K. (2011) Amyloid  $\beta$ -induced FOXRED2 mediates neuronal cell death via inhibition of proteasome activity. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.* **68**, 2115–2127

267. Ma, T., Trinh, M. A., Wexler, A. J., Bourbon, C., Gatti, E., Pierre, P., Cavener, D. R., and Klann, E. (2013) Suppression of eIF2 $\alpha$  kinases alleviates Alzheimer's disease-related plasticity and memory deficits. *Nat. Neurosci.* **16**, 1299–1305
268. Stutzmann, G. E., Smith, I., Caccamo, A., Oddo, S., Laferla, F. M., and Parker, I. (2006) Enhanced ryanodine receptor recruitment contributes to Ca<sup>2+</sup> disruptions in young, adult, and aged Alzheimer's disease mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **26**, 5180–5189
269. Supnet, C., Grant, J., Kong, H., Westaway, D., and Mayne, M. (2006) Amyloid-beta-(1-42) increases ryanodine receptor-3 expression and function in neurons of TgCRND8 mice. *J. Biol. Chem.* **281**, 38440–38447
270. Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A., and Yuan, J. (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature.* **403**, 98–103
271. Song, S., Lee, H., Kam, T.-I., Tai, M. L., Lee, J.-Y., Noh, J.-Y., Shim, S. M., Seo, S. J., Kong, Y.-Y., Nakagawa, T., Chung, C.-W., Choi, D.-Y., Oubrahim, H., and Jung, Y.-K. (2008) E2-25K/Hip-2 regulates caspase-12 in ER stress-mediated Abeta neurotoxicity. *J. Cell Biol.* **182**, 675–684
272. Matsuzaki, S., Hiratsuka, T., Kuwahara, R., Katayama, T., and Tohyama, M. (2010) Caspase-4 is partially cleaved by calpain via the impairment of Ca<sup>2+</sup> homeostasis under the ER stress. *Neurochem. Int.* **56**, 352–356
273. Casley, C. S., Canevari, L., Land, J. M., Clark, J. B., and Sharpe, M. A. (2002) Beta-amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities. *J. Neurochem.* **80**, 91–100
274. Wang, X., Perry, G., Smith, M. A., and Zhu, X. (2010) Amyloid-beta-derived diffusible ligands cause impaired axonal transport of mitochondria in neurons. *Neurodegener. Dis.* **7**, 56–59
275. Wang, X., Su, B., Lee, H., Li, X., Perry, G., Smith, M. A., and Zhu, X. (2009) Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **29**, 9090–9103
276. Wang, X., Su, B., Fujioka, H., and Zhu, X. (2008) Dynamin-like protein 1 reduction underlies mitochondrial morphology and distribution abnormalities in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. *Am. J. Pathol.* **173**, 470–482
277. De Montigny, A., Elhiri, I., Allyson, J., Cyr, M., and Massicotte, G. (2013) NMDA Reduces Tau Phosphorylation in Rat Hippocampal Slices by Targeting NR2A Receptors,

- GSK3 $\beta$ , and PKC Activities. *Neural Plast.* 10.1155/2013/261593
278. Bradley, C. A., Peineau, S., Taghibiglou, C., Nicolas, C. S., Whitcomb, D. J., Bortolotto, Z. A., Kaang, B.-K., Cho, K., Wang, Y. T., and Collingridge, G. L. (2012) A pivotal role of GSK-3 in synaptic plasticity. *Front. Mol. Neurosci.* 10.3389/fnmol.2012.00013
279. Stancu, I.-C., Vasconcelos, B., Terwel, D., and Dewachter, I. (2014) Models of  $\beta$ -amyloid induced Tau-pathology: the long and “folded” road to understand the mechanism. *Mol. Neurodegener.* **9**, 51
280. Mucke, L., and Selkoe, D. J. (2012) Neurotoxicity of amyloid  $\beta$ -protein: synaptic and network dysfunction. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a006338
281. Ferreira, S. T., Lourenco, M. V., Oliveira, M. M., and De Felice, F. G. (2015) Soluble amyloid- $\beta$  oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer’s disease. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 191
282. Katzman, R., Terry, R., DeTeresa, R., Brown, T., Davies, P., Fuld, P., Renbing, X., and Peck, A. (1988) Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. *Ann. Neurol.* **23**, 138–144
283. Fagan, A. M., Mintun, M. A., Shah, A. R., Aldea, P., Roe, C. M., Mach, R. H., Marcus, D., Morris, J. C., and Holtzman, D. M. (2009) Cerebrospinal fluid tau and ptau(181) increase with cortical amyloid deposition in cognitively normal individuals: implications for future clinical trials of Alzheimer’s disease. *EMBO Mol. Med.* **1**, 371–380
284. Kametani, F., and Hasegawa, M. (2018) Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer’s Disease. *Front. Neurosci.* 10.3389/fnins.2018.00025
285. Morris, G. P., Clark, I. A., and Vissel, B. (2014) Inconsistencies and Controversies Surrounding the Amyloid Hypothesis of Alzheimer’s Disease. *Acta Neuropathol. Commun.* 10.1186/s40478-014-0135-5
286. Boland, B., Kumar, A., Lee, S., Platt, F. M., Wegiel, J., Yu, W. H., and Nixon, R. A. (2008) Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer’s disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **28**, 6926–6937
287. Cataldo, A. M., Barnett, J. L., Pieroni, C., and Nixon, R. A. (1997) Increased neuronal endocytosis and protease delivery to early endosomes in sporadic Alzheimer’s disease: neuropathologic evidence for a mechanism of increased beta-amyloidogenesis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **17**, 6142–6151

288. Nixon, R. A., Wegiel, J., Kumar, A., Yu, W. H., Peterhoff, C., Cataldo, A., and Cuervo, A. M. (2005) Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immunoelectron microscopy study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **64**, 113–122
289. Di Cera, E. (2009) Serine Proteases. *IUBMB Life.* **61**, 510–515
290. Rawlings, N. D., Barrett, A. J., Thomas, P. D., Huang, X., Bateman, A., and Finn, R. D. (2018) The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res.* **46**, D624–D632
291. Page, M. J., and Di Cera, E. (2008) Serine peptidases: classification, structure and function. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.* **65**, 1220–1236
292. Page, M. J., and Di Cera, E. (2008) Evolution of peptidase diversity. *J. Biol. Chem.* **283**, 30010–30014
293. Antalis, T. M., Bugge, T. H., and Wu, Q. (2011) Membrane-anchored serine proteases in health and disease. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **99**, 1–50
294. Hooper, J. D., Clements, J. A., Quigley, J. P., and Antalis, T. M. (2001) Type II transmembrane serine proteases. Insights into an emerging class of cell surface proteolytic enzymes. *J. Biol. Chem.* **276**, 857–860
295. Sevenich, L., and Joyce, J. A. (2014) Pericellular proteolysis in cancer. *Genes Dev.* **28**, 2331–2347
296. Antalis, T. M., Buzza, M. S., Hodge, K. M., Hooper, J. D., and Netzel-Arnett, S. (2010) The cutting edge: membrane-anchored serine protease activities in the pericellular microenvironment. *Biochem. J.* **428**, 325–346
297. Grau, S., Baldi, A., Bussani, R., Tian, X., Stefanescu, R., Przybylski, M., Richards, P., Jones, S. A., Shridhar, V., Clausen, T., and Ehrmann, M. (2005) Implications of the serine protease HtrA1 in amyloid precursor protein processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 6021–6026
298. Park, H.-J., Kim, S.-S., Seong, Y.-M., Kim, K.-H., Goo, H. G., Yoon, E. J., Min, D. S., Kang, S., and Rhim, H. (2006) Beta-amyloid precursor protein is a direct cleavage target of HtrA2 serine protease. Implications for the physiological function of HtrA2 in the mitochondria. *J. Biol. Chem.* **281**, 34277–34287
299. Chen, L.-M., and Chai, K. X. (2019) Matriptase cleaves the amyloid-beta peptide 1-42 at Arg-5, Lys-16, and Lys-28. *BMC Res. Notes.* **12**, 5
300. Lin, C. Y., Anders, J., Johnson, M., Sang, Q. A., and Dickson, R. B. (1999) Molecular

- cloning of cDNA for matriptase, a matrix-degrading serine protease with trypsin-like activity. *J. Biol. Chem.* **274**, 18231–18236
301. Hooper, J. D., Campagnolo, L., Goodarzi, G., Truong, T. N., Stuhlmann, H., and Quigley, J. P. (2003) Mouse matriptase-2: identification, characterization and comparative mRNA expression analysis with mouse hepsin in adult and embryonic tissues. *Biochem. J.* **373**, 689–702
302. Szabo, R., Netzel-Arnett, S., Hobson, J. P., Antalis, T. M., and Bugge, T. H. (2005) Matriptase-3 is a novel phylogenetically preserved membrane-anchored serine protease with broad serpin reactivity. *Biochem. J.* **390**, 231–242
303. Kim, C., Cho, Y., Kang, C.-H., Kim, M. G., Lee, H., Cho, E.-G., and Park, D. (2005) Filamin is essential for shedding of the transmembrane serine protease, epithin. *EMBO Rep.* **6**, 1045–1051
304. Inouye, K., Tomoishi, M., Yasumoto, M., Miyake, Y., Kojima, K., Tsuzuki, S., and Fushiki, T. (2013) Roles of CUB and LDL receptor class A domain repeats of a transmembrane serine protease matriptase in its zymogen activation. *J. Biochem. (Tokyo)*. **153**, 51–61
305. Oberst, M. D., Chen, L.-Y. L., Kiyomiya, K.-I., Williams, C. A., Lee, M.-S., Johnson, M. D., Dickson, R. B., and Lin, C.-Y. (2005) HAI-1 regulates activation and expression of matriptase, a membrane-bound serine protease. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **289**, C462-470
306. Lee, M.-S., Tseng, I.-C., Wang, Y., Kiyomiya, K., Johnson, M. D., Dickson, R. B., and Lin, C.-Y. (2007) Autoactivation of matriptase in vitro: requirement for biomembrane and LDL receptor domain. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **293**, C95-105
307. Benaud, C., Dickson, R. B., and Lin, C. Y. (2001) Regulation of the activity of matriptase on epithelial cell surfaces by a blood-derived factor. *Eur. J. Biochem.* **268**, 1439–1447
308. Lee, M.-S., Kiyomiya, K., Benaud, C., Dickson, R. B., and Lin, C.-Y. (2005) Simultaneous activation and hepatocyte growth factor activator inhibitor 1-mediated inhibition of matriptase induced at activation foci in human mammary epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **288**, C932-941
309. Kirchhofer, D., Peek, M., Li, W., Stamos, J., Eigenbrot, C., Kadkhodayan, S., Elliott, J. M., Corpuz, R. T., Lazarus, R. A., and Moran, P. (2003) Tissue expression, protease specificity, and Kunitz domain functions of hepatocyte growth factor activator inhibitor-1B (HAI-1B), a new splice variant of HAI-1. *J. Biol. Chem.* **278**, 36341–36349



310. Kiyomiya, K., Lee, M.-S., Tseng, I.-C., Zuo, H., Barndt, R. J., Johnson, M. D., Dickson, R. B., and Lin, C.-Y. (2006) Matriptase activation and shedding with HAI-1 is induced by steroid sex hormones in human prostate cancer cells, but not in breast cancer cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **291**, C40-49
311. Oberst, M. D., Singh, B., Ozdemirli, M., Dickson, R. B., Johnson, M. D., and Lin, C.-Y. (2003) Characterization of matriptase expression in normal human tissues. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **51**, 1017–1025
312. List, K., Szabo, R., Molinolo, A., Nielsen, B. S., and Bugge, T. H. (2006) Delineation of matriptase protein expression by enzymatic gene trapping suggests diverging roles in barrier function, hair formation, and squamous cell carcinogenesis. *Am. J. Pathol.* **168**, 1513–1525
313. List, K., Bugge, T. H., and Szabo, R. (2006) Matriptase: Potent Proteolysis on the Cell Surface. *Mol. Med.* **12**, 1–7
314. Szabo, R., Hobson, J. P., Christoph, K., Kosa, P., List, K., and Bugge, T. H. (2009) Regulation of cell surface protease matriptase by HAI2 is essential for placental development, neural tube closure and embryonic survival in mice. *Dev. Camb. Engl.* **136**, 2653–2663
315. Fang, J.-D., Chou, H.-C., Tung, H.-H., Huang, P.-Y., and Lee, S.-L. (2011) Endogenous Expression of Matriptase in Neural Progenitor Cells Promotes Cell Migration and Neuron Differentiation. *J. Biol. Chem.* **286**, 5667–5679
316. Tung, H.-H., and Lee, S.-L. (2017) Physical Binding of Endothelial MCAM and Neural Transmembrane Protease Matriptase—Novel Cell Adhesion in Neural Stem cell Vascular Niche. *Sci. Rep.* **7**, 4946
317. Yin, Z., Raj, D., Saiepour, N., Van Dam, D., Brouwer, N., Holtman, I. R., Eggen, B. J. L., Möller, T., Tamm, J. A., Abdourahman, A., Hol, E. M., Kamphuis, W., Bayer, T. A., De Deyn, P. P., and Boddeke, E. (2017) Immune hyperreactivity of A $\beta$  plaque-associated microglia in Alzheimer’s disease. *Neurobiol. Aging.* **55**, 115–122
318. Wirz, K. T. S., Bossers, K., Stargardt, A., Kamphuis, W., Swaab, D. F., Hol, E. M., and Verhaagen, J. (2013) Cortical beta amyloid protein triggers an immune response, but no synaptic changes in the APP<sup>sw</sup>/PS1<sup>dE9</sup> Alzheimer’s disease mouse model. *Neurobiol. Aging.* **34**, 1328–1342
319. Béliveau, F., Désilets, A., and Leduc, R. (2009) Probing the substrate specificities of matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1 with internally quenched fluorescent

- peptides. *FEBS J.* **276**, 2213–2226
320. Lee, S.-L., Dickson, R. B., and Lin, C.-Y. (2000) Activation of Hepatocyte Growth Factor and Urokinase/Plasminogen Activator by Matriptase, an Epithelial Membrane Serine Protease. *J. Biol. Chem.* **275**, 36720–36725
321. Netzel-Arnett, S., Currie, B. M., Szabo, R., Lin, C.-Y., Chen, L.-M., Chai, K. X., Antalis, T. M., Bugge, T. H., and List, K. (2006) Evidence for a matriptase-prostasin proteolytic cascade regulating terminal epidermal differentiation. *J. Biol. Chem.* **281**, 32941–32945
322. Takeuchi, T., Harris, J. L., Huang, W., Yan, K. W., Coughlin, S. R., and Craik, C. S. (2000) Cellular localization of membrane-type serine protease 1 and identification of protease-activated receptor-2 and single-chain urokinase-type plasminogen activator as substrates. *J. Biol. Chem.* **275**, 26333–26342
323. Wu, C.-J., Feng, X., Lu, M., Morimura, S., and Udey, M. C. (2017) Matriptase-mediated cleavage of EpCAM destabilizes claudins and dysregulates intestinal epithelial homeostasis. *J. Clin. Invest.* **127**, 623–634
324. Scharschmidt, T. C., List, K., Grice, E. A., Szabo, R., Renaud, G., Lee, C.-C. R., Wolfsberg, T. G., Bugge, T. H., and Segre, J. A. (2009) Matriptase-Deficient Mice Exhibit Ichthyotic Skin with a Selective Shift in Skin Microbiota. *J. Invest. Dermatol.* **129**, 2435–2442
325. List, K., Haudenschild, C. C., Szabo, R., Chen, W., Wahl, S. M., Swaim, W., Engelholm, L. H., Behrendt, N., and Bugge, T. H. (2002) Matriptase/MT-SP1 is required for postnatal survival, epidermal barrier function, hair follicle development, and thymic homeostasis. *Oncogene.* **21**, 3765–3779
326. List, K. (2009) Matriptase: a culprit in cancer? *Future Oncol. Lond. Engl.* **5**, 97–104
327. Uhland, K. (2006) Matriptase and its putative role in cancer. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.* **63**, 2968–2978
328. Milner, J. M., Patel, A., Davidson, R. K., Swingler, T. E., Desilets, A., Young, D. A., Kelso, E. B., Donell, S. T., Cawston, T. E., Clark, I. M., Ferrell, W. R., Plevin, R., Lockhart, J. C., Leduc, R., and Rowan, A. D. (2010) Matriptase is a novel initiator of cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **62**, 1955–1966
329. Beaulieu, A., Gravel, É., Cloutier, A., Marois, I., Colombo, É., Désilets, A., Verreault, C., Leduc, R., Marsault, É., and Richter, M. V. (2013) Matriptase proteolytically activates influenza virus and promotes multicycle replication in the human airway epithelium. *J. Virol.* **87**, 4237–4251

330. Lanchec, E., Désilets, A., Béliveau, F., Flamier, A., Mahmoud, S., Bernier, G., Gris, D., Leduc, R., and Lavoie, C. (2017) The type II transmembrane serine protease matriptase cleaves the amyloid precursor protein and reduces its processing to  $\beta$ -amyloid peptide. *J. Biol. Chem.* **292**, 20669–20682
331. Aimes, R. T., Zijlstra, A., Hooper, J. D., Ogbourne, S. M., Sit, M.-L., Fuchs, S., Gotley, D. C., Quigley, J. P., and Antalis, T. M. (2003) Endothelial cell serine proteases expressed during vascular morphogenesis and angiogenesis. *Thromb. Haemost.* **89**, 561–572
332. Seitz, I., Hess, S., Schulz, H., Eckl, R., Busch, G., Montens, H. P., Brandl, R., Seidl, S., Schömig, A., and Ott, I. (2007) Membrane-type serine protease-1/matriptase induces interleukin-6 and -8 in endothelial cells by activation of protease-activated receptor-2: potential implications in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 769–775
333. Götz, M., and Huttner, W. B. (2005) The cell biology of neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 777–788
334. Gogtay, N., Giedd, J. N., Lusk, L., Hayashi, K. M., Greenstein, D., Vaituzis, A. C., Nugent, T. F., Herman, D. H., Clasen, L. S., Toga, A. W., Rapoport, J. L., and Thompson, P. M. (2004) Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 8174–8179
335. Clarris, H. J., Key, B., Beyreuther, K., Masters, C. L., and Small, D. H. (1995) Expression of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease in the developing rat olfactory system. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **88**, 87–95
336. Hwang, T., Park, C.-K., Leung, A. K. L., Gao, Y., Hyde, T. M., Kleinman, J. E., Rajpurohit, A., Tao, R., Shin, J. H., and Weinberger, D. R. (2016) Dynamic regulation of RNA editing in human brain development and disease. *Nat. Neurosci.* **19**, 1093–1099
337. Harris, J. L., Backes, B. J., Leonetti, F., Mahrus, S., Ellman, J. A., and Craik, C. S. (2000) Rapid and general profiling of protease specificity by using combinatorial fluorogenic substrate libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 7754–7759
338. Shi, Y. E., Torri, J., Yieh, L., Wellstein, A., Lippman, M. E., and Dickson, R. B. (1993) Identification and characterization of a novel matrix-degrading protease from hormone-dependent human breast cancer cells. *Cancer Res.* **53**, 1409–1415
339. Rossjohn, J., Cappai, R., Feil, S. C., Henry, A., McKinstry, W. J., Galatis, D., Hesse, L., Multhaup, G., Beyreuther, K., Masters, C. L., and Parker, M. W. (1999) Crystal structure of the N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 327–331

340. The Human Protein Atlas [online] <https://www.proteinatlas.org/> (Accessed December 13, 2019)
341. Ensembl genome browser 99 [online] <https://useast.ensembl.org/index.html> (Accessed January 30, 2020)
342. Noda, Y., Kuzuya, A., Tanigawa, K., Araki, M., Kawai, R., Ma, B., Sasakura, Y., Maesako, M., Tashiro, Y., Miyamoto, M., Uemura, K., Okuno, Y., and Kinoshita, A. (2018) Fibronectin type III domain-containing protein 5 interacts with APP and decreases amyloid  $\beta$  production in Alzheimer's disease. *Mol. Brain*. 10.1186/s13041-018-0401-8
343. Huang, T. Y., Zhao, Y., Li, X., Wang, X., Tseng, I.-C., Thompson, R., Tu, S., Willnow, T. E., Zhang, Y., and Xu, H. (2016) SNX27 and SORLA Interact to Reduce Amyloidogenic Subcellular Distribution and Processing of Amyloid Precursor Protein. *J. Neurosci.* **36**, 7996–8011
344. Information, N. C. for B., Pike, U. S. N. L. of M. 8600 R., MD, B., and Usa, 20894 National Center for Biotechnology Information. [online] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Accessed February 4, 2020)
345. Sun, M., and Zhang, J. (2019) Chromosome-wide co-fluctuation of stochastic gene expression in mammalian cells. *PLoS Genet.* **15**, e1008389
346. Benaud, C., Oberst, M., Hobson, J. P., Spiegel, S., Dickson, R. B., and Lin, C.-Y. (2002) Sphingosine 1-phosphate, present in serum-derived lipoproteins, activates matriptase. *J. Biol. Chem.* **277**, 10539–10546
347. Van Doorn, R., Van Horssen, J., Verzijl, D., Witte, M., Ronken, E., Van Het Hof, B., Lakeman, K., Dijkstra, C. D., Van Der Valk, P., Reijerkerk, A., Alewijnse, A. E., Peters, S. L. M., and De Vries, H. E. (2010) Sphingosine 1-phosphate receptor 1 and 3 are upregulated in multiple sclerosis lesions. *Glia.* **58**, 1465–1476
348. Weichand, B., Popp, R., Dziumbila, S., Mora, J., Strack, E., Elwakeel, E., Frank, A.-C., Scholich, K., Pierre, S., Syed, S. N., Olesch, C., Ringleb, J., Ören, B., Döring, C., Savai, R., Jung, M., von Knethen, A., Levkau, B., Fleming, I., Weigert, A., and Brüne, B. (2017) S1PR1 on tumor-associated macrophages promotes lymphangiogenesis and metastasis via NLRP3/IL-1 $\beta$ . *J. Exp. Med.* **214**, 2695–2713
349. Colombo, E., Désilets, A., Duchêne, D., Chagnon, F., Najmanovich, R., Leduc, R., and Marsault, E. (2012) Design and synthesis of potent, selective inhibitors of matriptase. *ACS Med. Chem. Lett.* **3**, 530–534
350. Duchêne, D., Colombo, E., Désilets, A., Boudreault, P.-L., Leduc, R., Marsault, E., and

- Najmanovich, R. (2014) Analysis of subpocket selectivity and identification of potent selective inhibitors for matriptase and matriptase-2. *J. Med. Chem.* **57**, 10198–10204
351. Wang, M., Jing, T., Wang, X., and Yao, D. (2018) Beta-secretase/BACE1 promotes APP endocytosis and processing in the endosomes and on cell membrane. *Neurosci. Lett.* **685**, 63–67
352. Evrard, C., Kienlen-Campard, P., Coevoet, M., Opsomer, R., Tasiaux, B., Melnyk, P., Octave, J.-N., Buée, L., Sergeant, N., and Vingtdeux, V. (2018) Contribution of the Endosomal-Lysosomal and Proteasomal Systems in Amyloid- $\beta$  Precursor Protein Derived Fragments Processing. *Front. Cell. Neurosci.* **12**, 435
353. SWATH-MS: Data Acquisition and Analysis (2016) *Proteomic Profiling Anal. Chem.* 10.1016/B978-0-444-63688-1.00009-4
354. Hesse, R., von Einem, B., Wagner, F., Bott, P., Schwanzar, D., Jackson, R. J., Föhr, K. J., Lausser, L., Kroker, K. S., Proepper, C., Walther, P., Kestler, H. A., Spires-Jones, T. L., Boeckers, T., Rosenbrock, H., and von Arnim, C. A. F. (2018) sAPP $\beta$  and sAPP $\alpha$  increase structural complexity and E/I input ratio in primary hippocampal neurons and alter Ca<sup>2+</sup> homeostasis and CREB1-signaling. *Exp. Neurol.* **304**, 1–13
355. Tackenberg, C., and Nitsch, R. M. (2019) The secreted APP ectodomain sAPP $\alpha$ , but not sAPP $\beta$ , protects neurons against A $\beta$  oligomer-induced dendritic spine loss and increased tau phosphorylation. *Mol. Brain.* **12**, 27