



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS MATEMÁTICAS E DA NATUREZA
INSTITUTO DE QUÍMICA

CLARISSA FEROLLA MENDONÇA

ASSINATURAS PROTEÔMICAS DE REGIÕES CEREBRAIS AFETADAS PELA
PATOLOGIA DE TAU EM ESTÁGIOS PRECOCES E TARDIOS DA DOENÇA DE
ALZHEIMER

Rio de Janeiro

2019

CLARISSA FEROLLA MENDONÇA

**ASSINATURAS PROTEÔMICAS DE REGIÕES CEREBRAIS AFETADAS PELA
PATOLOGIA DE TAU EM ESTÁGIOS PRECOCES E TARDIOS DA DOENÇA DE
ALZHEIMER**

Tese de doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Bioquímica (PPGBq)
da Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como requisito parcial à obtenção do título de
doutor em Ciências (Bioquímica).

Orientador: Gilberto Barbosa Domont

Co-orientador: Fábio César Sousa Nogueira

Rio de Janeiro

2019

CIP - Catalogação na Publicação

F539a Ferolla Mendonça, Clarissa
 Assinaturas proteômicas de regiões cerebrais
 afetadas pela patologia de tau em estágios precoces
 e tardios da doença de Alzheimer / Clarissa Ferolla
 Mendonça. -- Rio de Janeiro, 2019.
 105 f.

Orientador: Gilberto Barbosa Domont.
Coorientador: Fábio César Sousa Nogueira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio
de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Programa
de Pós-Graduação em Química Biológica, 2019.

1. doença de Alzheimer. 2. proteômica. 3.
vulnerabilidade de regiões cerebrais. 4. estágios
Braak/Braak. I. Barbosa Domont, Gilberto, orient.
II. César Sousa Nogueira, Fábio, coorient. III.
Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

CLARISSA FEROLLA MENDONÇA

**ASSINATURAS PROTEÔMICAS DE REGIÕES CEREBRAIS AFETADAS PELA
PATOLOGIA DE TAU EM ESTÁGIOS PRECOCES E TARDIOS DA DOENÇA DE
ALZHEIMER**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica (PPGBq) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Ciências (Bioquímica).

Rio de Janeiro, 01 de fevereiro de 2019.

Prof. Dr. Gilberto Barbosa Domont – IQ-UFRJ
Presidente

Prof. Dra. Elis Cristina Araújo Eleuthério – IQ-UFRJ
Membro interno

Prof. Dr. Richard Hemmi Valente – FIOCRUZ-RJ
Membro externo

Prof. Dr. Fernando Lucas Palhano Soares – IBqM-UFRJ
Membro externo

Dedico este trabalho a todos aqueles que sofrem da doença de Alzheimer e a Nosso Senhor Jesus Cristo, minha fortaleza e inspiração.

AGRADECIMENTOS

À Deus, Pai, sem o qual nada se faz.

Ao meu marido Edmilson. Sem o seu amor e dedicação, este trabalho não seria possível.

Às amigas de Doce Lar, minha motivação.

A todos os amigos e familiares que contribuíram conosco.

A todos os colegas de trabalho que auxiliaram no desenvolvimento desta tese.

Aos meus orientadores, por todo o auxílio.

“Combatí o bom combate, acabei a carreira,
guardei a fé”.

2 Timóteo 4:7

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é a desordem neurodegenerativa mais comum. Depósitos de peptídeo β amiloide ($A\beta$) e proteína tau estão entre os principais marcos patológicos da DA. O acúmulo de $A\beta$ e tau segue padrões espaciais previsíveis durante a progressão da DA. Contudo, permanece obscuro porque certas regiões cerebrais são mais vulneráveis do que outras; para investigar isto e quais vias são desreguladas durante a progressão da DA, um estudo de proteômica baseado em espectrometria de massas foi realizado. Um total de 103 amostras de tecidos de regiões afetadas precoce (côrtices entorrinal e parahipocampal – lobo temporal medial (MTL)) e tardivamente (côrtices temporal e frontal - neocôrortex) pela patologia de tau foram submetidas à análise de proteômica quantitativa *label-free*. Considerando proteínas desreguladas durante a progressão da DA, a maioria (681 de um total de 814 proteínas) foi região-específica, enquanto que algumas proteínas foram compartilhadas entre regiões (117 proteínas alteradas em duas áreas e 16 proteínas alteradas em três áreas). Analogamente, muitas vias desreguladas durante a progressão da doença foram exclusivas para certas regiões, sendo poucas vias alteradas em duas ou mais regiões. Mudanças na expressão proteica sugeriram a ocorrência de perda de sinapses em todas as regiões analisadas, enquanto que a desregulação da tradução foi preponderante nos côrtices entorrinal, parahipocampal e frontal. Prejuízo na fosforilação oxidativa foi proeminente no MTL. Uma análise de proteômica diferencial de áreas cerebrais de indivíduos saudáveis (controles) mostrou metabolismo mais alto e aumento na expressão de proteínas relacionadas à DA (e.g. APOE) no MTL comparado ao neocôrortex. De nosso conhecimento, este trabalho fornece a primeira comparação de alterações proteômicas em regiões cerebrais afetadas pela patologia de tau em diferentes estágios da DA. Este trabalho identificou algumas proteínas e vias comumente reguladas durante o avanço da doença, embora tenhamos encontrado os processos desregulados sendo predominantemente região-específicos. Além disso, foi encontrada uma assinatura proteômica distinta entre o MTL e o neocôrortex em indivíduos saudáveis que pode estar relacionada à vulnerabilidade à DA. Estes achados destacam a necessidade da investigação da cascata de eventos da DA em todo o cérebro e estudos abrangendo mais áreas cerebrais são necessários para melhor compreender a etiologia da DA e a vulnerabilidade de regiões à doença.

Palavras-chave: doença de Alzheimer, proteômica, vulnerabilidade de regiões cerebrais, lobo temporal medial, neocôrortex, estágios Braak/Braak.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disorder. Depositions of amyloid β peptide (A β) and protein tau are among the major pathological hallmarks of AD. A β and tau burden follows predictable spatial patterns during the progression of AD. Nevertheless, it remains obscure why certain brain regions are more vulnerable than others; to investigate this and dysregulated pathways during AD progression, a mass spectrometry-based proteomics study was performed. In total 103 tissue samples from regions early (entorhinal and parahippocampal cortices - medial temporal lobe (MTL)) and late affected (temporal and frontal cortices - neocortex) by tau pathology were subjected to label-free quantitative proteomics analysis. Considering dysregulated proteins during AD progression, the majority (681 of the 814 proteins) was region specific, while some proteins were shared between regions (117 proteins altered in two areas and 16 proteins altered in three areas). Analogously, many dysregulated pathways during disease progression were exclusive to certain regions, but a few pathways altered in two or more areas. Changes in protein expression suggesting that synapse loss occurred in all analyzed regions, while translation dysregulation was preponderant in entorhinal, parahippocampal and frontal cortices. Oxidative phosphorylation impairment was prominent in MTL. Differential proteomics of brain areas in health state (controls) showed higher metabolism and increased expression of AD-related proteins (e.g. APOE) in the MTL compared to the neocortex. To our knowledge, this work provides the first comparison of proteomic changes in brain regions affected by tau pathology at different stages of AD. This work identified some commonly regulated proteins and pathways during disease advancement, although we found the dysregulated processes being predominantly region specific. In addition, a distinct proteomic signature was found between MTL and neocortex in healthy subjects that might be related to AD vulnerability. These findings highlight the need of investigating AD's cascade of events throughout the whole brain and studies spanning more brain areas are required to better understand AD etiology and region vulnerability to disease.

Keywords: Alzheimer's disease, proteomics, brain region vulnerability, medial temporal lobe, neocortex, Braak/Braak staging.

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	Doença de Alzheimer.....	13
1.2	Proteômica baseada em espectrometria de massas.....	23
1.3	Proteômica de Alzheimer.....	25
2	JUSTIFICATIVA.....	30
3	OBJETIVOS.....	32
3.1	OBJETIVO GERAL.....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1	COORTE DE PACIENTES.....	35
4.2	REAGENTES.....	35
4.3	PREPARO DE AMOSTRAS.....	35
4.4	DOSAGEM DE PROTEÍNAS POR BRADFORD.....	35
4.5	DIGESTÃO DE PROTEÍNAS.....	36
4.6	DESSALINIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS POR CROMATOGRAFIA EM FASE REVERSA.....	36
4.7	DOSAGEM DE PEPTÍDEOS.....	37
4.8	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE	37

	MASSAS.....	
4.9	INFERÊNCIA DE PROTEÍNAS E QUANTIFICAÇÃO RELATIVA.....	38
4.10	TRATAMENTO DE DADOS, ANÁLISE ESTATÍSTICA E ANÁLISE POR BIOINFORMÁTICA.....	39
5	RESULTADOS (ARTIGO SUBMETIDO).....	40
6	CONCLUSÕES.....	97
	REFERÊNCIAS	
	BIBLIOGRÁFICAS.....	99

1 Introdução

1.1 Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é a doença neurodegenerativa mais frequente no mundo e consiste no tipo mais comum de demência, abrangendo entre 60-80% dos casos (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2018; BARKER et al., 2002). Atualmente, cerca de 50 milhões de pessoas no mundo são afetadas por demência e estima-se que no ano de 2050 esse número chegará a 152 milhões de indivíduos (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2018). A DA acomete majoritariamente indivíduos senis (>65 anos), sendo rara a incidência em pessoas mais jovens. Além disso, a incidência da DA aumenta com a idade e o envelhecimento é o maior fator de risco para a doença (GUERREIRO; BRAS, 2015). Estudos epidemiológicos estimam uma incidência de 1-3% e prevalência de 10-30% em idosos (>65 anos), sendo estes dados coerentes com uma média de 10 anos de duração da doença (EVANS et al., 2003; HEBERT et al., 1995; KAWAS et al., 2000). Foram identificados diversos fatores de risco passíveis de intervenção preventiva, dentre eles diabetes mellitus, fumo, depressão, inatividade física, inatividade mental, dieta pobre, hipertensão, obesidade e baixa escolaridade (BARNES; YAFF, 2011; DAVIGLUS et al., 2010). A DA tem maior prevalência em mulheres do que em homens, no entanto não se sabe se esse fenômeno é devido a um maior índice de mortalidade em homens proveniente de outras causas (HEBERT et al., 2013; PLASSMAN et al., 2007). Além disso, um fato interessante é que a DA esporádica (sem componentes genéticos determinados) tem incidência semelhante em todo o mundo (PRINCE et al., 2015).

A demência é uma síndrome caracterizada pela deterioração de diferentes funções cerebrais como cognição, comportamento, personalidade e funções sensório-motoras (ELAHI; MILLER, 2017). Segundo o critério atual, o diagnóstico de demência requer o comprometimento de pelo menos dois domínios neuropsiquiátricos ou cognitivos que não podem ser explicados por desordens não degenerativas ou primariamente psiquiátricas (MCKHANN et al., 2011). As demências não-vasculares de ordem degenerativa são proteíнопatias uma vez que regiões cerebrais específicas, a depender de cada subtipo de demência, apresentam acúmulo de agregados proteicos tóxicos em compartimentos intra e/ou extracelulares (ELAHI; MILLER, 2017). O espectro clínico de demências é classificado em subtipos de acordo com os sintomas (domínios afetados) e marcos patológicos (agregados proteicos) apresentados (Tabela 1). Estudos recentes

mostraram que muitos pacientes com demência apresentam marcos patológicos característicos de mais de um subtipo de demência, sendo esses casos denominados demência mista (JELLINGER, 2007; SCHNEIDER et al., 2007, 2009). A esse respeito, alguns estudos reportaram que cerca de metade dos indivíduos com DA também possui outro subtipo de demência, sendo a demência vascular cerebral a mais comum (SCHNEIDER et al., 2007, 2009).

O diagnóstico das demências não é simples, sendo necessários avaliação do histórico familiar do indivíduo, exames genéticos, aferimento de déficit cognitivo e exames de imagem, como ressonância magnética (ELAHI; MILLER, 2017). Os biomarcadores principais e mais utilizados para a DA são: redução dos níveis do peptídeo A β ₄₂ e aumento da concentração da proteína tau total (t-tau) e tau fosforilada (p-tau), todos no líquido cefalorraquidiano (CSF) (OLSSON et al., 2016; SCHELTENS et al., 2016). Estes biomarcadores apresentam alta acurácia, permitindo a predição de evolução para DA em pacientes ainda no estágio de comprometimento cognitivo leve (MCI, do inglês *Mild Cognitive Impairment*) (SHAW et al., 2009; VISSER et al., 2009). Além disso, os referidos biomarcadores principais tem alto valor preditivo negativo, uma vez que um paciente com MCI portador de perfil contrário à DA é praticamente excluído do diagnóstico de DA (SCHELTENS et al., 2016). O diagnóstico definitivo, porém, é possível apenas com a avaliação neuropatológica de tecido cerebral, o que na maior parte das vezes se dá durante autópsia (ELAHI; MILLER, 2017).

Infelizmente, até o presente momento não há nenhum medicamento disponível capaz de curar ou interromper a progressão da DA. Os tratamentos existentes são voltados para a administração dos sintomas da doença, buscando minorá-los ao máximo. Caracteristicamente, a neurodegeneração observada na DA causa um desbalanço em diferentes neurotransmissores, sendo afetados os sistemas colinérgico, monoaminérgico e glutamatérgico (NOETZLI; EAP, 2013). Desta forma, uma das vias de tratamento da DA consiste na administração de fármacos reguladores destes neurotransmissores, visando ao aumento da cognição. Dentro desta categoria, duas classes de medicamentos foram aprovadas para o tratamento da DA: inibidores da colinesterase e o antagonista do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), memantina (MASTERS et al., 2015).

Causa	Características
Doença de Alzheimer	<p>Causa mais comum de demência; representa cerca de 60% a 80% dos casos. Estudos de autópsia mostram que cerca de metade dos casos envolve somente patologia de Alzheimer ; muitos dos casos remanescentes tem evidência de mudanças patológicas adicionais relacionadas a outras demências Isto é denominado patologia mista, e quando reconhecida durante a vida é chamado de demência mista. Dificuldade de lembrar de conversas , nomes ou eventos é frequentemente um sintoma clínico inicial; apatia e depressão também são sintomas precoces frequentes . Sintomas tardios incluem comunicação prejudicada, desorientação, confusão, juízo empobrecido, mudanças comportamentais e, ultimamente , dificuldade de falar, engolir e andar. Orientações revisadas para diagnosticar o Alzheimer foram propostos e publicados em 2011. Eles recomendam que o Alzheimer seja considerado como uma doença cerebral de progressão lenta que começa bem antes de os sintomas clínicos emergirem . Os marcos patológicos do Alzheimer são acúmulo progressivo de fragmentos da proteína beta-amiloide fora do neurônios e fitas torcidas da proteína tau dentro dos neurônios. Essas mudanças são eventualmente acompanhadas por dano e morte neuronais.</p>
Demência vascular	<p>As mudanças cerebrais da demência vascular são encontradas em cerca de 40% dos indivíduos com demência . Aproximadamente 10% dos indivíduos com demência mostram evidência apenas de demência vascular. No entanto, esta é muito comum como uma patologia mista em indivíduos mais velhos com Alzheimer , cerca de 50% dos quais possuem evidência patológica infartos (derrames silenciosos).</p> <p>Juízo prejudicado ou prejuízo da habilidade de tomar decisões , planejar ou organizar são mais prováveis como sintomas iniciais, ao contrário da perda de memória frequentemente associada com os sintomas iniciais do Alzheimer. Além de mudanças na cognição, pessoas com demência vascular podem ter dificuldade com a função motora, especialmente marcha lenta e equilíbrio ruim.</p> <p>Demência vascular ocorre mais comumente a partir de bloqueio de vaso sanguíneo ou dano levando a infartos (derrames) ou sangramento no cérebro . A localização , número e tamanho da injúria cerebral determina se a demência irá ocorrer e como o pensamento do indivíduo e funcionamento físico será afetado. No passado , evidência de demência vascular era usada para excluir um diagnóstico de Alzheimer (e vice versa). Essa prática não é mais considerada consistente com a evidência patológica , que mostra que mudanças cerebrais do Alzheimer e da demência vascular comumente coexistem . Quando existe evidência clínica de duas ou mais causas de demência, o indivíduo é considerado portador de demência mista.</p>
Demência com corpos de Lewi (DLB)	<p>Pessoas com DLB têm alguns dos sintomas comuns no Alzheimer , mas são mais prováveis de ter sintomas iniciais de distúrbios no sono , halucinações visuais bem formadas , e lentidão , desequilíbrio na marcha ou outras características parkinsonianas . Essas características , assim como comprometimento visuoespacial precoce, podem ocorrer na ausência de comprometimento significativo de memória . Corpos de Lewi são agregados anormais da proteína alfa-sinucleína nos neurônios. Quando eles se desenvolvem no córtex, pode ocorrer demência. Alfa-sinucleína também se agrava no cérebro de pessoas com doença de Parkinson , na qual é acompanhada por perda neuronal severa na substantia nigra . Enquanto ambas as pessoas com DLB e Parkinson apresentam corpos de Lewi, o início da doença é marcado por comprometimento motor no Parkinson e comprometimento cognitivo na DLB. As mudanças cerebrais da DLB sozinhas podem causar demência, mas é muito comum que pessoas com DLB tenham patologia de Alzheimer coexistente . Em pessoas com ambas DLB e Alzheimer , os sintomas das duas doenças podem emergir e levar a alguma confusão no diagnóstico . Demência vascular também pode coexistir e contribuir para a demência.</p>

Causa	Características
Demência mista	Caracterizada pelas anormalidades marcantes de mais de uma causa de demência - mais comumente doença de Alzheimer combinada com demência vascular, seguido por Alzheimer com DLB, e Alzheimer com demência vascular e DLB. Demência vascular com DLB é muito menos comum . Estudos recentes sugerem que a demência mista é mais comum do que anteriormente reconhecido , com cerca de metade das pessoas idosas com demência apresentando evidência patológica de mais de uma causa de demência . Estudos recentes também mostram que a probabilidade de ter demência mista aumenta com a idade e é mais alta nos idosos mais velhos (pessoas com 85 anos ou mais).
Degeneração lobar fronto-temporal (FTLD)	Inclui demências como FTLD variante comportamental, afasia progressiva primária, doença de Pick , degeneração corticobasal e paralisia supranuclear progressiva . Sintomas precoces típicos incluem mudanças marcantes na personalidade e comportamento e/ou dificuldade de produzir ou compreender linguagem . Ao contrário do Alzheimer , a memória é tipicamente poupada nos estágios iniciais da doença. Células nervosas nas regiões frontal (lobo frontal e lateral (lobo lateral) do cérebro são especialmente afetadas e estas regiões se tornam marcadamente atrofiadas. Adicionalmente, as camadas superiores do córtex se tornam macias e esponjosas e possuem inclusões proteicas anormais (geralmente, a proteína tau ou TDP-43). Os sintomas da FTLD podem ocorrer em pessoas com 65 anos ou mais, de forma semelhante ao Alzheimer , mas a maioria das pessoas com FTLD desenvolvem a doença em idade mais jovem . Cerca de 60% das pessoas com FTLD tem idade entre 45 e 60 anos . A FTLD representa cerca de 10% dos casos de demência.
Doença de Parkinson (PD)	Problemas com movimento (lentidão , rigidez , tremor e mudanças na caminhada) são sintomas comuns do PD. No PD, agregados da proteína alfa-sinucleína aparecem na substantia nigra. Os agregados causam degeneração das células dopaminérgicas. A incidência do PC é cerca de um décimo do Alzheimer . À medida que o PD progride , frequentemente , resulta em demência secundária ao acúmulo de corpos de Lewy no córtex (semelhante à DLB) ou ao acúmulo de beta-amiloide ou tau (semelhante ao Alzheimer).
Doença de Creutzfeldt-Jakob	Esta doença muito rara e rapidamente fatal prejudica a memória e coordenação e causa mudanças comportamentais. Resulta de uma proteína malenovelada (prón) que faz com que outras proteínas em todo o cérebro apresentem malenovelamento. Pode ser hereditária, esporádica ou causada por infecção priônica. Uma forma específica chamada doença de Creutzfeldt-Jakob é causada pelo consumo de produtos de gado afetado pela doença da vaca louca.
Hidrocefalia com pressão normal	Sintomas incluem dificuldade de andar, perda de memória e inabilidade para controlar a urina. Representa menos de 5% dos casos de demência . Causado por prejuízo da reabsorção de fluido cerebroespinal e consequente acúmulo de fluido no cérebro , aumentando a pressão cerebral. Pessoas com histórico de hemorragia cerebral (particularmente hemorragia subaracnóidea) e meningite apresentam maior risco . Algumas vezes pode ser corrigido com instalação cirúrgica de um shunt no cérebro para drenar o excesso de fluido.

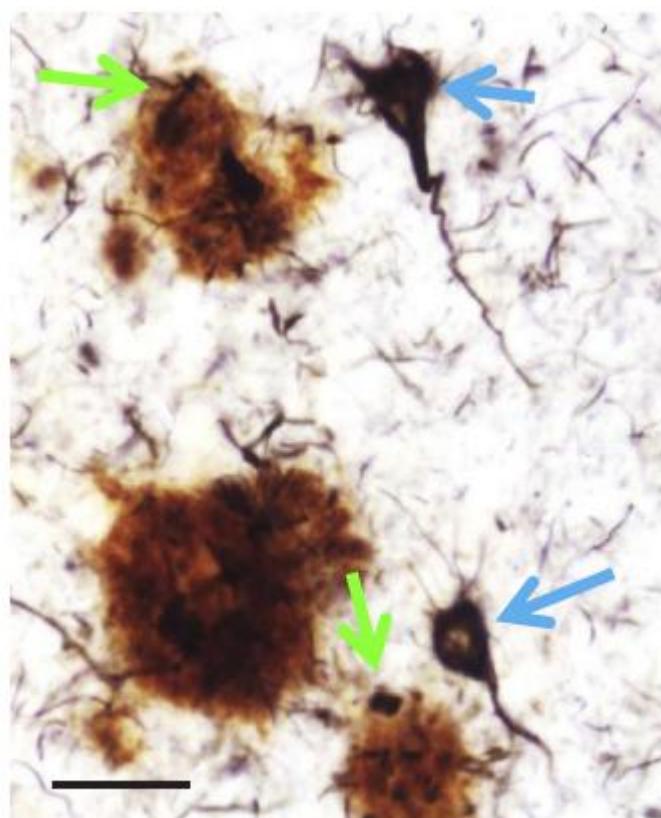
Tabela 1: Causas de demência e características associadas. Resumo do espectro clínico de demências, sintomas associados e marcos patológicos. Adaptado de: ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2018.

Os resultados do uso destes fármacos para melhora da cognição são limitados. A maior parte dos pacientes apresenta um atraso na piora cognitiva, permanecendo cerca de 6-9 meses sem déficits adicionais, após o início da medicação (DI SANTO et al., 2013; TAKEDA et al., 2006). O tratamento geralmente é descontinuado quando o paciente atinge um nível de comprometimento cognitivo em que estes fármacos não geram mais benefícios. Um aspecto frequente na DA é a manifestação de sintomas neuropsiquiátricos, como depressão, apatia, ilusões e alucinações, agitação/agressividade e distúrbios no sono (ECHÁVARRI et al., 2013). Estes sintomas comprometem muito a qualidade de vida do paciente e dos cuidadores, sendo necessário intervenção farmacológica em casos com sintomas intensos.

Em 1907 o médico alemão Dr. Alois Alzheimer publicou um relato de caso descrevendo os marcos patológicos da doença que terminou por levar o seu epônimo (ALZHEIMER, 1907). Alzheimer efetuou a análise histopatológica do espécime cerebral *post mortem* de uma paciente sua, acometida por demência aos 51 anos, utilizando um método de coloração recente à época (método de prata de Bielschowsky). Ele observou a presença de atrofia cerebral, bem como a deposição de emaranhados neurofibrilares intracelulares, descritos como “mudanças muito marcantes das neurofibrilas”, e placas senis extracelulares (então denominadas focos miliares), sendo que estas últimas já haviam sido previamente associadas a quadros de demência (BERRIOS, 1990). Mais tarde, descobriu-se que as placas senis são formadas majoritariamente pelo peptídeo β -amiloide ($A\beta$) e os emaranhados neurofibrilares são constituídos pela proteína tau hiperfosforilada (Figura 1). Atualmente, sabe-se que as principais características patológicas da DA são: perda de sinapses, morte neuronal, redução de neurotransmissores específicos e acúmulo de placas senis extracelulares e emaranhados neurofibrilares intracelulares (MASTERS et al., 2015).

Os peptídeos $A\beta$ são formados a partir da clivagem sequencial da proteína precursora amiloide (APP) pelas enzimas β secretase e γ secretase. Desde a descrição inicial do acúmulo de placas senis e emaranhados neurofibrilares no cérebro de portadores da DA feita pelo Dr. Alois Alzheimer, a primeira grande evidência da relevância de $A\beta$ como agente causal da DA ocorreu a partir da descoberta de que mutações nos genes APP, presenilina 1 (*PSEN1*) e presenilina 2

(*PSEN2*) (dois genes homólogos que formam subunidades do complexo γ secretase) estão presentes na forma familiar autossômica dominante da DA (GOATE et al., 1991; LEVY-LAHAD et al., 1995; SHERRINGTON et al., 1995). Além disso, portadores da síndrome de Down, que apresentam uma cópia extra do gene *APP* devido à trissomia do cromossomo 21, possuem níveis elevados de peptídeo A β e frequentemente apresentam alterações neuropatológicas similares à DA e demência precoce (WISNIEWSKI; WISNIEWSKI; WEN, 1985).



**Immunohistochemistry:
A β (brown) and Tau (black)**

Figura 2: Marcos histopatológicos da doença de Alzheimer. Fotomicrografia de uma seção do neocôrte x de um cérebro com doença de Alzheimer corado utilizando dupla marcação imunohistoquímica para A β (marrom) e Tau (preto). As placas senis são extracelulares e aproximadamente esféricas (setas verdes), enquanto os emaranhados neurofibrilares (setas azuis) se desenvolvem dentro dos neurônios. Note que alguns dos neuritos distróficos nas placas senis contêm patologia de tau aberrante (preto), a qual é bioquimicamente idêntica à observada nos emaranhados neurofibrilares. Estas placas senis têm sido descritas como “placas neuríticas”. Barra de escala = 50 μ m. Adaptado de: NELSON et al., 2012.

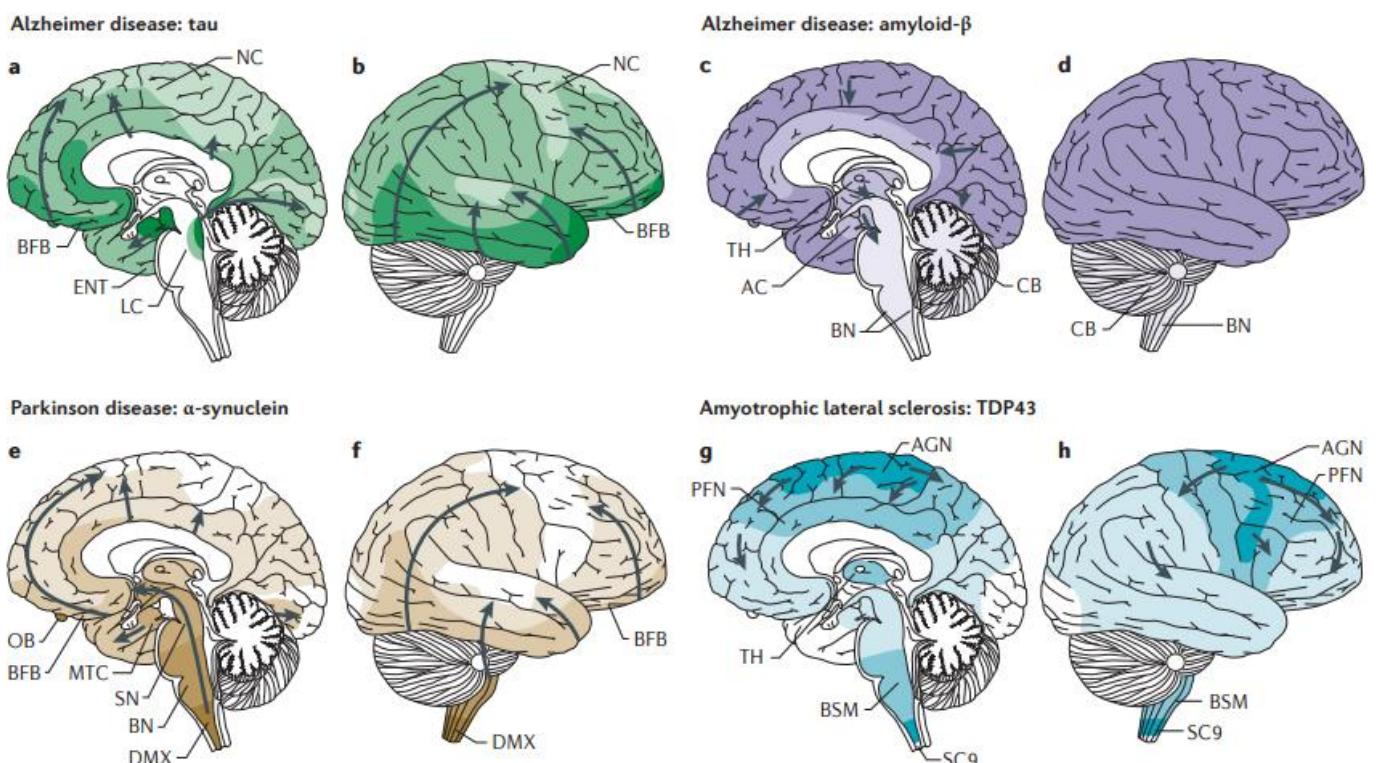
Tau é uma proteína ligante de microtúbulos e, em condições normais, localiza-se majoritariamente nos axônios. Nos axônios, suas funções já descritas são: estabilização e montagem de microtúbulos e regulação de transporte (FEINSTEIN; WILSON, 2005; WANG; MANDELKOW, 2015). Tau também possui localização nuclear, auxiliando na manutenção da integridade de DNA genômico e RNA nuclear, além de RNA citoplasmático (VIOLET et al., 2014). Estruturalmente, a proteína tau é muito solúvel e possui pouca tendência à agregação. Apesar disso, a presença de agregados de proteína tau caracteriza um amplo espectro de doenças neurodegenerativas, conhecidas como taupatias, a saber: degeneração lobar frontotemporal, doença de Pick, doença com grãos argirofílicos, taupatia sistêmica múltipla esporádica, degeneração corticobasal, paralisia supranuclear progressiva, doença de Creutzfeldt-Jakob e DA (MASTERS et al., 2015). A descoberta de que mutações no gene que codifica a proteína tau, MAPT, ocasionam um tipo de demência (doença de Pick) com herança autossômica dominante, confirmou que tau é um fator causal para doenças neurodegenerativas (HUTTON et al., 1998).

O fundo genético da DA é complexo: a maior parte dos casos (>95%) apresenta-se na forma esporádica com início tardio (>65 anos), enquanto uma minoria (<5%) possui início precoce (<65 anos), dentre os quais menos de 1% possuem herança autossômica dominante com penetrância total, caracterizada por mutação em um dentre três genes: APP, PSEN1 e PSEN2 (ŠIMIĆ et al., 2016). Sabe-se que o polimorfismo E4 no gene apolipoproteína E (apoE) confere o maior risco para desenvolvimento da DA com início tardio e penetrância parcial: indivíduos com um alelo E4 possuem risco duas vezes maior de desenvolver Alzheimer, enquanto portadores de dois alelos E4 apresentam 12 vezes mais chance (FARRER et al., 1997).

Um fato intrigante é que, apesar da diversidade de sintomas e regiões cerebrais afetadas entre as diversas doenças neurodegenerativas, existe um fator comum a todas: a deposição de agregados proteicos insolúveis intra ou extracelulares (BRETTSCHEIDER et al., 2015). Assim, além dos já mencionados marcos patológicos da DA (placas senis extracelulares e emaranhados neurofibrilares intraneuronais), são bem descritos o acúmulo da proteína α-sinucleína na doença de Parkinson e na demência com corpos de Lewy, a deposição de tau nas taupatias e a presença de agregados da proteína TAR DNA-binding

protein 43 (TDB43) na esclerose lateral amiotrófica e em um subgrupo de casos com degeneração lobar frontotemporal (MASTERS et al., 2015; NEUMANN et al., 2006; SPILLANTINI et al., 1998). Além disso, a deposição destes agregados proteicos segue uma sequência topográfica peculiar a cada doença (Figura 2). Com relação à DA, à medida que a doença progride o acúmulo de placas senis e de emaranhados neurofibrilares em diferentes regiões cerebrais apresenta um padrão previsível descrito por dois sistemas de estagiamento (BRAAK; BRAAK, 1991; THAL et al., 2002) (Figura 2A, B, C, D). O depósito de agregados da proteína tau na forma de emaranhados neurofibrilares e filamentos do neurópilo foi classificada em seis estágios distintos (estágios de Braak/Braak) (BRAAK; BRAAK, 1991). Nos estágios iniciais, I-II, os agregados de tau estão restritos basicamente ao córtex transentorrinal. A fase límbica (estágios III-IV) é caracterizada pela expansão destes agregados ao sistema límbico, de forma que o córtex transentorrinal e entorrinal encontram-se severamente afetados, aliado a um modesto envolvimento do hipocampo (CA1). Por fim, nos estágios finais (V-VI) observa-se a destruição do neocôrtex pelas inclusões proteicas. Recentemente, uma atualização do estagiamento B/B foi proposta devido à descrição da existência de pré-emaranhados de tau (tau solúvel não-agregado, na forma hiperfosforilada) em regiões subcorticais (locus coeruleus) na ausência de agregados corticais (BRAAK et al., 2011; BRAAK;

DEL TREDICI, 2011). Estas alterações foram observadas em indivíduos jovens (crianças e adolescentes). Foi postulado então que possivelmente a deposição de



tau tenha início em núcleos subcorticais e pode ter início em idades precoces, contanto que os pré-emaranhados de tau não sejam transitentes ou regridam.

Figura 2: Disseminação topográfica sequencial de proteínas não-priônicas em doenças neurodegenerativas. Em todos os painéis, a patologia é primeiro detectada em áreas delineadas por cores mais escuras e subsequentemente em regiões mostradas com cores mais claras. A, B: na doença de Alzheimer, os agregados de tau se desenvolvem no locus coeruleus (LC), depois nas regiões transentorrinal e entorrinal e subsequentemente na formação hipocampal e em vastas áreas do neocôrte (NC). C, D: em oposição à patologia de tau, os depósitos de A β na doença de Alzheimer são primeiro observados no neocôrte e são então detectados em estruturas alocorticais, diencefálicas e gânglios basais (em uma direção caudal) e no tronco cerebral, e ocasionalmente no cerebelo (CB). E, F: a progressão de corpos de Lewy compostos por α -sinucleína imunorreativa na doença de Parkinson segue um padrão ascendente do tronco cerebral para o telencéfalo. As lesões iniciais podem ser detectadas no bulbo olfativo (OB), assim como no núcleo motor dorsal do nervo vago (DMX) na medula oblongata. Em estágios posteriores, os agregados de α -sinucleína são encontrados mais rostralmente ao longo do tronco cerebral via ponte e mesencéfalo e, finalmente, no NC. G, H: em casos de esclerose lateral amiotrófica com uma baixa carga de patologia de TDP43, inclusões proteicas de TDP43 são observadas no córtex motor agranular (AGN), nos núcleos motores do tronco cerebral dos nervos cranianos XII-X, VII e V, e nos neurônios motores α da medula

espinhal. Estágios posteriores são caracterizados pela presença da patologia de TDP43 no neocôrortex pré-frontal (PFN), formação reticular do tronco cerebral, núcleos pré-cerebelares, *griseum pontis* e núcleo rubro. Subsequentemente, os neocôrtices pré-frontal e pós-central, assim como os neurônios estriatais, são afetados por TDP43 patológico, antes de a patologia ser encontrada nas porções anteromediais do lobo temporal, incluindo o hipocampo. AC, alocôrortex; BFB, parte basilar do telencéfalo; BN, núcleos do tronco encefálico; BSM, núcleo somatomotor do tronco cerebral; ENT, córortex entorrinal; MTC, córortex mesiotemporal; SC9, lámina IX de matéria cinzenta da medula espinhal; SN, substância nigra; TH, tálamo. Adaptado de: BRETTSCHEIDER et al., 2015.

Em contrapartida, o padrão de deposição de A β (placas senis) divide-se em 5 fases e é diverso de tau (THAL et al., 2002). No estágio I, as placas senis encontram-se restritas ao neocôrortex. O estágio II caracteriza-se pela expansão destas ao alocôrortex. No estágio III são encontrados depósitos de A β nos núcleos diencefálicos, striatum e no núcleo colinérgico da parte basilar do telencéfalo. No estágio IV são afetados os núcleos do tronco encefálico e, por fim, no estágio V observa-se o envolvimento do cerebelo.

A degeneração estrutural e funcional do sistema nervoso não é uniforme nas doenças neurodegenerativas, de forma que determinados grupos de neurônios são mais vulneráveis à degeneração. Este fato, comumente conhecido como vulnerabilidade neuronal seletiva, tem sido investigado, porém suas causas subjacentes não são completamente compreendidas (NIJSSEN; COMLEY; HEDLUND, 2017; SURMEIER; OBESO; HALLIDAY, 2017; WANG; MICHAELIS; MICHAELIS, 2010). De forma interessante, esse fenômeno também ocorre durante o processo de envelhecimento, porém o padrão de alterações observado no envelhecimento saudável (atrofia/hipertrofia de certas regiões cerebrais) difere da DA. Estudos de ressonância magnética funcional revelaram que as regiões cerebrais mais vulneráveis à perda de volume durante o envelhecimento são o córortex associativo, o neoestriado e o cerebelo, ao passo que o córortex sensorial primário, o córortex entorrinal, o paleostriatum e a ponte apresentam menor encolhimento (RAZ; RODRIGUE, 2006; RAZ; RODRIGUE; HAACKE, 2007). Análises da taxa metabólica cerebral de glicose por tomografia por emissão de pósitrons (PET) corroboram que a alteração funcional do cérebro durante o envelhecimento não é uniforme. A esse respeito, observou-se que o córortex frontal apresenta maior redução na taxa metabólica de glicose do que as demais regiões corticais e subcorticais (LOESSNER et al., 1995; REIMAN et al., 2010). Um fato adicional que se tem observado é que,

ao contrário do que ocorre nas doenças neurodegenerativas, no envelhecimento normal a perda de neurônios é modesta, de forma que modificações estruturais (perda de dendritos, redução do volume de espinhas dendríticas, alterações no perfil molecular de sinapses), resultando na diminuição do número de sinapses, parecem ser responsáveis pelas alterações globais características do envelhecimento (BURKE; BARNES, 2006; MATTSON; MAGNUS, 2006; RAPP; GALLAGHER, 1996; WEST et al., 1994).

Na DA, os neurônios mais vulneráveis à degeneração são os que estão presentes na camada II do córtex entorrinal e no hipocampo (subículo e região CA1). Estes neurônios morrem e apresentam acúmulo de agregados da proteína tau já nas fases iniciais da doença (KORDOWER et al., 2001; PRICE et al., 2001). É importante destacar que existe uma correlação entre o declínio cognitivo e a deposição dos agregados proteicos formados por A β e tau (NELSON et al., 2012). Desta forma, as regiões cerebrais que caracteristicamente acumulam agregados de A β e tau são mais vulneráveis à degeneração. Observou-se que as placas neuríticas (placas senis contendo neuritos ricos em agregados de proteína tau) tem maior correlação com o déficit cognitivo do que as placas senis difusas (placas senis sem neuritos reativos para tau) (MCKEE; KOSIK; KOWALL, 1991). Adicionalmente, o acúmulo de emaranhados neurofibrilares no neocôrortex correlaciona-se melhor com a piora na cognição do que as placas senis (NELSON et al., 2007). Recentemente, um estudo utilizando tomografia por emissão de pósitrons mostrou que a deposição de tau no lobo temporal tem maior capacidade de predição do nível cognitivo do que os depósitos de A β em qualquer região cerebral (BRIER et al., 2016). Estes trabalhos indicam que as regiões cerebrais que são precocemente afetadas por tau (estágios B/B iniciais) são mais suscetíveis à neurodegeneração, e revelam a relevância de tau na patogênese da DA. Uma vez que diversas evidências mostram uma relação sinérgica entre A β e tau, ainda não se comprehende o fato de o padrão de acúmulo de placas amiloïdes e emaranhados neurofibrilares ser distinto.

1.2 Proteômica baseada em espectrometria de massas

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes nas células, compondo cerca de 50% do seu peso seco, onde desempenham funções catalíticas e estruturais (MILLO, 2013). Na bactéria *Escherichia coli* estima-se que uma célula com

1 μm^3 de volume possui cerca de 3-4 milhões de proteínas, ao passo que uma célula de mamífero, com volume entre 2.000-4.000 μm^3 , apresenta a impressionante quantidade de 10^{10} proteínas por célula (MILLO, 2013). O conjunto total de proteínas expressas pela célula em um dado momento é denominado de “proteoma”. Este termo foi criado em 1995 para referir-se ao “complemento total de proteínas de um genoma” (WASINGER et al., 1995). Ao contrário do genoma, que possui por natureza uma característica mais estável visando à integridade do material genético, o proteoma é altamente dinâmico porque a relação de proteínas expressas a partir do genoma é modulada em função de estímulos ambientais e endógenos (e.g. fases do desenvolvimento). Uma vez que o proteoma altera-se quantitativa e qualitativamente (modificações pós-traducionais) de forma constante, a sua análise se faz comprehensivelmente complexa. No trabalho seminal de Wasinger e colaboradores (WASINGER et al., 1995), em que 270 proteínas foram visualizadas em gel de eletroforese bidimensional, aventou-se “ser improvável que a totalidade desse potencial para a expressão de proteínas será apreendida em qualquer dado instante”. Apesar de sua premissa permanecer válida ainda hoje, implementos analíticos consideráveis foram obtidos (instrumentação, metodologias, análise bioinformática) que atualmente permitem maior cobertura do proteoma, tendo-se atingido o impressionante marco de mais 14.200 proteoformas identificadas em células HeLa recentemente (BEKKER-JENSEN et al., 2017).

A proteômica compreende o estudo do proteoma. Dentre suas aplicações estão (1) a identificação de peptídeos, proteínas e modificações pós-traducionais; (2) a medida da quantidade de proteínas; (3) a caracterização da estrutura de proteínas; (4) identificação da interação de proteínas com proteínas ou ácidos nucleicos (SIDOLI; KULEJ; GARCIA, 2016). Atualmente, a espectrometria de massas é o método analítico mais empregado no estudo de proteomas em larga-escala. No tocante ao preparo de amostras para análise proteômica por espectrometria de massas, duas abordagens principais são empregadas: *bottom-up* e *top-down*. A proteômica *bottom-up* é mais empregada e consiste na digestão de proteínas em peptídeos por métodos enzimáticos (adição de proteases) (AEBERSOLD; MANN, 2016). Os peptídeos obtidos são então analisados no espectrômetro de massas e sua identificação é efetuada utilizando-se ferramentas de bioinformática, como MASCOT (PERKINS et al., 1999) e SEQUEST (ENG; MCCORMACK; YATES,

1994), que compararam os espectros de massa obtidos com espectros teóricos gerados a partir de um banco genômico. Já na abordagem de proteômica *top-down*, as proteínas são analisadas por espectrometria de massas na sua forma intacta, sendo essa aplicação particularmente útil na identificação mais precisa de proteoformas (TRAN et al., 2011).

Previamente à análise no espectrômetro de massas é necessária a aplicação de métodos de separação de peptídeos/proteínas, a fim de reduzir a complexidade do proteoma. A eletroforese em gel de poliacrilamida (2D PAGE) foi amplamente utilizada para esse fim (GYGI et al., 2000; MONTEOLIVA; ALBAR, 2004), mas por ser um método trabalhoso e demorado, tem sido substituído cada vez mais pela cromatografia líquida a qual permite a separação de proteínas em larga escala, podendo estar acoplada (*online*) ao espectrômetro de massas (ZHANG et al., 2014). A análise de peptídeos ou proteínas por espectrometria de massas requer uma etapa de ionização, ou seja, a transferência destas moléculas polares e não voláteis para a fase gasosa, evitando-se a degradação da amostra. A este respeito, dois métodos de ionização são amplamente utilizados na análise proteômica por espectrometria de massas, a ionização por eletrospray (ESI, do inglês *electrospray ionization*) e ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI, do inglês *matrix-assisted laser desorption ionization*) (FENN et al., 2016; KARAS; HILLENKAMP, 1988). Os métodos para análise proteômica em larga-escala estão em constante desenvolvimento. Ainda assim, existem algumas limitações atuais da espectrometria de massas aplicada à proteômica, tais como: a baixa detecção de proteínas pouco abundantes e a reprodução limitada de resultados entre diferentes grupos devido à diversidade de métodos aplicados no preparo de amostras e análise de dados (MOYA-ALVARADO et al., 2016).

1.3 Protômica de Alzheimer

No estudo da DA, a proteômica tem sido utilizada na busca de biomarcadores para diagnóstico clínico, assim como na investigação da etiologia da doença. A identificação de biomarcadores periféricos (sangue e CSF) para a DA é importante na prática clínica, pois permite a melhoria do diagnóstico e a predição da progressão da doença, e na pesquisa, possibilitando a seleção de candidatos a testes clínicos (MOYA-ALVARADO et al., 2016). Diversos estudos têm investigado a existência de

proteínas biomarcadoras no CSF. Apesar de vários candidatos a biomarcadores terem sido propostos, uma revisão recente revelou que apenas 4 proteínas, apolipoproteína A-1 (apoA1), apolipoproteína E (apoE), prostaglandina H2 D isomerase (PTGDS) e transtiretina (TTR), dentre mais de 100 potenciais biomarcadores, foram replicadas em pelo menos 2 estudos (BRINKMALM et al., 2015). Recentemente, a equipe de um consórcio internacional (*Biomarkers Consortium CSF Proteomics Project*) empregou uma abordagem de proteômica alvo-direcionada baseada em espectrometria de massas para avaliação de biomarcadores no CSF (SPELLMAN et al., 2015). Um total de 567 peptídeos compreendendo 222 proteínas foi avaliado. Diversos peptídeos apresentaram valor diagnóstico ou preditivo, dos quais destacaram-se: peptídeos da hemoglobina A (HBA), hemoglobina B (HBB) e superóxido dismutase (SODE) para diferenciar progressão de MCI para DA e peptídeos da pentraxina neuronal-2 (NPTX2), proteína neurosecretora VGF (VGF) e secretogranina-2 (SCG) para predizer a progressão de MCI para DA. Uma vez que a punção lombar é um método invasivo e arriscado, esforços tem sido realizados na identificação de biomarcadores no sangue para a DA. Recentemente, foi realizado um estudo de replicação para 94 proteínas que haviam sido previamente sugeridas como potenciais biomarcadores para a DA, provenientes de 21 trabalhos com amostras de plasma (KIDDLE et al., 2014). Destas, apenas 9 proteínas foram replicadas.

Alguns trabalhos interessantes têm sido realizados com ênfase na caracterização do subproteoma de placas senis e de emaranhados neurofibrilares. Em um estudo do proteoma de placas amiloides de portadores de Alzheimer isoladas por microdissecção de captura a laser (LCM), foram encontradas mais de 400 proteínas nestes agregados, além do peptídeo A β (LIAO et al., 2004). A análise do proteoma de emaranhados neurofibrilares do hipocampo por LCM levou à identificação de alguns controles positivos como tau, apoE, α -sinucleína, e de 63 novas proteínas, dentre as quais validou-se a presença de GAPDH nestes agregados (WANG et al., [s.d.]). Em outro trabalho foi investigada a fração insolúvel por detergente do proteoma cerebral em pacientes portadores de Alzheimer e demência prodromática (WOLTJER et al., 1923). Observou-se que A β e sete outras proteínas (apoE, tubulinas, GAPDH, 14-3-3, citocromo c, GFAP e proteína básica de mielina) apresentam baixas abundâncias em controles e abundâncias crescentes em

indivíduos com demência prodromica e Alzheimer, ao passo que os níveis de tau insolúvel se elevam apenas nos portadores de Alzheimer, conforme proposto pela teoria β-amiloide em que as alterações patológicas de tau ocorriam em fases tardias da doença.

Diversos trabalhos se utilizaram da abordagem *proteômica dirigida por descoberta* (*discovery driven proteomics*) para melhor compreender os mecanismos causais da DA. Neste tipo de estudo, ao contrário de grande parte do trabalho da literatura científica que é *dirigida por uma hipótese* inicial, a análise proteômica é empregada com o objetivo de investigar vias moleculares alteradas na DA as quais muitas vezes são desconhecidas *a priori*. Empregando-se da abordagem dirigida por descoberta, diversos autores investigaram as alterações proteômicas em diferentes regiões cerebrais na DA utilizando tecidos humanos *post mortem* ou provenientes de modelos animais. Embora tenham oferecido *insights* importantes, grande parte destes trabalhos não investigou todos os estágios histopatológicos da doença, de forma que certos grupos estudaram cérebros com DA em estágios avançados (DONOVAN et al., 2012; MARTIN et al., 2008) e alguns fizeram *pool* de pacientes com diferentes estágios da doença (SCHONBERGER et al., 2001). Além disso, em determinados trabalhos a informação acerca da avaliação histopatológica utilizada não está clara, tornando, a nosso ver, os resultados de difícil interpretação (CHANG et al., 2015; ZAHID et al., 2014). Em contrapartida, outros autores consideraram a variável temporal da doença (estagiamento das alterações neuropatológicas) e mapearam as alterações no proteoma/transcriptoma cerebral de uma única região durante a progressão da DA (BOSSERS et al., 2010; HONDIUS et al., 2016; ZELAYA et al., 2015). Finalmente, poucos trabalhos integraram ambos os aspectos, espacial (regiões cerebrais) e temporal (progressão da doença), e investigaram o proteoma/transcriptoma de mais de uma região cerebral durante os estágios da DA (MATARIN et al., 2015; MIYASHITA et al., 2014; SEYFRIED et al., 2017).

A análise do perfil proteômico do bulbo olfativo em diferentes estágios da DA indicou uma alteração em fatores de splicing em estágios B/B iniciais (I-II), ao passo que em estágios B/B tardios (V-VI) foi encontrado disfunção mitocondrial, desregulação no ciclo de neurotransmissores, distúrbios na adesão entre neurônios e na expansão de neuritos (ZELAYA et al., 2015). Recentemente, um estudo análogo foi realizado em que foram avaliadas as alterações no proteoma do

hipocampo em todos os estágios B/B (HONDIUS et al., 2016). Hondius e colaboradores encontraram um total de 372 proteínas diferencialmente expressas durante o curso da doença, dentre as quais proteínas do citoesqueleto, proteínas envolvidas na liberação de vesículas sinápticas e na plasticidade de sinapse, assim como proteínas de resposta ao estresse, tiveram uma desregulação em estágios iniciais da DA. De forma interessante, um trabalho anterior em que o transcriptoma do córtex pré-frontal foi avaliado durante a progressão dos estágios B/B, também relatou alterações na plasticidade sináptica e um aumento na atividade sináptica em fases iniciais da doença, seguida da redução da expressão desses genes em fases tardias (BOSSERS et al., 2010).

Em se tratando de estudos que investigaram a progressão temporal da DA em mais de uma região cerebral, um trabalho recente efetuou uma análise de *whole-genome exon array* em 213 amostras de cérebro humano *post mortem* provenientes dos córtices entorrinal, temporal e frontal, compreendendo todos os estágios B/B (0-VI) a fim de identificar genes relacionados com a deposição de emaranhados da proteína tau (MIYASHITA et al., 2014). Foi identificada a associação de 8 genes, *RELN*, *PTGS2*, *MYO5C*, *TRIL*, *DCHS2*, *GRB14*, *NPAS4* e *PHYHD1*, com os estágios B/B, dos quais *PHYHD1* e *MYO5C* foram validados em outra coorte de pacientes com DA. Um trabalho notável empregou análise de microarranjo para investigar alterações nos níveis de RNAm em 4 linhagens de camundongo transgênico para a DA, abrangendo 4 idades e 3 regiões cerebrais (hipocampo, córtex e cerebelo) (MATARIN et al., 2015). Nos camundongos portadores de patologia A β (mutação em APP,) foi encontrada uma correlação positiva entre a deposição de placas senis e a ativação do sistema imune em todas as idades. Já nos camundongos com patologia de tau (mutação no gene *MAPT*, codificador para a proteína tau), evidenciou-se uma correlação negativa entre a deposição dos emaranhados de tau e a expressão de genes sinápticos, e correlação positiva entre as lesões de tau e genes relacionados à imunidade, sendo ambos apenas em animais idosos. Recentemente, foi realizado um estudo das alterações no proteoma de duas regiões cerebrais (córtex pré-frontal dorsolateral e pré-cúneo) durante os estágios pré-clínico (assintomático) e clínico (sintomático) da DA, utilizando-se 129 amostras de tecido humano *post-mortem* (SEYFRIED et al., 2017). Foram identificados módulos de proteínas co-expressas que se correlacionam com os

marcos neuropatológicos da DA. Módulos com proteínas marcadoras para astrócitos e micróglia tiveram correlação positiva com placas senis e emaranhados neurofibrilares, ao passo que módulos com marcadores neuronais apresentaram correlação negativa com ambos os marcos histopatológicos. Além disso, alguns módulos de proteínas foram alterados em casos de DA assintomática, dentre os quais observou-se redução da expressão de proteínas de sinapse e aumento do metabolismo de RNA, indicando alterações moleculares antecedendo a disfunção cognitiva.

Apesar dos avanços obtidos no campo da proteômica aplicada ao estudo da DA, existe um baixo consenso entre estudos realizados por diferentes laboratórios, como recentemente revisado (BRINKMALM et al., 2015; MOYA-ALVARADO et al., 2016). A este respeito, é preciso levar em consideração a complexidade do tecido cerebral composto por diferentes regiões e tipos celulares dispostos em camadas, e o fato de que diferentes regiões cerebrais são afetadas à medida em que a doença progride. Além disso, a complexidade dos protocolos de preparo e fracionamento de amostra aplicados na proteômica e a necessidade de validação de resultados de proteômica *bottom-up* por métodos ortogonais são fatores limitantes para a reproduzibilidade de acordo com a tecnologia atualmente disponível nos estudos de proteômica por espectrometria de massas (MOYA-ALVARADO et al., 2016). Desse modo, estudos adicionais envolvendo um maior número de amostras e regiões cerebrais, preferencialmente abrangendo diferentes estágios do Alzheimer poderão dar pistas adicionais para uma melhor compreensão da etiologia desta doença desoladora.

2 Justificativa

A doença de Alzheimer é a doença neurodegenerativa mais comum no mundo, com uma previsão de aumento do número de casos para as próximas décadas, atingindo cerca de 152 milhões de pessoas em 2050. A deposição de agregados proteicos no cérebro (placas senis e emaranhados neurofibrilares), marcos patológicos característicos da doença, segue um padrão previsível. A este respeito, os estágios B/B descrevem o acúmulo progressivo de proteína tau patológica em diferentes regiões cerebrais durante a DA. Sabe-se que na DA determinadas regiões do cérebro degeneram primeiro (perda de sinapses e morte neuronal), apresentando, portanto, maior vulnerabilidade à doença. Contudo, os fatores responsáveis por esta vulnerabilidade permanecem elusivos. O presente trabalho tem como objetivo mapear as alterações no proteoma de regiões cerebrais com vulnerabilidades distintas à DA. Para tanto, efetuou-se uma análise comparativa do proteoma de 4 regiões cerebrais, sendo 2 regiões afetadas em estágios B/B iniciais (cortices entorrinal e parahipocampal) e 2 regiões afetadas em estágios B/B tardios (cortices temporal e frontal). Duas abordagens foram empregadas: (1) comparação de regiões no estado fisiológico (indivíduos saudáveis) e (2) comparação de regiões durante a progressão da doença (estágios B/B). A partir dos resultados obtidos, será possível melhor compreender as alterações moleculares durante a progressão da DA que são compartilhadas entre regiões cerebrais ou exclusivas de regiões específicas. Além disso, a elucidação do mapa proteômico das regiões analisadas em estado fisiológico irá gerar conhecimento a respeito de características inerentes às regiões vulneráveis que possivelmente estão relacionadas à uma maior susceptibilidade à neurodegeneração. Em síntese, os resultados obtidos representarão conhecimento novo a respeito do comportamento de regiões cerebrais na DA, indicando proteínas e vias importantes para a etiologia da doença.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Compreender como o proteoma de regiões cerebrais com vulnerabilidade distinta à doença de Alzheimer se comportam em estado fisiológico e durante a progressão da doença.

3.2 Objetivos específicos

- Mapear as alterações no proteoma durante a progressão da DA em regiões afetadas precocemente (lobo medial temporal, MTL) ou tardeamente (neocôrtex) pela patologia de tau (estágios B/B).
- Verificar quais mecanismos são conservados (proteínas e vias moleculares) entre as regiões durante a DA.
- Comparar o proteoma de regiões cerebrais com maior (MTL) e menor (neocôrtex) vulnerabilidade ao Alzheimer, em estado fisiológico (indivíduos controle).

4 Materiais e métodos

4.1 Coorte de pacientes

Um total de 103 amostras de cérebro humano *post-mortem* provenientes de 4 regiões cerebrais distintas (córtex entorrinal/áreas de Brodmann 28 e 34, córtex parahipocampal/dois terços posteriores do giro parahipocampal, córtex temporal/área de Brodmann 21 e córtex frontal/área de Brodmann 10) foram adquiridas do Banco de Tecidos Cerebrais Humanos (Universidade de Semmelweis, Budapeste, Hungria). Os indivíduos foram submetidos à análise histopatológica e classificados de acordo com os estágios B/B (sistema de classificação para o acúmulo de proteína tau hiperfosforilada) em Controles (patologia de tau negativa ou mínima, relacionada à idade) e estágios B/B (I, II, III, IV, V, VI) (Tabela S1). As amostras foram doadas sob consentimento escrito e esclarecido e o trabalho foi efetuado de acordo com a Declaração de Helsinki.

4.2 Reagentes

A não ser que esteja especificado, todos os reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Solventes orgânicos e água qualidade LC-MS foram comprados da Merck.

4.3 Preparo de amostras

Após coleta por autópsia, os tecidos cerebrais foram estocados em freezer à -80 °C até o momento de uso. As amostras congeladas foram submetidas à microdissecção sob refrigeração (-20 °C) utilizando um criostato. Foram obtidas fatias de 10 µm (20-60 fatias por amostra) e o material foi estocado à -80 °C. 200 µL de tampão de lise (7 M ureia, 2 M tioureia, 50 mM Tris pH 7,4, inibidor de protease MS-SAFE) foram adicionados em cada tubo de microcentrífuga contendo tecido cerebral seccionado, no gelo. Procedeu-se à agitação usando vórtex e as amostras foram sonicadas no gelo (Sonicador Branson Digital SFX 150) de acordo com os seguintes parâmetros: 20% de amplitude, modo pulsado (9 pulsos com 10 s cada e intervalos de 10 s entre cada pulso, para evitar degradação). As amostras lisadas foram centrifugadas a 21.000 xg à 4 °C durante 30 min (Centrífuga Eppendorf Nordic Aps). O sobrenadante foi transferido para um tubo novo e o pellet (debris celulares) foi descartado.

4.4 Dosagem de proteínas por Bradford

A quantificação de proteínas foi efetuada pelo método de Bradford, ensaio em placa de 96 poços, segundo as instruções do fabricante. A absorbância (595 nm) foi lida em equipamento FLUOstar Omega (BMG LABTECH). A concentração de proteínas foi calculada a partir da dosagem de uma curva padrão de BSA.

4.5 Digestão de proteínas

A etapa de digestão foi realizada segundo um protocolo *Filter Aided Sample Preparation* (FASP) modificado (WISNIEWSKI et al., 2009). Um total de 100 µg de proteína foi utilizado para a reação de digestão. Foram adicionados 50 mM de ditiotreitol (DTT) para redução das pontes dissulfeto dos resíduos de cisteína, com incubação de 1h à 30 °C. As amostras foram transferidas para um filtro Microcon de 30 kDa (Merck Milipore) acoplado à tubos de coleta. Foram adicionados 200 µL de tampão U/Tris (8 M Ureia, 0,1 M Tris-HCl pH 8,5) e as amostras foram centrifugadas à 12.000 xg por 15 min à temperatura ambiente (Centrífuga Eppendorf Nordic Aps). 50 µL de Iodoacetamida 0,05 M (IAA) em tampão U/Tris foram adicionados para a etapa de alquilação e a reação foi incubada no escuro durante 20 min à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas à 12.000 xg por 15 min. A seguir, foram adicionados 100 µL de tampão U/Tris, seguido por outra etapa de centrifugação de acordo com as mesmas condições. As amostras foram lavadas pela adição de 100 µL de bicarbonato de amônio 50 mM (AMBIC) e efetuou-se nova centrifugação. Esta etapa de lavagem foi realizada 4 vezes. Os filtros contendo as proteínas retidas foram transferidos para tubos de coleta novos. A digestão de proteínas foi efetuada pela adição de 50 µL de tripsina (Sequencing grade modified trypsin, Promega) a 0,04 µg/µL em AMBIC, resultando em uma proporção de enzima:proteína equivalente a 1:50. Incubou-se a reação à 37 ° C durante a noite. Os peptídeos foram coletados centrifugando-se as amostras à 12.000 xg por 15 min. Foram realizadas duas etapas de lavagem pela adição de 100 µL de AMBIC, seguido por centrifugação. A fim de parar por completo a reação de digestão foi adicionado ácido fórmico para uma concentração final de 0,5 %. Os peptídeos foram secos no speed vac e ressuspensos em 100 µL de ácido trifluoroacético (TFA).

4.6 Dessalinização de peptídeos por cromatografia em fase reversa

Após a digestão tríptica os peptídeos foram submetidos à limpeza para remoção de sais por cromatografia em fase reversa, utilizando-se colunas de C18

(MacroSpin Columns®, The Nest Group Inc.). As colunas foram submetidas à acondicionamento pela adição de 400 µL de solução 100% acetonitrila (ACN)/0,1% TFA e centrifugação à 100 xg por 1 min. A seguir, as colunas foram equilibradas duas vezes adicionando-se 400 µL de solução H₂O/0,1% TFA e foram centrifugadas à 100 xg por 1 min. As amostras (ressuspendidas em 100 µL de TFA à 0,1%) foram adicionadas às colunas de C18 e centrifugadas à 200 xg por 1 min. Foram efetuadas duas etapas de lavagem: adição de 200 µL de solução H₂O/0,1% TFA seguido por centrifugação à 200 xg por 1 min. Os tubos de coleta foram substituídos por tubos novos. A etapa de eluição dos peptídeos foi efetuada duas vezes conforme descrito a seguir: foram adicionados 100 µL de solução 50% ACN/0,1% TFA e centrifugou-se as amostras à 100 xg por 1 min. Os peptídeos foram secados em concentrador à vácuo e ressuspendidos em 50 µL de solução 0,1% Ácido fórmico.

4.7 Dosagem de peptídeos

Os peptídeos trípticos foram quantificados por ensaio em placa de 96 poços utilizando-se o kit Pierce Quantitative Colorimetric Peptide Assay (Thermo Fisher Scientific) segundo as instruções do fabricante. A absorbância (480 nm) foi lida em equipamento FLUOstar Omega (BMG LABTECH). A concentração de peptídeos foi calculada a partir da dosagem de uma curva padrão de um digesto de levedura fornecido no kit.

4.8 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)

Antes da injeção no espectrômetro de massas, os peptídeos foram diluídos em solvente A (Ácido fórmico à 0,1%) e foram adicionados 25 fmol/µL de uma mistura de calibração de tempo de retenção (PRTC, Thermo Fisher Scientific). Foi utilizado um espectrômetro de massas Thermo Q Exactive equipado com uma fonte de ionização Dream (AMR Inc) e conectado à um sistema de cromatografia líquida Easy n-LC 1000 (Thermo Fisher Scientific). Um total de 1 ug de peptídeos foi injetado em uma pré-coluna Acclaim PepMap 100 (100µmx2cm, Thermo Fisher Scientific) e separado em uma coluna de C18 Zaplous α Pep-C18 (0,1mmx20cm, AMR Inc.) utilizando-se um fluxo de 500 nL/min e temperatura da coluna à 24°C. Um gradiente não linear foi estabelecido a partir de uma mistura de solventes A (0,1% ácido fórmico em água) e B (0,1% ácido fórmico em acetonitrila) e usado para a eluição dos peptídeos. O gradiente foi iniciado com 5% de solvente B e aumentou

para 22% durante 100 min. Nos próximos 14 min, aumentou-se a concentração de solvente B para 32% e, finalmente, este aumentou para 95% em 12 min e foi mantido à 95% durante 14 min, totalizando 140 min de gradiente. As amostras foram analisadas por um método top 15 de aquisição dependente de dados (DDA). O scan de MS1 foi adquirido em analizador Orbitrap, com um intervalo de 400-1600 m/z, resolução de 70.000 (@ 200 m/z), valor de AGC de 1e6 e tempo máximo de injeção de 100 ms. Os 15 picos mais intensos (com carga ≥ 2) foram selecionados e fragmentados em uma célula de HCD (do inglês, High Energy Collisional Dissociation) (energia de colisão normalizada igual a 30%) e os espectros de MS2 foram adquiridos com uma resolução de 17.500 (@ 200 m/z), valor de AGC igual a 2e5 e tempo máximo de injeção de 120 ms. O limiar para seleção de íon foi de 8,3e3 e a exclusão dinâmica igual a 20 s. As amostras foram injetadas de forma randômica e cada corrida foi seguida pela injeção de um branco (0,1% Ácido fórmico em água MilliQ) em gradiente curto de 35 min para limpar-se quaisquer resíduos da amostra prévia. Uma amostra de controle de qualidade (CQ) foi preparada a partir da mistura de 4 digestos de cérebro e acrescida de PRTC à 25 fmol/ μ L. 1 μ g da amostra CQ foi injetada após cada 15 amostras analisadas para avaliar a estabilidade do sistema.

4.9 Inferência de proteínas e quantificação relativa

Os arquivos *raw* gerados no espectrômetro de massas foram analisados utilizando o programa Proteome Discoverer (PD) versão 2.1 (Thermo Fisher Scientific). A identificação de peptídeos foi efetuada através do algoritmo SEQUEST HT usando-se o banco de dados humano do UniProt como referência (versão 07/09/2016, 20.171 sequências, contendo apenas proteínas canônicas). Os seguintes parâmetros de busca foram utilizados: carbamidometilação de cisteína (modificação estática), oxidação de metionina (modificação dinâmica), tolerância de 10 ppm para os íons precursores e tolerância de 0,02 Da para os íons fragmento. No máximo 2 clivagens perdidas foram aceitas para os peptídeos tripticos e foram considerados peptídeos com tamanho entre 7 e 144 aminoácidos. Aplicou-se os seguintes filtros: alta confiança (FDR 0,01) e pelo menos dois peptídeos por proteína. A quantificação de proteínas foi efetuada por XIC (do inglês, *Extracted Ion Chromatogram*) selecionando-se a ferramenta Precursor Ions Area Detector. Para a quantificação de proteínas foi utilizado o método Top 3 (média dos 3 peptídeos mais intensos), sendo considerados apenas peptídeos únicos. Os dados de proteômica

por espectrometria de massas gerados foram depositados no banco do Consórcio ProteomeXchange via PRIDE (referência PRIDE) com o identificador PXD010138.

4.10 Tratamento de dados, análise estatística e análise por bioinformática

As proteínas identificadas a partir da busca no PD 2.1 foram exportadas considerando-se os seguintes filtros: proteínas master, proteínas com alta confiança (FDR 0,01) e proteínas identificadas com pelo menos 2 peptídeos. O tratamento de dados e a análise estatística foram efetuados no programa Perseus versão 1.6.0.7. Os dados foram transformados em log2 e normalizados subtraindo-se o valor (XIC) de cada proteína pela mediana da distribuição da amostra. A seguir, proteínas com menos de 50% de valores válidos em cada grupo (Controle, B/B I-III e B/B III-VI) foram removidas da análise e procedeu-se à imputação de *missing values* utilizando-se a ferramenta de imputação disponível no programa Perseus (substituição randômica a partir da distribuição normal de cada amostra, usando-se apenas valores baixos que mimetizam medidas pouco abundantes). Para verificação de proteínas diferencialmente expressas (DEPs) durante a progressão da doença, aplicou-se teste T de Student comparando-se estágios B/B iniciais (I-III) e estágios B/B tardios (IV-VI) com o grupo Controle ($p < 0.05$, *Fold Change* ≤ 0.66 ou ≥ 1.5). Análise de DEPs entre as 4 regiões cerebrais nos indivíduos controles foi realizada aplicando-se ANOVA ($p < 0.05$, *Fold Change* ≤ 0.66 ou ≥ 1.5). As análises de clusterização hierárquica também foram realizadas no programa Perseus (distância de Canberra) após normalização dos dados por Z-score.

Os diagramas de Venn, utilizados para comparar a sobreposição do proteoma de cada região cerebral e as proteínas diferencialmente expressas, foram gerados no programa Venny versão 2.1 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>). O interatoma de proteínas diferencialmente expressas foi construído utilizando-se o programa String versão 10.5 (<https://string-db.org/>) e editado no programa Cytoscape versão 3.5.1 (<http://www.cytoscape.org/>). As análises de enriquecimento de vias foram efetuadas no programa DAVID versão 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>) e String 10.5 (<https://string-db.org/>).

5 Resultados (artigo submetido)

Proteomic signatures of brain regions affected by tau pathology in early and late stages of Alzheimer's disease

Clarissa Ferolla Mendonça^a, Magdalena Kuras^b, Fábio César Sousa Nogueira^a, Indira Plá^b, Tibor Hortobágyi^{c,d,e}, László Csiba^{c,f}, Miklós Palkovits^g, Éva Renner^g, Péter Döme^{h,i}, György Marko-Varga^b, Gilberto B. Domont^{a*} and Melinda Rezeli^{b*#}

^aProteomics Unit, Department of Biochemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^bDivision of Clinical Protein Science & Imaging, Department of Clinical Sciences (Lund) and Department of Biomedical Engineering, Lund University, Lund, Sweden

^cMTA-DE Cerebrovascular and Neurodegenerative Research Group, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

^dInstitute of Pathology, Faculty of Medicine, University of Szeged, Szeged, Hungary

^eDepartment of Old Age Psychiatry, Institute of Psychiatry Psychology & Neuroscience, King's College London, London, UK

^fDivision of Neurology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

^gSE-NAP – Human Brain Tissue Bank Microdissection Laboratory, Semmelweis University, Budapest, Hungary

^hDepartment of Psychiatry and Psychotherapy, Semmelweis University, Budapest, Hungary

ⁱNational Institute of Psychiatry and Addictions – Nyírő Gyula Hospital, Budapest, Hungary

*Corresponding authors:

Gilberto B. Domont, Proteomics Unit, Department of Biochemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

#To whom correspondence should be addressed:

Melinda Rezeli, Division of Clinical Protein Science & Imaging, Department of Biomedical Engineering, Lund University, BMC D13, SE-221 84 Lund, Sweden

Phone: +46-46-222 3721

Email: melinda.rezeli@bme.lth.se

Keywords: Alzheimer's disease, proteomics, brain region vulnerability, medial temporal lobe, neocortex, Braak/Braak staging

Abstract

BACKGROUND: Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disorder. Depositions of amyloid β peptide (A β) and protein tau are among the major pathological hallmarks of AD. A β and tau burden follows predictable spatial patterns during the progression of AD. Nevertheless, it remains obscure why certain brain regions are more vulnerable than others; to investigate this and dysregulated pathways during AD progression, a mass spectrometry-based proteomics study was performed.

METHODS: In total 103 tissue samples from regions early (entorhinal and parahippocampal cortices - medial temporal lobe (MTL)) and late affected (temporal and frontal cortices - neocortex) by tau pathology were subjected to label-free quantitative proteomics analysis.

RESULTS: Considering dysregulated proteins during AD progression, the majority (681 of the 814 proteins) was region specific, while some proteins were shared between regions (117 proteins altered in two areas and 16 proteins altered in three areas). Analogously, many dysregulated pathways during disease progression were exclusive to certain regions, but a few pathways altered in two or more areas. Changes in protein expression suggesting that synapse loss occurred in all analyzed regions, while translation dysregulation was preponderant in entorhinal, parahippocampal and frontal cortices. Oxidative phosphorylation impairment was prominent in MTL. Differential proteomics of brain areas in health state (controls) showed higher metabolism and increased expression of AD-related proteins (e.g. APOE) in the MTL compared to the neocortex.

CONCLUSIONS: To our knowledge, this work provides the first comparison of proteomic changes in brain regions affected by tau pathology at different stages of AD. This work identified some commonly regulated proteins and pathways during disease advancement, although we found the dysregulated processes being predominantly region specific. In addition, a distinct proteomic signature was found between MTL and neocortex in healthy subjects that might be related to AD vulnerability. These findings highlight the need of investigating AD's cascade of events throughout the whole brain and studies spanning more brain areas are required to better understand AD etiology and region vulnerability to disease.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent neurodegenerative disorder and also the major cause of dementia (60-80% cases) (2017). Major hallmarks of AD are loss of synapses, neuronal death and deposition of extracellular amyloid β peptide (A β) and intracellular hyperphosphorylated protein tau (Masters et al., 2015). During AD progression A β and tau aggregates spread through the brain, following predictable patterns (Braak and Braak, 1991; Thal et al., 2002). Tau deposition was classified into six neuropathological stages designated as Braak/Braak (B/B) stages (Braak and Braak, 1991). During B/B I-II, tau inclusions are restricted to the transentorhinal and entorhinal cortices. They disseminate into the limbic system during B/B III-IV with mild engagement of the hippocampus (CA1-4), parts of the frontal and temporal neocortices and the amygdala. The final stages, B/B V-VI, are distinguished by the destruction of the neocortex by protein inclusions (Hyman et al., 2012). There is a correlation between cognitive impairment and the number of neuritic plaques (A β plaques) in the neocortex, but cortical Tau neurofibrillary tangles (NFT) burden correlates better with cognitive decline (Nelson et al., 2007).

Since AD progressively affects distinct brain regions, many studies compared the changes that occur in different regions, trying to elucidate which processes make an area more vulnerable than another one (Martin et al., 2008; Schonberger et al., 2001; Zahid et al., 2014). Other authors focused on the temporal advancement of AD by investigating changes that occur in one brain area during different disease stages (Bossers et al., 2010; Hondius et al., 2016; Lachén-Montes et al., 2017; Lau et al., 2013; Zelaya et al., 2015). Both strategies were also merged through transcriptomic/proteomic investigation of brain areas considering distinct disease stages (Matarin et al., 2015; Miyashita et al., 2014; Seyfried et al., 2017).

Although many works have profiled molecular alterations in the AD brain, no study has compared proteomic changes that occur during AD advancement in brain areas affected early and late by tau pathology. With the aim to map proteome dysregulation during AD progression in brain regions with distinct susceptibility to neurodegeneration and to investigate which processes make some brain areas more vulnerable to AD, we performed quantitative proteome profiling of 103 human brain samples from regions affected by tau pathology already in the early (medial temporal lobe (MTL)) or only the late stages of AD (neocortex).

Methods

Patient cohort

A total of 103 postmortem human brain samples from 4 distinct brain regions (entorhinal cortex (Brodmann areas 28 and 34), parahippocampal cortex (posterior two thirds of the parahippocampal gyrus), temporal cortex (Brodmann area 21) and frontal cortex (Brodmann area 10)) were acquired from the Human Brain Tissue Bank (Semmelweis University, Budapest, Hungary). Individuals were classified according to tau pathology (B/B stages) into controls (negative or minimal age-related tau pathology) and B/B stages (I, II, III, IV, V and VI) (Table S1). The work has been carried out in accordance with the Declaration of Helsinki. Brains were donated under informed written consent.

Reagents

All reagents used were acquired from Sigma-Aldrich, unless specified. Organic solvents and water with LC-MS quality was bought from Merck.

Protein extraction and digestion

Frozen brain tissue samples were sectioned at -20 °C using a cryostat to obtain 10 µm slices (20-60 per sample) and samples were stored at -80 °C until further usage. 200 µL of lysis buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 50 mM Tris pH 7.4, MS-SAFE protease inhibitor) was added to each microcentrifuge tube containing 20 tissue slices. Samples were vortexed and then sonicated on ice (Digital Branson Sonicator SFX 150): 20% amplitude, pulsed mode (9 pulses with 10 s each and intervals of 10 s between each pulse). Lysates were centrifuged at 21,000 x g at 4 °C for 30 min (Eppendorf Nordic Aps) and the supernatant was transferred to a new tube to avoid cell debris. Prior to digestion, protein quantification was done using the Bradford 96 well plate assay, according to the manufacturer instructions.

Protein digestion was carried out using a modified Filter Aided Sample Preparation (FASP) protocol (Wisniewski et al., 2009). 100 µg protein was used for digestion. Reduction of disulfide bonds was performed by the addition of 50 mM dithiothreitol (DTT) and incubation at 30 °C for 1 h. Samples were then transferred to 30 kDa Microcon filters (Merck Milipore) coupled to collection tubes. 200 µL of U/Tris

buffer (8 M Urea in 0.1 M Tris-HCl pH 8.5) was added and samples were centrifuged at 12,000 x g for 15 min at room temperature. 50 µL of 50 mM iodoacetamide (IAA) in U/Tris buffer was added for the alkylation step and the reaction was incubated in dark for 20 min at room temperature. Samples were centrifuged at 12,000 x g for 15 min. After that, 100 µL of U/Tris buffer was added and another centrifugation step with the same conditions was carried out. Samples were washed by the addition of 100 µL of 50 mM ammonium bicarbonate (AMBIC), followed by centrifugation. This washing step was repeated 4 times. Filters containing the proteins were transferred to new collection tubes. Protein digestion was done by the addition of 50 µL of 0.04 µg/uL trypsin (1:50 enzyme:protein ratio, *Sequencing grade modified trypsin*, Promega) in AMBIC. Reaction was incubated overnight at 37 °C. Peptides were collected by centrifugation at 12,000 x g for 15 min. Two washing steps were carried out by the addition of 100 uL of AMBIC, followed by centrifugation. Formic acid was added to a final concentration of 0.5 %. Peptides were dried with speed vacuum centrifugation, then resuspended in 100 µL of 0.1 % trifluoroacetic acid (TFA) and finally desalted by reversed phase chromatography using C18 columns (*MacroSpin Columns®*, The Nest Group Inc.). After desalting, tryptic peptides were dried and resuspended in 50 µL of 0.1% formic acid. Prior to injection on the mass spectrometer, peptides were quantified using the Pierce Quantitative Colorimetric Peptide Assay (Thermo Fisher Scientific).

Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

1µg of tryptic peptide was injected for each analysis spiked with the Pierce retention time calibration mixture (PRTC, Thermo Fisher Scientific) (25 fmol/injection). For LC-MS/MS analysis, we used a Thermo Q Exactive mass spectrometer equiped with a Dream ionization source (AMR Inc) and connected to a liquid chromatography system (Easy n-LC 1000, Thermo Fisher Scientific). Peptides were injected on an Acclaim PepMap 100 pre-column (100 µm x 2cm, Thermo Fisher Scientific) and separated on a Zaplous α Pep-C18 analytical column (0.1 mm x 20cm, AMR Inc.) at a flow rate of 500 nL/min and a column temperature at 24 °C. A non-linear gradient was established using solvents A (0.1 % formic acid in water) and B (0.1 % formic acid in acetonitrile) to elute the peptides. The gradient started with 5 % solvent B and increased to 22 % during 100 min. In the next 14 min, solvent B

increased to 32 % and finally, it augmented to 95 % in 12 min and it was kept at 95 % for 14 min. Samples were analyzed using a top 15 data dependent acquisition (DDA) method. MS1 scan was acquired in the Orbitrap analyzer with a 400-1600 m/z interval, 70,000 (@ 200 m/z) resolution, target AGC value of 1e6 and maximum injection time of 100 ms. The 15 most intense peaks (charge \geq 2) were selected and fragmented in a Higher Energy Collisional Dissociation (HCD) cell with a normalized collision energy of 30 %. MS2 spectra were acquired with a 17,500 (@ 200 m/z) resolution, target AGC value of 2e5 and maximum injection time of 120 ms. The ion selection threshold was set to 8.3e3 and dynamic exclusion was set to 20 s. Samples were randomly analyzed and each run was followed by a blank injection (0.1 % formic acid in MilliQ water) with a short gradient of 35 min to avoid any residues from the previous sample. A quality control sample (QC) was prepared from a pool of 4 brain digests spiked with PRTC. 1 μ g of QC sample together with 25 fmoles of PRTC peptides was injected after each 15 samples in order to evaluate system stability.

Protein inference and relative quantification

Raw data generated on the mass spectrometer was analyzed using the software Proteome Discoverer (PD) version 2.1 (Thermo Fisher Scientific). Peptide identification was done with the SEQUEST HT algorithm using UniProt human database as reference (version from 07/09/2016, canonical sequences only). The following search parameters were employed: cysteine carbamidomethylation as static modification, methionine oxidation as dynamic modification, 10 ppm tolerance for precursor ions and 0.02 Da for fragment ions. A maximum of 2 missed cleavages was allowed. Protein quantification was done using the Precursor Ions Area Detector node, where the average of the 3 most intense peptides was used for protein quantification, being considered only unique peptides. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE (Vizcaíno et al., 2015) partner repository with the dataset identifier PXD010138.

Bioinformatics and statistical analysis

Proteins identified from database search that fulfilled the following requirements were subjected to further analysis: master proteins, proteins with low FDR (0.01) and

proteins identified with at least 2 peptides. Statistical analysis was carried out in Perseus version 1.6.0.7. Data was converted to log2 scale and normalized by subtracting the protein area value by the median of sample distribution. Proteins with less than 50% valid values in each group (Controls, B/B I-III and B/B III-VI) were removed from analysis. The remaining proteins were subjected to missing value imputation using the available tool from Perseus that performs a random substitution from the normal distribution of each sample, using only low values that simulate low signals. In order to evaluate differentially expressed proteins (DEPs) during disease progression, Student's t-test was applied comparing early B/B (I-III) and late B/B (IV-VI) stages with the control group ($p < 0.05$, Fold Change ≤ 0.66 and ≥ 1.5). Analysis of DEPs between the 4 brain regions in health state was performed with ANOVA ($p < 0.05$, Fold Change ≤ 0.66 and ≥ 1.5). Hierarchical clustering analysis (Canberra distance) was also done in Perseus after applying Z-score normalization to data.

Venn diagrams were generated with Venny version 2.1 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) and with an online tool from Ghent University (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). Protein interaction networks were built with String version 10.5 (<https://string-db.org/>) and Cytoscape version 3.5.1 (<http://www.cytoscape.org/>) was used to edit visualization. Enrichment analysis was carried out on DAVID version 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>) and String (<https://string-db.org/>).

Verification of DEPs identified in the present work was performed by comparison with three other AD proteomic studies [12, 14, 17], and only proteins reported to be significantly altered were used for the comparison. From the study reported in ref 17, the results from dorsolateral prefrontal cortex were selected for verification, and proteins fulfilling the following criteria were regarded as DEPs: ANOVA $p \leq 0.05$ and Tukey's ≤ 0.05 . For the comparison the highest log2 fold change values were used in case of all DEPs.

Results

Human brain proteome profiling

We employed a mass spectrometry-based approach to interrogate the human brain proteome during AD progression (B/B stages) in four distinct brain regions: entorhinal cortex (EC), parahippocampal cortex (PHC), temporal cortex (TC) and

frontal cortex (FC). Importantly, we wanted to evaluate brain areas that are affected by tau pathology at different disease stages, in order to gain insights if there are common mechanisms or patterns shared between different brain regions during disease progression. Among the investigated regions EC and PHC that belong to the medial temporal lobe are affected already at the early, while the neocortical regions (TC, FC) are affected by tau pathology only at the late stages of AD (Braak and Braak, 1991). A total of 103 samples were analyzed individually, furthermore digestion replicates were generated for each brain region in order to evaluate the reproducibility of sample preparation. As expected, the correlation was higher between digestion replicates than biological replicates from the same disease group (Figure S1). In total 3805, 3815, 3610 and 3720 protein groups with at least 2 peptides were identified in EC, PHC, TC and FC, respectively. There was a huge overlap (> 85%) between the identified protein groups from different disease stages in each brain region as it is indicated in Figure S2. Gene ontology enrichment for cellular components (GOCC) revealed similar categories for the four brain regions (Figure S3).

Proteins differentially expressed during AD progression

In this work, we employed two approaches to analyze differences in proteome profiles of brain areas affected by tau in early (EC, PHC) and late disease stages (TC, FC) (Figure 1). Firstly, in order to understand how the brain proteome is altered during AD progression, we investigated which proteins are differentially expressed (DEP) when comparing early (B/B I-III) and late disease stages (B/B IV-VI) to control individuals in each brain region. Secondly, to investigate physiological proteomic signatures that might contribute to brain area susceptibility to AD, we compared the proteomic profiles of four brain regions in healthy subjects (controls).

Regarding the first approach (investigation of changes in the proteome of each region during AD progression), a total of 279, 309, 187 and 188 proteins were significantly different in EC, PHC, TC and FC, respectively, totaling 814 proteins (Table S2). Interestingly, the highest numbers of DEPs were observed in the regions affected early by tau pathology. Early changes in protein levels were observed in each region but the number of altered proteins increased, when late disease stage was compared with controls (Figure S4). The comparison of DEPs from various brain

regions revealed that there is only a small overlap between regions, especially during early stages, although there is an increase in the number of shared proteins during late stages (Figure S5). The comparison of differentially expressed proteins found in each region indicated that in total 117 proteins are shared between two, and only 16 proteins are shared between three brain regions (Table 1, Figure S6). Out of these 133 proteins, only 15 were contra-regulated (up-regulated in one and down-regulated in another comparison). In contrast, the greater part of these proteins ($n=118$) showed co-regulation (regulated in the same direction in all comparisons). Some of the aforementioned 16 proteins are related to cell-adhesion: RAB10, SH3GL1 and CTNND1 are cadherin binding proteins; CD63 and FLNA are involved in integrin signaling; NUMBL and CTNND1 play a role in adherens junction organization; and APP, RAB10, CTNND1 and FLNA are expressed in the cell junction. Hierarchical clustering of the 16 proteins altered in three brain regions was performed and a heat map was generated considering their expression during disease progression in all brain areas (Figure 2A). Two main protein clusters were detached in which the major differences were observed between controls and late disease stages. The cluster with augmented expression levels in late disease stages consists of 5 proteins including two well-known AD players: amyloid precursor protein (APP) and glial fibrillary acidic protein (GFAP), a marker of astrocytes. The other cluster harbors 9 proteins that show reduced levels in late B/B stages compared to controls.

We wondered if some proteins that were found to be altered during disease progression have already been associated with genetic risk for AD. A comparison was done between all 814 differentially expressed proteins and a list of AD risk genes recently published (Hu et al., 2017). We found that 31 proteins have already been described as AD risk loci, strengthening the validity of our data set (Figure 2B). With the aim to better clarify the relationship between these proteins, an interactome showing protein-protein interactions was built with String (Figure 2C). The majority of proteins are connected, and APP appears as a central node with the highest number of interactions. Functional enrichment analysis revealed that aerobic respiration and synapse are enriched among these proteins. Additionally, some of these proteins are involved in pathways related to Alzheimer's disease (APP, GRIN2B, GSK3 β , MT-ATP8, MT-CYB), Parkinson's disease (MT-ATP8, MT-CYB, MT-ND1, MT-ND4) and Huntington's disease (GRIN2B, MT-ATP8, MT-CYB, TFAM) (Table S3).

Analysis of altered pathways in the medial temporal lobe during AD progression

In order to evaluate segregation of disease stages and to observe expression profiles, hierarchical clustering of DEPs from MTL samples (EC and PHC) was performed. Four major protein clusters were found, which represent distinct expression patterns (early-up, early-down, late-up and late-down) during disease progression. The majority (>70%) of altered proteins were found down-regulated in AD, and the late-down cluster was the largest for both areas (Figure 3). With the aim to clarify which pathways and processes are altered during disease progression, each cluster was further subjected to enrichment and interactome analysis.

Regarding EC, pathway analysis indicated that oxidative phosphorylation is significantly enriched in the early-down cluster, which consist of 41 proteins. The late-down cluster incorporate 189 proteins, among which proteins involved in translation including ribosome subunits, and synaptic proteins are highly enriched. A greater impairment in oxidative phosphorylation was also observed in this cluster. On the other hand, the early-up cluster presents 24 proteins, some of which are associated with cell-cell adhesion and astrocyte development. Only 13 proteins belong to the late-up cluster, where regulation of gluconeogenesis and fatty-acid beta oxidation were found as enriched processes (Figure 3, Figure S7 and Table S4).

Considering PHC, 74 proteins are present in the early-down cluster, and as it was seen in EC oxidative phosphorylation is significantly enriched. Actin filament and synapse-based processes are also present in this cluster. PHC late-down cluster is composed of 133 proteins, which are related to oxidative phosphorylation, translation and synapse. Interestingly, these processes were also found in EC late-down cluster. PHC early-up cluster harbors 35 proteins, which are related to cell adhesion and platelet aggregation. Late-up cluster has 53 proteins that are associated with astrocyte development, cell adhesion, long chain fatty acid biosynthetic process and n-acetylglucosamine biosynthetic process (Figure 3, Figure S7 and Table S5). Remarkably, proteins involved in astrocyte development and cell adhesion were also present in EC early-up cluster.

Analysis of altered pathways in the neocortex during AD progression

Hierarchical clustering of DEPs from the neocortex samples was carried out as well, and the 4 previously described expression patterns (early-up, early-down, late-up and late-down) were also found in TC and FC (Figure 4). Similarly to MTL, down-regulated proteins were dominant in neocortex, while the early-down cluster proved to be the most populous. Functional enrichment and interactome analysis were performed on each protein cluster.

Considering TC, early-down cluster has 63 proteins that are mainly involved in synaptic processes and regulation of cytoskeleton. Late-down cluster presents 22 proteins that are related to cell adhesion processes. Early-up cluster consists of 53 proteins that are associated with lipid metabolism (lipid and cholesterol metabolic processes), lipid transport and oxidation-reduction process. Only 13 proteins compose TC late-up cluster, where protein kinase binding is one of the few processes found enriched (Figure 4, Figure S8 and Table S6).

Concerning FC, early-down cluster contains 74 proteins, which are mainly synaptic proteins. In total, 37 proteins form the late-down cluster of FC, where protein translation was found enriched. FC early-up cluster presents 27 proteins, which are related to acute phase response and cell adhesion mechanisms. Finally, FC late-up cluster includes 24 proteins that are involved in platelet degranulation and protein metabolic process (Figure 4, Figure S8 and Table S7).

Proteome profiling of healthy subjects reveals specific molecular signatures of the MTL and neocortex

Currently, the matter of brain area vulnerability in neurodegenerative disorders is a highly debated and unsolved question. Our goal was to identify distinctive proteomic signatures in the brain that can be associated with the susceptibility of some areas to present early degeneration in AD. The comparison of proteome from healthy individuals (controls) resulted in 698 differentially expressed proteins between the four brain areas (Table S8). Hierarchical clustering of all 698 DEPs was performed and the resulting dendrogram clearly separated MTL samples from neocortical samples (Figure 5A). DEPs were divided into 2 major clusters: one group of 256 proteins with higher levels in the neocortex compared to MTL (MTL-down) and another group of 442 proteins that are more expressed in MTL (MTL-up).

In order to clarify which pathways are more active in specific brain areas, each cluster was subjected to enrichment analysis using DAVID (Table S9). It is noteworthy that several overrepresented pathways in cluster MTL-up have already known link to AD, such as energy production (oxidative phosphorylation), insulin signaling pathway, protein translation, proteasome (Figure 5B). Long-term potentiation is also significantly enriched in this cluster. A total of 16 ribosomal proteins (RPL17, RPL27A, RPL36, RPL38, RPS4X, RPS16, RPL23, RPL9, RPS14, RPS12, RPL10, RPL5, RPS10, RPS20, RPS11, RPL4) and 13 proteins from proteasome-complex (RAD23A, UBQLN1, PSMA2, PSMD12, PSMC4, PSME1, PSMC2, PSMB3, PSMD10, PSMC1, PSMB2, PSMD7, PSMD8) were found among the proteins significantly upregulated in MTL. Additionally, a greater number of mitochondrial proteins was recognized in cluster MTL-up (84 proteins, 19.26%) compared to cluster MTL-down (26 proteins, 10.4%). The protein-protein interactome that was built based on the 442 proteins up-regulated in MTL (Figure 5C), further confirmed previous enrichment results performed with DAVID. Proteins involved in pathways related to ribosome, oxidative phosphorylation, metabolism and AD (including APOE) are highly enriched and form specific clusters in the network.

Regarding the cluster of proteins significantly upregulated in neocortex, some proteins involved in proteasome regulation (negative regulation of proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process, GO:0032435), e.g. UBXN1, BAG6 and CCAR2 are enriched in this cluster, but none of them belongs to the proteasome complex. Proteins involved in mRNA splicing via spliceosome (HNRNPL, SRSF1, NONO, SRSF2, SF3B1, SRSF7, ELAVL1, RBMX, YBX1) and in integrin-mediated signaling pathway (ADAM23, LAMA5, SEMA7A, ADAM22, ZYX, DST) are exclusively enriched in this cluster. Cytoskeleton and synapse related proteins are overrepresented in both clusters.

Comparative analysis with other proteomic studies in AD validate altered proteins and reveal important pathways

With the aim to confirm the validity of our findings, we sought to compare our full dataset of dysregulated proteins during AD progression (814 proteins in the four brain regions) with the lists of altered proteins reported by three recently published AD proteomic studies (Honius et al., 2016; Seyfried et al., 2017; Zelaya et al.,

2015). In total, 406 proteins are shared between at least two studies, 62 proteins are common to three studies and 5 proteins were dysregulated in AD in all four studies (Figure 6A; Table S10). An inspection of the direction of changes in protein expression (up or down-regulated) throughout the four proteomic studies revealed that there is a great agreement with respect to the 5 common proteins (GFAP, ASAHI, CORO1A, PACSIN1 and TUBA4A) (Table S10, highlighted). This is especially interesting, since the three previous works focused on different brain regions: olfactory bulb [12], hippocampus [14] and dorsolateral prefrontal cortex [17].

To unravel the role of the conserved proteins, pathway enrichment analysis was carried out using proteins shared between at least two studies. Only co-regulated proteins (same direction of change in all studies) were evaluated in this analysis. Among up-regulated proteins, the most significant functions were extracellular matrix/cell adhesion, metabolic pathways (fatty acid beta-oxidation, pentose-phosphate shunt, and gluconeogenesis), platelet degranulation and astrocyte development (Figure 6B). On the other hand, down-regulated proteins are mainly involved in transport, cytoskeleton, Wnt signaling, ephrin receptor signaling, mitochondrial electron transport, and synaptic related processes (Figure 6B).

Remarkably, 255 proteins that showed alteration during AD in the present study have already been described in at least one of the three previously published works. Additionally, the majority of these proteins (201) shows co-regulation (Table S10). With the aim to better evaluate the similarity between our results and other proteomic studies, we compared the log₂ fold changes of overlapping altered proteins (Figure 6C). Moderate correlation (R^2) was found between our results and two other datasets (Hondius *et al.* and Seyfried *et al.*), while low correlation was found with the study from Zelaya *et al.* It is important to note that, although there are differences between the log₂ fold changes of various proteins, which has an impact on the correlation, the great majority of shared proteins are co-regulated. Overall, these results reinforce the validity of our proteomic findings.

Discussion

Proteomic changes during AD progression show a complex scenario with a few shared but mostly specific processes in the different brain regions

We observed a few dysregulated proteins and pathways during AD course that are shared between 2 or more brain regions, possibly indicating their importance in the pathogenesis of the disease. A summary of the most important common pathways is depicted on Figure 7A. Many proteins however were exclusively dysregulated in specific brain areas and the majority of altered pathways during the disease course was specific to certain brain regions. Regarding the progress of the disease, the similarities and differences found between the individual brain regions are most likely linked to the high degree of specialization of the brain. In accordance with the endogenous specificities of various brain areas we hypothesize that genetic and environmental triggers of AD affect individual brain regions differentially, and this is reflected in the found diversity of dysregulated protein expression. In other words, we assume that the regionally different responses to early AD triggers are the consequences of the different proteomic background of each region. In some regions, proteomic changes may already be observed independent of the presence of classic pathological features of AD (e.g. tau protein aggregation). For instance, changes of the proteome in neocortical areas were observed in early B/B stages, suggesting that these regions have already responded to AD triggers regardless of tau seeding. According to our proteomic data synapse loss occurred in all analyzed regions, indicating that this process is ubiquitous in AD.

Synapse loss, translation dysregulation and oxidative phosphorylation impairment during AD progression and their implications to disease

Processes associated with synapse were found down-regulated in AD in all four brain areas. Synapse loss is a pathological hallmark of AD and it is an early event in disease, occurring before neuron death (Scheff et al., 2006). Synaptic degeneration presents the best correlation with cognitive impairment, even higher than NFT or A β plaques deposition (Terry et al., 1991). The alteration of synaptic proteins was observed in both neocortical regions during early B/B stages (Tables S6, S7 and Figures 7A, S8), which suggests that earlier events, occurring before the accumulation of insoluble tau tangles, trigger neuron dysfunction. This is supported by previous studies, which reported that synapse loss occurs before tangles formation in a tauopathy mouse model (Yoshiyama et al., 2007) and soluble tau causes synaptic dysfunction in an early AD model (Polydoro et al., 2013).

Additionally, A β peptide has also been shown to cause synaptic degeneration (Walsh et al., 2002).

Several proteins involved in translation were found down-regulated in AD, mostly in 3 regions (EC, PHC, and FC). In total, 21 ribosomal subunits and 4 translation initiation factors showed reduced levels in these regions, however in TC only 3 translational proteins were altered (1 down- and 2 up-regulated in AD). Some of the translation regulators were altered already in early B/B stages in neocortical regions, indicating dysregulated pathways before insoluble tau deposition. In line with our findings several studies reported altered protein synthesis and ribosomal protein expression in various brain regions from AD patients (Ding, 2005; Garcia-Esparcia et al., 2017; Hernández-Ortega et al., 2015). Previous research identified high number of translation machinery members among A β oligomers interacting partners (Virok et al., 2011), and it was found that tau interactome is enriched for proteins involved in translation and RNA processing (Gunawardana et al., 2015). Furthermore, it was reported that tau isolated from AD patients binds to more ribosomal proteins than tau from control subjects, and tau oligomers inhibit translation process (Meier et al., 2016). Table S11 summarizes the 27 dysregulated translation proteins in our AD cohort, associating our findings with literature data.

Reduced levels of oxidative phosphorylation proteins were observed during early B/B stages in both MTL regions, with a higher number of proteins being affected during late stages (Tables S4, S5). In both EC and PHC, subunits of all electron transport chain complexes (I-V) were down-regulated. In contrast, in neocortical regions only 3 oxidative phosphorylation proteins were downregulated (NDUFS6 and COX6B1 in TC, and NDUFA6 in FC). Hypometabolism is a known feature of AD brains, occurring years before the onset of symptoms in AD-vulnerable regions (de Leon et al., 2001; Mosconi et al., 2008). Previous studies with human tissue and animal models showed that proteins involved in energy generation in mitochondria, including mitochondrial electron transport chain subunits, are dysregulated in AD (Liang et al., 2008; Shevchenko et al., 2012). Finally, a complex regulatory mechanism underlies metabolism control, A β and tau. A β and tau have been implicated in the impairment of oxidative phosphorylation (Rhein et al., 2009) and it was reported that APP is able to inhibit oxidative phosphorylation independently of A β peptide (Lopez Sanchez et al., 2017). Animal studies have demonstrated that tau

has a new physiological function in insulin signaling regulation (Marciniak et al., 2017), and that energy deprivation increases the translation of BACE1, resulting in higher A β levels (O'Connor et al., 2008). Furthermore that glucose deficit induces tau phosphorylation and aggregation in a tauopathy mouse model (Lauretti et al., 2017).

Vulnerability of brain areas to AD

An intriguing question in AD and other neurodegenerative disorders is why do some brain regions accumulate toxic protein aggregates and degenerate first. To gain potential insights into this, we analyzed proteomic differences between EC, PHC, TC and FC in healthy control subjects.

Hierarchical clustering resulted in a clear segregation of MTL and neocortex samples (Figure 5A) that is consistent with the anatomical and functional differences of these regions. The MTL is involved primarily in memory functions (Squire et al., 2004), while the neocortex is rather related to cognitive processes (Rakic, 2009). MTL has high energy demands due to increased synaptic plasticity (memory formation and storage) and the presence of large neurons (Mosconi, 2013), which is in line with our results that metabolism-related pathways (metabolic pathways, oxidative phosphorylation, insulin signaling) and mitochondrial proteins were highly overrepresented in the cluster of proteins with augmented levels in MTL. Translation and proteasome pathways were also significantly enriched in MTL, indicating an accelerated proteostasis; as well as long-term potentiation that is consistent with EC and PHC involvement in memory formation (Figure 5B). Interestingly, Alzheimer's disease KEGG pathway was also found enriched in the cluster of proteins overexpressed in MTL (23 proteins, p-value= 1.41e-7).

Remarkably, one of these AD proteins was APOE, the major genetic risk factor for late-onset AD (Corder et al., 1993). APOE level was significantly higher in PHC compared to both neocortical regions. Although it was not significant, APOE showed considerably higher expression in EC compared to the neocortex. In addition, no significant difference for APOE level was found between PHC and EC. A previous work reporting that APOE mRNA level is augmented in EC compared to other brain areas (Liang et al., 2007) also strengthens our assumption that the MTL expresses APOE in higher level. Further studies are required to confirm this. Recent studies elucidated the missing link between APOE, A β and tau, since it has been shown that

APOE ε4 allele mediates and exacerbates tau toxic effects (Shi et al., 2017) and *APOE* mediates APP transcriptional regulation in such a way that *APOE ε4* presenting the highest induction of APP expression and *APOE ε2* the lowest (Huang et al., 2017). Accordingly, *APOE ε4* represents an increased risk for AD, while *APOE ε2* is protective against AD (Yu et al., 2014). *APOE* plays a role in metabolism regulation and it is known that *APOE* isoforms differently regulate glucose pathways (Keeney et al., 2015). It has been previously shown that *APOE ε4* decreases the levels of mitochondrial respiratory complexes, further linking *APOE* to mitochondrial metabolism (Chen et al., 2011). In addition, *APOE* has transcriptional factor activity as it binds to the promoter of genes related to trophic support, programmed cell death, microtubule disassembly, synaptic function, aging and insulin resistance (Theendakara et al., 2016).

Considering the increased *APOE* level in MTL, the relevance of metabolic control in this region, as well as the relationship between *APOE*, Aβ and tau, we summarize how differences in *APOE* expression could be related to MTL vulnerability to AD (Figure 7B). We believe that 1) the proteomic background, including higher *APOE* level together with 2) the high energy demand of MTL, impaired early in AD, make this region more susceptible to early triggers of AD. A previous work described correlation between AD histopathological staging and the expression pattern of proteins that co-aggregate with plaques and tangles, as well as proteins involved in Aβ and tau homeostasis (Freer et al., 2016). These observations collectively suggest that a sum of factors might account for brain region vulnerability to AD and the whole picture needs to be elucidated.

Comparison of proteomic studies in AD reveals overlapping proteins and pathways

A recent review about proteomic studies in AD reported low reproducibility between distinct works (Moya-Alvarado et al., 2016). However, we compared three proteomic datasets with the results reported in the present work, and 406 overlapping DEPs between at least two studies were identified. Strikingly, the great majority of shared proteins between our work and the other datasets were co-regulated. This shows that there is a certain degree of overlap between these proteomic studies, and most probably, this overlap indicates important proteins to AD pathology. A recent

work that compared the results from three transcriptomic studies on human hippocampus in AD (Hargis and Blalock, 2017), revealed that the overlapping up- and down-regulated genes are involved mainly in cell adhesion and platelet aggregation, and in energy metabolism and synaptic processes, respectively. This is in great accordance with the results we got for the overlapping proteins between proteomic studies in AD (Figure 6B), where cell adhesion and platelet aggregation were enriched for up-regulated proteins, and mitochondrial electron transport, cytoskeleton and synaptic related processes were enriched for down-regulated proteins. This further strengthens the view that there are key proteins and pathways commonly identified by distinct transcriptomic/proteomic studies which are of importance to AD etiology.

Conclusions

To the best of our knowledge this work provides the first description of the proteomic changes during AD progression in brain regions early and late affected by tau pathology. We identified peculiar mechanisms to each region, but also found processes that are shared between regions possibly representing fundamental features involved in disease etiology. Based on the different proteomic signatures of MTL and neocortex, we contextualized brain region vulnerability to AD with the current A β /tau paradigm. In summary, this work provides insights into how distinct brain regions behave in health and during the course of AD. The results found strengthen the view that the series of events leading to AD should be investigated at the whole brain level, since the inherent characteristics of each brain region might be related to specific molecular alterations during disease. Future studies spanning more areas are needed to better clarify the cascade of events involved in AD and why particular brain regions are affected first by certain neurodegenerative diseases.

Abbreviations

AD - Alzheimer's disease, EC - entorhinal cortex, PHC - parahippocampal cortex, TC - temporal cortex, FC - frontal cortex, MTL – medial temporal lobe, NFT - neurofibrillary tangles, A β - amyloid β peptide, DEP – differentially expressed protein, AMBIC – ammonium-bicarbonate, DTT – dithiothreitol, IAA – iodoacetamide, TFA - trifluoroacetic acid

Declarations

Acknowledgements

The authors thank Magdolna Toronyay-Kasztner and Alexander Rappensberger for technical assistance, and Zsolt Horváth for help in preparation of illustrations.

Funding

A joint grant from the South Swedish healthcare sector Region Skåne and the Brazilian Research Foundation supported this study. We thank financial support from Coordination of Improvement of Higher Education (CAPES) and Hungarian Brain Research Program (2017-1.2.1-NKP-2017-00002).

Availability of data and materials

The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD010138.

Authors' contributions

CFM conceived the original idea. CFM and MR conceived and planned the experiments. CFM performed the experiments of entorhinal, parahippocampal and temporal cortex, MK performed the experiments of frontal cortex. MR advised mass spectrometry analysis. IP advised statistical procedures. IP, CFM, MR and MK contributed to define the statistical workflow. CFM analyzed data and performed biological interpretation. CFM wrote the article. MR, GBD, FCSN, GMV, PD, TH, ER and MP revised the article. LC and TH carried out histopathological examination of samples and contributed to manuscript drafting. MP, ER provided samples and contributed to manuscript drafting. PD participated in the conception of the project, contributed to manuscript drafting and gave elucidations about the involvement of each brain region in B/B staging during discussions with CFM and MR. MR, GBD, FCSN and GMV supervised the work.

Ethics approval

Ethical approval was given by the Semmelweis University Regional Committee of Science and Research Ethic (No. 32/1992/TUKEB) and the Committee of Science and Research Ethic of the Ministry of Health in Hungary (No. 6008/8/2002/ETT).

Consent for publication

All authors have approved of the contents of this manuscript and provided consent for publication.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

- 2017 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*. 13, 325-373.
- Bossers, K., et al., 2010. Concerted changes in transcripts in the prefrontal cortex precede neuropathology in Alzheimer's disease. *Brain*. 133, 3699-3723.
- Braak, H., Braak, E., 1991. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*. 82, 239-259.
- Chen, H. K., et al., 2011. Apolipoprotein E4 domain interaction mediates detrimental effects on mitochondria and is a potential therapeutic target for Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 286, 5215-21.
- Corder, E. H., et al., 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 261, 921-3.
- de Leon, M. J., et al., 2001. Prediction of cognitive decline in normal elderly subjects with 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxy-D-glucose/positron-emission tomography (FDG/PET). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98, 10966-10971.
- Ding, Q., 2005. Ribosome Dysfunction Is an Early Event in Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience*. 25, 9171-9175.
- Freer, R., et al., 2016. A protein homeostasis signature in healthy brains recapitulates tissue vulnerability to Alzheimers disease. *Science Advances*. 2, e1600947-e1600947.
- Garcia-Esparcia, P., et al., 2017. Altered mechanisms of protein synthesis in frontal cortex in Alzheimer disease and a mouse model. *Am J Neurodegener Dis*. 6, 15-25.
- Gunawardana, C. G., et al., 2015. The Human Tau Interactome: Binding to the Ribonucleoproteome, and Impaired Binding of the Proline-to-Leucine Mutant at Position 301 (P301L) to Chaperones and the Proteasome. *Molecular & Cellular Proteomics*. 14, 3000-3014.
- Hargis, K. E., Blalock, E. M., 2017. Transcriptional signatures of brain aging and Alzheimer's disease: What are our rodent models telling us? *Behav Brain Res*. 322, 311-328.
- Hernández-Ortega, K., et al., 2015. Altered Machinery of Protein Synthesis in Alzheimer's: From the Nucleolus to the Ribosome. *Brain Pathology*. 26, 593-605.
- Hondius, D. C., et al., 2016. Profiling the human hippocampal proteome at all pathologic stages of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*. 12, 654-668.

- Hu, Y.-S., et al., 2017. Analyzing the genes related to Alzheimer's disease via a network and pathway-based approach. *Alzheimer's Research & Therapy*. 9.
- Huang, Y.-W. A., et al., 2017. ApoE2, ApoE3, and ApoE4 Differentially Stimulate APP Transcription and A β Secretion. *Cell*. 168, 427-441.e21.
- Hyman, B. T., et al., 2012. National Institute on Aging—Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*. 8, 1-13.
- Keeney, J. T.-R., et al., 2015. Human ApoE Isoforms Differentially Modulate Glucose and Amyloid Metabolic Pathways in Female Brain: Evidence of the Mechanism of Neuroprotection by ApoE2 and Implications for Alzheimer's Disease Prevention and Early Intervention. *Journal of Alzheimer's Disease*. 48, 411-424.
- Lachén-Montes, M., et al., 2017. Olfactory bulb neuroproteomics reveals a chronological perturbation of survival routes and a disruption of prohibitin complex during Alzheimer's disease progression. *Scientific Reports*. 7.
- Lau, P., et al., 2013. Alteration of the microRNA network during the progression of Alzheimer's disease. *EMBO Molecular Medicine*. 5, 1613-1634.
- Lauretti, E., et al., 2017. Glucose deficit triggers tau pathology and synaptic dysfunction in a tauopathy mouse model. *Translational Psychiatry*. 7, e1020-e1020.
- Liang, W. S., et al., 2007. Gene expression profiles in anatomically and functionally distinct regions of the normal aged human brain. *Physiological Genomics*. 28, 311-322.
- Liang, W. S., et al., 2008. Alzheimer's disease is associated with reduced expression of energy metabolism genes in posterior cingulate neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105, 4441-4446.
- Lopez Sanchez, M. I. G., et al., 2017. Amyloid precursor protein drives down-regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation independent of amyloid beta. *Scientific Reports*. 7.
- Marciniak, E., et al., 2017. Tau deletion promotes brain insulin resistance. *The Journal of Experimental Medicine*. 214, 2257-2269.
- Martin, B., et al., 2008. iTRAQ Analysis of Complex Proteome Alterations in 3xTgAD Alzheimer's Mice: Understanding the Interface between Physiology and Disease. *PLoS ONE*. 3, e2750.
- Masters, C. L., et al., 2015. Alzheimer's disease. *Nature Reviews Disease Primers*. 15056.
- Matarin, M., et al., 2015. A Genome-wide Gene-Expression Analysis and Database in Transgenic Mice during Development of Amyloid or Tau Pathology. *Cell Reports*. 10, 633-644.

- Meier, S., et al., 2016. Pathological Tau Promotes Neuronal Damage by Impairing Ribosomal Function and Decreasing Protein Synthesis. *Journal of Neuroscience*. 36, 1001-1007.
- Miyashita, A., et al., 2014. Genes associated with the progression of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Translational Psychiatry*. 4, e396-e396.
- Mosconi, L., 2013. Glucose metabolism in normal aging and Alzheimer's disease: methodological and physiological considerations for PET studies. *Clinical and Translational Imaging*. 1, 217-233.
- Mosconi, L., et al., 2008. Hippocampal hypometabolism predicts cognitive decline from normal aging. *Neurobiology of Aging*. 29, 676-692.
- Moya-Alvarado, G., et al., 2016. Neurodegeneration and Alzheimer's disease (AD). What Can Proteomics Tell Us About the Alzheimer's Brain? *Mol Cell Proteomics*. 15, 409-25.
- Nelson, P. T., et al., 2007. Clinicopathologic Correlations in a Large Alzheimer Disease Center Autopsy Cohort. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 66, 1136-1146.
- O'Connor, T., et al., 2008. Phosphorylation of the Translation Initiation Factor eIF2 α Increases BACE1 Levels and Promotes Amyloidogenesis. *Neuron*. 60, 988-1009.
- Polydoro, M., et al., 2013. Soluble pathological tau in the entorhinal cortex leads to presynaptic deficits in an early Alzheimer's disease model. *Acta Neuropathologica*. 127, 257-270.
- Rakic, P., 2009. Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. *Nature Reviews Neuroscience*. 10, 724-735.
- Rhein, V., et al., 2009. Amyloid- and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106, 20057-20062.
- Scheff, S. W., et al., 2006. Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiology of Aging*. 27, 1372-1384.
- Schonberger, S. J., et al., 2001. Proteomic analysis of the brain in Alzheimer's disease: Molecular phenotype of a complex disease process. *PROTEOMICS*. 1, 1519.
- Seyfried, N. T., et al., 2017. A Multi-network Approach Identifies Protein-Specific Co-expression in Asymptomatic and Symptomatic Alzheimer's Disease. *Cell Systems*. 4, 60-72.e4.
- Shevchenko, G., et al., 2012. Longitudinal Characterization of the Brain Proteomes for the Tg2576 Amyloid Mouse Model Using Shotgun Based Mass Spectrometry. *Journal of Proteome Research*. 11, 6159-6174.

- Shi, Y., et al., 2017. ApoE4 markedly exacerbates tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of tauopathy. *Nature*. 549, 523-527.
- Squire, L. R., et al., 2004. THE MEDIAL TEMPORAL LOBE. *Annual Review of Neuroscience*. 27, 279-306.
- Terry, R. D., et al., 1991. Physical basis of cognitive alterations in alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Annals of Neurology*. 30, 572-580.
- Thal, D. R., et al., 2002. Phases of A β -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*. 58, 1791-1800.
- Theendakara, V., et al., 2016. Direct Transcriptional Effects of Apolipoprotein E. *Journal of Neuroscience*. 36, 685-700.
- Virok, D. P., et al., 2011. Protein Array Based Interactome Analysis of Amyloid- β Indicates an Inhibition of Protein Translation. *Journal of Proteome Research*. 10, 1538-1547.
- Vizcaíno, J. A., et al., 2015. 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Research*. 44, D447-D456.
- Walsh, D. M., et al., 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*. 416, 535-539.
- Wisniewski, J. R., et al., 2009. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods*. 6, 359-62.
- Yoshiyama, Y., et al., 2007. Synapse Loss and Microglial Activation Precede Tangles in a P301S Tauopathy Mouse Model. *Neuron*. 53, 337-351.
- Yu, J.-T., et al., 2014. Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease: An Update. *Annual Review of Neuroscience*. 37, 79-100.
- Zahid, S., et al., 2014. Differential Expression of Proteins in Brain Regions of Alzheimer's Disease Patients. *Neurochemical Research*. 39, 208-215.
- Zelaya, M. V., et al., 2015. Olfactory bulb proteome dynamics during the progression of sporadic Alzheimer's disease: identification of common and distinct olfactory targets across Alzheimer-related co-pathologies. *Oncotarget*. 6.

Gene names	Early AD (B/B I-III)				Late AD (B/B IV-VI)				in AD vs control			
	EC	PHC	TC	FC	EC	PHC	TC	FC	EC	PHC	TC	FC
NUMBL		█				█	█	█		█	█	█
STRN4			█			█	█	█		█	█	█
RAB3B						█	█	█		█	█	█
SH3GL1						█	█	█		█	█	█
CTNND1				█	█		█		█		█	

RAB10										
CEP170B										
AUH										
RFTN1	Red							Red		
CD63		Green	Red						Red	
BCL2L13					Green		Red			
FLNA	Red	Red		Red	Red					Red
GFAP	Red			Red	Red					Red
RNPEP	Red					Red				Red
TPP1			Red			Red			Red	Red
APP						Red	Red			Red
TANC2				Green	Green					Green
GRIN2B										
SH2D5										
CSNK1E				Green						
DLGAP3				Green						
RPL23A				Green						
BSN						Green				Green
SGIP1							Green			Green
CAMK4							Green			Green
FBXL16		Green		Green					Green	
RIMS1				Green					Green	
EXOC3					Green					
PFDN6					Green					
SLC27A4					Green					
SUB1				Green						
MTMR1							Green			
DMXL2								Green		
GRIN1								Green		
ACSF2									Green	
KIAA1217									Green	
VGF									Green	
CYFIP2									Green	
EMC1	Green				Green					
LINGO1	Green				Green					
CA4				Green	Green					
PLXNA1				Green	Green					
RPTOR				Green	Green					
NCALD				Green	Green					
SCN2A					Green		Green			

C2CD4C											
PRPSAP1											
IGSF21											
RAB11FIP5											
NRGN											
MAP2											
ACYP2											
COX6B1											
PCLO											
DLGAP1											
CTTN											
AGFG1											
SYNGAP1											
HOMER1											
CORO1A											
PHACTR1											
FABP3											
PIK3R1											
ERC2											
FKBP1A											
MARK2											
TRIM3											
CHN1											
SCYL1											
RAB3GAP1											
STXBP6											
ATPAF1											
DIRAS2											
LRRC57											
DYNLL2											
EXOC7											
RAB33B											
SRC											
FGF12											
SDHC											
FAM134A											
CD82											
RAP2A											
VAMP2											
SLC25A46											

UQCR10									
AP3M2									
FXYD7									
HPCA									
PCCB									
RPS13									
THY1									
MT-ND4									
SYT7									
GMPS									
GAP43									
RPA3	Red								
SCFD1		Green				Green	Red		
TARDBP		Green			Red			Red	
SLC24A2		Red			Red			Red	Green
FDXR		Red			Green			Red	
KRT2		Red			Green			Red	
EXOC2					Green	Red		Green	Red
RPL23					Green			Green	
GABRA1					Green	Red		Green	Red
ESYT1					Green	Red		Green	Red
DIRAS1					Red	Red		Red	
GGA3					Green		Red	Green	Red
VIM	Red				Red	Red		Red	
GYG1	Red		Red			Red		Red	
CAPG	Red		Red			Red	Red		Red
ANXA1		Red			Red	Red		Red	
CAPS		Red			Red	Red		Red	
HP		Red		Red		Red		Red	
SCARB2			Red		Red	Red		Red	
ORM1				Red		Red	Red		Red
CCBL2	Red	Red					Red	Red	
CLIC1	Red					Red			
PITPNB	Red					Red			
GNG5	Red		Red				Red		Red
BDH2					Red	Red		Red	
PLIN3					Red	Red		Red	
SPR		Red				Red		Red	
EDF1		Red		Red				Red	
VAT1			Red		Red			Red	

HAPLN2						Red	Red			Red	Red	
PFKFB2				Red		Red				Red		Red
GART				Red		Red				Red		Red
CD44						Red			Red			Red
C3						Red			Red			Red
VCAN						Red			Red			Red
ALB						Red			Red			Red
STOM			Red	Red						Red	Red	

Table 1. Differentially expressed proteins (DEPs) during AD progression that are shared between brain regions. Green color indicates down-regulated, red color indicates up-regulated genes.

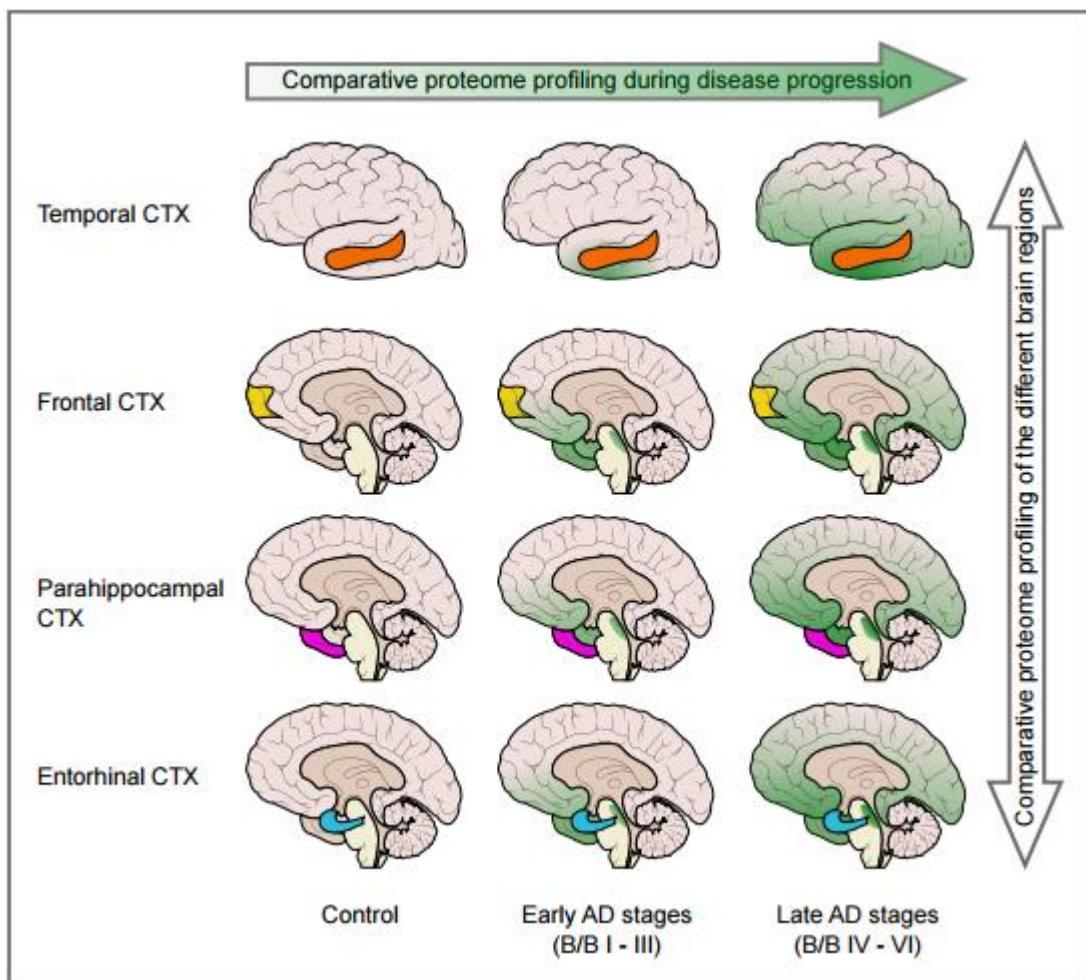


Figure 1. Graphical illustration of the study design. Two approaches were employed in the study: 1) comparative proteome profiling during disease progression to unravel altered proteins/pathways in different brain regions and 2) comparative proteome profiling of different brain regions in healthy subjects to investigate brain region vulnerability to AD.

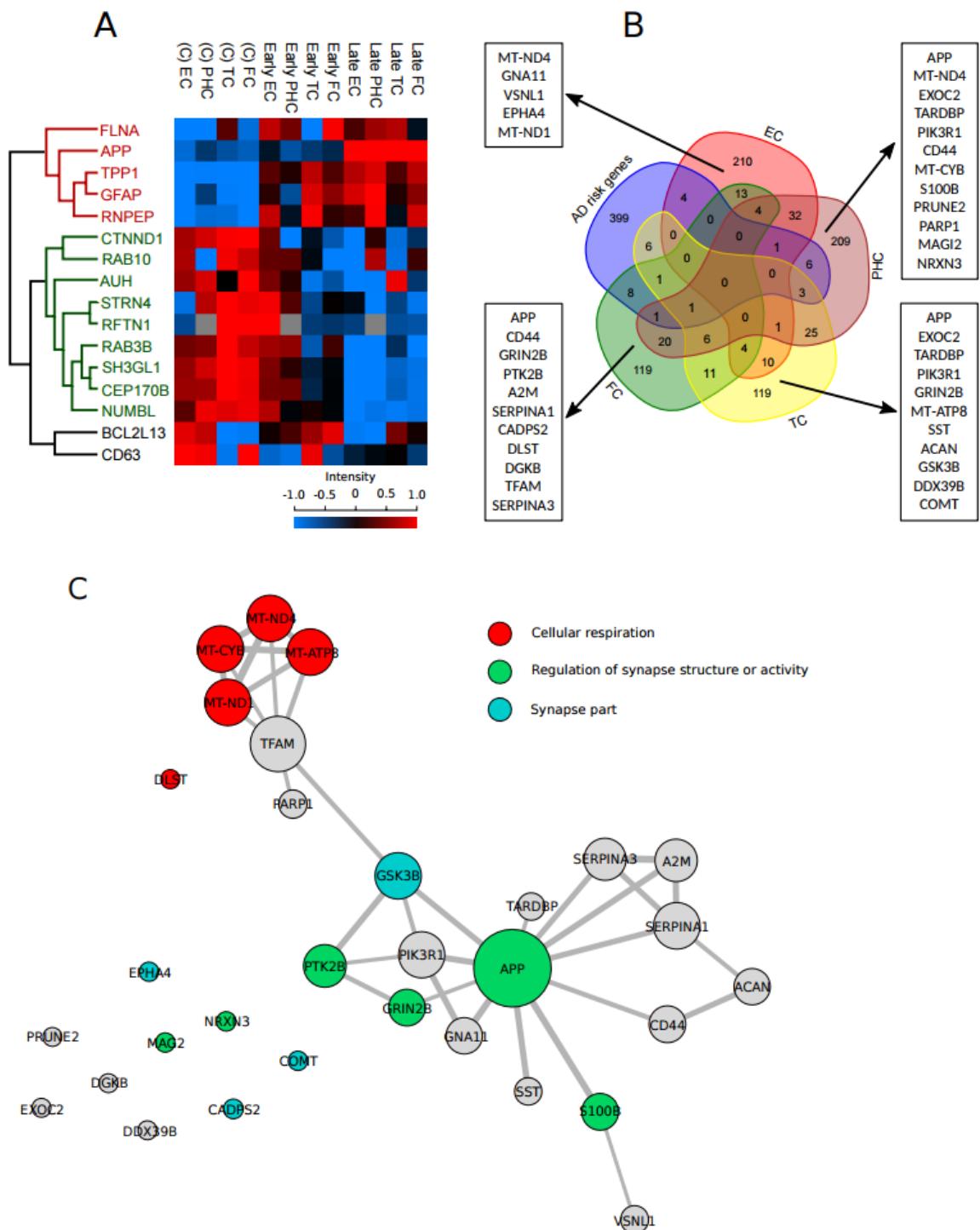


Figure 2. Proteins differentially expressed during AD progression. **A)** Hierarchical clustering of 16 proteins that are altered in 3 brain regions. Proteins labeled in red: up-regulated during AD course; proteins labeled in green: down-regulated during AD course. **B)** Venn diagram showing the overlap of AD risk loci with DEPs found in each brain region. **C)** Protein interactome of DEPs described as AD risk genes. Node size is proportional to the number of edges.

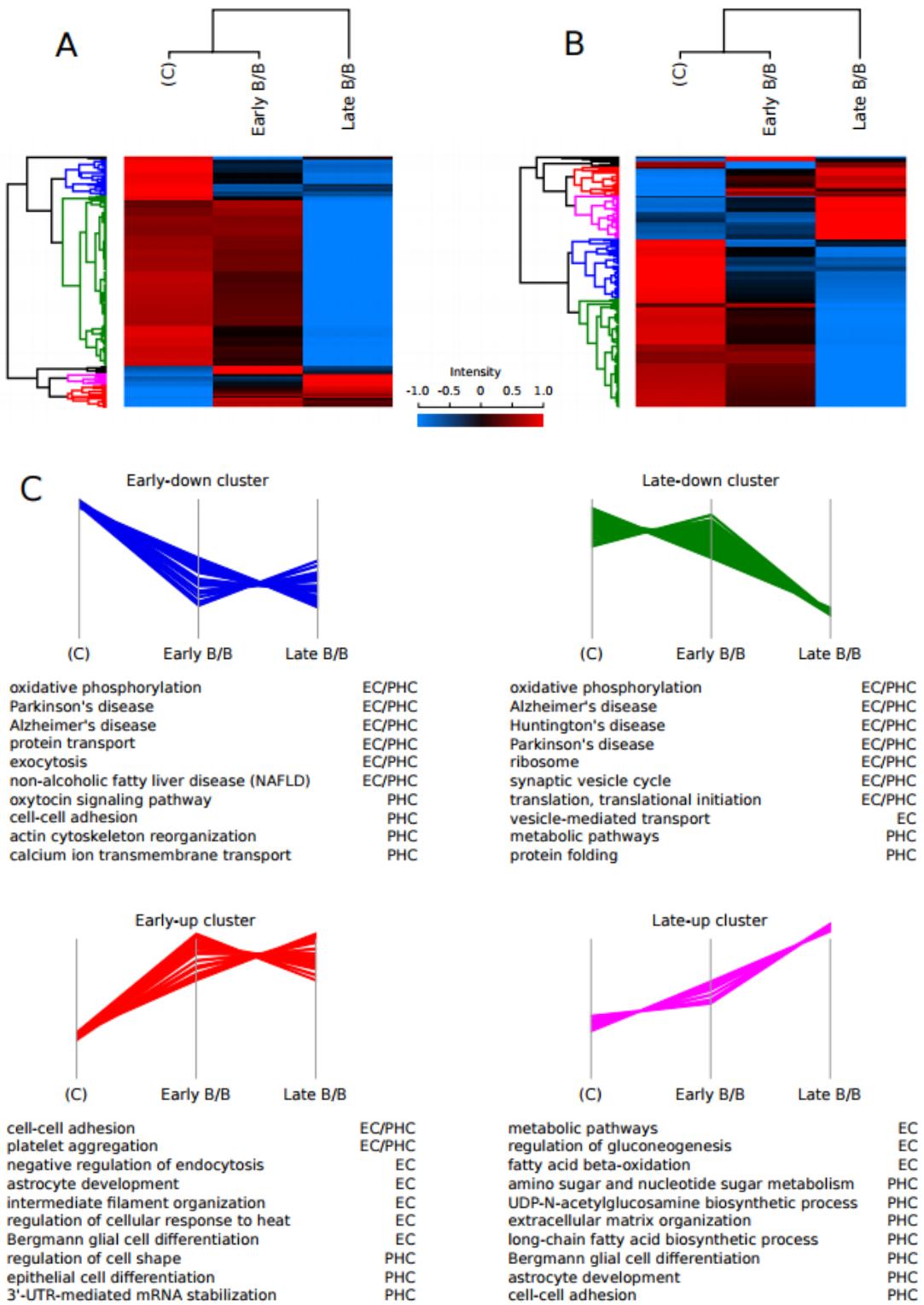


Figure 3. Hierarchical clustering and functional enrichment analysis of DEPs in the MTL during AD progression. A) Heat map built with DEPs found in EC. B) Heat map built with DEPs found in PHC. C) Clusters representing the four typical expression profiles are colored accordingly to the heat map. The most significant pathways and biological processes (4-10) are listed for each expression profile.

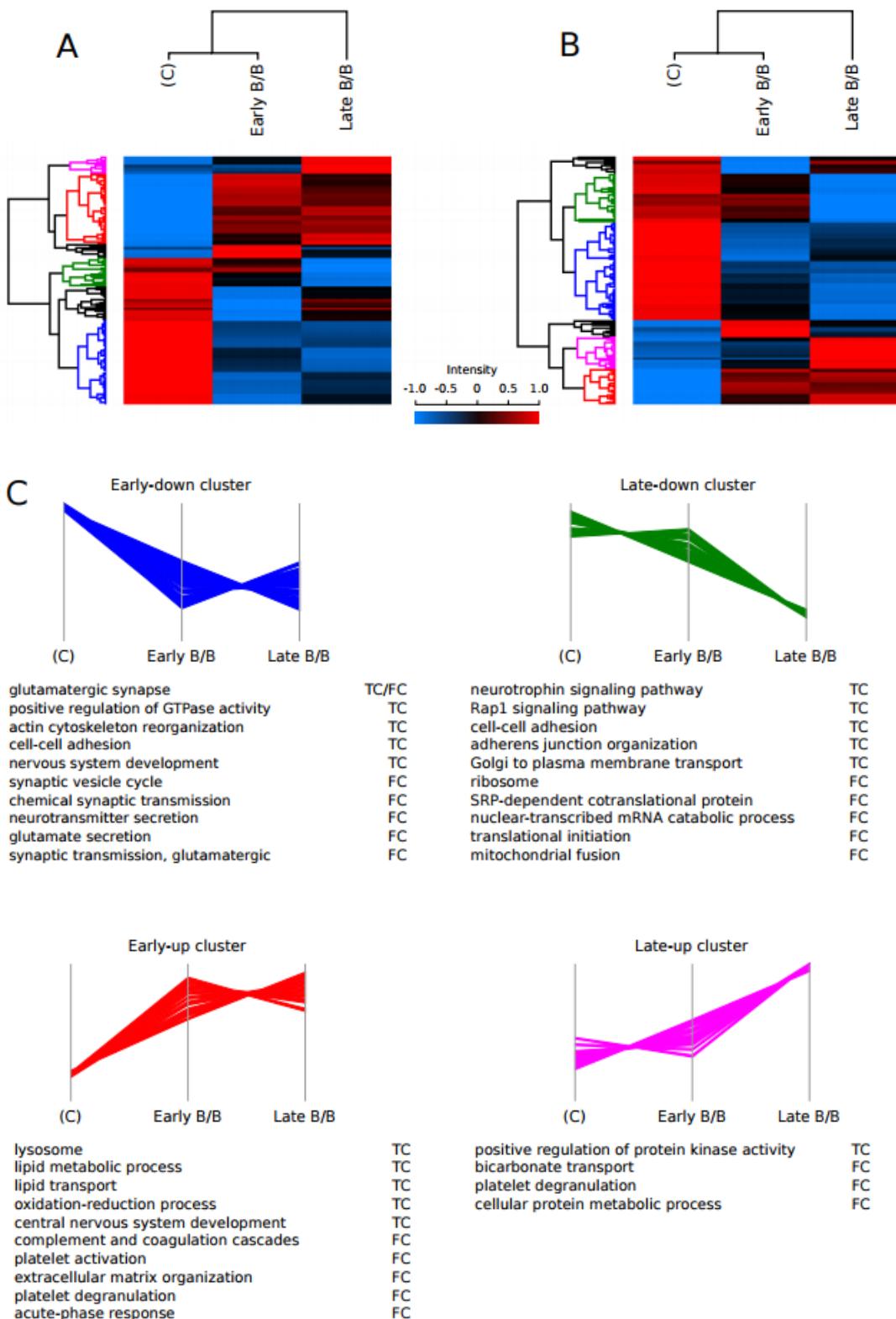


Figure 4. Hierarchical clustering and functional enrichment analysis of DEPs in the neocortex during AD progression. **A)** Heat map built with DEPs found in TC. **B)** Heat map built with DEPs found in FC. **C)** Clusters representing the four typical expression profiles are colored accordingly to the heat map. The most significant pathways and biological processes (4-10) are listed for each expression profile.

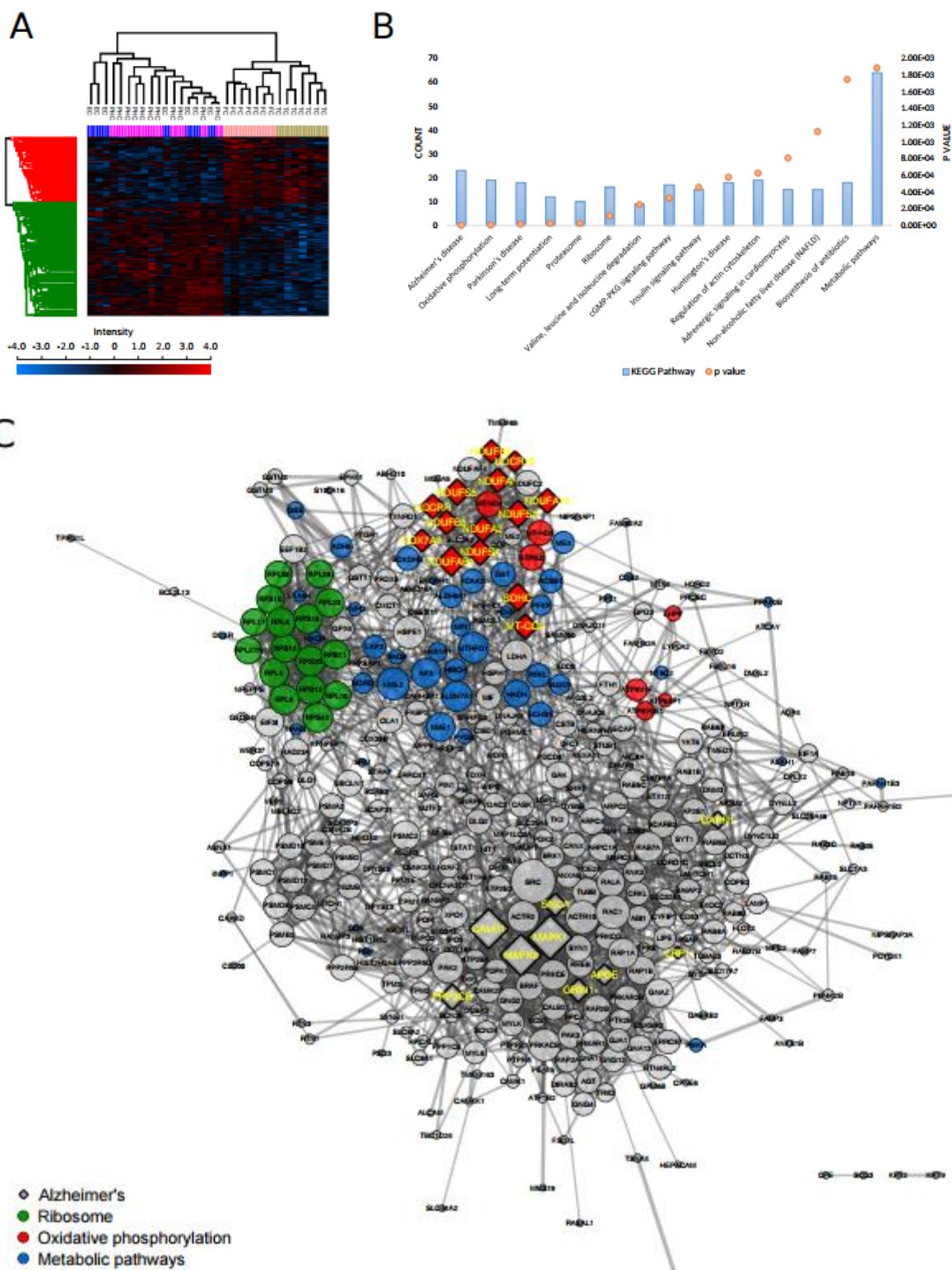
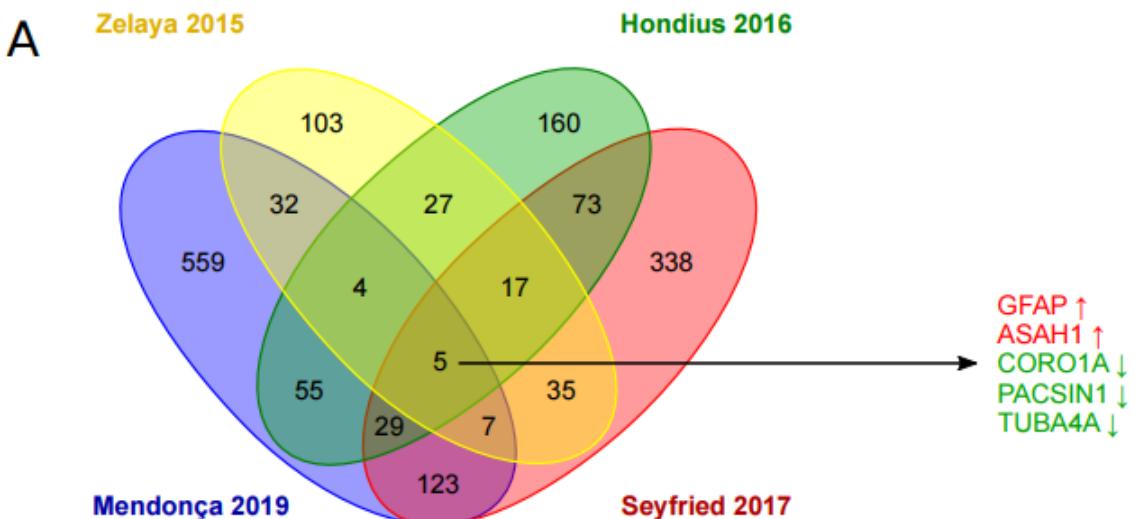


Figure 5. Hierarchical clustering, pathway and interactome analysis of DEPs between brain regions in healthy subjects. **A)** Heat map built with DEPs between brain regions. **B)** Top 15 pathways enriched for proteins up-regulated in MTL. **C)** Protein-protein interactome for proteins present in cluster MTL-up.



B

GOBP (up-regulated in AD)	Count	p-value	GOBP (down-regulated in AD)	Count	p-value
extracellular matrix organization	11	2.14E-07	cytoskeleton organization	17	1.40E-09
extracellular matrix disassembly	6	8.13E-05	microtubule-based process	10	1.50E-09
fatty acid beta-oxidation	5	1.24E-04	vesicle-mediated transport	14	2.98E-07
cell-cell adhesion	9	1.86E-04	Wnt signaling pathway	8	1.20E-06
osteoblast differentiation	6	3.56E-04	movement of cell or subcell. component	10	3.92E-06
cell adhesion	10	1.44E-03	ephrin receptor signaling pathway	10	3.92E-06
platelet aggregation	4	1.75E-03	endocytosis	12	5.27E-06
pentose-phosphate shunt	3	1.79E-03	mitochondrial electron transport	8	5.91E-06
gluconeogenesis	4	2.15E-03	mitochondrial resp. chain comp. I assembly	8	3.21E-05
lipid metabolic process	6	2.26E-03	glutamate secretion	6	4.38E-05
platelet degranulation	5	3.10E-03	ion transmembrane transport	13	5.30E-05
astrocyte development	3	3.84E-03	synaptic vesicle endocytosis	5	6.58E-05

C

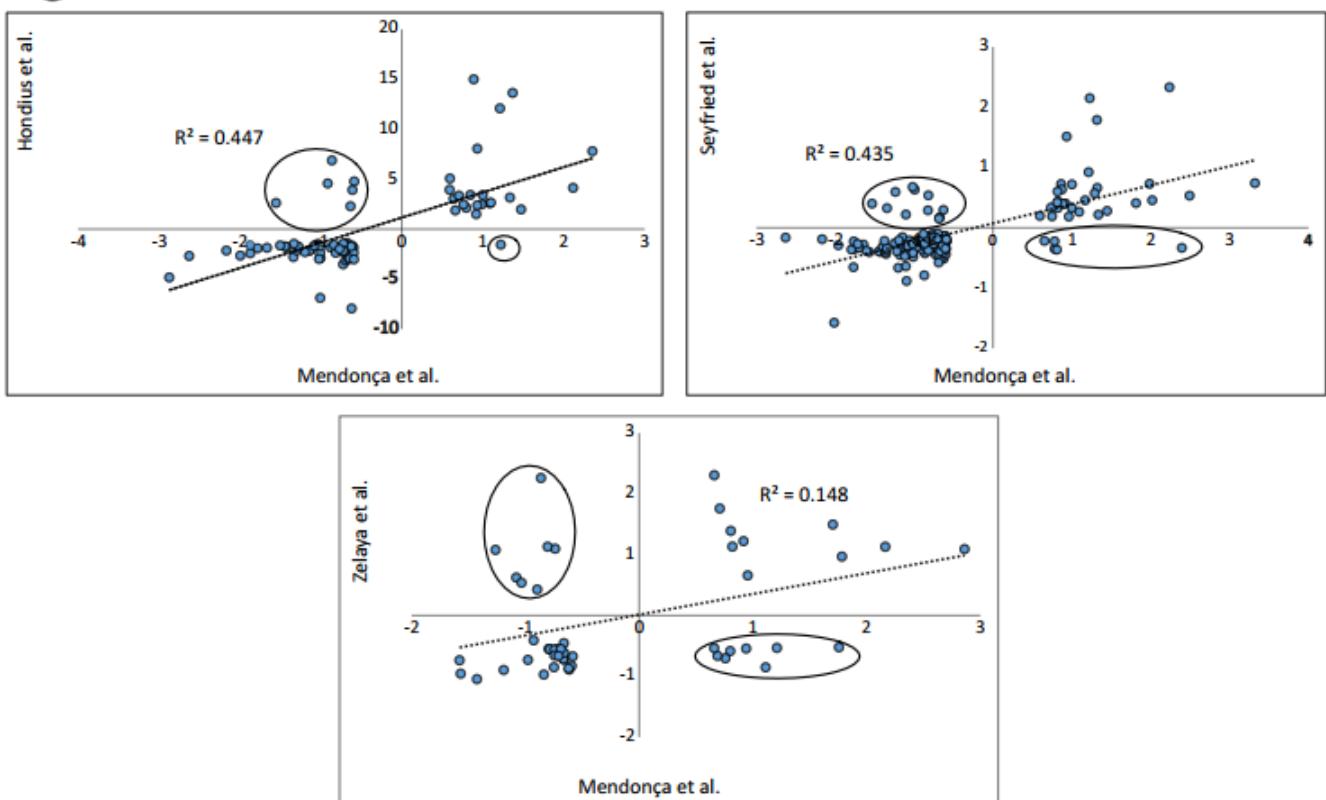
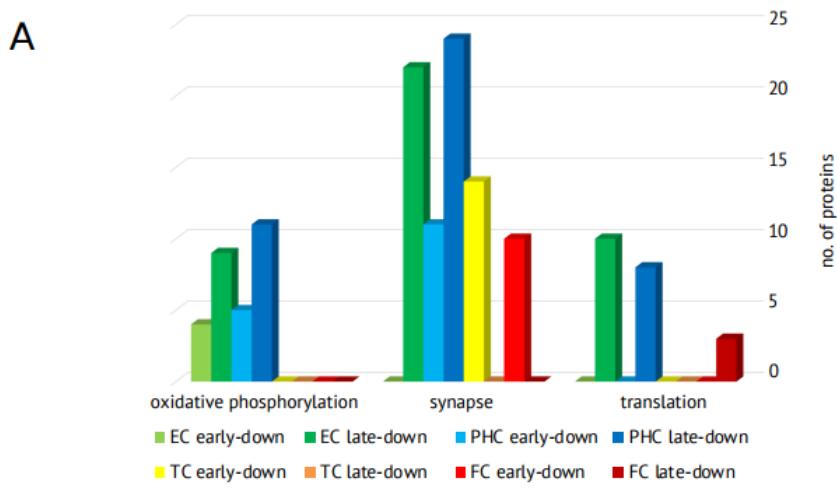
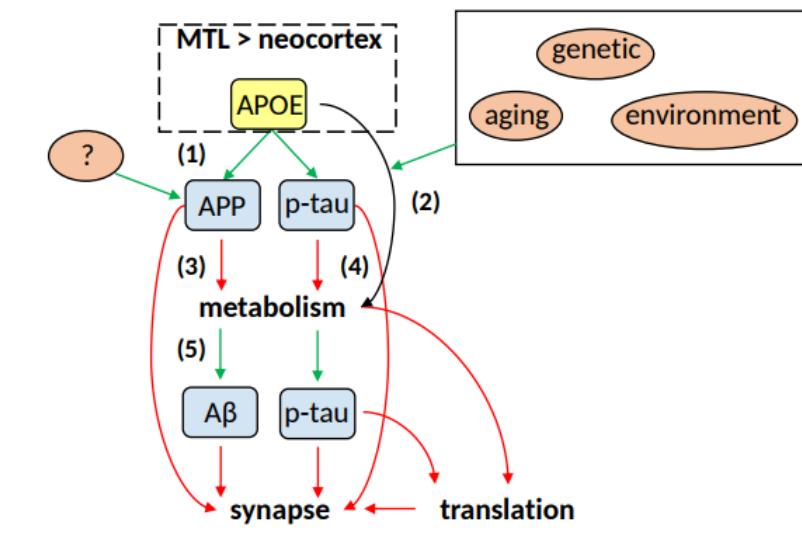


Figure 6. Comparison of the altered proteins with independent AD proteomic datasets. **A)** Venn diagram showing the overlap of DEPs between the present work and three other proteomic studies. **B)** Change in abundance of 5 proteins altered in all four AD proteomic studies shows an overall agreement. **C)** Gene ontology enrichment analysis for overlapping proteins between at least two proteomic studies. **D-F)** Log2 fold change for shared proteins between the current work and other proteomic studies; the general correlation is shown (R^2); black circles indicate the minority of proteins that are contra-regulated.



B

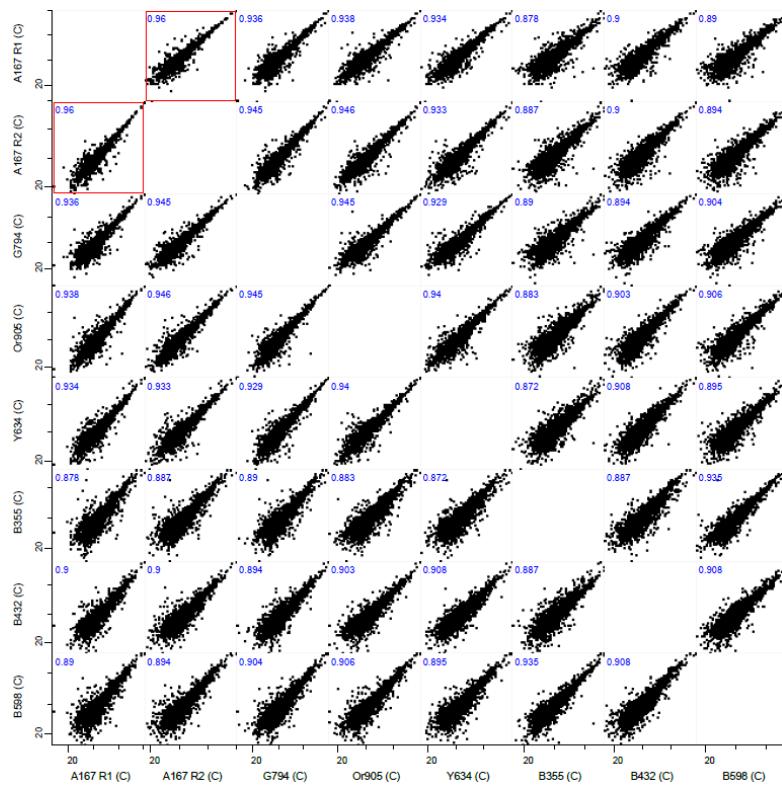


$$\boxed{\text{MTL proteomic background}} + \boxed{\text{MTL high energy demands}} = \boxed{\text{Vulnerability to AD}}$$

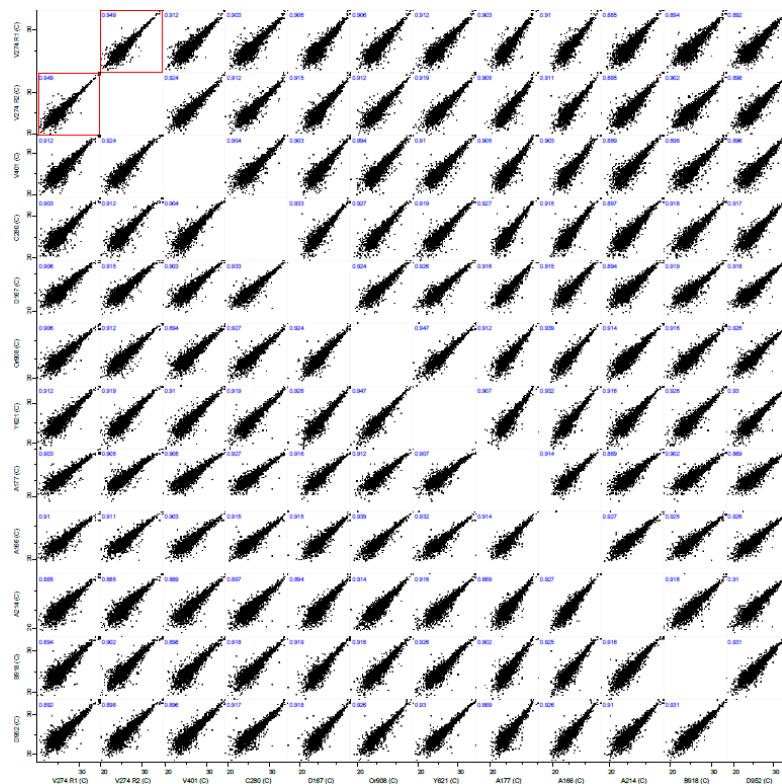
Figure 7. Summary of the most important common pathways between different brain areas and possible consequences of increased APOE levels in the MTL. A) Pathways that were found down-regulated during AD progression in two or more brain regions. **B)** Scheme showing how differences in APOE expression could be related to MTL vulnerability to AD 1) APOE stimulates APP transcription and tau phosphorylation; 2) APOE plays a role in metabolism regulation; 3) APP inhibits oxidative phosphorylation; 4) tau regulates insulin signaling; 5) hypometabolism increases A β levels and tau phosphorylation. Two additive effects, among others, would be involved in MTL vulnerability to AD. The endogenous proteomic background of MTL, specially its higher APOE level, might confer susceptibility to early triggers of AD (A β , tau, others); and the high energy demands of MTL, which is impaired early in disease course, make this region more vulnerable to the toxic effects of A β and tau.

Supplementary Figures and Tables:

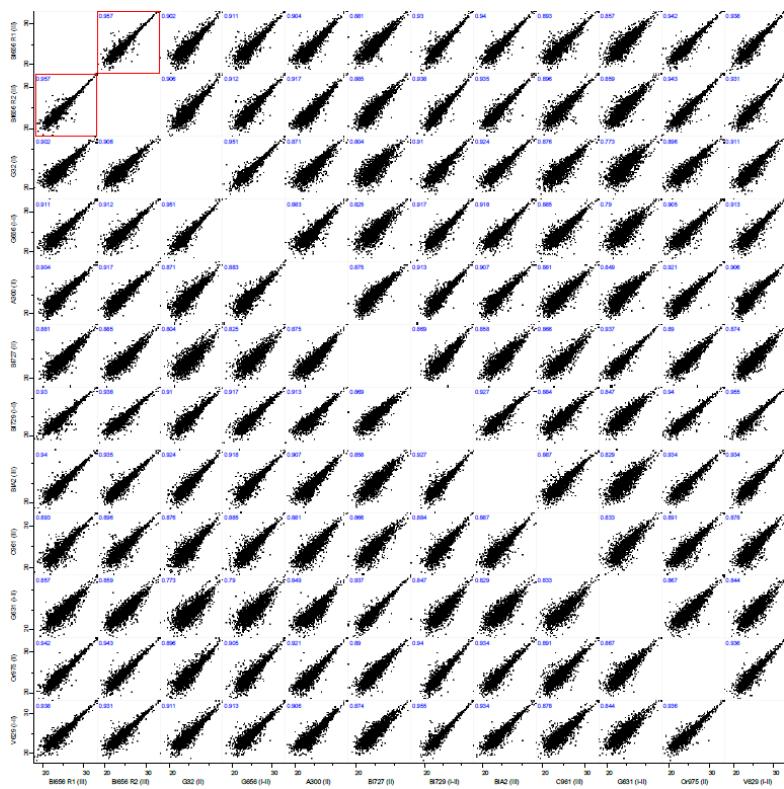
(A)



(B)



(C)



(D)

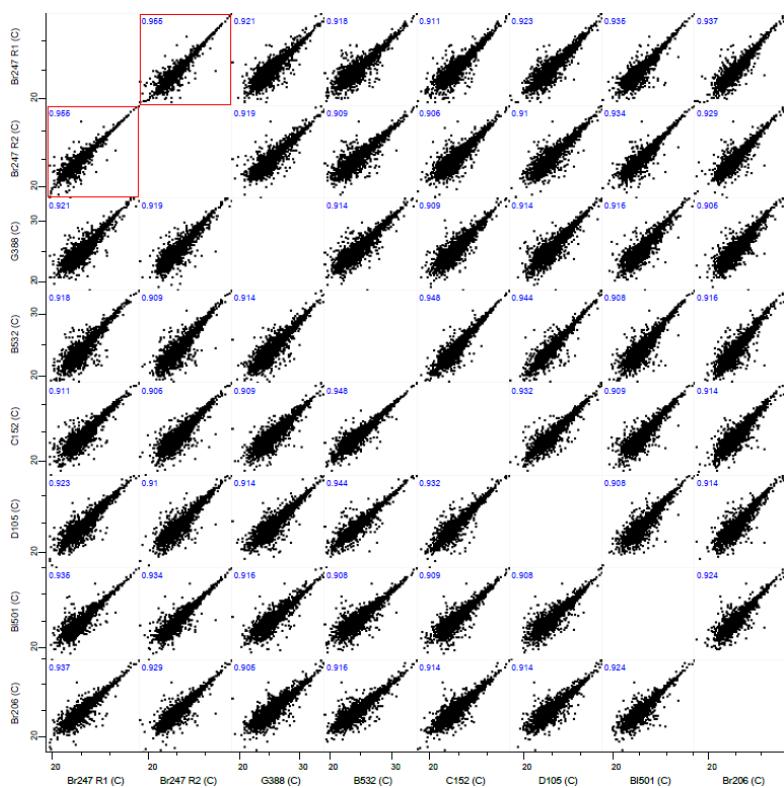


Figure S1. Reproducibility of the FASP digestion. Multi scatter plots show Pearson correlation (blue numbers) between samples. Red squares indicate scatter plots of technical replicates. (A) EC; (B) PHC; (C) TC; (D) FC.

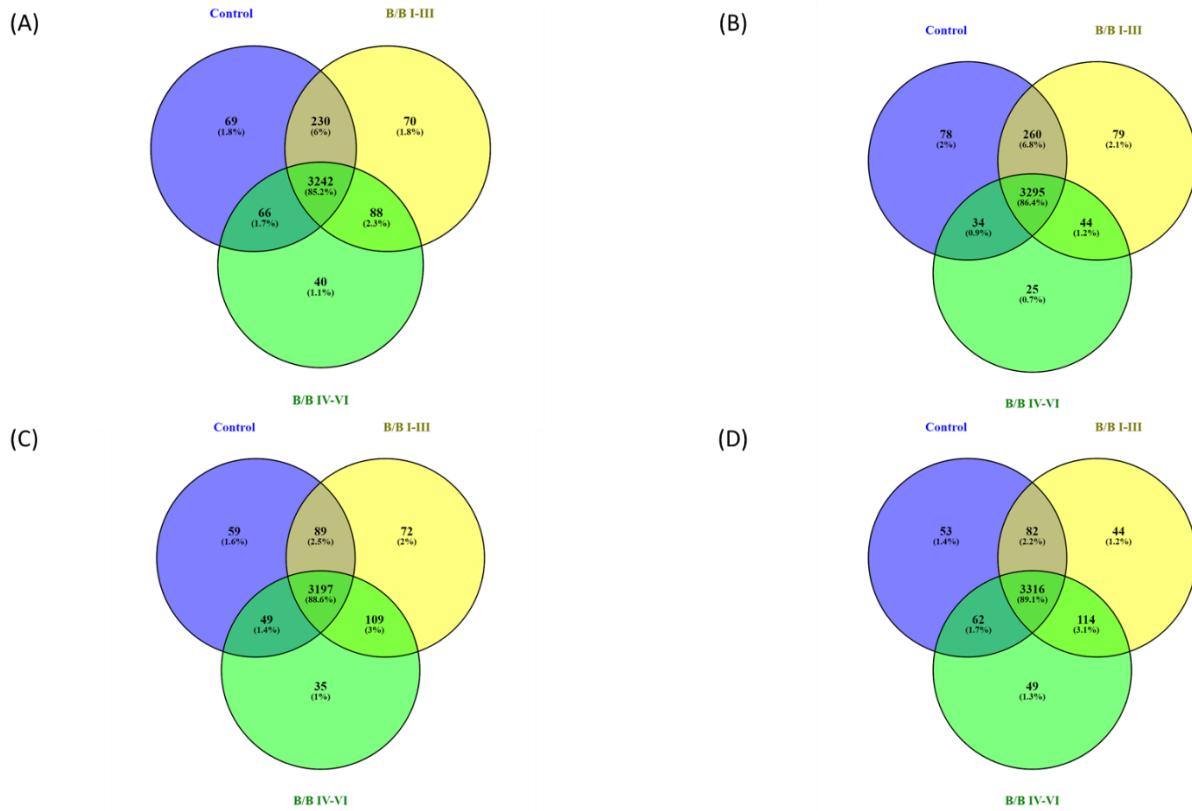


Figure S2. Proteome coverage for each brain region. Venn diagrams show the number of protein groups identified in Controls, B/B I-III and B/B IV-VI for each brain region. (A) EC; (B) PHC; (C) TC; (D) FC.

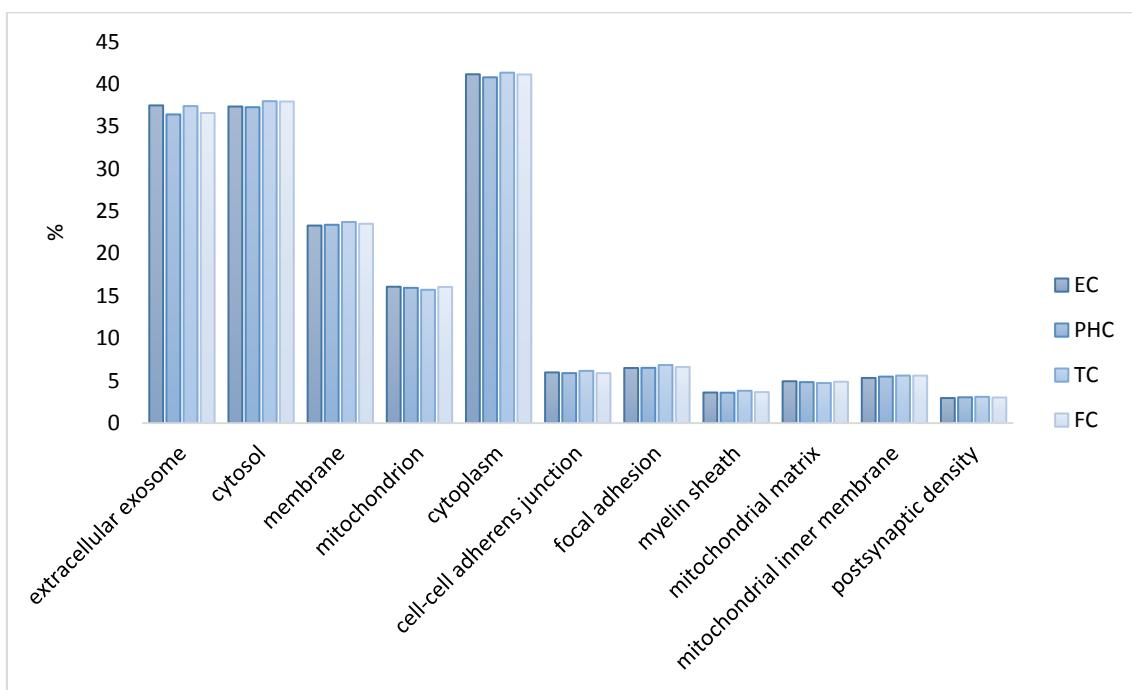
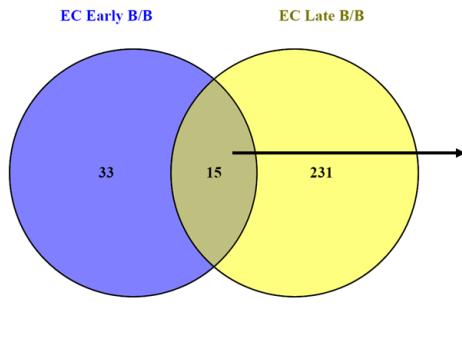


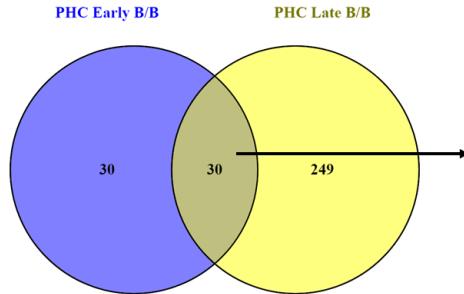
Figure S3. GOCC enrichment for the total proteome. Histogram shows the top 11 GOCC categories (lowest p value) enriched for the total proteome of each brain region.

(A)



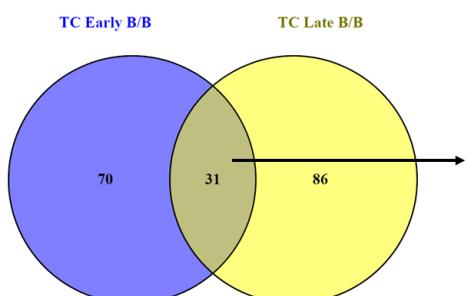
VIM
ANXA2
FLNA
COL6A3
LGALS3
GFAP
LRRC57
SULT4A1
LINGO1
EMC1
DIRAS2
ATPAF1
PRKACA
MARS
RPL10

(B)



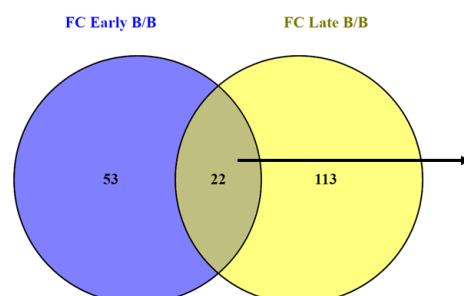
DAK
FLNA
TLN1
ANXA1
FIBP
CAPS
SLC8A1
RAB11FIP5
LPHN1
HNRNPDL
MT-CYB
CALM1
CDC42BPB
SV2B
EXOC7
NUMBL
TUBAL3
ITPKA
DYNLL2
SRC
SFN
CACNA2D3
RAB33B
S100A13
NUMB
BRI3BP
ZC2HC1A
FGF12
AGPAT3
CD63

(C)



ASAHI
SLC16A1
KRT10
FTL
ERLIN2
DDX39B
SCARB2
DHR57
BCL2L13
APOL2
CMTM5
EPDR1
GYG1
PMVK
LCMT1
PLLP
CROCC
EVL
TANC2
MT-ATP8
MAP2
WDR47
MARK2
TARS
SCFD1
CLINT1
NRGN
GRIN2B
SH2D5
WIBG
STRN4

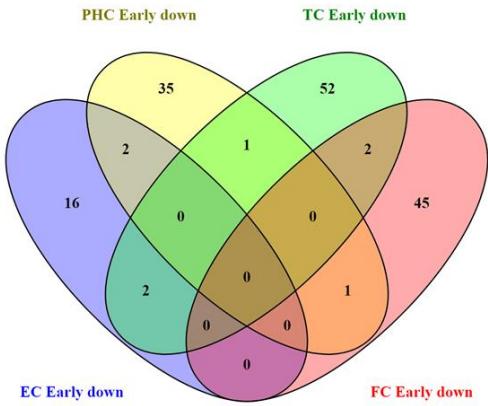
(D)



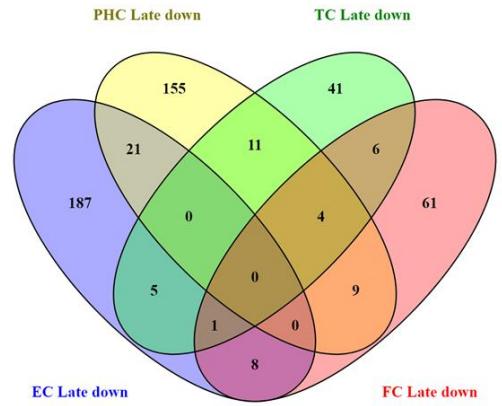
GFAP
HP
SERPINA1
CAPG
CP
ORM1
EHD2
HP1BP3
MEGF9
CA4
PLXNA1
SYNCRIP
FBXL16
RIMS1
UBAP2L
CACNB3
PTPRN2
PPP2R5B
CSNK1E
RPL17
TMEM163
CSNK1A1

Figure S4. Proteins altered during AD progression. Venn diagrams indicate the number of DEPs found in Early B/B and Late B/B per brain region. (A) EC, (B) PHC, (C) TC, (D) FC. Red indicates up-regulated proteins and green indicates down-regulated proteins.

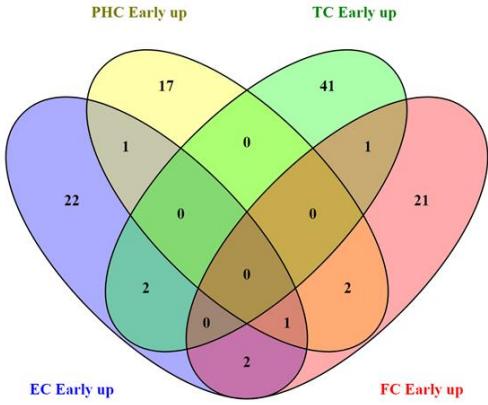
(A)



(B)



(C)



(D)

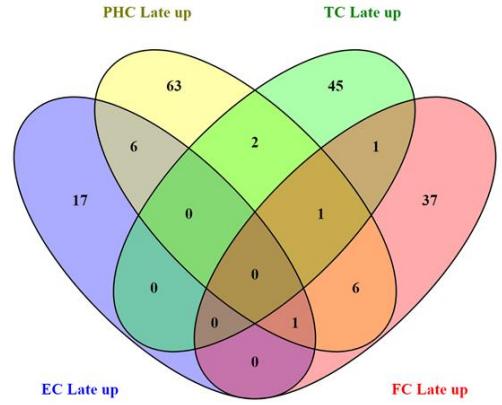


Figure S5. Overlap of DEPs between the 4 brain regions in each disease stage. (A) Proteins down-regulated during early B/B stages; (B) Proteins down-regulated during late B/B stages; (C) Proteins up-regulated during early B/B stages; (D) Proteins up-regulated during late B/B stages.

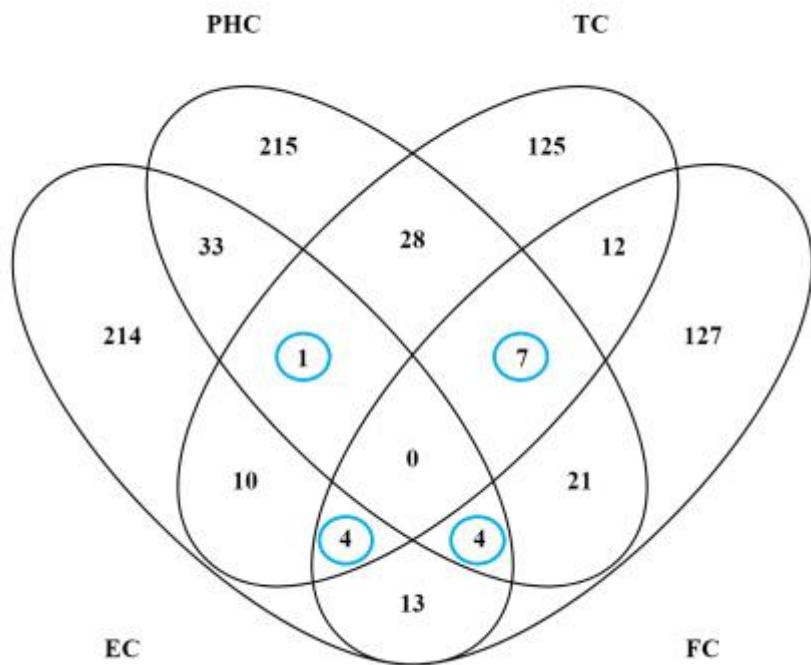
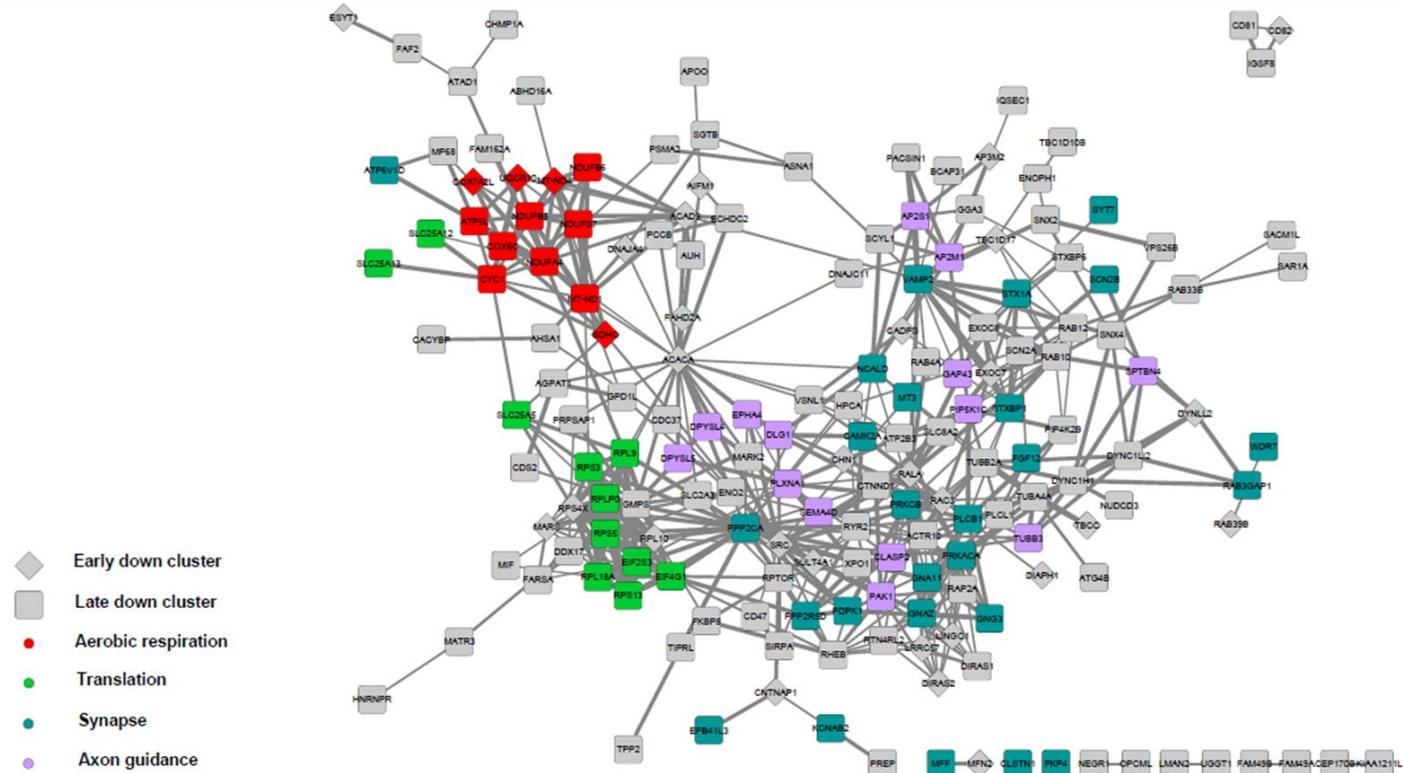
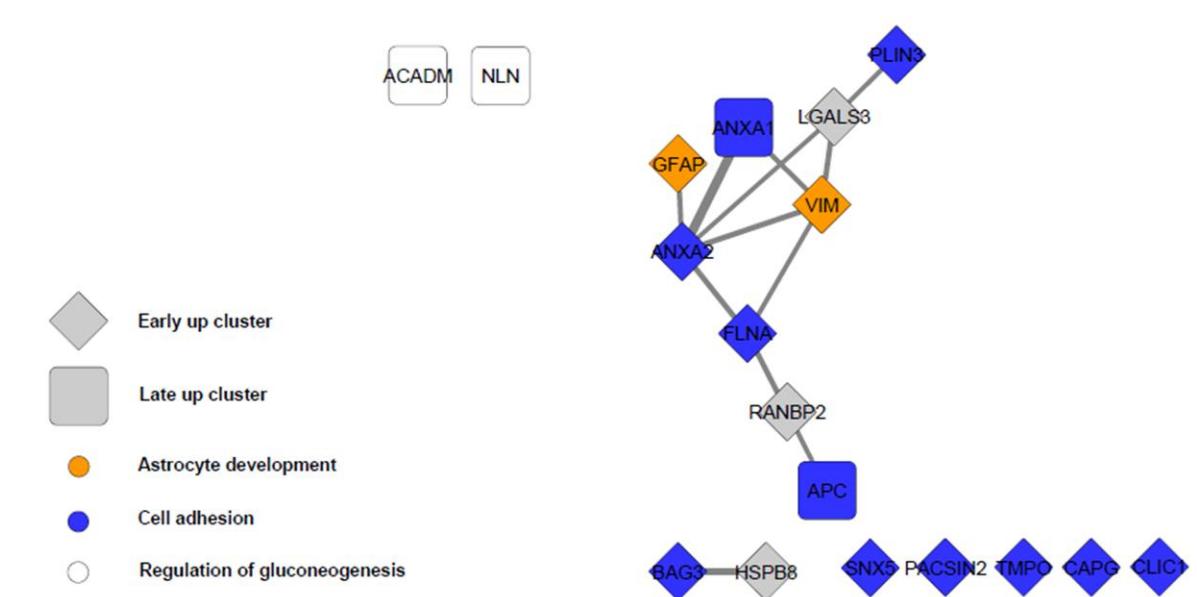


Figure S6. Overlap of DEPs between the 4 brain regions. Blue circles indicate 16 overlapping proteins between three brain regions.

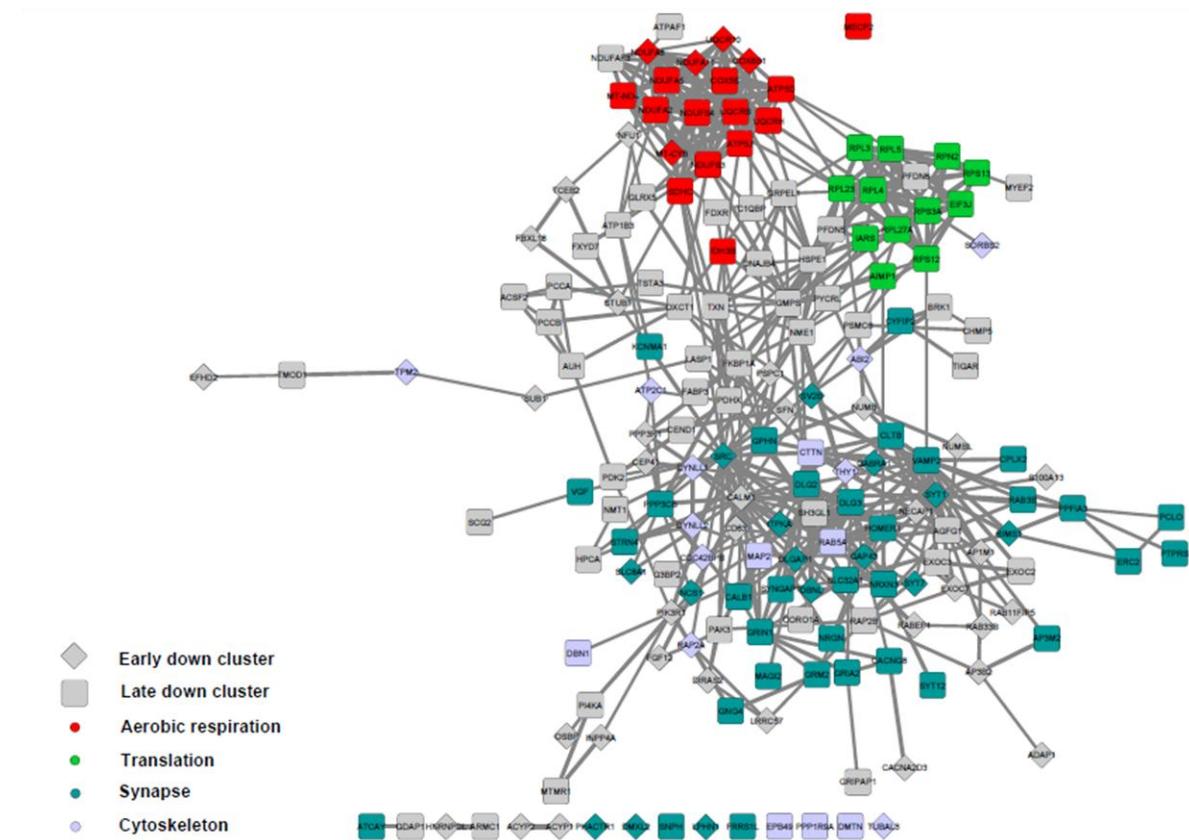
(A)



(B)



(C)



(D)

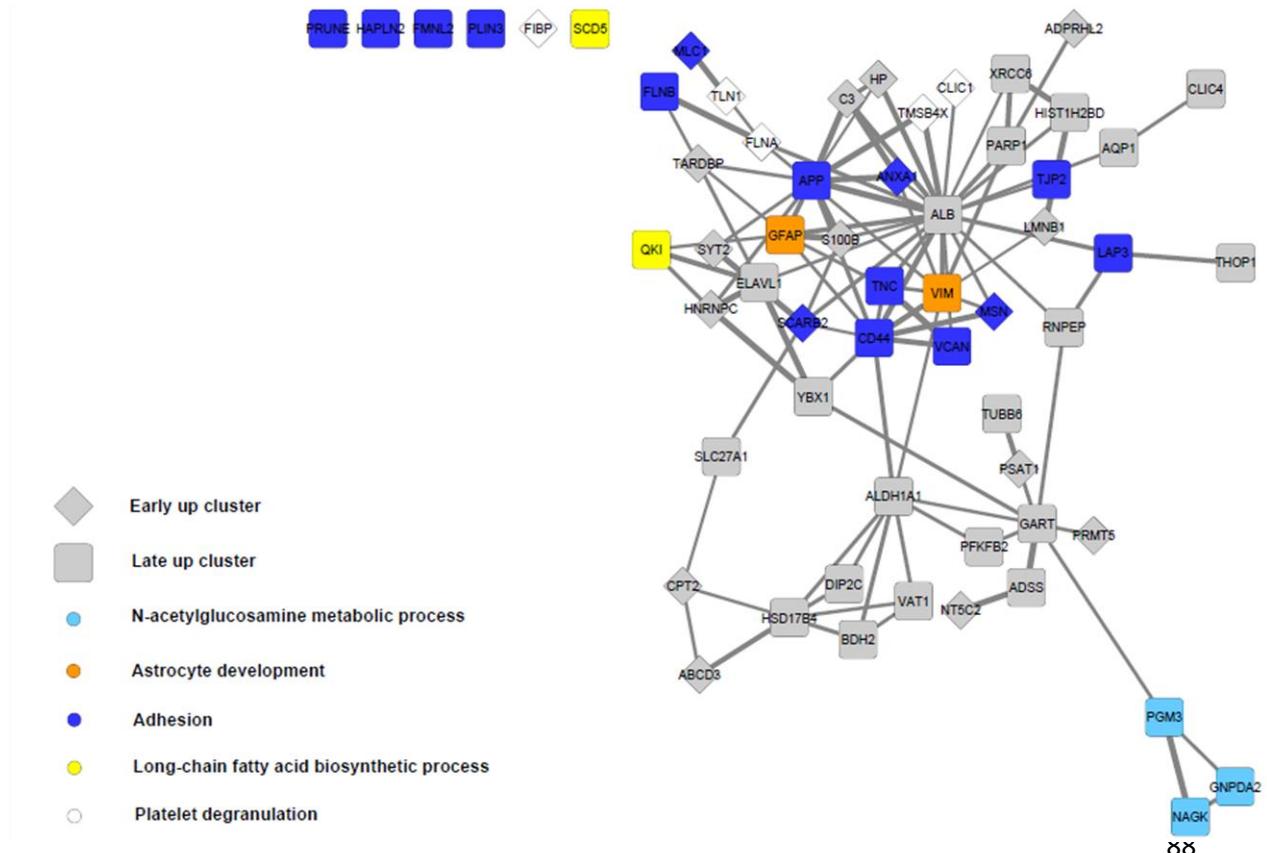
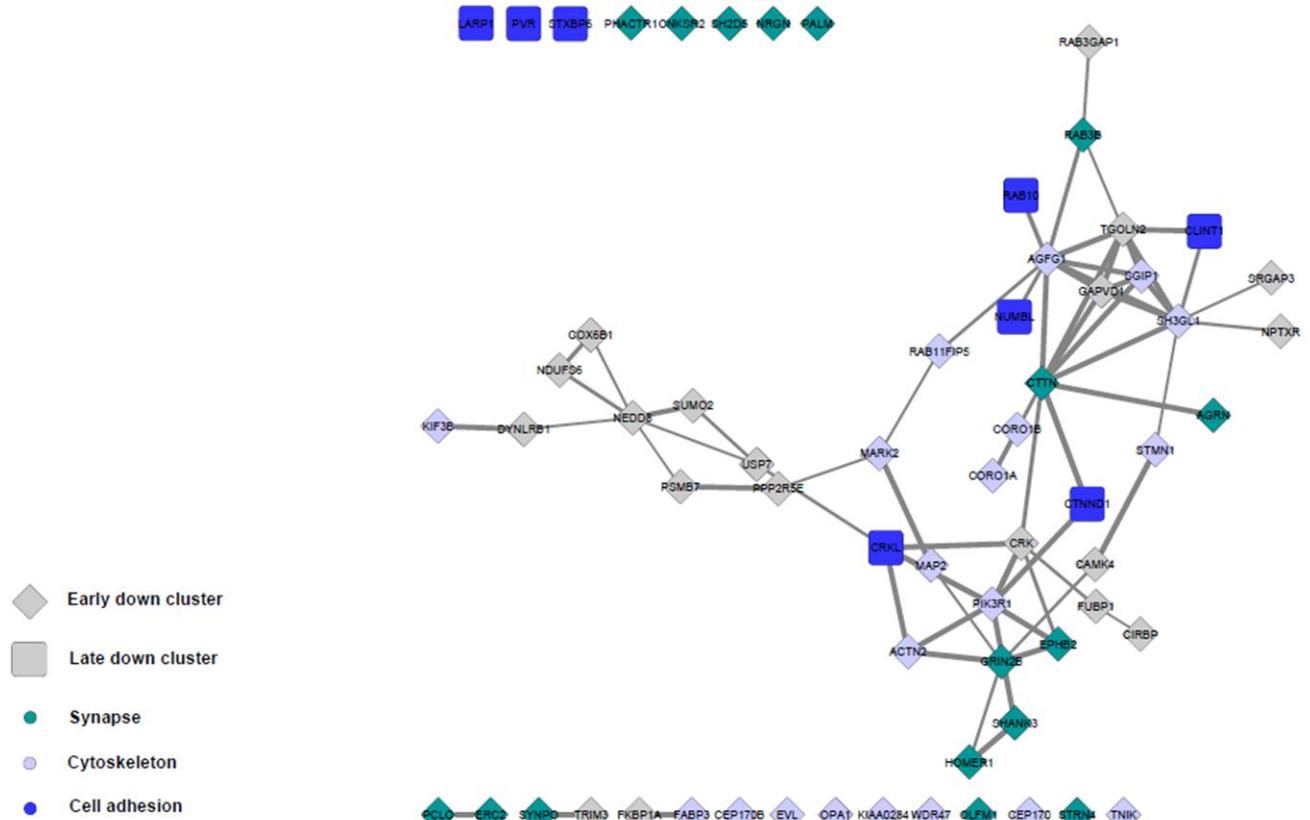
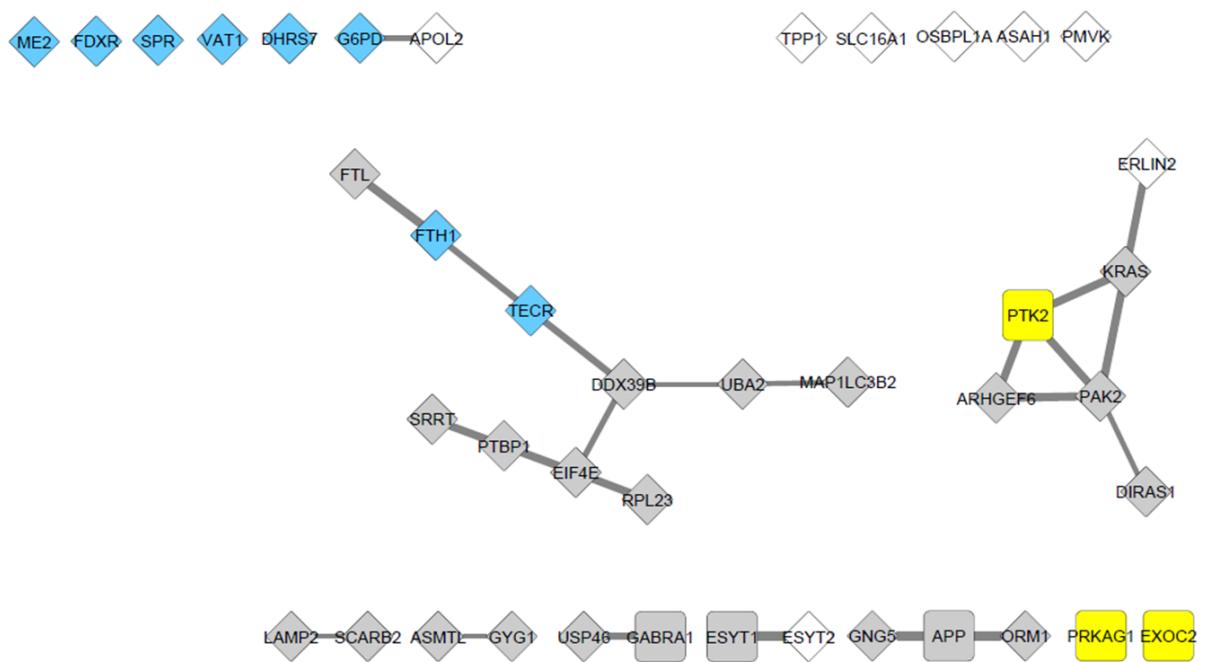


Figure S7. Pathway and interactome analysis of altered proteins during AD in MTL. (A) EC early down and late down clusters. (B) EC early up and late up clusters. (C) PHC early down and late down clusters. (D) PHC early up and late up clusters.

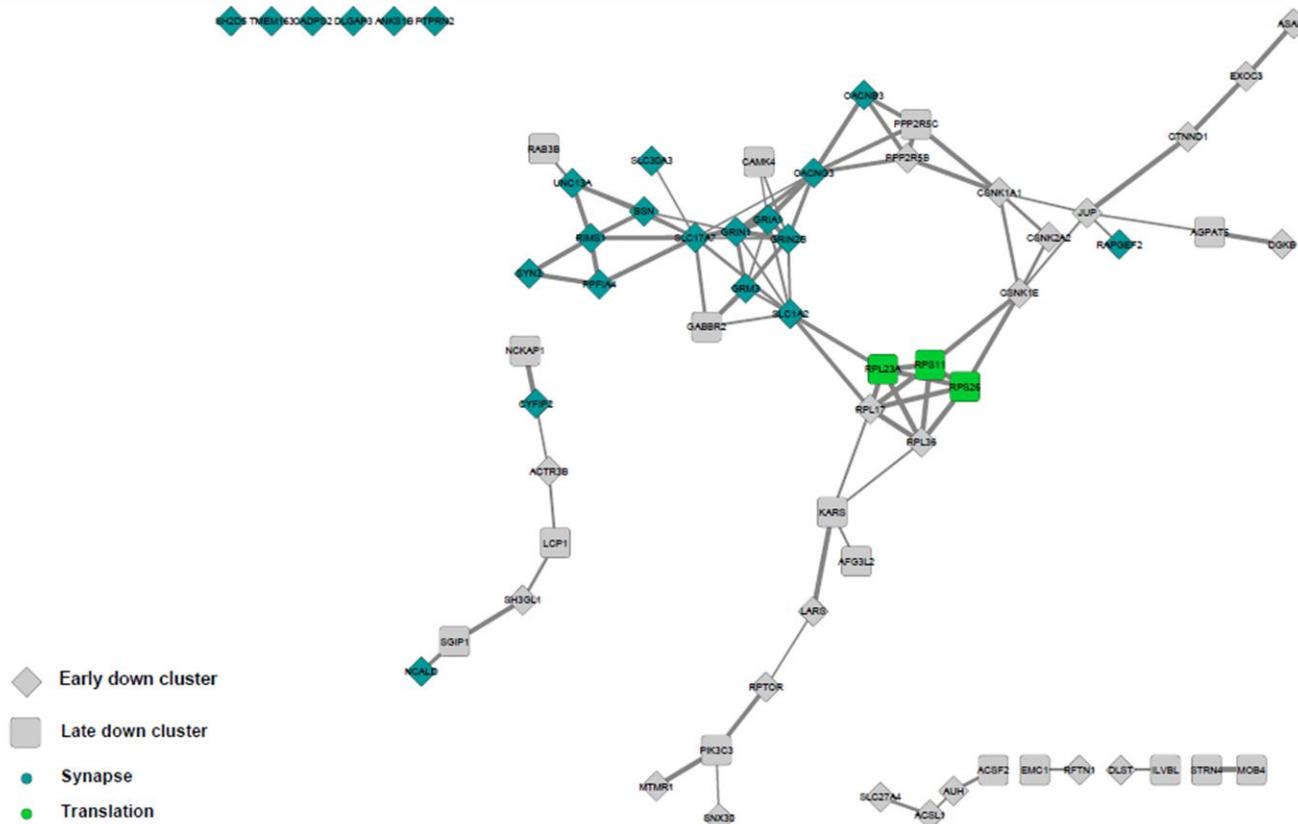
(A)



(B)



(C)



(D)

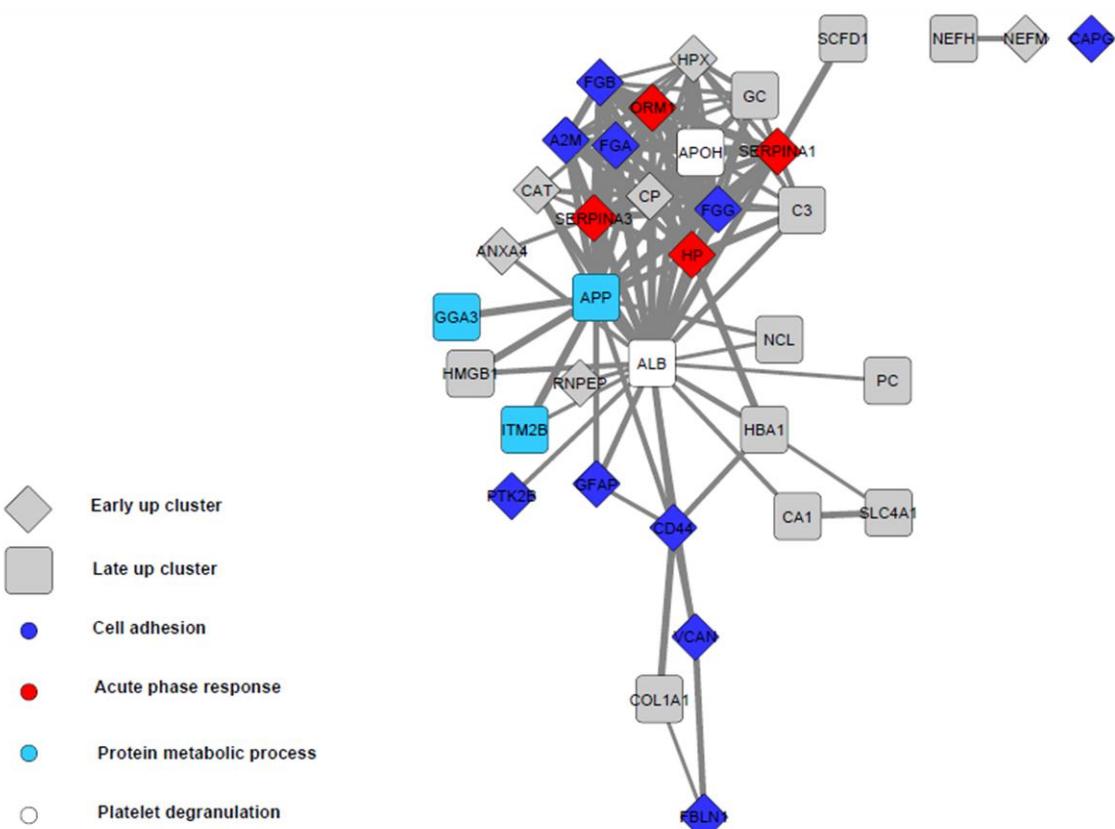


Figure S8. Pathway and interactome analysis of altered proteins during AD in the neocortex.
(A) TC early down and late down clusters. (B) TC early up and late up clusters. (C) FC early down and late down clusters. (D) FC early up and late up clusters.

Supplementary Table 1A. Sample cohort summary

B/B stages	Entorhinal cortex	Parahippocampal cortex	Frontal cortex	Temporal cortex
Control	7	11	7	7
B/B I-III	10	9	9	11
B/B IV-VI	6	5	10	11
Total	23	25	26	29

Supplementary Table 1B. Sample characteristics

Patient number	Disease category	Gender	Age	Post mortem interval
1	B/B I-II.	male	65	2 h
2	B/B I-II.	male	68	2,5 h
3	B/B I-II.	female	80	2 h
4	B/B II.	male	83	3,5 h
5	B/B II.	male	62	5,5 h
6	B/B II.	female	93	6,5 h
7	B/B II.	female	72	4,5 h
8	B/B I-II.	male	67	5 h
9	B/B II.	male	64	10 h
10	B/B III	male	80	5,5 h
11	B/B III	male	80	4,5 h
12	B/B III	male	80	6 h
13	B/B III	female	91	4 h
14	B/B III	female	94	4 h
15	B/B IV.	female	79	6 h
16	B/B IV.	male	90	5 h
17	B/B IV.	male	79	6 h
18	B/B V	female	72	4 h
19	B/B VI.	female	65	5 h
20	B/B V-VI.	female	89	2 h
21	B/B VI.	female	86	4,5 h
22	B/B VI.	male	83	6 h
23	B/B V-VI.	female	93	5,5 h
24	B/B V-VI.	male	84	6,5 h
25	B/B V-VI.	female	87	6 h
26	B/B VI.	female	86	4 h
27	B/B VI.	female	78	5 h
28	B/B VI.	female	77	5 h
29	control	male	47	2 h
30	control	male	56	2 h
31	control	male	50	2 h
32	control	male	64	4 h
33	control	male	75	5 h
34	control	female	44	5 h
35	control	male	52	2,5 h
36	control	male	54	2 h
37	control	male	61	8 h
38	control	male	79	2 h
39	control	female	70	7 h
40	control	female	75	10 h
41	control	male	75	8 h
42	control	female	85	8 h
43	control	female	78	4 h

Additional files

- SupplementaryFigures.docx** **Figure S1.** Reproducibility of the FASP digestion; **Figure S2.** Proteome coverage for each brain region; **Figure S3.** GOCC enrichment for the total proteome; **Figure S4.** Proteins altered during

AD progression; **Figure S5.** Overlap of DEPs between the 4 brain regions in each disease stage; **Figure S6.** Overlap of DEPs between the 4 brain regions; **Figure S7.** Pathway and interactome analysis of DEPs during AD in MTL; **Figure S8.** Pathway and interactome analysis of DEPs during AD in neocortex.

2. **Table S1.xlsx** Characteristics of patient cohort.
3. **Table S2.xlsx** Proteins differentially expressed during AD progression in 4 brain regions.
4. **Table S3.xlsx** Enrichment analysis of the 31 AD risk genes.
5. **Table S4.xlsx** Enrichment analysis of DEPs from EC.
6. **Table S5.xlsx** Enrichment analysis of DEPs from PHC.
7. **Table S6.xlsx** Enrichment analysis of DEPs from TC.
8. **Table S7.xlsx** Enrichment analysis of DEPs from FC.
9. **Table S8.xlsx** Differentially expressed proteins between the four brain areas in healthy individuals.
10. **Table S9.xlsx** Enrichment analysis of the proteins significantly enriched in MTL (MTL-up cluster).
11. **Table S10.xlsx** Comparison of DEPs from the current study with three independent proteomic studies in AD.
12. **TableS11.xlsx** Summary of the 27 dysregulated translation proteins in the four analyzed brain areas from our AD cohort, and from literature data.

6 Conclusões

Apesar da extensa literatura sobre proteômica de DA, este é o primeiro trabalho a efetuar uma comparação das alterações no proteoma de regiões cerebrais afetadas precoce (MTL) e tardivamente (neocôrortex) pela patologia de tau durante a progressão da DA. Assim, este trabalho apresenta dois aspectos diferenciais: (1) trata-se de uma análise espacial (regiões) e temporal (estágios B/B) do proteoma cerebral na DA; (2) o proteoma das regiões cerebrais também foi analisado em estado fisiológico (controles). O primeiro aspecto gerou informações sobre como o proteoma de regiões cerebrais distintas é afetado durante a DA. A este respeito, foi observado um cenário complexo onde a maior parte das proteínas e vias desreguladas na DA é região-específica. Contudo, existe de fato uma sobreposição entre as regiões, tanto a nível de proteínas alteradas (133 proteínas compartilhadas entre 2 ou mais regiões, e 16 proteínas entre 3 regiões cerebrais) como a nível de vias alteradas (repressão de vias sinápticas em todas as regiões, desregulação de tradução proteica em 3 regiões e repressão da fosforilação oxidativa majoritariamente nas regiões do MTL). Nós acreditamos que estas proteínas e vias comuns possivelmente representem elementos-chave na etiologia da doença. A segunda análise efetuada neste trabalho (proteômica diferencial de regiões em controles) permitiu uma melhor compreensão sobre como características endógenas de regiões vulneráveis à DA (MTL) estariam relacionadas à uma maior susceptibilidade destas regiões à doença. A análise proteômica revelou altas taxas metabólicas e maior expressão de proteínas relacionadas à DA em regiões cerebrais vulneráveis à doença, incluindo APOE, o maior fator de risco genético para a DA. Levando-se em consideração estes dados, discutimos neste trabalho o fato de que o proteoma do MTL em estado fisiológico parece tornar esta região naturalmente mais suscetível aos gatilhos tóxicos de tau e A β .

Um fato adicional abordado neste estudo foi a realização de uma análise comparativa dos dados aqui obtidos com 3 trabalhos de proteômica de Alzheimer previamente publicados. Foi identificada uma certa reproduzibilidade entre estudos, uma vez que 406 proteínas são compartilhadas entre 2 ou mais trabalhos, dentre as quais a maioria é co-regulada. Uma vez que estes estudos foram efetuados em regiões cerebrais distintas, este achado fortalece a visão da existência de proteínas-chave na DA as quais são importantes para a etiologia da doença mesmo em

diferentes regiões. Além disso, reforça o emprego da proteômica por espectrometria de massas como método analítico no estudo da DA.

Em síntese, este trabalho reforça a importância da investigação da DA a nível de diferentes regiões cerebrais a fim de identificar-se fatores peculiares a cada região (e possivelmente relacionados à vulnerabilidade à doença) e mecanismos compartilhados entre regiões os quais potencialmente são elementos centrais na etiologia da DA. Considerando-se que a DA progride ao longo de anos, é também imprescindível a investigação das alterações moleculares durante a progressão da doença. Estudos futuros abrangendo um maior número de regiões cerebrais e amostras são necessários para compreender-se completamente como o proteoma de áreas cerebrais distintas é afetado pela DA e como o *background* molecular endógeno de regiões afetadas precocemente pela doença está relacionado à vulnerabilidade à DA.

Referências bibliográficas

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. **Nature**, v. 537, n. 7620, p. 347–355, 2016.

ALZHEIMER, A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. **Allgemeine Zeitschrift fur Psychiatrie und phychish-Gerichtliche Medizin**, n. 64, p. 146-148, 1907.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2018 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimers Dement**, v.14, p. 367-429, 2018.

BARKER, W. W. et al. Relative frequencies of Alzheimer disease, Lewy body, vascular and frontotemporal dementia, and hippocampal sclerosis in the State of Florida Brain Bank. **Alzheimer Dis Assoc Disord.**, v. 16, n. 4, p. 203-212, 2002.

BARNES, D. E.; YAFF, K. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. **The Lancet**, v. 10, p. 819–828, 2011.

BEKKER-JENSEN, D. B. et al. An Optimized Shotgun Strategy for the Rapid Generation of Comprehensive Human Proteomes. **Cell Systems**, v. 4, p. 587–599, 2017.

BERRIOS, G. E. Alzheimer's disease: a conceptual history. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 5, p. 355–365, 1990.

BOSSERS, K. et al. Concerted changes in transcripts in the prefrontal cortex precede neuropathology in Alzheimer's disease. **Brain**, v. 133, n. 12, p. 3699–3723, 2010.

BRAAK, H. et al. Stages of the Pathologic Process in Alzheimer Disease: Age Categories From 1 to 100 Years. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 70, p. 960–969, 2011.

BRAAK, H.; BRAAK, E. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. **Acta Neuropathologica**, v. 82, p. 239–259, 1991.

BRAAK, H.; DEL TREDICI, K. The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty. **Acta Neuropathologica**, v. 121, p. 171–181, 2011.

BRETTSCHEIDER, J. et al. Spreading of pathology in neurodegenerative diseases:

a focus on human studies. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 2, p. 109–120, 2015.

BRINKMALM, A. et al. Explorative and targeted neuroproteomics in Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1854, n. 7, p. 769–778, 2015.

BURKE, S. N.; Barnes, C. A. Neural plasticity in the ageing brain. **Nat Rev Neurosci.**, v. 7, p. 30–40, 2006.

CHANG, R. Y. K. et al. Neurochemistry International SWATH analysis of the synaptic proteome in Alzheimer's disease. **Neurochemistry International**, v. 87, p. 1–12, 2015.

DAVIGLUS, M. L. et al. National Institutes of Health State-of-the-Science Conference Statement: Preventing Alzheimer Disease and Cognitive Decline. **Ann Intern Med.**, v. 153, p. 176–181, 2010.

DI SANTO, G. S. et al. A Meta-Analysis of the Efficacy of Donepezil, Rivastigmine, Galantamine, and Memantine in Relation to Severity of Alzheimer' s Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 35, p. 349–361, 2013.

DONOVAN, L. E. et al. Analysis of a membrane-enriched proteome from postmortem human brain tissue in Alzheimer's disease. **Proteomics Clin. Appl.**, v. 6, p. 201–211, 2012.

ECHÁVARRI, C. et al. Neuropsychiatric Symptoms in Alzheimer ' s Disease and Vascular Dementia. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 33, p. 715–721, 2013.

ELAHI, F. M.; MILLER, B. L. A clinicopathological approach to the diagnosis of dementia. **Nat. Rev. Neurol.**, v. 13, p. 457-476, 2017.

ENG, J. K.; MCCORMACK, A. L.; YATES, J. R. An Approach to Correlate Tandem Mass Spectral Data of Peptides with Amino Acid Sequences in a Protein Database. **J Am SW Mass Spectrom**, v. 5, p. 976–989, 1994.

EVANS, D. A. et al. Incidence of Alzheimer Disease in a Biracial Urban Community. **Arch Neurol.**, v. 60, n. 185, p. 189, 2003.

FARRER, L. A. et al. Effects of Age , Sex , and Ethnicity on the Association Between

Apolipoprotein E Genotype and Alzheimer Disease. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 278, p. 1349–1356, 1997.

FEINSTEIN, S. C.; WILSON, L. Inability of tau to properly regulate neuronal microtubule dynamics: A loss-of-function mechanism by which tau might mediate neuronal cell death. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1739, n. 2, p. 268–279, 2005.

FENN, J. B. et al. Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. **Science**, v. 246, p. 64–71, 2016.

GOATE, A. et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. **Nature**, v. 349, n. 6311, p. 704–6, 1991.

GUERREIRO, R.; BRAS, J. The age factor in Alzheimer' s disease. **Genome Medicine**, p. 7–9, 2015.

GYGI, S. P. et al. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 97, p. 9390–9395, 2000.

HEBERT, L. E. et al. Age-Specific Incidence of Alzheimer â€™ s Disease in a Community Population. **JAMA**, v. 273, n. 1354, p. 1359, 1995.

HEBERT, L. E. et al. Alzheimer disease in the United States (2010 – 2050) estimated using the 2010 census. **Neurology**, v. 80, p. 1778–1783, 2013.

HONDIUS, D. C. et al. Profiling the human hippocampal proteome at all pathologic stages of Alzheimer' s disease. **Alzheimer's & Dementia**, p. 1–15, 2016.

HUTTON, M. et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. **Nature**, v. 393, n. 6686, p. 702–5, 1998.

JELLINGER, K. A. The enigma of mixed dementia. **Alzheimer's & Dementia**, v. 3, p. 40–53, 2007.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons. **Anal. Chem.**, v. 60, p. 2299–2301, 1988.

KAWAS, C. et al. Age-specific incidence rates of Alzheimer' s disease The Baltimore Longitudinal Study of Aging. **Neurology**, v. 54, n. 2072, p. 2077, 2000.

KIDDLE, S. J. et al. Candidate blood proteome markers of Alzheimer's disease onset and progression: A systematic review and replication study. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 38, p. 515–531, 2014.

KORDOWER, J. H. et al. Loss and Atrophy of Layer II Entorhinal Cortex Neurons in Elderly People with Mild Cognitive Impairment. **Ann Neurol**, v. 49, p. 202–213, 2001.

LEVY-LAHAD, E. et al. Candidate Gene for the Chromosome 1 Familial Alzheimer's Disease Locus. **Science**, v. 269, p. 973–977, 1995.

LIAO, L. et al. Proteomic Characterization of Postmortem Amyloid Plaques Isolated by Laser Capture Microdissection * □. v. 279, n. 35, p. 37061–37068, 2004.

LOESSNER, A. et al. Regional Cerebral Function Determined by FDG-PET in Healthy Volunteers: Normal Patterns and Changes with Age. **J Nucl Med**, v. 36, p. 1141–1150, 1995.

MARTIN, B. et al. iTRAQ analysis of complex proteome alterations in 3xTgAD Alzheimer's mice: Understanding the interface between physiology and disease. **PLoS ONE**, v. 3, 2008.

MASTERS, C. L. et al. Alzheimer's disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 1–18, 2015.

MATARIN, M. et al. A Genome-wide Gene-Expression Analysis and Database in Transgenic Mice during Development of Amyloid or Tau Pathology. **Cell Reports**, v. 10, p. 633–644, 2015.

MATTSON, M. P.; MAGNUS, T. Aging and Neuronal Vulnerability. **Nat Rev Neurosci.**, v. 7, p. 278–294, 2006.

MCKHANN, G. M. et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging- Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v. 7, n. 3, p. 263–269, 2011.

MILO, R. What is the total number of protein molecules per cell volume? A call to rethink some published values. **Bioessays**, v. 35, p. 1050–1055, 2013.

MIYASHITA, A. et al. Genes associated with the progression of neurofibrillary tangles

- in Alzheimer's disease. **Translational Psychiatry**, v. 4, p. 1–8, 2014.
- MONTEOLIVA, L.; ALBAR, J. P. Differential proteomics: An overview of gel and non-gel based approaches. **Brief. Funct. Genomics Proteomics**, v. 3, p. 220–239, 2004.
- MOYA-ALVARADO, G. et al. Neurodegeneration and Alzheimer's disease (AD). What Can Proteomics Tell Us About the Alzheimer's Brain? **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 15, n. 2, p. 409–425, 2016.
- NELSON, P. T. et al. Correlation of Alzheimer Disease Neuropathologic Changes With Cognitive Status: A Review of the Literature. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 71, n. 5, p. 362–381, 2012.
- NEUMANN, M. et al. Ubiquitinated TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Science**, v. 314, p. 130–133, 2006.
- NIJSSEN, J.; COMLEY, L. H.; HEDLUND, E. Motor neuron vulnerability and resistance in amyotrophic lateral sclerosis. **Acta Neuropathologica**, 2017.
- NOETZLI, M.; EAP, C. B. Pharmacodynamic, Pharmacokinetic and Pharmacogenetic Aspects of Drugs Used in the Treatment of Alzheimer' s Disease. **Clin Pharmacokinet**, 2013.
- OLSSON, B. et al. CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer' s disease: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Neurology**, v. 4422, n. 16, p. 1–12, 2016.
- PERKINS, D. N. et al. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, v. 20, p. 3551–3567, 1999.
- PLASSMAN, B. L. et al. Prevalence of Dementia in the United States: The Aging, Demographics, and Memory Study. **Neuroepidemiology**, v. 29, p. 125–132, 2007.
- PRICE, J. L. et al. Neuron Number in the Entorhinal Cortex and CA1 in Preclinical Alzheimer Disease. **Arch Neurol**, v. 58, p. 1395–1402, 2001.
- PRINCE, M. et al. World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia - An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. **Alzheimer's Disease**

International, p. 84, 2015.

RAPP, P. R.; GALLAGHER, M. Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, p. 9926–9930, 1996.

RAZ, N.; RODRIGUE, K. M. Differential aging of the brain: Patterns , cognitive correlates and modifiers. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 30, p. 730–748, 2006.

RAZ, N.; RODRIGUE, K. M.; HAACKE, E. M. Brain Aging and Its Modifiers Insights from in Vivo Neuromorphometry. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1097, p. 84–93, 2007.

REIMAN, E. M. et al. Higher serum total cholesterol levels in late middle age are associated with glucose hypometabolism in brain regions affected by Alzheimer' s disease and normal aging. **NeuroImage**, v. 49, p. 169–176, 2010.

SCHELTENS, P. et al. Alzheimer' s disease. **The Lancet**, v. 6736, n. 15, p. 1–13, 2016.

SCHNEIDER, J. A. et al. Mixed brain pathologies account for most dementia cases in community- dwelling older persons. v. 69, p. 2197–2204, 2007.

SCHNEIDER, J. A. et al. The Neuropathology of Probable Alzheimer Disease and Mild Cognitive Impairment. n. **Mci**, p. 200–208, 2009.

SCHONBERGER, S. J. et al. Proteomic analysis of the brain in Alzheimer's disease: Molecular phenotype of a complex disease process. **Proteomics**, v. 1, p. 1519–1528, 2001.

SEYFRIED, N. T. et al. A Multi-network Approach Identifies Protein- Specific Co-expression in Asymptomatic and Symptomatic Alzheimer's Disease. **Cell Systems**, v. 4, p. 60–72, 2017.

SHAW, L. M. et al. Cerebrospinal Fluid Biomarker Signature in Alzheimer ' s Disease Neuroimaging Initiative Subjects. **Ann Neurol**, v. 65, p. 403–413, 2009.

SHERRINGTON, R. et al. **Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease****Nature**, 1995. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/375754a0>>

SIDOLI, S.; KULEJ, K.; GARCIA, B. A. Why proteomics is not the new genomics and

the future of mass spectrometry in cell biology. **The Journal of cell biology**, v. 216, p. 21–24, 2016.

ŠIMIĆ, G. et al. Tau protein hyperphosphorylation and aggregation in alzheimer's disease and other tauopathies, and possible neuroprotective strategies. **Biomolecules**, v. 6, n. 1, p. 2–28, 2016.

SPELLMAN, D. S. et al. Development and evaluation of a multiplexed mass spectrometry based assay for measuring candidate peptide biomarkers in Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI) CSF. **Proteomics Clin Appl.**, v. 9, p. 715–731, 2015.

SPILLANTINI, M. G. et al. α-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson' s disease and dementia with Lewy bodies. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 95, p. 6469–6473, 1998.

SURMEIER, D. J.; OBESO, J. A.; HALLIDAY, G. M. Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. **Nat Rev Neurosci.**, v. 18, p. 101–113, 2017.

TAKEDA, A. et al. A systematic review of the clinical effectiveness of donepezil, rivastigmine and galantamine on cognition, quality of life and adverse events in Alzheimer' s disease. **Int J Geriatr Psychiatry**, v. 21, p. 17–28, 2006.

THAL, D. R. et al. Phases of Aβ-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. **Neurology**, v. 58, p. 1791–1800, 2002.

TRAN, J. C. et al. Mapping intact protein isoforms in discovery mode using top-down proteomics. **Nature**, v. 480, p. 254–258, 2011.

VIOLET, M. et al. A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, n. March, p. 1–11, 2014.

VISSEER, P. J. et al. Prevalence and prognostic value of CSF markers of Alzheimer ' s disease pathology in patients with subjective cognitive impairment or mild cognitive impairment in the DESCRIPTA study: a prospective cohort study. **The Lancet Neurology**, v. 8, n. 7, p. 619–627, 2009.

WANG, Q. et al. Proteomic analysis of neurofibrillary tangles in Alzheimer disease

identifies GAPDH as a detergent- insoluble paired helical filament tau binding protein. p. 869–871, [s.d.].

WANG, X.; MICHAELIS, M. L.; MICHAELIS, E. K. Functional Genomics of Brain Aging and Alzheimer' s Disease : Focus on Selective Neuronal Vulnerability. p. 618–633, 2010.

WANG, Y.; MANDELKOW, E. Tau in physiology and pathology. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 22–35, 2015.

WASINGER, V. C. et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium. **Electrophoresis**, v. 16, p. 1090–1094, 1995.

WEST, M. J. et al. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer' s disease. **The Lancet**, v. 344, p. 769–772, 1994.

WISNIEWSKI, K. E.; WISNIEWSKI, H. M.; WEN, G. Y. Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome. **Annals of Neurology**, v. 17, n. 3, p. 278–282, 1985.

WISNIEWSKI JR, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis. **Nat Methods**, v. 6, p. 359-362, 2009.

WOLTJER, R. L. et al. Proteomic determination of widespread detergent- insolubility including A^β but not tau early in the pathogenesis of Alzheimer' s disease. p. 1923–1925, 1923.

ZAHID, S. et al. Differential expression of proteins in brain regions of Alzheimer's disease patients. **Neurochemical Research**, v. 39, p. 208–215, 2014.

ZELAYA, M. V. et al. Olfactory bulb proteome dynamics during the progression of sporadic Alzheimer's disease: identification of common and distinct olfactory targets across Alzheimer-related co-pathologies. **Oncotarget**, v. 6, n. 37, p. 39437–56, 2015.

ZHANG, Z. et al. High-Throughput Proteomics. **Annu. Rev. Anal. Chem.**, v. 7, p. 427–454, 2014.