

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

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

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

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