UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

André Luiz Brandão Bitencourt

**Isolamento de oligômeros tóxicos do peptídeo β -amiloide usando o
anticorpo de cadeia única NUsc1**

RIBEIRÃO PRETO – SP

2019

André Luiz Brandão Bitencourt

Isolamento de oligômeros tóxicos do peptídeo β -amiloide usando o anticorpo de cadeia única NUsc1

Orientador: Prof. Dr. Adriano Silva Sebollela

Tese de doutoramento apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Bioquímica

RIBEIRÃO PRETO

2019

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Bitencourt, André Luiz Brandão.

Isolamento de oligômeros tóxicos do peptídeo β -amiloide usando o anticorpo de cadeia única NUsc1. Ribeirão Preto, 2019.

80 p.: il., 30cm.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Silva Sebollela

1. Oligômeros β -amiloide. 2. scFv. 3. Doença de Alzheimer

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Bitencourt, André Luiz Brandão

Título: Isolamento de oligômeros tóxicos do peptídeo β -amiloide usando o anticorpo de cadeia única NUsc1.

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

Área de concentração: Bioquímica.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

A minha família, por todo empenho em me proporcionar o poder de mudar meu destino, vocês são meus pilares e exemplos!

A minha amada companheira Sarah e sua querida família que não me deixou desistir em nenhum momento, obrigado!

AGRADECIMENTOS

Á Deus, pois a minha fé me deu forças para não desistir e entender o quão pequeno sou diante da imensidão do saber.

Ao meu orientador Prof. Dr. Adriano Silva Sebollela, obrigado pela sua paciência e companheirismo. Aprender com você foi uma verdadeira honra! A melhor forma de avaliar sua contribuição em minha vida acadêmica e pessoal é me comparar com meu início do doutorado, é fácil perceber o quanto cresci profissionalmente e aprimorei meu senso crítico. Você me ensinou a orientar e ser orientado e espero ter te honrado como seu primeiro de muitos alunos de doutorado.

Á minha força, exemplo e pilar: minha mãe Sueli, meu pai Antônio Carlos e meus irmãos: Patrick, Cristiane e Maria Eduarda. Obrigado por serem meu porto seguro e me mostrarem que não preciso me conformar com o que a vida me dá, e que posso conquistar tudo que eu quiser. *“É TUDO NOSSO!”*

Á família Brandão e Bitencourt, vocês são minha história e meu legado, de onde retiro exemplos de tudo que posso me tornar.

Á minha noiva, você me ensinou o quão pouco é necessário para ser feliz e que não importa o quão longe eu queira ir, o importante é aproveitar o caminho, pois a felicidade está nas pequenas coisas da vida. Mesmo em momentos difíceis durante esses 4 anos, eu sabia que tudo ia ficar bem, pois você estava comigo.

Ao meu sogro Luiz, sogra Lelei e cunhada Renata, obrigado por me recebem em sua família com tanto amor e carinho desde o primeiro dia. Eu seria um fracasso se tentasse descrever o quanto vocês contribuíram para minha vida. Obrigado por todo carinho.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório nestes 4 anos: Mariane, Nathalia, Raquel, Glaucia, Israel, Niele, Arthur, Andressa, Geovana e Isabela, que me incentivaram a todo momento e diretamente contribuíram para este trabalho. Obrigado a todos vocês.

Á Silvana, que foi o suporte técnico e ombro amigo durante estes 4 anos. Suas palavras me deram a confiança que eu precisava em muitos momentos, e suas broncas me ensinaram muito. Obrigado Sill!.

Ao grupo do professor William L. Klein que me receberam de braços abertos na Northwestern University, me permitindo ter uma das maiores oportunidades acadêmicas de minha carreira. Um agradecimento especial a Erika Cline, que além de me ensinar, teve a resiliência de continuar meu trabalho mesmo após minha volta ao Brasil.

Ao Prof. Daniel Martins e Mariana Fioramonte da UNICAMP, que prontamente me auxiliaram no desenvolvimento do protocolo de *crosslinking*.

Ao Prof. Eduardo por sempre estar disponível para me auxiliar com seu grande conhecimento.

Ao Prof. Júlio e seu aluno Paulo pelo auxílio com para determinação estrutural via SAXS.

Aos meus amigos de café do prédio central da FMRP-USP, que sempre me animaram e ensinam. Minhas melhores ideias vieram destes cafés e conversas de corredor.

A todos os Professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia por estarem sempre disponíveis e por serem tão carinhosos e atenciosos. Em especial ao pessoal da secretaria Ivone, Rose e Ronaldo, por sempre resolverem nossos pepinos com tanta preocupação. E a Cacilda, Lúcia, Silvia, Silvana e Odete por sempre serem tão carinhosas comigo.

A FAPESP, CAPES, CNPq, FAEPA por apoiarem financeiramente a realização deste trabalho.

““Cada vez que você faz uma opção está transformando sua essência em alguma coisa um pouco diferente do que era antes.”

C.S. Lewis

RESUMO

Bitencourt, A. L. B. Isolamento de oligômeros tóxicos do peptídeo β -amiloide usando o anticorpo de cadeia única NUsc1. 2019. 80 f. Tese (Doutorado em ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A doença de Alzheimer é a principal causa de demência em todo o mundo, e é caracterizada pelo acúmulo cerebral de diferentes agregados proteicos, incluindo aqueles formados pelo peptídeo A β . Embora a patogênese da doença de Alzheimer não seja completamente compreendida, evidências crescentes sugerem que os oligômeros solúveis do peptídeo A β desempenham um papel chave no início e progresso da doença. Neste trabalho desenvolvemos e otimizamos um método de isolamento de oligômeros de β -amiloide tóxicos, no qual utilizamos o fragmento de anticorpo de cadeia única NUsc1 como ferramenta de captura. NUsc1 foi descrito pelo nosso grupo como um anticorpo seletivo para oligômeros do peptídeo β -amiloide, sendo capaz de inibir sua citotoxicidade *in vitro* e *in vivo*. Fomos capazes de confirmar a especificidade de NUsc1 por uma subpopulação de oligômeros de β -amiloide tóxicos, e de mostrar que estes desempenham um papel chave no processo de agregação para formação de fibras amiloides. Também, fomos bem-sucedidos no desenvolvimento de um método de isolamento de oligômeros de β -amiloide alvos de NUsc1 utilizando *beads* magnéticas. Este método permitiu o isolamento de oligômeros de β -amiloide de diferentes fontes, incluindo extrato de cérebro de camundongo transgênico. Além disso, avançamos na caracterização destas espécies tóxicas, sendo capazes de estabilizar o complexo formado entre A β Os-NUsc1 através de *crosslinking*. Nossos achados confirmaram a interação preferencial de NUsc1 por oligômeros de β -amiloide de alto peso molecular, auxiliando assim a revelar a identidade destes agregados tóxicos.

Palavras chaves: Oligômeros de β -amiloide, scFv, Doença de Alzheimer

ABSTRACT

Bitencourt, A. L. B. **Isolation of toxic oligomers formed by the β -amyloid peptide using the single-chain antibody NUsc1. 2019. 80 f. Tese (Doutorado em ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.**

Alzheimer disease (AD), the leading cause of dementia worldwide, is characterized by the brain accumulation of different protein aggregates, including those formed by the β -amyloid peptide ($A\beta$). Although the pathogenesis of AD is not completely understood, mounting evidence implicates soluble $A\beta$ oligomers ($A\beta$ Os) as key players in disease onset and progression. In this work, we developed and optimized a method for the isolation of toxic amyloid β -oligomers, in which the single chain antibody fragment NUsc1 was used as a capturing tool. NUsc1 has been described by our group as a selective antibody against amyloid β -oligomers, being able to inhibit $A\beta$ O cytotoxicity both *in vitro* and *in vivo*. Here, we were able to confirm the preference of NUsc1 for a subpopulation of toxic amyloid β -oligomers of ≥ 100 kDa, and show that these species play a key role in the aggregation leading to fiber formation. Also, we have successfully developed a method to isolate amyloid β -oligomers targeted by NUsc1 using magnetic beads. This method allowed us to isolate amyloid β -oligomers from different sources, including transgenic mouse brain extracts, thus helping in the characterization of these toxic amyloid β -oligomers. In addition, we have advanced in the characterization of these toxic species, as we were able to stabilize the complex formed between $A\beta$ Os-NUsc1 through crosslinking. Our findings confirmed the preference of NUsc1 by high molecular weight amyloid β -oligomers, contributing to the field to determine the identity of these toxic aggregates.

Keywords: β -amyloid oligomers, scFv, Alzheimer's Disease

LISTA DE ABREVIATURAS

APOE	Apolipoproteína
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i> (Proteína precursora amiloide)
A β	Peptídeo β -amiloide
A β Os	Oligômeros do peptídeo β -amiloide
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina soro bovina)
CDR	<i>Complementarity-determining region</i> (Região determinante de complementariedade)
DA	Doença de Alzheimer
DFDNB	1,5-difluoro-2, 4-dinitrobenzeno
DMF	N,N-Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade Óptica
DSS	Suberato de disuccinimidila
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i> (quimioluminescência aprimorada)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio de imunoabsorção enzimática)
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida de proteína rápida)
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> (Peroxidase de rabanete)
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo

LDLR	Receptor de LDL
LRP1	Receptor de LDL relacionado a proteína 1
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
NUsc1	<i>Northwestern University single-chain 1</i>
pbNUsc1	<i>phage-bound</i> NUsc1 (NUsc1 ligado a fago)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão fosfato salino)
PSEN	Presenilina
PSF	<i>Point spread function</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene Fluoride</i> (Fluoreto de polivinilideno)
scFv	<i>Single-Chain Variable Fragment</i> (Fragmento de anticorpo variável de cadeia única)
SEC	Size Exclusion Chromatography (Cromatografia de exclusão molecular)
TBST	<i>Tris Buffered Saline Tween</i> (Tampão tris salino com Tween20)
TDMS	Espectrometria de massas <i>Top-Down</i>
TMB	Solução Cromogênica de Tetrametilbenzidina
VLDLR	Receptor de VLDL
XL	Estabilizado por <i>crosslinking</i>
WB	<i>Western Blotting</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processamento da APP	21
Figura 2. Agregação do peptídeo A β e formação de A β Os neurotóxicos	23
Figura 3. Representação esquemática da molécula de IgG e os fragmentos de anticorpos derivados desta estrutura	26
Figura 4. NUsc1 se liga a uma subpopulação de A β Os na superfície de neurônios	43
Figura 5. Inibição da formação de fibras amiloides a partir de A β Os por NUsc1	44
Figura 6. Purificação do fragmento de anticorpo NUsc1	46
Figura 7. Identificação de condições ótimas para o isolamento de A β Os usando NUsc1 imobilizado em <i>beads</i> magnéticas	48
Figura 8. Eluição do complexo A β Os-NUsc1 de <i>beads</i> magnéticas analisado por <i>western blotting</i>	50
Figura 9. Isolamento de A β Os de extrato de cérebro de camundongos transgênicos 5xFAD usando NUsc1 imobilizado em <i>beads</i> magnéticas	52
Figura 10. Análise do peso molecular do complexo A β Os-NUsc1 por filtração através de membranas	53
Figura 11. Isolamento e análise da massa molecular de A β Os estabilizados por <i>crosslinking</i> usando NUsc1 imobilizado	55
Figura 12. Análise da estabilidade e do peso molecular do complexo A β Os-NUsc1 eluído de <i>beads</i> magnéticas e submetido a reação de <i>crosslinking</i> com DSS	56
Figura 13. Influência da concentração do agente <i>crosslinker</i> DSS na estabilização e no peso molecular do complexo A β Os-NUsc1	57
Figura 14. Fracionamento e determinação da massa molecular do complexo A β Os-NUsc1 por cromatografia de exclusão molecular	58

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Aspectos clínicos e moleculares da Doença de Alzheimer	17
1.2. Agregados solúveis do peptídeo A β	20
1.3. Conformação dos A β Os	23
1.4. O fragmento de anticorpo de cadeia única NUsc1	25
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivo Geral	29
2.2. Objetivos Específicos	29
3. METODOLOGIA	31
3.1. Preparação de oligômeros do peptídeo A β	31
3.1.1. Preparação de filmes do peptídeo A β	31
3.1.2. Ressuspensão dos filmes do peptídeo A β	31
3.2. Produção e purificação de NUsc1	32
3.2.1. Produção de NUsc1 em <i>E. coli</i>	32
3.2.2. Purificação de NUsc1 por cromatografia de afinidade	32
3.2.3. Análise da integridade e pureza de NUsc1 purificado	33
3.3. Quantificação da co-localização entre NUsc1 e A β Os na superfície de neurônios	33
3.3.1. Agregação de A β Os monitorada por fluorescência de Tioflavina ..	34
3.4. Imobilização de NUsc1 em <i>beads</i> magnéticas e sua aplicação no isolamento bioquímico de oligômeros de A β	34
3.4.1. Imobilização de NUsc1 em <i>beads</i> magnéticas para o isolamento de A β Os	34
3.4.2. Liberação do complexo A β Os-NUsc1 das <i>beads</i> magnéticas e análise por SDS-PAGE	35
3.4.3. Análise do isolamento bioquímico de A β Os usando NUsc1 imobilizado em <i>beads</i> magnéticas via “ELISA em <i>beads</i> ”	36
3.5. Isolamento de A β Os de extrato de cérebro camundongos transgênicos 5xFAD	37
3.5.1. Preparação do extrato de cérebro	37
3.5.2. Isolamento de A β Os de extrato de 5xFAD	37
3.6. Caracterização bioquímica dos A β Os isolados por NUsc1	38

3.6.1. Análise do peso molecular do complexo AβOs-NUsc1 com auxílio de filtros	38
3.6.2. Análise da espécie de AβOs alvo de NUsc1 utilizando <i>crosslinked</i> AβOs	38
3.6.3. <i>Crosslinking</i> do complexo AβOs-NUsc1 por DSS	39
3.6.4. Análise do peso molecular do complexo AβOs-NUsc1 por gel filtração	39
4. RESULTADOS	42
4.1. Quantificação dos AβOs ligados a superfície neuronal reconhecidos por NUsc1	42
4.2. Avaliação do papel das espécies oligoméricas reconhecidas por NUsc1 na formação de fibras amiloides de Aβ	43
4.3. Purificação do fragmento de anticorpo NUsc1	45
4.4. Otimização da ligação de AβOs a NUsc1 imobilizado em <i>beads</i> magnéticas	46
4.5. Isolamento de espécies de AβOs reconhecidas por NUsc1 em preparação sintética de AβOs	49
4.6. Isolamento de espécies de AβOs reconhecidas por NUsc1 em extrato de cérebro de camundongo transgênico 5xFAD	50
4.7. Determinação da massa molecular do complexo AβOs-NUsc1 por filtração em membranas	52
4.8. Isolamento de AβOs estabilizados por <i>crosslinking</i> usando NUsc1 imobilizado	54
4.9. Estabilização do complexo AβOs-NUsc1 por <i>crosslinking</i>	55
4.10. Determinação do peso molecular do complexo AβOs-NUsc1 por cromatografia de gel filtração	57
5. DISCUSSÃO	60
6. CONCLUSÃO	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos clínicos e moleculares da Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) é um dos maiores desafios de saúde pública do século XXI. A DA afeta atualmente cerca de 47 milhões de pessoas no mundo inteiro, sendo a principal causa de demência (PRINCE *et al.*, 2015; SCHELTENS *et al.*, 2016). Nesta doença, o envelhecimento é o maior fator de risco e, como ainda não existem métodos efetivos de diagnóstico *pre-mortem* e tratamento, espera-se que sua incidência continuará a crescer nos próximos anos, em paralelo ao aumento na expectativa de vida. Segundo Prince e colaboradores (2013), estima-se que em 2050 o número de pessoas com idade igual ou superior a 60 anos aumente para 1,25 bilhões, o que corresponderá a aproximadamente 22% da população mundial, sendo que 79% destas pessoas serão moradores das regiões menos desenvolvidas do planeta.

Em 1907, Alois Alzheimer descreveu os sintomas apresentados por uma paciente de 51 anos, Auguste Deter, que possuía claramente um grande déficit cognitivo relacionado principalmente a perda de memória. Alois Alzheimer descreveu os sintomas de sua paciente da seguinte forma: *“Her memory is seriously impaired. If objects are shown to her, she names them correctly, but almost immediately afterwards she has forgotten everything. When reading a text, she skips from line to line or reads by spelling the words individually, or by making them meaningless through her pronunciation. In writing she repeats separate syllables many times, omits others and quickly breaks down completely. In speaking, she uses gap-fills and a few paraphrased expressions (“milk-pourer” instead of cup); sometimes it is obvious she cannot go on. Plainly, she does not understand certain questions. She does not remember the use of some objects.”*. Após sua morte, o Dr. Alzheimer analisou histologicamente o cérebro da paciente através de marcação com prata, e observou a presença de placas neuríticas, emaranhados neurofibrilares e angiopatia amiloide, que então se tornaram marcas fisiopatológicas desta doença que agora leva o seu nome (BONDI *et al.* 2017).

As causas da DA ainda não foram completamente desvendadas, pois envolve uma combinação de fatores genéticos, moleculares e ambientais (BONDI *et al.*, 2017).

Também pode-se destacar alguns fatores de risco, como diabetes mellitus, hipertensão, obesidade de meia idade, sedentarismo, depressão, fumo e baixo nível educacional (NORTON *et al.*, 2014), os quais estão relacionados a doenças cerebrovasculares, já reconhecidas como potencial fator de risco de desenvolvimento da DA. Os fatores de risco aumentam a probabilidade de ocorrência e do avanço da DA, porém os fatores genéticos e principalmente os moleculares tem maior destaque no seu desencadeamento. Aproximadamente 1 – 5% de todos os casos de DA documentados derivam da herança de desordens autossomais dominantes familiares (REITZ E MAYEUX, 2014). Pessoas com a forma familiar da DA carregam raras mutações autossômicas dominantes em um dos genes da presenilina (PSEN-1 e PSEN-2), a subunidade catalítica da γ -secretase, essencial na clivagem da proteína precursora amiloide (APP) que dá origem ao peptídeo β -amiloide ($A\beta$). Estas mutações na presenilina, assim como mutações na APP, geram um comportamento anômalo de clivagem reduzindo a especificidade e consequentemente levando a formação de peptídeos mais longos de 42 aminoácidos ($A\beta_{42}$), mais propensos a agregação. Este efeito é capaz de alterar a proporção fisiológica entre peptídeos curtos e longos ($A\beta_{40}/A\beta_{42}$), que como consequência leva ao desenvolvimento da doença (SCHELTENS *et al.*, 2016).

Mais comum é a forma esporádica da DA, que corresponde a mais de 95% dos casos, se instala em média aos 80 anos, e apresenta fatores genéticos mais complexos e menos compreendidos (REITZ E MAYEUX, 2014). Atualmente, sabe-se que o alelo $\epsilon 4$ do gene da Apolipoproteína E (APOE4), localizado no cromossomo 19, é o maior fator de risco genético para o desenvolvimento dessa forma da DA. Embora o principal papel da APOE seja como carreadora de colesterol e outros lipídeos, especula-se que sua relação com a DA seja pelo seu papel na mediação da depuração do peptídeo $A\beta$. Portadores APOE4 podem apresentar déficits de depuração do peptídeo $A\beta$, uma vez que a remoção de $A\beta$ do sistema nervoso central e do plasma é reduzida em camundongos *knock-in* APOE4 humana (CASTELLANO *et al.*, 2011; SHARMAN *et al.*, 2010). O principal impacto da APOE talvez esteja relacionado com a interação do peptídeo $A\beta$ com receptores da APOE na superfície celular, incluindo os receptores de LDL relacionado com a proteína 1 (LRP1), receptor de LDL (LDLR) e receptores de VLDL (VLDLR). A ligação do peptídeo $A\beta$ isoladamente ou em complexo com a APOE, libera o peptídeo $A\beta$ para via lisossomal ou leva a transcitose no plasma através da barreira hematoencefálica (HOLTZMAN *et al.*, 2012).

A relação entre as mutações nos genes da APP ou das PSEN-1 e PSEN-2, que levam ao acúmulo do peptídeo A β , e a presença majoritária do peptídeo A β nas placas senis, levou a formulação da hipótese da cascata amiloide. Nesta hipótese, alterações que levam ao acúmulo do peptídeo A β teriam como consequência a formação de fibras amiloides, que por sua vez levariam a hiperfosforilação patológica da proteína estabilizadora de microtúbulo Tau, com consequente morte neuronal e demência. Segundo essa hipótese, portanto, as alterações no nível de fosforilação da proteína Tau, assim como de sua solubilidade, que é bem caracterizada como marcador da DA, seria uma consequência da deposição do peptídeo A β . Embora esta hipótese tenha sido bem aceita pela comunidade científica, ela possui limitações no que diz respeito a explicar se as placas e emaranhados neurofibrilares poderiam ser produtos da neurodegeneração da DA, em vez de sua causa, e como o depósito de A β levaria à formação dos emaranhados neurofibrilares (REITZ, 2012).

Outras hipóteses consideram o acúmulo de A β e de tau hiperfosforilada como mecanismos independentes, mas paralelos, que possuem um intermediário comum que ainda permanece não identificado. Apesar de os emaranhados de tau serem usados como marcadores histopatológicos da DA, e de mutações nos genes codificantes de tau levarem a demência (como na Demência fronto temporal; FOIANI *et al.*, 2018), existem ainda algumas dúvidas em relação ao papel da Tau na patogênese da DA. Na Demência fronto-temporal, os emaranhados neurofibrilares formados pela Tau hiperfosforilada são histologicamente diferente dos emaranhados encontrados em pacientes com DA, pois estão majoritariamente em sítios extra-hipocampais. Além disso, o cérebro dos pacientes com Demência fronto-temporal é desprovido de placas amiloides. Essas observações demonstram que os emaranhados de Tau não são necessariamente consequência do acúmulo de A β , e podem induzir neurodegeneração de forma independente. Sendo assim, pode-se supor que a formação das placas amiloides características da DA seja consequência de mudanças no metabolismo do A β (HARDY *et al.*, 1998; HUTTON *et al.*, 1998; SCHELTENS *et al.*, 2016).

A importância do metabolismo do A β na DA também é reforçada por evidências advindas da comparação entre camundongos transgênicos que super-expressam APP e tau humanas, ou somente tau, com mutações encontradas nas formas familiares da doença. Lewis e colaboradores (2001) demonstraram que os animais que super-expressavam APP e tau mutantes desenvolveram um aumento significativo

na formação de emaranhados neurofibrilares em comparação com os animais que apenas super-expressavam tau mutante, de mesma idade. Estes dados destacaram a importância da APP, ou do peptídeo A β , na formação dos emaranhados neurofibrilares, assim como sugeriu que estes fazem parte do evento inicial e central na DA.

1.2. Agregados solúveis do peptídeo A β

O peptídeo A β derivado do processamento proteolítico da APP já está bem estabelecido como um dos protagonistas na DA, apesar de os mecanismos pelos quais o A β atua ainda não estarem completamente esclarecidos. O peptídeo A β pode apresentar de 36 a 43 aminoácidos, todos produtos do processamento proteolítico APP. A APP pode ser processada por três diferentes proteases chamadas α , β e γ -secretases, sendo este processamento dividido em duas vias principais, chamadas via amiloidogênica, que leva a formação do peptídeo A β , e via não-amiloidogênica, que previne a formação do peptídeo A β (Fig. 1). O A β produzido na via amiloidogênica é resultado da ação da β e γ -secretase, sendo a β -secretase responsável por iniciar o processo eliminando uma grande parte da APP (como sAPP β) e gerando um fragmento carboxi-terminal (β CTF ou C99), que é então clivado pela γ -secretase em um ambiente hidrofóbico na membrana plasmática (HAASS *et al.*, 2012).

Figura 1. Processamento da APP. Na via não-amiloidogênica, a ação da α -secretase gera um ectodomínio (sAPP α) e um fragmento C-terminal de 83 aminoácidos, o qual é clivado pela γ -secretase liberando p3 para o meio extracelular. Na via amiloidogênica, a APP é clivada pela β -secretase gerando um fragmento menor (sAPP β) que é liberado para o meio e, o C-terminal C99 que é substrato da γ -secretase para produção do peptídeo A β . Fonte: adaptado de QUERFURTH E LAFAERLA, 2010.

Como já foi descrito, na via amiloidogênica, a ação da γ -secretase sobre o substrato C99 pode gerar peptídeos A β de diferentes tamanhos (38 a 43 aminoácidos), sendo os peptídeos de maior comprimento, como o A β ₄₂, os mais hidrofóbicos e portanto mais propensos a agregação. Sendo assim, estas mudanças no comprimento C-terminal do peptídeo A β pode ter efeitos drásticos na cinética de agregação e toxicidade dos agregados destes fragmentos (DE STROOPER, 2010; QUERFURTH E LAFAERLA, 2010). O peptídeo A β ₄₀, por exemplo, é encontrado em uma proporção dez vezes maior com relação ao peptídeo A β ₄₂ em cérebros saudáveis, e possui uma cinética de agregação muito menor que o peptídeo A β ₄₂ (que possui produção aumentada na DA), além de formarem agregados menos neurotóxicos (QUERFURTH E LAFAERLA, 2010).

Moléculas do peptídeo A β são sabidamente capazes de se auto associarem de maneira não covalente em múltiplos estados de montagem, sendo cada estado é capaz de levar a diferentes efeitos fisiopatológicos (BHARADWAJ *et al.*, 2009). Os monômeros deste peptídeo inicialmente se associam em um processo de nucleação, o qual leva à formação de pequenos agregados solúveis e metaestáveis chamados de oligômeros do peptídeo A β (A β Os). Estes, por sua vez, podem sofrer adições e se estender até formarem protofibras. Finalmente, as protofibras se juntam para formar

fibras grandes, insolúveis e ricas em estrutura secundária em folha β , que então precipitam e se acumulam para formação das placas senis (GILBERT, 2013).

Já foi demonstrado que o peptídeo A β em sua forma monomérica não é tóxico, e que a carga de fibras amiloides -de A β não é diretamente proporcional à severidade da DA ou ao número de placas senis (LORENZO E YANKNER, 1994; MCLEAN *et al.*, 1999). Uma explicação para esse paradoxo foi apresentada por LAMBERT *et al.*, 1998 e WALSH *et al.*, 2002. Nesses trabalhos, foi demonstrado que oligômeros solúveis do peptídeo A β (A β Os), metaestáveis, são tóxicos *in vitro* e *in vivo*. Foi mostrado ainda que os déficits de aprendizagem e de memória causados por A β Os em camundongos transgênicos modelo da DA podem ser reduzidos quando os níveis de A β Os são diminuídos pela aceleração da formação de fibras (CHENG *et al.*, 2007). O papel dos A β Os como as principais espécies tóxicas formadas pelo peptídeo A β também foi demonstrado por MEILANDT *et al.*, 2009, que observaram que modelos animais da DA que não possuíam placas amiloides cerebrais, mas eram positivos para A β Os, apresentavam déficit cognitivo. Já em cérebros humanos *post-mortem*, a quantidade de A β Os extraído foi até 70 vezes maior em pacientes com DA quando comparado com indivíduos controle da mesma idade, portanto um biomarcador mais fidedigno da DA do que o número de placas amiloides (GONG *et al.*, 2003; MC DONALD *et al.*, 2010). Em conjunto, esses achados indicam que os A β Os são agregados solúveis do peptídeo A β com atividade neurotóxica, e que portanto possuem um papel chave no mecanismo de gênese da DA (Fig. 2).

Figura 2. Agregação do peptídeo Aβ e formação de AβOs neurotóxicos. O peptídeo Aβ gerado pelo processamento da APP é enviado para o meio extracelular e se auto-associa para formar agregados solúveis (AβOs), que são neurotóxicos. Fonte: adaptado de VIOLA E KLEIN, 2015.

1.3. Conformação dos AβOs

Mesmo com todos os avanços na identificação dos AβOs como espécies neurotóxicas, a conformação destes agregados permanece desconhecida. Vários estudos sustentam que espécies oligoméricas de baixo peso molecular, como dímeros, trímeros e tetrâmeros, que foram extraídas de cérebros humanos e de modelos transgênicos, seriam as espécies mais tóxicas (BROUILLETTE *et al.*, 2012; POLING *et al.*, 2008; SHANKAR *et al.*, 2008). Isso se deve ao fato de que os dímeros estáveis em SDS são encontrados em extratos de cérebro post-mortem de pacientes da DA (MC DONALD *et al.* 2010; SHANKAR *et al.* 2009), assim como a fração de baixo peso molecular correspondente a dímeros e triméros de uma gel filtração do extrato de cérebros da DA prejudicam a potenciação de longa duração (LTP) (SHANKAR *et al.*, 2008). Outros trabalhos também sustentam a hipótese de que as espécies oligoméricas de baixo peso molecular tem grande potencial sinaptotóxico

(JIN *et al.*, 2011). No entanto, já foi demonstrado que a relação entre a grande quantidade de dímeros, e o déficit cognitivo em camundongos transgênicos, não é uma relação direta e linear (LESNÉ *et al.*, 2006), assim como já foi demonstrado que dímeros rapidamente se tornam estruturas maiores e mais estáveis como as protofibras (O'NUALLAIN *et al.*, 2010). Logo, é difícil associar os oligômeros de baixo peso molecular à DA, pois não se sabe ao certo se estas espécies encontradas são produtos de outras estruturas, ou são unidades iniciais de construção das espécies tóxicas (LARSON E LESNÉ, 2012).

Muitos outros trabalhos (e.g. GONG *et al.*, 2003; LESNÉ *et al.*, 2006; NOGUCHI *et al.*, 2009; SEBOLLELA *et al.*, 2014; TOMIC *et al.*, 2009) reportaram a presença de oligômeros de alto peso molecular (como dodecâmeros) em extratos de cérebro de humanos com DA, ou de camundongos transgênicos. Outros trabalhos também suportaram a hipótese de que os A β Os de alto peso molecular poderiam ser os agentes neurotóxicos na DA, como os A β Os tóxicos maiores que 100 kDa descritos por Tomic *et al.* 2009 e Noguchi *et al.* 2009. Além disso, nosso grupo também demonstrou a presença de espécies oligoméricas do peptídeo A β de aproximadamente 80 kDa em extratos de cérebros humanos com DA (SEBOLLELA *et al.*, 2014). Recentemente, também foi demonstrado a capacidade dos oligômeros de alto peso de induzir neurotoxicidade através de danos na membrana plasmática (YASUMOTO *et al.*, 2019). Em contrapartida, alguns dados sugerem que oligômeros de alto peso molecular extraídos do cérebro *post-mortem* de pacientes da DA são menos neurotóxicos que os de baixo peso molecular, e que quando os de alto peso molecular dissociavam eram formadas estruturas menores mais tóxicas (YANG *et al.*, 2017).

A dificuldade na identificação e caracterização das espécies oligoméricas tóxicas se deve principalmente a heterogeneidade dos oligômeros. Os A β Os podem ser subdivididos em espécies que são intermediárias para formação de fibras, ou espécies que não levam a formação de fibras (CHITI E DOBSON, 2006). A via de formação de fibra se inicia através de uma fase de nucleação lenta (ou fase lag), que envolve basicamente a formação de núcleos críticos termodinamicamente desfavoráveis que está associado a uma etapa de transição, e uma vez formados os núcleos críticos, ocorre a fase de alongamento ou crescimento, que é um aumento rápido para formação de estruturas fibrilares (MURPHY, 2007; XUE *et al.*, 2008).

Contudo, a caracterização da via de agregação pode ser complicada, envolvendo outras espécies de agregados como por exemplo as protofibras, que são estruturas menores e alongadas que comumente são caracterizadas como uma fase de transição entre os oligômeros e fibras (LANNFELT *et al.*, 2014). Além disso, também são descritas agregados e fibras estruturalmente diferentes com diferentes níveis de toxicidade (PETKOVA *et al.*, 2005), e também diferentes estruturas de fibras estão associadas com diferentes fenótipos clínicos (PARAVASTU *et al.*, 2009; QIANG *et al.*, 2017). Logo, ainda é um desafio caracterizar quais são as espécies tóxicas relevantes na DA, já que existem espécies transientes que possuem plasticidade para formação de outras estruturas, além de existirem diferentes vias de agregação.

1.4. O fragmento de anticorpo de cadeia única NUsc1

Anticorpos monoclonais têm mostrado um grande potencial terapêutico para doenças do sistema nervoso central (WALSH, 2004), mas sua alta massa molecular é um desafio quando o órgão alvo é o cérebro, uma vez que a maioria das IgGs não atravessa de forma eficaz a barreira hematoencefálica (BOADO *et al.*, 2007). Além disso, em testes clínicos algumas IgGs induziram altas respostas inflamatórias com consequências indesejáveis, como meningoencefalite e, em alguns casos, morte (BOADO *et al.*, 2007; GILMAN *et al.*, 2005). Como alternativa para contornar estas desvantagens relacionadas às IgGs, foram desenvolvidos fragmentos de anticorpos artificiais (MONNIER *et al.*, 2013), que possuem menor massa molecular, e reduzido potencial pro-inflamatório.

Os fragmentos de anticorpos são moléculas derivadas de imunoglobulinas, que possuem tamanhos e arranjos estruturais diferentes. Dentre os fragmentos de anticorpos, existem três grandes grupos de moléculas que são mais comumente produzidas: Fab, scFv e VHH (NELSON, 2010). Inicialmente foram produzidos por remoção do domínio Fc das imunoglobulinas, resultando no fragmento Fab (massa molecular de ~50 kDa), que é composto pelos domínios C_{H1}, C_L unidos por uma ponte dissulfeto, e os domínios V_H e V_L, que contém as regiões hipervariáveis responsáveis pelo reconhecimento do antígeno (STROHL *et al.*, 2012). Posteriormente, com os avanços na engenharia de anticorpos, foi possível desenvolver fragmentos de anticorpo ainda menores, chamados de scFv (ou cadeia única) (~28 kDa) e VHH (~15-

20 kDa) (NELSON E REICHERT, 2009), como esquematizado na Figura 3. Os scFvs contêm somente os domínios variáveis V_H e V_L ligados por um *linker* peptídico, enquanto os VHs correspondem somente ao domínio polipeptídico pesado similares a V_H (MONNIER *et al.*, 2013).

Figura 3. Representação esquemática da molécula de IgG e os fragmentos de anticorpo derivados desta estrutura. A IgG é composta por uma região F_c (4 domínios C_{H2}) e 2 regiões denominadas Fab (domínios C_L , C_{H1} , V_L e V_H). O fragmento de anticorpo primeiramente derivado da IgG corresponde a porção Fab, da qual ainda se derivam os fragmentos de anticorpos scFv (domínios V_L e V_H) e VH/VHH (somente o domínio V_H).

Os fragmentos de anticorpos do tipo scFv tem sido investigados como possível estratégia terapêutica para amiloidoses do sistema nervoso central, incluindo a DA (MANOUTCHARIAN *et al.*, 2017). Os scFvs para DA foram inicialmente desenvolvidos para se ligarem na sequência linear do peptídeo A β , isto é, para serem capazes de se ligar ao A β monomérico ou agregado, e demonstraram capacidade de reduzir a agregação e a toxicidade induzida por A β (FRENKEL E SOLOMON 2002; MARTIN-PEÑA *et al.*, 2017; NISBET *et al.*, 2013; ROBERT *et al.*, 2009). No entanto, devido aos fracassos nos testes clínicos com anticorpos contra a sequência linear do A β , fez-se necessário uma busca por anticorpos mais específicos, que reconhecessem preferencialmente A β na conformação de A β Os tóxicos encontrados nos pacientes com DA (LAMBERT *et al.*, 2007). Sendo assim, nosso grupo iniciou uma busca por fragmentos de anticorpos de cadeia única (ou scFv) que fossem capazes de

reconhecer especificamente oligômeros do peptídeo A β , para isto, foi utilizado a técnica de *phage display* para seleção dos fragmentos de anticorpo, dando origem a 11 fragmentos de anticorpos nomeados de NUscs 1-11. Estes fragmentos de anticorpos de cadeia única não tinham especificidade nem por monômeros do peptídeo A β , e nem para fibras. Dentre os NUscs selecionados, foi demonstrado que o NUsc1 detinha a habilidade de se ligar apenas a uma subpopulação neurotóxicas de A β Os de alto peso molecular (SEBOLLELA *et al.*, 2017; VELASCO *et al.*, 2012). No trabalho de Sebollela e colaboradores (2017) também foram mostrados dados indicando que NUsc1 também era capaz de detectar A β Os em cultura primária de neurônios, em cérebro de camundongos transgênicos APP/PS1, e em cérebro humano post-mortem de portadores da DA. Além disto, NUsc1 também foi capaz de conferir neuroproteção *in vitro* reduzindo o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e hiperfosforilação de Tau induzidas por A β Os (SEBOLLELA *et al.*, 2017; VELASCO *et al.*, 2012).

Neste trabalho, usamos a capacidade do fragmento de anticorpo de cadeia única NUsc1 de reconhecer uma subpopulação de A β Os para capturar espécies tóxicas de A β Os em solução. Acreditamos que se trata de uma abordagem inédita, para tentar solucionar um problema central na busca pela compreensão da identidade das entidades oligoméricas mais tóxicas na DA, que é o isolamento bioquímico de oligômeros a partir de amostras complexas compostas por agregados de diversas massas moleculares. Esse passo representa a etapa inicial, porém crítica na elucidação estrutural dos A β Os neurotóxicos que podem ser os alvos principais na busca pelo tratamento definitivo para a DA.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver um ensaio para isolamento de oligômeros tóxicos do peptídeo A β centralizado na seletividade do anticorpo conformacional de cadeia única NUsc1.

2.3. Objetivos específicos

- Avaliar o papel dos A β Os alvos de NUsc1 na agregação amiloide do peptídeo A β ;
- Padronizar o protocolo de isolamento de A β Os utilizando *beads* magnéticas;
- Caracterizar bioquimicamente o complexo A β Os-NUsc1 resultantes da metodologia de isolamento;
- Estabelecer um método de estabilização do complexo A β Os-NUsc1 via *crosslinking*;
- Avaliar o protocolo de isolamento na captura de A β Os proveniente de tecido cerebral.

METODOLOGIA

3. METODOLOGIA

3.1. Preparo de oligômeros do peptídeo A β

3.1.1. Preparação de filmes do peptídeo A β

Seguindo a metodologia descrita por Chromy e colaboradores (2003), 1 mg de peptídeo A β_{42} humano (American Peptide), foi ressuspensionado em 500 μ L de hexafluoroisopropanol (HFIP, Sigma) gelado. Sem homogeneizar, o frasco foi selado com parafilme e mantido em repouso por 1 h a temperatura ambiente. Após o repouso, o conteúdo foi aliquotado igualmente em fluxo laminar em oito tubos estéreis gelados. Estes tubos permaneceram abertos *overnight* a temperatura ambiente no fluxo laminar. Em seguida, os tubos foram cobertos com parafilme furado, e secos utilizando *speed vac* por 10 minutos. Os tubos foram armazenados em caixa contendo sílica dessecante no ultrafreezer a -80°C.

3.1.2. Ressuspensão dos filmes do peptídeo A β

Ainda seguindo a metodologia descrita por Chromy e colaboradores (2003), em um fluxo laminar, um tubo com filme de A β foi ressuspensionado em 5 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma), com movimentos suaves com a pipeta, evitando o atrito entre a ponteira e o tubo. A solução foi transferida para um tubo *low binding* (Axygen) e diluída em 245 μ L de PBS (Laborclin) estéril, sendo mantido em gelo até a próxima etapa. Simultaneamente, em um tubo *low binding* vazio e estéril, o veículo foi preparado com a diluição de 5 μ L de DMSO em 245 μ L de PBS estéril. Ambos os tubos foram levados ao vórtex por 10 segundos. Os dois tubos foram incubados por 24 h a 4°C. Após a incubação, as amostras foram submetidas à centrifugação a 14000g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo pré-gelado. A preparação de A β Os foi então quantificada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), dividida em alíquotas e mantida a 4°C (até 3 dias depois da ressuspensão) ou congelada a -20°C para uso a longo prazo.

3.2. Produção e purificação de NUsc1

3.2.1. Produção de NUsc1 em *E. coli*

NUsc1 foi expresso na cepa HB2151 de *E. coli* transformada previamente com o vetor pIT-2 contendo a sequência codificadora para NUsc1 (SEBOLLELA *et al.*, 2017; VELASCO *et al.*, 2012). As bactérias foram crescidas em uma placa de petri contendo meio TYE sólido, com ampicilina e 1% de glicose. Foi utilizada uma colônia isolada para inocular 10 ml de meio 2xTy, suplementado com ampicilina (100 µg/ml) e 1% de glicose, que foi incubado a 37°C com agitação à 220-250 rpm, *overnight*. No dia seguinte, o pré-inóculo foi diluído 1:100 em 1 L de meio 2xTy, com ampicilina (100 µg/ml) e 0,1% de glicose, que foi incubado a 37°C sob agitação de 250 rpm, até a cultura atingir uma D.O. de 0,7. Em seguida, foi adicionado ao meio de cultura 0,5 mM de IPTG (Isopropil-b-D-galactosídeo), a fim de induzir a expressão do fragmento de anticorpo. A cultura foi incubada *overnight* sob agitação de 220 rpm a 30°C. No dia seguinte, a cultura foi centrifugada a 5000g por 60 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado, e centrifugado novamente a 5000g por 30 minutos a 4°C, e imediatamente usado na purificação do anticorpo.

3.2.2. Purificação de NUsc1 por cromatografia de afinidade

O sobrenadante do meio de cultura foi diluído em uma proporção de 1:2 em PBS pH 7,4 gelado, e o pH do meio verificado após a adição. A coluna de proteína A (HiTrap Protein A HP, GE) de 1 ml foi previamente lavada com 5 ml de água milli-Q, e depois equilibrada com 25 ml de PBS pH 7,4. Todos os processos de preparação da coluna, carregamento e eluição foram realizados a 4°C (câmara fria). O meio diluído em PBS foi carregado na coluna em fluxo de 0,7ml/min. Após o carregamento, a coluna foi lavada com 50 ml de PBS pH 7,4 + 300mM de NaCl, seguido de lavagem com 80 ml de PBS pH 7,4. Os microtubos para coleta das frações do eluato receberam previamente 60 µL de Tris 1M pH 8 para neutralizar o tampão glicina utilizado na eluição. NUsc1 foi eluído da coluna com tampão glicina 100 mM pH 2,8, com fluxo

máximo de 1 ml/min, em frações de 250µl. Após a eluição, a quantificação de NUsc1 foi realizada pelo método de Bradford (BioRad).

3.2.3. Análise da integridade e pureza de NUsc1 purificado

As frações coletadas da purificação de NUsc1 via coluna de proteína A foram primeiramente analisadas por SDS-PAGE utilizando gel de poliacrilamida 12% (Acrilamida 30%, BioRad). A corrida foi realizada a 100V com corrente variável, utilizando o padrão de peso molecular *All-Blue* (BioRad). Após o SDS-PAGE, o gel foi corado com commassie blue e fotografado no *ChemiDoc* (BioRad). Para análise da integridade das caudas de His e c-myc por *western blotting*, foi utilizado o mesmo protocolo de SDS-PAGE, e as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose 0,45 µm (GE) utilizando um transferidor semi seco (*Trans-blot Turbo Transfer System*, Bio-Rad) a ~16V (voltagem variável) e 300 mA durante 40 min, em tampão de transferência (48 mM Tris, 39 mM glicina, 20% metanol, 0,04% SDS). A membrana foi então incubada sob agitação em solução de bloqueio (Leite desnatado 5% em *Tris-buffered saline*: 20 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) por 1 h, a temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi incubada *overnight* com solução de anticorpo primário anti-his-tag (BioLegend) diluído 1:5000 em BSA 2%/TBS-T, ou de anti-c-myc-tag (Sigma) 1:2000 em BSA 2%/TBS-T, a 4°C. No dia seguinte, a membrana foi lavada 3 x 10 min com TBS-T e então incubada com solução de anticorpo secundário anti-mouse-HRP (GE), por 1 h a temperatura ambiente. A membrana foi novamente lavada 5 x 10 min com TBS-T, e então revelada utilizando o kit *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE). As imagens foram capturadas usando o fotodocumentador (*ChemiDoc*, Bio-Rad).

3.3. Quantificação da co-localização entre NUsc1 e AβOs na superfície de neurônios

Foram utilizados 5 campos provenientes de 2 experimentos independentes realizados pelo Prof. Adriano Sebollela no Lab. do Prof. William L. Klein (Northwestern University, EUA). Neste experimento, uma cultura primária de neurônios foi primeiramente incubada com AβOs marcados com a sonda fluorescente FAM, e

depois com NUsc1 ligado a fago (pbNUsc1). O percentual de co-localização foi determinado independentemente da intensidade em cada canal. A quantificação foi realizada utilizando o *plug-in* Coloc 2, utilizando o valor padrão de 3px para *point spread function* (PSF). O gráfico foi gerado considerando a porcentagem de sinal para A β Os co-localizados com o sinal de pbNUsc1.

3.3.1. Agregação de A β Os monitorada por fluorescência de Tioflavina-T

Em uma placa de 96 poços de fundo preto (Perkin Elmer) posicionada sobre uma camada de gelo, foram adicionados: 70,5 μ L de PBS, pH 7,2; 37,5 μ L de Tioflavina-T (ThT, Sigma) 40 μ M diluída em PBS; 21 μ L de NUsc1 (concentração estoque 35,7 μ M); e 23 μ L de A β Os (estoque 65 μ M). O volume final foi de 150 μ L. Imediatamente após a montagem, a placa foi lida em espectrofluorímetro de placa EnSpire (PerkinElmer), utilizando os comprimentos de onda de 450nm para excitação e 482nm para emissão, com agitação orbital suave de 5 segundos antes da leitura. Em seguida, a placa foi vedada com uma tampa adesiva para evitar evaporação, e incubada em shaker a 37°C com agitação de 50 rpm. Leituras foram realizadas a cada 4 h até o tempo total de 20 h. Para os microscopia eletrônica de transmissão (MET), as amostras correspondentes aos pontos finais de 20 h foram diluídas 10x em água e 3 μ L da diluição foi aplicado na grade de cobre, que secou por 1 h. As amostras foram fixadas com acetato de uranila 2% e imageadas em um microscópio eletrônico (JEOL modelo JEM-100CXII, câmera ORCA-HR)

3.4. Imobilização de NUsc1 em *beads* magnéticas e sua aplicação no isolamento bioquímico de oligômeros de A β

3.4.1. Imobilização de NUsc1 em *beads* magnéticas para o isolamento de A β Os

Partiu-se de 5 μ L de *beads* magnéticas cobertas com cobalto (*Dynabeads His-Tag Isolation and Pulldown*, Thermo Fisher), que foram incubadas com 700 μ L de NUsc1 (a 0,8 μ M) em *Binding/Wash Buffer* (50mM de fosfato de sódio, 300 mM de

NaCl, 0,01% de Tween20, pH 8,0), por 30 min a 4°C, sob agitação. Para remoção do sobrenadante após as incubações e lavagens, foi utilizada uma estante magnética para separar as *beads* do sobrenadante. As *beads* foram lavadas 3 x 1 ml com *Binding/Wash buffer*, e então bloqueadas com solução BSA 0,75% em *Binding/Wash buffer* por 1 h a 4°C. As *beads* foram lavadas 1 x 1 ml com *Binding/Wash buffer* para remoção do excesso de BSA, e então incubadas com A β Os a uma concentração final de 0,8 μ M em *Pull-Down Buffer* (6.5 mM de fosfato de sódio, 140 mM de NaCl, 0,01% de Tween20, pH 7,4) por 2 h a 4°C, sob agitação. Os A β Os não ligados foram removidos por 5 lavagens de 1 ml com *Binding/Wash buffer*. A partir desta etapa, as *beads* foram direcionadas para a eluição. ou para a análise do isolamento pelo ensaio que intitulamos “ELISA em *beads*”.

3.4.2. Liberação do complexo A β Os-NUsc1 das *beads* magnéticas e análise por SDS-PAGE

Para a eluição do complexo A β Os-NUsc1, as *beads* foram transferidas para um novo microtubo, e então incubadas com 100 μ L de *His elution buffer* (300 mM de imidazol, 50 mM de fosfato de sódio, 300 mM de NaCl, 0,01% de Tween20, pH 8,0) em gelo por 15 min. O sobrenadante foi coletado e utilizado imediatamente para os experimentos subsequentes. O complexo A β Os-NUsc1 pós eluição foi analisado por SDS-PAGE, no qual as amostras eluídas foram utilizadas na proporção de 25 μ L do eluato e 7 μ L de tampão de amostra (62.5 mM Tris-HCL, 2% SDS, 10% v/v glicerol, 0,1 M ditioneitol, 0,01% azul de bromofenol, pH 6,8), seguido por fervura por 5 min. As amostras foram aplicadas em um gel de 1mm de espessura de poliacrilamida 12% (12% de acrilamida, 0,32% bis-acrilamida, 375 mM Tris, 0,01% SDS, 0,01% PSA, 0,08% TEMED, pH 8,8), e a corrida procedeu sob voltagem constante de 90V por 2 h e 30min, em tampão de corrida (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS, pH 8,3). Foi utilizado 7 μ L do marcador de peso molecular *All-Blue* (BioRad). Ao final da corrida, o gel foi corado com Coomassie blue, e fotografado no fotodocumentador *ChemiDoc* (BioRad), ou direcionado para *western blotting* (WB). A transferência do WB foi realizada em sistema de transferência semi-seco (*Trans-blot Turbo Transfer System* (Bio-Rad)) a ~16V (voltagem variável) a 300 mA durante 40 min, em tampão de transferência (48 mM Tris, 39 mM glicina, 20% metanol, 0,04% SDS). As proteínas

foram transferidas para membrana de nitrocelulose 0,45 μ m (*GE Healthcare Life Sciences*), que foi incubada em solução de bloqueio [Leite em pó desnatado 5% diluído em TBS-T (*Tris-buffered saline*: 20 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20)] por 1 h. Em seguida, a membrana foi incubada com solução de anticorpo anti-c-myc (Sigma) diluído 1:2000 em solução de BSA 2%/TBS-T, a 4°C e sob agitação suave, *overnight*. Após a lavagem da membrana com solução TBS-T (3 x 10 min), procedeu-se à incubação com o anticorpo secundário anti-mouse IgG-HRP (Amersham) 1:6000, diluído em solução BSA 2%/TBS-T, por 1 h a temperatura ambiente e sob agitação. A membrana foi lavada novamente 5 x 10min com solução TBS-T, e revelada com o kit *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE). As imagens foram capturadas usando o fotodocumentador *ChemiDoc* (Bio-Rad).

3.4.3. Análise do isolamento bioquímico de A β Os usando NUsc1 imobilizado em *beads* magnéticas via “ELISA em *beads*”

A ligação dos A β Os ao NUsc1 imobilizado nas *beads* magnéticas foi analisada pelo ensaio de “ELISA em *beads*”. *Beads* magnéticas previamente funcionalizadas com NUsc1 e incubadas com A β Os (como descrito no tópico **3.5.1**), foram incubadas com solução do anticorpo primário anti-A β 6E10 (*BioLegend*) diluído 1:2000 em *Binding/Wash Buffer* com 0,1% BSA, a 4°C sob agitação vertical por 1 h, lavadas 3 x 1ml com *Binding/Wash Buffer*, e finalmente incubadas com solução de anti-mouse IgG-HRP (Amersham) 1:20000 em *Binding/Wash Buffer* com 0,1% BSA, a 4°C sob agitação vertical por 1 h. Para a revelação, as *beads* foram lavadas 5 x 1ml com *Binding/Wash Buffer*, transferidas para microtubos novos, e incubadas com 100 μ L do substrato colorimétrico da peroxidase TMB (Sigma). A reação ocorreu no escuro a temperatura ambiente por aproximadamente 5 min, e foi interrompida com 50 μ L de ácido sulfúrico 0.5 M. Os tubos foram incubados por 2 min na estante magnética, e o sobrenadante coletado foi transferido para uma placa transparente de 96 poços. A leitura foi realizada em um leitor de placas (EnSpire, PerkinElmer) no comprimento de onda de 450nm.

3.5. Isolamento de A β Os de extrato de cérebro de camundongos transgênicos 5xFAD

3.5.1. Preparação do extrato de cérebro

Os extratos de cérebro de camundongos transgênicos 5xFAD (OAKLEY *et al.*, 2006) ou tipo selvagem (WT) foram preparados a partir do cérebro inteiro congelado de machos de 13 meses. O cérebro foi imerso em 500 μ L de meio de cultura F12 (Ham's F-12, Coisson) em microtubo *Low Binding* e macerados com auxílio de disruptor manual, em banho de gelo. Após 5 minutos de maceração, foram adicionados mais 500 μ L de meio F12, e a maceração prosseguiu por mais 10 min, ou até a obtenção de um extrato homogêneo. O extrato foi centrifugado a 14000g por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a quantidade de proteína total foi determinada pelo método BCA (BCA *Protein Assay kit*, Pierce).

3.5.2. Isolamento de A β Os de extrato de 5xFAD

Para o isolamento de A β Os presentes no extrato de cérebro de camundongos 5xFAD, foi utilizado como base o protocolo de isolamento descrito no tópico **3.5.4**. As *beads* funcionalizadas com NUsc1 foram bloqueadas com BSA, e depois incubadas com os extratos de animais 5xFAD ou WT a 1 ou 3 mg/ml de proteína total, sob agitação por 2 h a 4°C. A *beads* foram lavadas 5 x 1 ml com *binding/wash buffer* e transferidas para microtubos *low-binding* novos. A eluição foi realizada como já descrito anteriormente para o complexo A β Os sintético-NUsc1. Para a detecção dos A β Os de extrato, foi realizado um SDS-PAGE/*western blotting*. As amostras foram diluídas em tampão de amostra, e aplicadas sem fervura em um gel gradiente 4%-20% (Novex, ThermoFisher) a 150V com corrente variável por ~2 h. A transferência foi realizada usando membrana de nitrocelulose em um sistema de transferência submerso por 1 h a 100v e a 4°C (em câmara fria). A membrana foi incubada em solução de bloqueio (Leite em pó desnatado 5% em TBS-T), por 1 h, com agitação suave. Posteriormente, a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-A β Os NU2 (cedido pelo Prof. Dr. William L. Klein, Northwestern University) 1,5 μ g/ml diluído

em BSA 2%/TBS-T, a 4°C e sob agitação suave, *overnight*. Após a lavagem da membrana 3 x 10 min com TBS-T, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-mouse IgG-HRP (Amersham) 1:50000 em BSA 2%/TBS-T, por 1 h a temperatura ambiente, sob agitação suave. Por fim, a membrana foi lavada 5 x 10 min com TBS-T e revelada utilizando SuperSignal West Femto (Thermo). As imagens foram capturadas com o fotodocumentador Image Station 2000MM (Kodak).

3.6. Caracterização bioquímica dos AβOs isolados por NUsc1

3.6.1. Análise do peso molecular do complexo AβO-NUsc1 com auxílio de filtros

O complexo AβOs-NUsc1 eluido (100μL) foi diluído em 100μL de PBS e submetido a filtração assistida por centrifugação em filtros de 50 ou 100 kDa (Amicon Ultra-0.5ml, Millipore) a 10000g, 4°C por 10 min. Alíquotas de 3 μL das frações retida e filtrada foram aplicadas em membranas de nitrocelulose 0,45μm (GE), que ficaram secando por 30 min. As membranas foram então bloqueadas e reveladas utilizando os anticorpos primários anti-Aβ 6E10 (Biolegend) 1:2000 ou anti-c-myc 9E10 (Sigma) 1:2000, seguindo os mesmos parâmetros utilizados para as membranas de *western blotting* do tópico 3.5.2.

3.6.2. Análise da espécie de AβOs alvo de NUsc1 utilizando *crosslinked* AβOs

A preparação de AβOs *crosslinked* (AβO-XL) com DFDNB foi realizada conforme descrito em Cline et al. 2019. O ensaio de isolamento seguiu o mesmo protocolo descrito no tópico 3.5.4 utilizando 0,4 μM da preparação de AβOs-XL. A análise do eluato foi realizada por *western blotting* como descrito no tópico 3.6.2, utilizando o anticorpo primário anti-AβOs NU2 a 1,5 μg/ml e o anticorpo secundário anti-mouse IgG HRP 1:20000 (GE).

3.6.3. *Crosslinking* do complexo A β Os-NUsc1 por DSS

Para a reação de *crosslinking*, foram utilizadas as frações do complexo A β Os-NUsc1 eluído que ficaram retidas no filtro de 50 kDa, como descrito no tópico 3.7.1. A fração retida (~20 μ L a 50 μ g/ml) foi diluída para um volume total de 195 μ L com PBS, e então foi adicionado 5 μ L do reagente *crosslinker* suberato de disuccinimidila (DSS) (Sigma) a 10 mg/ml em DMF (dimetilformamida). A amostra foi imediatamente incubada em um termobloco (Thermo mixer, Eppendorf) a 27°C por 2 h. Para neutralizar o DSS, foi adicionado Tris-HCl 1M pH 8,0 para obter a concentração final de 50 mM. O complexo A β Os-NUsc1 estabilizado por *crosslinking* foi analisado por *western blotting*, como descrito no tópico 3.5.2, utilizando uma membrana de PVDF de 45 μ m (GE), e os anticorpos primário anti-his tag (Sigma) 1:5000 e o secundário anti-mouse IgG-HRP (Amersham) 1:6000.

3.6.4. Análise do peso molecular do complexo A β Os-NUsc1 por gel filtração

O complexo A β Os-NUsc1 eluído das *beads* magnéticas foi aplicado (100 μ L) em uma coluna de exclusão molecular (Biosuite, Waters) acoplada a HPLC (Shimadzu), utilizando um fluxo contínuo de 0,75 ml/min de PBS pH 7,2 a temperatura ambiente. Foram coletadas frações de 220 μ L, que foram mantidas a 4°C. As frações foram usadas em ELISA realizado em placa de 96 poços (*high binding*, COSTAR) previamente coberta com 80 μ L de anti-His-tag (Sigma) 1:2000 em PBS, por incubação a 4°C *overnight*, sem agitação. Antes da incubação com as frações, os poços foram lavados 3 x 300 μ L com PBS e incubados por 1 h com 300 μ L da solução de bloqueio contendo BSA 2% em PBS. Após a remoção da solução de bloqueio, foram adicionados 80 μ L/poço de cada fração coletada no HPLC, e a placa foi então incubada a 4°C, *overnight*. No dia seguinte, os poços foram lavados 3 x 300 μ L com PBS contendo Tween20 0,1% e então foram adicionados 70 μ L/poço de anti-c-myc 1:1000 (Sigma) em PBS/BSA 2%. Após incubação de 2 h a temperatura ambiente com agitação suave, os poços foram novamente lavados com 3 x 300 μ L de PBS contendo Tween20 0,1%. Foram então adicionados 70 μ L do anticorpo secundário anti-mouse IgG-HRP (GE) 1:6000 diluído em PBS/BSA 2%, e então a placa foi

incubada por 1 h a temperatura ambiente com agitação suave. Os poços foram lavados 5 x 300 µL com PBS contendo Tween20 0,1% e então foram adicionados 100 µL/poço de TMB (Sigma) para a revelação. A placa foi mantida protegida da luz por 5-10 min, e então a reação foi interrompida com 50µL de uma solução de ácido sulfúrico 0,5M. A leitura foi realizada leitor de placas ajustado para absorção a 450nm (EnSpire, PerkinHelmer). Alternativamente, o complexo AβOs-NUsc1 eluido das *beads* magnéticas foi aplicado (55µL) em uma coluna de exclusão molecular (Superdex Increase 200 10/300, GE) previamente equilibrada em PBS sob um fluxo de 1.5 ml/min a 4°C. Foram coletadas frações de 200µL até o volume total da coluna (25ml), sendo que 150µL de cada fração foi aplicado diretamente sobre uma membrana de nitrocelulose de 0,45µm com o auxílio de um sistema *Minifold dot blot* (GE). A membrana foi revelada utilizando os anticorpos primário anti-AβOs NU2 1.5 µg/ml e secundário anti-mouse IgG-HRP (GE) 1:20000, seguindo os parâmetros utilizados no tópico **3.6.2**.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Quantificação dos A β Os ligados a superfície neuronal reconhecidos por NUsc1

O fragmento de anticorpo tipo scFv NUsc1, selecionado e produzido pelo nosso grupo, já foi bem descrito por reconhecer oligômeros tóxicos do peptídeo A β ₄₂, e por se ligar a uma subpopulação destes oligômeros (SEBOLLELA *et al.*, 2017; VELASCO *et al.*, 2012). Em um experimento ainda não publicado, conduzido pelo Prof. Adriano Sebollela durante o seu pós-doutorado no Lab. do Prof. William Klein (Northwestern University, Chicago, EUA), foi avaliada a ligação de NUsc1 (no formato ligado a fago, chamado pbNUsc1) a A β Os (previamente marcados com uma sonda fluorescente) ligados a superfície de neurônios em uma cultura primária (Fig. 4A). Foi observado que apenas uma subpopulação de A β Os ligados a superfície neuronal co-localizava com o sinal de pbNUsc1 (Fig. 4B). Para compreender melhor a interação oligômero-específica de NUsc1 com A β Os capazes de se ligar a superfície neuronal (e potencialmente induzir neurotoxicidade), decidimos quantificar a co-localização entre de A β Os e pbNUsc1 nos dados provenientes daquele experimento. Usando 5 diferentes campos derivados de dois experimentos independentes, observou-se que NUsc1 se liga a aproximadamente 30% dos A β Os ligados a superfície dos neurônios (Fig. 4C). Considerando resultados prévios, podemos inferir que mesmo não se ligando a 100% dos A β Os que se ligam a superfície neuronal, NUsc1 foi capaz de promover neuroproteção em culturas neuronais (SEBOLLELA *et al.*, 2017), e de inibir o déficit cognitivo em camundongos (MC SELLÉS, ST FERREIRA *et al.*, em preparação) em modelos de toxicidade por A β Os. Essa conclusão parcial confere força a noção de que NUsc1 se liga a uma subpopulação bem definida de A β Os com atividade neurotóxica.

Figura 4. NUSC1 se liga a uma subpopulação de AβOs na superfície de neurônios. (A) Esquema mostrando a detecção de AβOs fluorescentes (FAM-AβOs) usando NUSC1 ligado a fago (pbNUSC1). **(B)** Imagem representativa de cultura primária de neurônios exposta ao veículo (*inset*) ou a 250 nM de AβOs. A co-localização entre NUSC1 e AβOs foi avaliada comparando diretamente a marcação para FAM-AβOs (verde) com o sinal de pbNUSC1 (vermelho). **(C)** Quantificação da co-localização entre FAM-AβOs e pbNUSC1 em relação ao sinal total (1.0) de FAM-AβOs.

4.2. Avaliação do papel das espécies oligoméricas reconhecidas por NUSC1 na formação de fibras amiloides de Aβ

A formação de fibras amiloides pelo peptídeo Aβ pode ser induzida por condições físicas como incubação a temperatura fisiológica por algumas horas (TIIMAN *et al.*, 2015). Como dados de trabalhos anteriores (VELASCO *et al.*, 2012) e os dados mostrado na Figura 4B indicam que NUSC1 se liga a uma subpopulação de AβOs, resolvemos avaliar a contribuição das espécies de AβO alvos de NUSC1 para o processo de agregação e formação de fibras induzido por incubação a 37°C. O monitoramento da formação de fibras foi realizado usando a sonda tiofavina-T (ThT), que se liga a estruturas ricas em folha-β, com consequente aumento na intensidade

de emissão de fluorescência. As estruturas mais insolúveis de A β , como protofibras e fibras, são sabidamente ricas em folha- β (LOMONT *et al.*, 2018), e portanto é esperado aumento na emissão de fluorescência da ThT na presença dessas estruturas. O resultado do monitoramento da agregação de A β Os (10 μ M) na presença ou ausência de NUsc1 (5 μ M) é mostrado na Figura 5A, e indica que NUsc1 inibe completamente a agregação dos A β Os em fibras. Os pontos finais (20h) da cinética de agregação foram analisados por microscopia eletrônica de transmissão (MET), como mostrado na Figura 5B, confirmando a formação de fibras somente na ausência de NUsc1. Com esse dado, pode-se inferir que a espécie de A β Os alvo de NUsc1, além de ser neurotóxica, também desempenham um papel importante como unidade de agregação para formação de fibras amiloides.

Figura 5: Inibição da formação de fibras amiloides a partir de A β Os por NUsc1. A solução de A β Os a 10 μ M foi incubada a 37°C por 20h na presença ou ausência de NUsc1 a 5 μ M. **(A)** A formação de fibras amiloides foi monitorada pelo aumento na intensidade de fluorescência da Tioflavina-T (ThT). Fibras do peptídeo A β foram utilizadas como controle positivo. **(B)** As amostras finais (20h) de todas as condições foram analisadas por MET (fibras indicadas com setas vermelhas).

4.3. Purificação do fragmento de anticorpo NUsc1

A expressão do fragmento de anticorpo NUsc1 foi realizada usando a cepa de bactéria *E.coli* HB2151 transformada com o vetor pIT2-NUsc1, selecionado por *phage display* a partir da biblioteca de anticorpos tipo scFv Tomlinson I and J (DE WILDT *et al.*, 2000; GRIFFITHS *et al.*, 1994) como descrito em Sebollela e colaboradores (2017). Como todos os clones de scFv nesta biblioteca possuem as *tags* de polihistidina e c-myc, além de um sítio de ligação para a proteína A, purificamos NUsc1 usando coluna de afinidade de proteína A. NUsc1 foi purificado com sucesso (Fig. 6A), e seu peso molecular e alto grau de pureza foram confirmados por eletroforese (Fig. 6B). Como as *tags* são importantes para detecção do NUsc1 em vários ensaios, a presença e integridade destas foram confirmadas por *western blotting* utilizando os anticorpos primários anti-his tag e anti-c-myc (Fig. 6C). Sendo assim, NUsc1 foi purificado com sucesso e não apresentou sinais de degradação ao longo dos processos de produção e purificação.

Figura 6. Purificação do fragmento de anticorpo NUSC1. (A) O meio de cultura da bactéria HB2151/NUSC1 foi purificado por cromatografia de afinidade de proteína A, e a quantificação de proteínas nas frações foi realizada pelo método de *Bradford*. (B) Uma alíquota de NUSC1 purificado foi analisada por SDS-PAGE corado com commassie blue. (C) Detecção de NUSC1 em *western blotting* utilizando os anticorpos primários anti-his-tag ou anti-c-myc.

4.4. Otimização da ligação de A β Os a NUSC1 imobilizado em *beads* magnéticas

Obtido o anticorpo purificado, partimos para o desenvolvimento de uma estratégia experimental que permitisse isolar A β Os reconhecidos por NUSC1. Embora, funcionalizar *beads* magnéticas com NUSC1 para captura de A β Os já tenha sido descrito por Sebollela e colaboradores (2017), naquele momento o ensaio não foi otimizado e o complexo A β Os-NUSC1 não foi removida da *bead*, logo, com o objetivo de obter o complexo A β Os-NUSC1 eluído da *bead*, foi necessário otimizar um protocolo para tal finalidade. Para avaliar a eficiência da formação do complexo A β Os-NUSC1, desenvolvemos um ensaio de “ELISA em *beads*” (Fig. 7A), no qual *beads* magnéticas

funcionalizadas com NUsc1 (via cauda de histidina) foram bloqueadas com BSA e incubadas com A β Os, e a presença do complexo A β Os-NUsc1 foi mensurada pelo sinal gerado pela ligação do anticorpo anti-A β 6E10. Primeiramente, determinamos a concentração ótima de BSA na solução de bloqueio usada na funcionalização das beads com NUsc1. O resultado (Fig. **7B**) mostrou que as soluções de BSA 0,5% e 1% conseguem inibir significativamente a ligação inespecífica dos A β Os às *beads*, quando comparado a solução de BSA 0,1%. No entanto, o aumento na concentração de BSA também levou a remoção de parte do NUsc1 ligado às *beads* magnéticas, como mostrado no SDS-PAGE (Fig. **7C**). Outras opções para o bloqueio das *beads* também foram testadas, como soluções de bloqueio de base proteica (Caseína) e também não-proteica (Gelatina e PEG). Como comparação nesse ensaio, testamos também uma solução de BSA 0,6% (concentração intermediária às testadas na Fig. **7B**). Embora as soluções de caseína 0,5% e gelatina 0,2% tenham sido capazes de remover grande parte da ligação inespecífica gerada por A β Os, essas soluções também interferiram na formação do complexo A β Os-NUsc1 (Fig. **7D**). Com isso, a condição com BSA 0,6% se apresentou como a melhor opção para o bloqueio das *beads* magnéticas.

Avaliamos também a estabilidade do complexo A β Os-NUsc1 frente a diferentes condições comumente utilizadas em ensaios bioquímicos. As *beads* funcionalizadas com NUsc1, bloqueadas e incubadas com A β Os foram submetidas a sucessivas lavagens com diferentes tampões de fosfato de sódio a 50mM suplementados com NaCl 500mM, Tween20 0,1%, Glicerol 10%, Triton X-100 1% e SDS 0,1% ou 0,04% (Fig. **7E**). Quando comparado com a condição padrão, que corresponde a solução de fosfato de sódio 50mM sem suplementação, o complexo A β Os-NUsc1 se mostrou estável na maioria das condições. Por outro lado, o complexo se mostrou altamente sensível a presença de SDS nas concentrações usualmente utilizadas no *western blotting*. Em conjunto, os resultados apresentados na Figura 7 nos possibilitaram estabelecer um protocolo para isolamento de A β Os alvo de NUsc1 usando *beads* magnéticas com baixa ligação inespecífica dos A β Os às *beads*.

Figura 7. Identificação de condições ótimas para o isolamento de AβOs usando NUSc1 imobilizado em *beads* magnéticas. (A) Para o ensaio de ELISA em *beads*, as *beads* funcionalizadas com NUSc1 foram bloqueadas e então incubadas com AβOs. O complexo AβOs-NUSc1 ligado as *beads* foi detectado utilizando os anticorpos anti-Aβ (6E10) e o secundário anti-mouse-IgG ligado a HRP. (B e C) As *beads* funcionalizadas com NUSc1 foram incubadas com diferentes concentrações de BSA, e então 10% do total de *beads* foi analisado por ELISA em *bead* (B), e os 90% restantes por SDS-PAGE corado com coomassie blue (C). (D) As *beads* funcionalizadas com NUSc1 foram incubadas com diferentes soluções de bloqueio e então a análise do complexo ligado a *bead* foi feita por ELISA em *bead*. (E) O complexo AβOs-NUSc1 ligado a *bead* foi submetido a sucessivas lavagens com diferentes tampões. A presença do complexo AβOs-NUSc1 ligado as *beads* após as lavagens foi avaliada por ELISA em *beads*.

4.5. Isolamento de espécies de A β O reconhecidas por NUsc1 em preparação sintética de A β Os

O protocolo otimizado de ligação de A β Os a NUsc1 imobilizado em beads magnéticas foi utilizado para isolar A β Os a partir de uma preparação sintética. Para isso, uma preparação de A β Os foi incubada com *beads* magnéticas previamente funcionalizadas com NUsc1 e bloqueadas com BSA. As *beads* foram submetidas a solução de eluição com imidazol (Fig. **8A**). O complexo A β Os-NUsc1 eluído das *beads* foi analisado por SDS-PAGE/*western blotting* utilizando os anticorpos anti-c-myc (9E10) para detecção de NUsc1, e anti-A β (6E10) para detecção do peptídeo A β (Fig. **8B**). No *western blotting* pode-se observar a presença de NUsc1 (~28 kDa) e monômeros de A β (4,5 kDa) na condição em que as *beads* foram funcionalizadas com NUsc1 e incubadas com A β Os. O estado monomérico do peptídeo A β se deve a conhecida sensibilidade dos A β Os ao SDS (presente no tampão de amostra) e fervura. Desta forma, sabendo que NUsc1 não interage preferencialmente com monômeros de A β (SEBOLLELA *et al.*, 2017), podemos concluir que NUsc1 foi capaz de isolar A β Os a partir de uma preparação sintética que tipicamente apresenta uma população heterogênea de A β Os (SEBOLLELA *et al.*, 2012). Além disso, o controle correspondente as *beads* incubadas apenas com A β Os não gerou banda de A β , indicando novamente que em nossa estratégia a maioria dos A β Os que se ligam de forma inespecífica à *beads* magnéticas.

Figura 8. Eluição do complexo AβOs-NUsc1 de *beads* magnéticas analisado por *Western Blotting*. (A) Esquema de isolamento de AβOs utilizando NUsc1. *Beads* funcionalizadas com NUsc1 e bloqueadas com BSA foram incubadas com AβOs, o complexo foi eluído com tampão fosfato acrescido com 300mM de imidazol e analisado por *western blotting*. (B) A membrana de nitrocelulose foi bloqueada com solução de Leite/TBST 5% e incubada com os anticorpos primários 6E10 (detecção de Aβ; esquerda) ou com anti-c-myc, 9E10 (detecção de NUsc1; direita).

4.6. Isolamento de espécies de AβOs reconhecidas por NUsc1 em extrato de cérebro de camundongo transgênico 5xFAD

Com base nos resultados de isolamento de AβOs em preparações sintéticas, decidimos utilizar a mesma estratégia para isolar AβOs alvo de NUsc1 em extrato de cérebro do camundongo transgênico 5xFAD. Este modelo animal da DA é um duplo

transgênico APP/PS1 que co-expressa 5 mutações ligadas a formas familiares da DA, levando ao aumento na produção de A β ₄₂ e consequente aceleração na formação de A β Os e placas amiloides no cérebro destes animais (OAKLEY *et al.*, 2006). *Beads* funcionalizadas com NUsc1 e bloqueadas foram incubadas com extratos de cérebro total de animais 5xFAD ou WT, e os eluatos foram analisados por *western blotting* utilizando o anticorpo primário anti-A β Os NU2 (LAMBERT *et al.*, 2007; cedido pelo Prof. Dr. William L. Klein, Northwestern University). O resultado mostrou a detecção de A β Os de alto peso molecular (acima de 250 kDa) somente na amostra correspondente ao extrato de 5xFAD (Fig. 9), indicando que nossa estratégia de isolamento baseada em NUsc1 imobilizado é capaz também de reconhecer e isolar A β Os relevantes *in vivo*. A presença de oligômeros em vez do monômeros A β no SDS-PAGE/WB, diferente do obtidos com A β Os sintéticos, provavelmente se deve a não fervura das amostras à fervura antes da eletroforese. Importante notar ainda a ausência de ligação inespecífica nos controles, estendendo para amostras derivadas de tecido a capacidade de prevenção de ligações inespecíficas de nosso protocolo. A amostra de A β Os isolados do extrato de 5xFAD também foi analisada via espectrometria de massas *Top-Down* (TDMS), onde foi confirmada a presença de A β ₄₂ humano (dato preliminar não mostrado obtido em colaboração com a Dra. Erika Cline, Northwestern University).

Figura 9: Isolamento de AβOs de extrato do cérebro de camundongos transgênicos 5xFAD usando NUSC1 imobilizado em *beads* magnéticas. Extrato de cérebro de camundongos selvagem (WT) ou transgênico 5xFAD de 13 meses foram incubados com *beads* magnéticas funcionalizadas com NUSC1 e bloqueadas. As *beads* foram eluídas com solução de imidazol, e os eluatos foram analisados por *western blotting* revelado utilizando o anticorpo conformacional anti-AβOs NU2.

4.7. Determinação da massa molecular do complexo AβOs-NUSC1 por filtração em membranas

Aproveitando o sucesso no isolamento de espécies de AβOs sintéticos usando NUSC1 imobilizado a *beads* magnéticas, nossa próxima etapa foi determinar a massa molecular do complexo AβOs-NUSC1. Para isso, o complexo AβOs-NUSC1 eluído das *beads* foi submetido a filtração através de membranas filtrantes com *cutoff* de 50 kDa ou 100 kDa, e as frações retida e filtrada foram analisadas por *dot-blot* (Fig. 10).

Figura 10. Análise do peso molecular do complexo AβOs-NUsc1 por filtração através de membranas. A preparação de AβOs sintéticos foi incubada com *beads* magnéticas funcionalizadas com NUsc1. O complexo AβOs-NUsc1 ligado foi eluído das *beads* e submetido a filtração através de membranas com *cutoff* de 50 ou 100 kDa. As frações obtidas foram analisadas por *dot-blot*. **(A)** 3μL de uma alíquota das amostras não submetidas a filtração (amostra), e as frações retida e filtrada obtidas após a filtração em membrana filtrante com *cutoff* de 100 kDa, foram aplicadas na membrana de nitrocelulose, que foi revelada com solução de anticorpo anti-Aβ (6E10) ou anti-c-myc (9E10). **(B)** 200 μl de uma preparação de AβOs (1,3 μM) foi submetida a filtração através de membranas com *cutoff* de 50 ou 100 kDa, e 3μL das frações retida e filtrada, assim como a amostra não filtrada, foram spotados na membrana do *dot-blot*, que foi revelada usando anti-Aβ (6E10).

Os resultados do *dot-blot* após passagem do complexo pelo filtro de 100 kDa indicam aumento na intensidade do sinal nas frações retidas, em paralelo a uma diminuição na intensidade correspondente as frações filtradas, tanto na revelação para Aβ (6E10) como para NUsc1 (9E10) (Fig. **10A**). Este resultado indica que o complexo formado entre NUsc1 e AβOs possui peso molecular ≥ 100 kDa, o que corresponde a AβOs $\sim \geq 72$ kDa se subtraído o NUsc1 (28 kDa). Além disso, esse dado também sugere que o complexo AβOs-NUsc1 se mantém estável após o processo de eluição das *beads* magnéticas. Observamos ainda que os AβOs, quando diretamente submetidos a filtração através de membranas de 50 ou 100 kDa, atravessam com eficiência esses filtros (Fig. **10B**), mostrando assim que o efeito de retenção observado na Figura **10A** não é causado por retenção de AβOs livres, mas sim do complexo AβOs-NUsc1.

4.8. Isolamento de A β Os estabilizados por *crosslinking* usando NUsc1 imobilizado

Com o intuito de avaliar o peso molecular da espécie de A β Os alvo de NUsc1 sem possíveis artefatos introduzidos pela influência do SDS (no SDS-PAGE) sobre o estado oligomérico dos A β Os, foi utilizada uma preparação de A β Os estabilizados por *crosslinking* (A β Os-XL) utilizando o reagente DFDNB. A β Os preparados por esse protocolo foram recentemente descritos como estáveis em SDS, e neurotóxicos (CLINE *et al.*, 2019). *Beads* funcionalizadas com NUsc1 e bloqueadas com BSA foram incubadas com A β Os-XL, e o complexo A β OsXL-NUsc1 resultante foi eluído e analisado por *western blotting* utilizando o anticorpo anti-A β Os NU2 (Fig. 11). Alinhado ao dado com A β Os não *cross-linked*, nesse experimento NUsc1 também interagiu preferencialmente com A β Os-XL de alto peso molecular (>100 kDa). Além disso, o ensaio de isolamento usando A β Os-XL novamente foi capaz de prevenir ligações inespecíficas dos A β Os-XL as *beads*. A corrida da fração dos A β OsXL incubados com as *beads* funcionalizadas com NUsc1 mas que não se ligaram a NUsc1 (A β Os-XL sobrenadante), mostrou uma proporção baixa de A β Os-XL de alto peso molecular em comparação a espécies de baixo PM, corroborando a noção de que NUsc1 não tem especificidade por A β Os de baixo peso molecular.

Figura 11. Isolamento e análise da massa molecular de AβOs estabilizados por *crosslinking* usando NUsc1 imobilizado. *Beads* funcionalizadas com NUsc1 e bloqueadas com BSA foram incubadas com 700uL de uma preparação de AβOsXL 1,6uM. Após as lavagens, o complexo AβOsXL-NUsc1 foi eluído com solução de imidazol e analisado por *western blotting* utilizando o anticorpo IgG monoclonal anti-AβOs NU2 (Lambert et al., 2007). Também foram analisados *beads* apenas incubadas com AβOs-XL e os AβOs-XL não ligados as *beads* funcionalizadas com NUsc1 resultantes da primeira condição.

4.9. Estabilização do complexo AβOs-NUsc1 por *crosslinking*

Ainda objetivando determinar o peso molecular do complexo AβOs- NUsc1, e buscando uma forma de estabilizá-lo para análises estruturais mais refinadas no futuro, avaliamos a eficiência de uma reação de *crosslinking*, utilizando o reagente DSS para estabilizar o complexo AβOs-NUsc1 eluído das *beads* magnéticas. O complexo AβOs-NUsc1 eluído das *beads* magnéticas com solução de imidazol foi inicialmente submetido a filtração através de membranas filtrantes de *cutoff* 50 kDa,

para remoção do NUsc1 livre (não ligado a A β Os). A fração retida nessa filtração, que portanto continha majoritariamente o complexo A β Os-NUsc1, foi utilizada na reação de *crosslinking* com DSS. O SDS-PAGE seguido por *western blotting* revelado com anticorpo anti-his tag (Fig. 12) indica que o complexo A β Os-NUsc1 estabilizado por *crosslinking* tem massa molecular maior que 150kDa. A ausência de sinal na *lane* correspondente as *beads* funcionalizadas com NUsc1 que não foram incubadas com A β Os indica que NUsc1 livre foi eficientemente removido pela filtração através do filtro de 50 kDa. Ainda mais importante, indica que a presença de NUsc1 na amostra do complexo A β Os-NUsc1 corresponde ao complexo desse scFv com A β Os, que se manteve estável após ser eluição e análise por SDS-PAGE/WB.

Figura 12. Análise da estabilidade e do peso molecular do complexo A β Os-NUsc1 eluído de *beads* magnéticas e submetido a reação de *crosslinking* com DSS. Uma preparação de A β Os sintéticos ($\sim 1.6\mu\text{M}$) foi incubada com *beads* magnéticas funcionalizadas com NUsc1. O complexo A β Os-NUsc1 foi eluído das *beads* magnéticas com solução de imidazol, filtrado em membrana filtrante de *cutoff* 50 kDa, e a fração retida foi submetida a reação com o agente *cross-linker* DSS 7,5 μM . A análise para revelar a presença do scFv NUsc1 foi feita por *western blotting* usando anticorpo anti-his-tag.

Analizamos também o efeito da concentração do reagente *crosslinker* DSS na estabilização do complexo A β Os-NUsc1. A reação de *crosslinking* foi feita nas mesmas condições do experimento apresentado na Figura 12, mas com diferentes

concentrações de DSS. A análise por *western blotting* (Fig. **13**) mostrou novamente que o complexo A β Os-NUsc1 estabilizado por *crosslinking* apresenta peso molecular maior que 150 kDa, o que não variou significativamente em função da concentração de DSS. Também foi possível notar uma diminuição na intensidade das bandas correspondentes as duas maiores concentrações de DSS, possivelmente devido a precipitação do complexo. Este ensaio mostra que a concentração intermediária de 7,5 mM utilizada na Figura **12**, parece corresponder a uma boa condição de reação com DSS para estabilização do complexo A β Os-NUsc1.

Figura 13. Influência da concentração do agente *crosslinker* DSS na estabilização e no peso molecular do complexo A β Os-NUsc1. O complexo A β Os-NUsc1 foi inicialmente filtrado em membrana filtrates com *cutoff* 50kDa, e então incubado com diferentes concentrações de DSS. O produto das reações foi analisado por SDS-PAGE/*Western-blotting* revelado com anticorpo anti-his tag para detecção de NUsc1.

4.10. Determinação do peso molecular do complexo A β Os-NUsc1 por cromatografia de gel filtração

Para analisar de forma mais acurada o peso molecular do complexo formado entre NUsc1 e a espécie de A β O alvo desse scFv, o complexo eluido das *beads* foi submetido a cromatografia de exclusão molecular, e as frações coletadas foram analisadas por ELISA para detecção de NUsc1. Uma estratégia similar foi usada

anteriormente por nosso grupo para determinar a massa molecular de espécies de A β Os alvos da IgG conformacional NU4 (SEBOLLELA *et al.*, 2014). Na análise apresentada na Figura 14A, pode-se observar, além de um pico correspondente ao NUsc1 livre, um pico majoritário de peso molecular ≥ 180 kDa, possivelmente correspondente ao complexo A β O-NUsc1. Esse achado está alinhado com nossos resultados anteriores, que também indicaram peso molecular do complexo nessa faixa, embora o pico correspondente a NUsc1 tenha apresentado um peso molecular anômalo de ~ 4 kDa (determinado comparando com uma corrida somente com NUsc1), além de um segundo pico de ~ 23 kDa que pode ser correspondente ao dímero de NUsc1, mas que também apresentou um peso molecular distante do esperado.

O complexo A β Os-NUsc1 foi também analisado por cromatografia de exclusão molecular na qual as frações coletadas foram analisadas por *dot-blot* revelado usando o anticorpo oligômero específico NU2 (Fig. 14B). A despeito de uma maior dispersão na faixa de massa molecular nesse ensaio, novamente o complexo A β Os-NUsc1 detectado apresentou massa molecular majoritariamente maior que 100 kDa, reforçando ainda mais a noção de que NUsc1 reconhece preferencialmente A β Os de alto peso molecular.

Figura 14. Fracionamento e determinação da massa molecular do complexo A β Os-NUsc1 por cromatografia de exclusão molecular. O complexo A β Os-NUsc1 foi aplicado e analisado por duas diferentes colunas de exclusão molecular. O complexo foi eluído das *beads* magnéticas utilizando imidazol, e fracionado em **(A)** uma coluna de alta pressão acoplada a um HPLC, seguido por ELISA para detecção de NUsc1 ou **(B)** em uma coluna de baixa pressão acoplada a um FPLC, seguido por *dot-blot* para detecção de A β Os utilizando o anticorpo oligômero específico NU2.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O fragmento de anticorpo de cadeia única NUsc1 tem sido detalhadamente estudado pelo nosso grupo. Caracterizamos NUsc1 como um scFv específico para agregados oligoméricos solúveis do peptídeo A β , com ação neuroprotetora em cultura primária de neurônios (SEBOLLELA *et al.*, 2017), e capaz de prevenir o déficit cognitivo induzido por A β Os *in vivo* (MC SELLÉS, ST FEFFEIRA *et al.*, em preparação). Além disto, testamos a capacidade de NUsc1 para bloquear a citotoxicidade induzida por A β Os em linhagem de neuroblastoma (SH-5YSY) diferenciada em neurônios, e NUsc1 foi capaz de prevenir completamente a morte celular induzida por A β Os (resultado não publicado obtido em colaboração com a Doutoranda do nosso Laboratório MSc. Nathalia Pinheiro). Em termos moleculares, foi demonstrado no fracionamento de uma preparação de A β Os sintéticos por cromatografia de gel filtração, seguido de ELISA utilizando NUsc1 como anticorpo de detecção, a maior reatividade foi observada na fração de A β Os maiores que 50 kDa. Desta forma, assumindo que NUsc1 reconhece A β Os tóxicos, e que se liga não em todos, mas em uma subpopulação dos A β Os, o objetivo principal deste trabalho foi detalhar a capacidade de NUsc1 de se ligar a uma subpopulação dos A β Os, e de definir a massa molecular dessa população alvo de NUsc1.

Inicialmente, recuperamos o experimento de ligação de A β Os fluorescentes à superfície de neurônios primários (Fig. **4A e 4B**), que foi realizado pelo Prof. Adriano Sebollela durante seu pós-doutorado no laboratório do Prof. Dr. William L. Klein (Northwestern University, IL, USA), e que ainda não publicado. Foi observado que NUsc1 (na forma ligada ao fago), foi capaz de se ligar em aproximadamente 30% do sinal total de A β Os ligados à superfície neuronal (Fig. **4C**), indicando a capacidade de discriminação de oligômeros por NUsc1 em modelo celular. Este dado também corrobora os achados de Velasco e cols. (2012), no qual demonstrou-se que a depleção seletiva de A β Os por NUsc1 em uma preparação de A β Os sintéticos inibiu apenas parcialmente a ligação de A β Os em neurônios primários.

Embora já tenham se passado mais de uma década após a descrição de A β Os como importantes agentes tóxicos na DA, a identidade precisa dos A β Os tóxicos ainda permanece desconhecida. Desta forma, utilizar uma biomolécula capaz de reconhecer especificamente uma subpopulação tóxica pode acrescentar muito na acurada caracterização destes A β Os. Neste trabalho, buscamos desenvolver um método

eficiente de isolamento de uma população homogênea de A β Os que são reconhecidas pelo scFv conformacional NUsc1. Entendemos que tal método constitui passo inicial e crucial para análises estruturais futuras mais refinadas destas espécies. Além disso, no cenário atual, em que anticorpos utilizados para imunoterapia tem falhado nos testes clínicos (MULLARD, 2019), um fragmento de anticorpo altamente específico para A β Os tóxicos pode ter grande relevância.

Nesse trabalho, avaliamos também o papel da subpopulação dos A β Os alvos de NUsc1 no processo de agregação que leva a formação de fibras amiloides. Já está bem descrito na literatura que o peptídeo A β , principalmente a forma A β ₄₂, que possui cinética mais rápida de agregação, onde inicia um processo de auto agregação que leva a formação de agregados oligoméricos e fibras amiloides, as quais são estruturas ricas em folhas β (LU *et al.*, 2013; SERPELL, 2000). A cinética de agregação de A β Os em fibras amiloides, monitorada por emissão de fluorescência de sonda Thioflavina-T, que em condições padrões permitiu a detecção da formação de fibras amiloides, foi significativamente afetada na presença de NUsc1, o qual inibiu completamente a conversão de espécies oligoméricas em fibras como observado pela MET (Fig. 5). Diferentemente do protocolo típico descrito na literatura, em que o peptídeo A β é utilizado como estado inicial para agregação, neste ensaio A β Os foram induzidos à agregação. Em contrapartida, utilizamos uma proporção de A β Os/NUsc1 de 2:1 (10 μ M : 5 μ M), enquanto que em outros trabalhos também usando scFv seletivo para A β Os (MO6) essa proporção foi 1:1 (10 μ M : 10 μ M) (ZHANG *et al.*, 2015). Também foi possível observar que na condição onde A β Os foram incubados com NUsc1 (Fig. 5B), as estruturas esféricas observadas correspondem a A β Os, baseado caracterização de A β Os via MET na literatura (BODE *et al.*, 2019). Possivelmente o NUsc1 é capaz de estabilizar os A β Os que estão na via de formação de fibras, o que pode ser interessante já que um dos grandes desafios de se trabalhar com A β Os é garantir que estes se mantenham estáveis para serem caracterizados estruturalmente.

Esse trabalho teve também com objetivo implementar em nosso Laboratório, de forma rotineira, e com alto rendimento e padrão de qualidade, a produção do fragmento de anticorpo NUsc1 purificado a partir de bactérias. A pureza e a integridade de NUsc1 purificado foram avaliadas por SDS-PAGE e pela presença das tags HIS e c-myc por western blot (Fig. 6). Obter uma preparação de anticorpo NUsc1

com alta qualidade foi um passo chave para iniciarmos o desafio de isolar A β OS, pois contaminantes poderiam deixar as amostras ainda mais complexas, assim como as tags eram necessárias para a funcionalização das *beads*, e para a detecção em todos os ensaios. O rendimento final de nosso processo de purificação de NUsc1 foi de aproximadamente 6 mg por litro de meio de cultura. Apesar de satisfatório para o seguimento desse projeto, esse valor pode ser considerado baixo quando comparado com purificações de proteína a partir de meio de cultura (INTACHAI *et al.*, 2015). Acreditamos que esse rendimento seja consequência do uso do vetor pIT2 e da cepa de *E.coli* HB2151, que não são sistemas otimizados para expressão em larga escala (SU *et al.*, 2011; XIA *et al.*, 2013). Valores de rendimento abaixo da média na expressão de fragmentos de anticorpo tipo scFv tem sido descritos, e relacionados a instabilidade conformacional destas moléculas quando comparado às IgG (CATTANEO E BIOCCA, 1999; WÖRN E PLÜCKTHUN, 2001). Outra possível explicação é a formação de dímeros no periplasma bacteriano, que pode influenciar na liberação do scFv para o meio de cultura, resultando assim na diminuição do rendimento final (ARNDT *et al.*, 1998). Embora tenhamos detectado NUsc1 em grande quantidade no pellet bacteriano, optamos por purificar NUsc1 a partir do meio de cultura por facilitar e melhorar o grau pureza final.

Para o ensaio de isolamento de espécies de A β Os reconhecidas por NUsc1 usando *beads* magnéticas, primeiramente avaliou-se a concentração ideal de BSA para o bloqueio das *beads* funcionalizadas com NUsc1. Como mostrado no ensaio de “ELISA em *beads*” (Fig. 7B), as concentrações de BSA 1% e 0,5% foram capazes de inibir a ligação inespecífica de A β Os às *beads* funcionalizadas, porém com consequente remoção de NUsc1 das *beads* (Fig. 7C). Este evento pode estar relacionado a estabilidade de algumas moléculas do fragmento de anticorpo, principalmente com relação a interação entre os domínios V_H-V_L. A interação entre estes domínios está relacionada a alterações conformacionais do monômero e também com a formação de dímeros (ARNDT *et al.*, 1998). Estes efeitos, podem levar a desestabilização do NUsc1 que se liga de forma pouco específica as *beads* e então é removido pela BSA, ou, a interação entre V_H-V_L é desestabilizada pela BSA, já que esta interface é mantida em grande parte por ligações hidrofóbicas e a BSA sabidamente possui sítio de ligação hidrofóbico (ARNDT *et al.*, 1998). Como alternativa, outras soluções de bloqueios foram testadas (Fig. 7D), mas novamente a

solução de BSA se mostrou a melhor alternativa, quando usada na concentração de 0,6%, intermediária às aquelas testadas na Figura **7C**. Quando comparado com as outras soluções de bloqueio, BSA 0,6% apresentou a melhor relação entre a prevenção de ligações inespecíficas A β Os as *beads*, e o rendimento do complexo A β Os-NUsc1 ligado. A decisão pelo uso de concentrações baixas de BSA também está relacionado a quantidade de BSA contaminante nas amostras pós eluição, já que a BSA pode ser um empecilho para determinações estruturais futuras em algumas técnicas. O polímero PEG 6000 a 0,05%, que tem sido usado para bloqueio em análise de interações de ácidos nucleicos (KNOWLES *et al.*, 2011), foi ineficiente no nosso ensaio, resultando assim em um alto sinal de ligação inespecífica de A β Os. Os bloqueios com caseína 0,5% e gelatina 0,2% foram eficientes no bloqueio da ligação inespecífica dos A β Os, mas também reduziram grande parte a formação do complexo A β Os-NUsc1. Desta forma, definimos a que BSA entre 0,6% - 0,75% é a solução ideal para os ensaios de isolamento do complexo A β Os-NUsc1.

O complexo A β Os-NUsc1 ligado às *beads* também foi testado quanto a sua estabilidade em diferentes tampões. Neste ensaio, o complexo A β Os-NUsc1 se manteve estável na maior parte das condições, com exceção das condições com SDS (Fig. **7E**). Esta labilidade ao SDS já era esperada, pois já foi amplamente descrito que agregados do peptídeo A β são sensíveis ao SDS (eg. GONG *et al.*, 2003). Acreditamos portanto que na presença de SDS o complexo é desfeito como consequência da dissociação da estrutura dos A β Os ligados a NUsc1. Esses dados de estabilidade foram utilizados como base para entender a quais condições o complexo A β Os-NUsc1 poderia ser submetido, e quais ensaios poderiam ser realizados para caracterização posterior do complexo.

A partir dos parâmetros definidos na otimização das condições de formação de complexo entre NUsc1 imobilizado e A β Os, um protocolo para o isolamento do complexo após liberação das *beads* em condições não desnaturantes foi estabelecido. Como mostrado na Figura **8B**, nosso protocolo foi eficiente para isolar A β Os alvos de NUsc1 a partir de uma preparação de A β Os sintéticos do peptídeo A β ₄₂. O resultado mostra a presença de A β no eluato correspondente as *beads* que foram funcionalizadas com NUsc1, assim como a ausência de A β no eluato das *beads* não funcionalizadas com NUsc1 que também foram incubadas com A β Os. Esse resultado permite concluir que NUsc1 imobilizado captura A β Os específicos, já que se pode

detectar A β Os não ligados na solução após incubada com *beads* funcionalizadas com NUsc1 (dados não mostrados). Porém com estes dados ainda não é possível concluir se o complexo eluído com imidazol permanece estável, mesmo já tendo sido descrito um efeito positivo do imidazol sobre a estabilidade e a solubilidade de fragmentos de anticorpo tipo scFv (HAMILTON *et al.*, 2003). Outra questão deixada em aberto por esse resultado é se a espécie de A β Os isolada pela ação de NUsc1 retém sua estrutura oligomérica original após o processo de eluição.

O mesmo protocolo de isolamento foi utilizado na tentativa de capturar A β Os alvo de NUsc1 de tecido, nesse caso, do camundongo transgênico 5xFAD, um modelo animal de DA amplamente usado (EIMER E VASSAR, 2013; OAKLEY *et al.*, 2006). Como mostrado na Figura 9, com esta metodologia foi possível isolar A β Os alvos de NUsc1 de alto peso molecular a partir de extrato do cérebro apenas de animais 5xFAD, sem detecção de ligação inespecífica significativa. Este dado corrobora os dados publicados em Sebollela e cols. (2017) acerca da capacidade de NUsc1 de reconhecer A β Os em modelo de camundongo transgênico APP/PS1, também modelo da DA (RADDE *et al.*, 2006), e em cérebros *post-mortem* de pacientes com DA. A detecção de A β Os de alto peso molecular nos extratos de camundongo 5xFAD pode estar relacionado a captura de A β Os associados fortemente com outras proteínas celulares/teciduais (WILCOX *et al.*, 2015). Outra possibilidade é que seja um artefato da análise por SDS-PAGE, já que as amostras utilizadas neste ensaio não foram fervidas, e desta forma, podem apresentar um padrão de corrida diferente daquela observada com A β Os sintéticos. Contudo, isolar A β Os presentes em extrato de cérebros de animais com alta produção de A β , acumulam placas/oligômeros, e apresenta, déficit cognitivo similar ao de pacientes com DA (OAKLEY *et al.*, 2006), representa uma nova avenida para caracterização conformacional, e de modificações pós traducionais de A β Os e dos monômeros de A β desses oligômeros, que tem relação com a cinética de agregação e a toxicidade, e portanto com a gênese da DA esporádica (BARYKIN *et al.*, 2017).

Comprovada a capacidade de isolarmos o complexo A β Os-NUsc1 por eluição das *beads*, passamos para a meta de determinação da massa molecular do complexo. Para isso, o eluato das *beads* contendo o complexo foi submetido a filtração através de membranas filtrantes de 50 ou 100 kDa. Como mostrado na Figura 10A, as amostras passadas pelo filtro de 100 kDa, e reveladas para presença de A β ,

apresentaram um aumento no sinal da fração retida, e nenhum sinal na fração filtrada, utilizando como referência a amostra não passada através das membranas filtrantes. A partir disto, pudemos concluir que o complexo A β Os-NUsc1 possui peso molecular ≥ 100 kDa, ou ainda que a espécie de A β O alvo de NUsc1 possui massa ≥ 72 kDa (subtraindo os 28 kDa correspondentes ao NUsc1). Além disto, na membrana revelada para presença de NUsc1, houve um pequeno aumento do sinal na fração retida, e redução desse sinal na fração filtrada, quando comparadas a amostra inicial, causado provavelmente pela ligação de NUsc1 aos A β Os, o que indica que o complexo A β Os-NUsc1 se mantém formado mesmo após a eluição utilizando imidazol. Os dados obtidos pela filtração de uma amostra controle contendo apenas preparação de A β Os pelos filtros (Fig. **10B**) revelou que o efeito de concentração do sinal para A β não ocorre com os A β Os livres, destacando novamente que a preparação de A β Os utilizada é descrita como sendo heterogênea com A β Os com baixo (ex. dímeros, trímeros,...) até alto peso molecular (ex. dodecâmeros, protofibras) (CHROMY *et al.*, 2003). Sebollela e cols. (2017), também utilizando membranas filtrantes de 50 kDa para separar uma preparação de A β Os, indicou especificidade de ligação de NUsc1 contra as frações retidas, logo, A β Os ≥ 50 kDa. Desta forma, pode-se inferir que além de confirmarmos os achados anteriores, com este ensaio nos obtivemos informações adicionais sobre a massa molecular da espécie de A β O alvo de NUsc1.

Cline e cols. (2019) desenvolveram recentemente um método para estabilizar A β Os sintéticos por reação de *crosslinking* utilizando o reagente DFDNB, no qual as espécies oligoméricas estabilizadas resistentes a SDS conservaram seu potencial citotóxico. Utilizamos então nosso método de isolamento com NUsc1 imobilizado para verificar a capacidade de NUsc1 em reconhecer A β Os desta preparação estabilizada por *crosslinking* (A β Os-XL). O dado apresentado na Figura 11 indica que os A β Os-XL isolados por NUsc1 possuem peso molecular majoritariamente maior que 100 kDa, reforçando nossos achados de que NUsc1 possui especificidade para agregados solúveis de alto peso molecular, além de mostrar de forma clara que NUsc1 não reconhece A β Os de baixo peso molecular, como dímeros, trímeros e tetrâmeros, já que os A β Os-XL presentes na fração que não se ligou a NUsc1 são de baixo peso molecular. Este dado contribui significativamente com a determinação da seletividade por massa molecular dos oligômeros reconhecidos por NUsc1. Além disso, esse

achado também contribui para a validação dos A β Os-XL como uma preparação na qual as espécies estabilizadas por *crosslinking* preservam epítomos conformacionais encontrados nos A β Os tóxicos (CLINE *et al.*, 2019).

Com o intuito de analisar com mais acurácia a massa molecular do complexo A β Os-NUsc1 eluido, desenvolvemos um protocolo para estabilizar o complexo por *crosslinking*. Diferentemente dos A β Os-XL, neste ensaio não somente os A β Os, mas o complexo A β Os-NUsc1 foi estabilizando por *crosslinking* utilizando o reagente DSS. A escolha desta abordagem foi baseada no uso do complexo A β Os-NUsc1 estabilizado por *crosslinking* (A β Os-NUsc1 XL) em futuras análises por espectrometria de massas, quando pretendemos mapear a interface de ligação entre A β Os e NUsc1 (O'Reilly e Rappsilber, 2018). Nessa análise ainda em planejamento, o uso do DSS deverá facilitar a identificação de peptídeos *cross-linked* por espectrometria de massas, já que é um reagente usualmente utilizado para este fim, sendo específico para formação de ligações entre aminas primárias dos resíduos de lisina (majoritariamente) e arginina (DETTMER *et al.*, 2013; OPAZO E INESTROSA, 1998). Nesse trabalho, encontramos que o complexo A β Os-NUsc1 XL apresentou massa molecular > 150 kDa, corroborando os dados anteriores sobre a especificidade de NUsc1 para A β Os de alto peso molecular (Fig. 12). A concentração do reagente *crosslinker* DSS usada na reação é uma etapa chave, pois em altas concentrações esse agente pode levar a precipitação das proteínas, enquanto que em baixas concentrações pode não ser eficiente para formar as ligações covalentes estabilizantes (LIU *et al.*, 2011). Em nosso sistema, variando a concentração de DSS, observamos a estabilização do complexo A β Os-NUsc1 XL, mas uma redução da eficiência associado ao aumento da concentração do DSS (Fig. 13). Este fato pode estar relacionado a precipitação do complexo durante as 2 h de reação, quando observamos um aspecto levemente translúcido nas amostras com maior concentração de DSS. Uma possível explicação para este fenômeno é que uma alta concentração de DSS pode ter levado a desestabilização da camada de solvatação pela ligação do DSS nos resíduos Lys e Arg na superfície do complexo, ou a alterações no esqueleto da proteína levando a desestabilização da estrutura terciária, levando assim a insolubilidade do complexo (LIU *et al.*, 2011). A estabilização por ligação covalente do complexo A β Os-NUsc1 constitui um importante avanço rumo a futuras análises estruturais baseadas no mapeamento das superfícies de contato entre A β Os e NUsc1,

em grande parte por iniciar o entendimento sobre os epítomos conformacionais que ainda são muito pouco conhecidos para os A β Os, e que podem contribuir para geração de novos anticorpos conformacionais mais específicos para estudo e terapia na DA.

Por fim, buscamos determinar o peso molecular do complexo A β Os-NUsc1 com uma metodologia livre de SDS, e sem interferência de outros potenciais artefatos, como eficiência de transferência em análises por WB. O complexo A β Os-NUsc1 eluído foi submetido a cromatografia de gel filtração, e as frações foram analisadas para detecção de NUsc1 (Fig. **14A**) e A β Os (Fig. **14B**). O deslocamento do sinal majoritário correspondente a NUsc1 indicou um peso molecular ≥ 180 kDa para o complexo, enquanto que na detecção de A β Os, o sinal majoritário se concentrou nas frações correspondentes ao peso molecular ≥ 146 kDa. Na corrida apresentada na Figura **14A**, o peso molecular aparente obtido para NUsc1 foi de ~ 4 kDa, portanto muito distante do esperado (28 kDa). Logo, é necessário refazer este experimento para validar o peso molecular do complexo A β Os-NUsc1. Além disso, como em ambos os resultados o pico referente ao complexo alcançou o volume de eluição correspondente ao volume excluído da coluna (*void*), é difícil conseguir com esse ensaio estimar um peso molecular aparente para o complexo A β Os-NUsc1 com segurança. Contudo, podemos utilizar o limite inferior da estimativa para sugerir que o complexo A β Os-NUsc1 possui peso molecular ≥ 146 kDa, o que corresponde a espécie de A β O ≥ 118 kDa (subtraindo 28 kDa correspondente ao NUsc1). Essa estimativa está de acordo com nossos dados obtidos por outras abordagens aqui apresentados, além de sugerir que as espécies de A β Os isoladas pela ação de NUsc1 retêm sua estrutura oligomérica original após o processo de eluição. A maior dispersão do sinal encontrado na Figura **14B** em comparação com a Figura **14A** pode estar relacionado a diferença no *range* de peso molecular das colunas utilizadas. Vale ressaltar, no entanto, que até o presente, não realizamos nenhum ensaio com NUsc1 capaz de estabelecer a estequiometria de ligação entre NUsc1 e A β Os, sendo possível existir a ligação de mais de uma molécula de NUsc1 para cada molécula de A β O alvo.

Em resumo, os dados aqui apresentados destacam o uso do fragmento de anticorpo de cadeia única NUsc1 com ferramenta de captura de A β Os tóxicos, principalmente quando utilizado em uma abordagem de isolamento utilizando *beads* magnéticas. A partir desta metodologia de isolamento, foi possível obter dados que

corroboram, e estendem, os achados prévios de nosso grupo (SEBOLLELA *et al.*, 2017), que indicaram a preferência de ligação de NUsc1 por A β Os de alto peso molecular. Esses achados tem impacto para a literatura, que tem descrito cada vez mais a toxicidade dos A β Os de alto peso molecular, e sua relação com a DA, sendo descritos achados de A β Os relacionados com a DA de ~80 kDa e > 100 kDa (NOGUCHI *et al.*, 2009; SEBOLLELA *et al.*, 2014; TOMIC *et al.*, 2009), além do recente trabalho de Yasumoto e colaboradores (2019) relacionando A β Os de alto peso molecular induzindo danos na membrana plasmática.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Nosso ensaio de isolamento usando NUsc1 imobilizado em *beads* magnéticas se mostrou eficiente na captura de A β Os alvo de NUsc1 provenientes de diferentes fontes, e se apresenta como um importante avanço na obtenção de A β Os tóxicos isolados para futuras análises estruturais refinadas. Além disso, foi possível confirmar a preferência de ligação do fragmento de anticorpo de cadeia única NUsc1 por A β Os tóxicos de alto peso molecular. A estabilização do complexo A β Os-NUsc1 por *crosslinking* permitirá uma análise mais refinada sobre a superfície de contato entre A β Os e NUsc1, gerando assim novas informações sobre epítomos conformacionais nos A β Os, o que pode gerar avanços consideráveis para elaboração de novos anticorpos conformacionais com maior seletividade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNDT, Katja M. *et al.* Factors influencing the dimer to monomer transition of an antibody single-chain Fv fragment. **Biochemistry**, v. 37, n. 37, p. 12918–12926, 1998.
- BARYKIN, Evgeny P. *et al.* Amyloid β Modification: A Key to the Sporadic Alzheimer's Disease. **Frontiers in genetics**, v. 8, p. 58, 2017.
- BHARADWAJ, Prashant R. *et al.* $A\beta$ aggregation and possible implications in Alzheimer's disease pathogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. **Journal of cellular and molecular medicine**. v. 13, n. 3, p. 412-421, 2009.
- BOADO, Ruben J. *et al.* Fusion antibody for Alzheimer's disease with bidirectional transport across the blood-brain barrier and A β fibril disaggregation. **Bioconjugate Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 447–455, 2007.
- BODE, David C *et al.* Amyloid- β oligomers have a profound detergent-like effect on lipid membrane bilayers, imaged by atomic force and electron microscopy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 19, p. 7566–7572, 10 maio 2019.
- BONDI, Mark W *et al.* Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future HHS Public Access. **J Int Neuropsychol Soc.**, v. 23, n. 9, p. 818–831, 2017.
- BROUILLETTE, Jonathan *et al.* Neurotoxicity and Memory Deficits Induced by Soluble Low-Molecular-Weight Amyloid-1-42 Oligomers Are Revealed In Vivo by Using a Novel Animal Model. **Journal of Neuroscience**. v. 32, n. 23, p. 7852-7861, 2012.
- CASTELLANO, J. M. *et al.* Human apoE Isoforms Differentially Regulate Brain Amyloid- Peptide Clearance. **Science Translational Medicine**, v. 3, n. 89, p. 89ra57-89ra57, 29 jun. 2011.
- CATTANEO, Antonino; BIOCCA, Silvia. The selection of intracellular antibodies. **Trends in Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 115–121, 1 mar. 1999.
- CHENG, Irene H. *et al.* Accelerating amyloid- β fibrillization reduces oligomer levels and functional deficits in Alzheimer disease mouse models. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 33, p. 23818–23828, 17 ago. 2007.
- CHITI, Fabrizio; DOBSON, Christopher M. Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. **Annual Review of Biochemistry**, v. 75, n. 1, p. 333–366, jun. 2006.

CHROMY, Brett A *et al.* Self-Assembly of A 1-42 into Globular Neurotoxins. **Biochemistry**, v. 42, n. 44, p. 12749-12760, 2003.

CLINE, Erika N. *et al.* A novel crosslinking protocol stabilizes amyloid β oligomers capable of inducing Alzheimer's-associated pathologies. **Journal of Neurochemistry**, v. 148, n. 6, p. 822–836, mar. 2019.

DE STROOPER, Bart. Proteases and Proteolysis in Alzheimer Disease: A Multifactorial View on the Disease Process. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 2, p. 465- 494, 2010.

DE WILDT, Ruud M. T. *et al.* Antibody arrays for high-throughput screening of antibody–antigen interactions. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 9, p. 989–994, set. 2000.

DETTMER, Ulf *et al.* In vivo cross-linking reveals principally oligomeric forms of α -synuclein and β -synuclein in neurons and non-neural cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 9, p. 6371–6385, 1 mar. 2013.

EIMER, William A; VASSAR, Robert. Neuron loss in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease correlates with intraneuronal A β 42 accumulation and Caspase-3 activation. **Molecular Neurodegeneration**, v. 8, n. 1, p. 2, 14 jan. 2013.

FOIANI, Martha S *et al.* Plasma tau is increased in frontotemporal dementia. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 89, n. 8, p. 804–807, 1 ago. 2018.

FRENKEL, Dan; SOLOMON, Beka. Filamentous phage as vector-mediated antibody delivery to the brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 8, p. 5675–5679, 2002.

GILBERT, Barnabas James. The role of amyloid β in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Journal of clinical pathology**, v. 66, n. 5, p. 362–6, 1 maio 2013.

GILMAN, S *et al.* Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. **Neurology**, v. 64, n. 9, p. 1553–1562, 2005.

GONG, Yuesong *et al.* Alzheimer's disease-affected brain: Presence of oligomeric A ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 18, p. 10417–10422, 2003.

- GRIFFITHS, A D *et al.* Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. ***The EMBO Journal***, v. 13, n. 14, p. 3245, 1994.
- HAASS, Christian *et al.* Trafficking and Proteolytic Processing of APP. ***Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine***, v. 2, n. 5, p. a006270, 2012.
- HAMILTON, Stephen *et al.* Effect of Imidazole on the Solubility of a His-Tagged Antibody Fragment. ***Hybridoma and Hybridomics***, v. 22, n. 6, p. 347–355, 2003.
- HARDY, John *et al.* Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. ***Nature Neuroscience***, v. 1, n. 5, p. 355–358, 1998.
- HOLTZMAN, D. M.; HERZ, J.; BU, G. Apolipoprotein E and Apolipoprotein E Receptors: Normal Biology and Roles in Alzheimer Disease. ***Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine***, v. 2, n. 3, p. a006312–a006312, 2012.
- HUTTON, Mike *et al.* Association of missense and 5-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. ***Nature***, v. 393, n. 6686, p. 702–704, 1998.
- INTACHAI, Kannaporn *et al.* Enhanced Production of Functional Extracellular Single Chain Variable Fragment Against HIV-1 Matrix Protein from *Escherichia coli* by Sequential Simplex Optimization. ***Preparative Biochemistry and Biotechnology***, v. 45, n. 1, p. 56–68, 2 jan. 2015.
- JIN, M. *et al.* Soluble amyloid β -protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. ***Proceedings of the National Academy of Sciences***, v. 108, n. 14, p. 5819–5824, 2011.
- KNOWLES, D B *et al.* Separation of preferential interaction and excluded volume effects on DNA duplex and hairpin stability. ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***, v. 108, n. 31, p. 12699–704, 2011.
- LAMBERT, M P *et al.* Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1–42 are potent central nervous system neurotoxins. ***Proceedings of the National Academy of Sciences***, v. 95, n. 11, p. 6448–6453, 1998.
- LAMBERT, Mary P. *et al.* Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of A β . ***Journal of Neurochemistry***, v. 100, n. 1, p. 23–35, 2007.
- LANNFELT, Lars *et al.* Perspectives on future Alzheimer therapies: Amyloid- β

*protofibrils-A new target for immunotherapy with BAN2401 in Alzheimer's disease. **Alzheimer's Research and Therapy**, v. 6, n. 1, 2014*

LARSON, Megan E.; LESNÉ, Sylvain E. Soluble A β oligomer production and toxicity. ***Journal of Neurochemistry***, v. 120, n. Suppl 1, p. 125, 2012.

LESNÉ, Sylvain *et al.* A specific amyloid- β protein assembly in the brain impairs memory. ***Nature***, v. 440, n. 7082, p. 352–357, 2006.

LIU, Yihong *et al.* Spectroscopic identification of interactions of formaldehyde with bovine serum albumin. ***Journal of Biochemical and Molecular Toxicology***, v. 25, n. 2, p. 95–100, 2011.

LOMONT, Justin P. *et al.* Spectroscopic Signature for Stable β -Amyloid Fibrils versus β -Sheet-Rich Oligomers. ***The Journal of Physical Chemistry B***, v. 122, n. 1, p. 144–153, 2018.

LORENZO, A.; YANKNER, B. A. Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. ***Proceedings of the National Academy of Sciences***, v. 91, n. 25, p. 12243–12247, 1994.

LU, Jun-Xia *et al.* Molecular structure of β -amyloid fibrils in Alzheimer's disease brain tissue. ***Cell***, v. 154, n. 6, p. 1257–68, 2013.

MANOUTCHARIAN, Karen; PEREZ-GARMENDIA, Roxanna; GEVORKIAN, Goar. Recombinant Antibody Fragments for Neurodegenerative Diseases. ***Current Neuroparmacology***, v. 15, n. 5, p. 779–788, 2017.

BRADFORD, M. . A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. ***Analytical Biochemistry***, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

MARTIN-PEÑA, Alfonso; RINCON-LIMAS, Diego E; FERNANDEZ-FUNEZ, Pedro. Anti-A β single-chain variable fragment antibodies restore memory acquisition in a Drosophila model of Alzheimer's disease. ***Scientific Reports***, v. 7, n. 1, p. 16638–16652, 2017.

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. 1-87 , 2015.

MC DONALD, *et al.* The presence of sodium dodecyl sulphate-stable Abeta dimers is strongly associated with Alzheimer-type dementia. ***Brain : a journal of neurology***, v. 133, n. Pt 5, p. 1328–41, 2010.

MCLEAN, C A *et al.* Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. ***Annals of neurology***, v. 46, n. 6, p. 860–6, 1999.

MEILANDT, W. J. *et al.* Neprilysin Overexpression Inhibits Plaque Formation But Fails to Reduce Pathogenic A Oligomers and Associated Cognitive Deficits in Human Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice. ***Journal of Neuroscience***, v. 29, n. 7, p. 1977–1986, 2009.

MONNIER, Philippe; VIGOUROUX, Robin; TASSEW, Nardos. In Vivo Applications of Single Chain Fv (Variable Domain) (scFv) Fragments. ***Antibodies***, v. 2, n. 2, p. 193–208, 2013.

MULLARD, Asher. Anti-amyloid failures stack up as Alzheimer antibody flops. ***Nature Reviews Drug Discovery***, 18:5, 5 abr. 2019.

MURPHY, Regina M. *Kinetics of amyloid formation and membrane interaction with amyloidogenic proteins.* ***Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes***. v. 1768, n. 8, p. 1923-1934, 2007.

NELSON, A L. Antibody fragments: hope and hype. ***MAbs.***, v. 2, n. 1, p. 77–83, 2010.

NELSON, A L; REICHERT, J M. Development trends for therapeutic antibody fragments. ***Nature biotechnology***, v. 27, n. 4, p. 331–337, 2009.

NISBET, R. M. *et al.* Central amyloid- β -specific single chain variable fragment ameliorates A β aggregation and neurotoxicity. ***Protein Engineering, Design and Selection***, v. 26, n. 10, p. 571–580, 2013.

NOGUCHI, Akihiko *et al.* Isolation and characterization of patient-derived, toxic, high mass amyloid beta-protein (Abeta) assembly from Alzheimer disease brains. ***The Journal of biological chemistry***, v. 284, n. 47, p. 32895–905, 2009.

NORTON, Sam *et al.* Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data. ***The Lancet Neurology***, v. 13, n. 8, p. 788–794, ago. 2014.

O'NUALLAIN, Brian *et al.* Amyloid -Protein Dimers Rapidly Form Stable Synaptotoxic Protofibrils. ***Journal of Neuroscience***, v. 30, n. 43, p. 14411–14419, 2010.

O'REILLY, Francis J.; RAPPILBER, Juri. Cross-linking mass spectrometry: methods and applications in structural, molecular and systems biology. ***Nature Structural & Molecular Biology***, v. 25, n. 11, p. 1000–1008, 2018.

OAKLEY, H. *et al.* Intraneuronal beta-Amyloid Aggregates, Neurodegeneration, and Neuron Loss in Transgenic Mice with Five Familial Alzheimer's Disease Mutations: Potential Factors in Amyloid Plaque Formation. ***Journal of Neuroscience***, v. 26, n. 40, p. 10129–10140, 4 out. 2006.

OPAZO, C; INESTROSA, N C. Crosslinking of amyloid-beta peptide to brain acetylcholinesterase. ***Molecular and chemical neuropathology***, v. 33, n. 1, p. 39–49, 1998.

PARAVASTU, A. K. *et al.* Seeded growth of -amyloid fibrils from Alzheimer's brain-derived fibrils produces a distinct fibril structure. ***Proceedings of the National Academy of Sciences***, v. 106, n. 18, p. 7443–7448, 2009.

PETKOVA, A. T. *et al.* Self-Propagating, Molecular-Level Polymorphism in Alzheimer's -Amyloid Fibrils. ***Science***, v. 307, n. 5707, p. 262–265, 2005.

POLING, Alan *et al.* Oligomers of the amyloid-beta protein disrupt working memory: confirmation with two behavioral procedures. ***Behavioural brain research***, v. 193, n. 2, p. 230–4, 2008.

QIANG, Wei *et al.* Structural variation in amyloid- β fibrils from Alzheimer's disease clinical subtypes. ***Nature***, v. 541, n. 7636, p. 217–221, 4 jan. 2017.

QUERFURTH, Henry W.; LAFERLA, Frank M. Alzheimer's Disease. ***New England Journal of Medicine***, v. 362, n. 4, p. 329–344, 2010.

RADDE, Rebecca *et al.* A β 42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. ***EMBO Reports***, v. 7, n. 9, p. 940–946, 2006.

REITZ, Christiane. A Critical Review. ***International Journal of Alzheimer's Disease***, v. 2012, p. 11, 2012.

REITZ, Christiane; MAYEUX, Richard. Alzheimer disease: Epidemiology, Diagnostic

Criteria, Risk Factors and Biomarkers. **Biochemical Pharmacology**, v. 88, n.4, p. 640-651, 2014.

ROBERT, Remy *et al.* Engineered antibody intervention strategies for Alzheimer's disease and related dementias by targeting amyloid and toxic oligomers. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 22, n. 3, p. 199–208, 2009.

SCHELTENS, Philip *et al.* Alzheimer's disease. **The Lancet**, v. 12, n. 74, p. 4338-4346, 2016.

SEBOLLELA, A. *et al.* A human scFv antibody that targets and neutralizes high molecular weight pathogenic amyloid- β oligomers. **Journal of Neurochemistry**, v. 142, n. 6, p. 934–947, 3 set. 2017.

SEBOLLELA, A. *et al.* Amyloid- β oligomers induce differential gene expression in adult human brain slices. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 10, p. 7436–7445, 2012.

SEBOLLELA, A. *et al.* Elucidating molecular mass and shape of a neurotoxic $\alpha\beta$ oligomer. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 5, n. 12, p. 1238–1245, 2014.

SERPELL, Louise C. *Alzheimer's amyloid fibrils: Structure and assembly*. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1502, n. 1, p. 16-30, 2000.

SHANKAR, G. M. *et al.* Biochemical and immunohistochemical analysis of an Alzheimer's disease mouse model reveals the presence of multiple cerebral A β assembly forms throughout life. **Neurobiology of Disease**, v. 36, n. 2, p. 293–302, nov. 2009.

SHANKAR, G. M. *et al.* Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. **Nature Medicine**, v. 14, n. 8, p. 837–842, 2008.

SHARMAN, Matthew J. *et al.* APOE Genotype Results in Differential Effects on the Peripheral Clearance of Amyloid- β 42 in APOE Knock-in and Knock-out Mice. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 21, n. 2, p. 403–409, 2010.

STROHL, L. M. *Therapeutic antibody engineering: Current and future advances driving the strongest growth area in the pharmaceutical industry*. **Therapeutic Antibody Engineering**, v.1 , n.1, p. 693, 2012.

SU, Yu-Ching; LIM, Kue-Peng; NATHAN, Sheila. Bacterial Expression of the scFv Fragment of a Recombinant Antibody Specific for *Burkholderia pseudomallei* Exotoxin. **BMB Reports**, v. 36, n. 5, p. 493–498, 2011.

TIIMAN, Ann *et al.* In vitro fibrillization of Alzheimer's amyloid- β peptide (1-42). **AIP Advances**, v. 5, n. 9, p. 092401, 2015.

TOMIC, Jennifer L *et al.* Soluble fibrillar oligomer levels are elevated in Alzheimer's disease brain and correlate with cognitive dysfunction. **Neurobiology of disease**, v. 35, n. 3, p. 352–8, 2009.

VELASCO, Pauline T. *et al.* Synapse-binding subpopulations of A β oligomers sensitive to peptide assembly blockers and scFv antibodies. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 3, n. 11, p. 972–981, 2012.

VIOLA, Kirsten L.; KLEIN, William L. *Amyloid oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis*. **Acta Neuropathologica**, v. 129, n. 2, p. 183–206, 2015.

WALSH, Dominic M. *et al.* Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. **Nature**, v. 416, n. 6880, p. 535–539, 2002.

WALSH, G. Modern Antibody-Based Therapeutics. **BioPharm International**, v. 17, n. 12, p. 8, 2004.

WILCOX, Kyle C *et al.* Nanoscale synaptic membrane mimetic allows unbiased high throughput screen that targets binding sites for Alzheimer's-associated A β oligomers. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, 2015.

WÖRN, Arne; PLÜCKTHUN, Andreas. *Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments*. **Journal of Molecular Biology**, v. 305, n. 5, p. 989–1010, 2001.

XIA, Jing *et al.* Isolation, identification and expression of specific human CD133 antibodies. **Scientific Reports**, v. 3, 2013.

XUE, Wei-Feng; HOMANS, Steve W.; RADFORD, Sheena E. Systematic analysis of nucleation-dependent polymerization reveals new insights into the mechanism of amyloid self-assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 26, p. 8926–8931, 2008.

YANG, Ting *et al.* Large Soluble Oligomers of Amyloid β -Protein from Alzheimer Brain Are Far Less Neuroactive Than the Smaller Oligomers to Which They Dissociate. ***The Journal of Neuroscience***, v. 37, n. 1, p. 152–163, 2017.

YASUMOTO, Taro *et al.* High molecular weight amyloid β 1-42 oligomers induce neurotoxicity via plasma membrane damage. ***The FASEB Journal***, p. fj.201900604R, 2019.

ZHANG, Yuan; SUN, Yuanhong; *et al.* Functional Characteristics and Molecular Mechanism of a New scFv Antibody Against A β 42 Oligomers and Immature Protofibrils. ***Molecular Neurobiology***, v. 52, n. 3, p. 1269–1281, 2015.

ZHANG, Yuan; CHEN, Xu; *et al.* The protective effects and underlying mechanism of an anti-oligomeric A β 42 single-chain variable fragment antibody. ***Neuropharmacology***, v. 99, p. 387–395, 2015.