



RAPORT ȘTIINȚIFIC ȘI TEHNIC

Etapa II (12 luni)

privind implementarea proiectului de cercetare cu titlul: „*Platformă integrată pentru detecția în timp real a antigenilor virusului hepatitei B, cu ajutorul biosenzorilor proteici*”, acronim: HEPATVIRDETECT, nr. 365PED/2020 cod proiect: PN-III-P2-2.1-PED-2019-0016, pentru perioada 1 ianuarie 2021 – decembrie 2021.

Coordonator: Universitatea Alexandru Ioan Cuza din Iași

Partener: Institutul de Biochimie din București

Scopul principal al proiectului, constă în dezvoltarea unui nanosenzor proteic portabil, de primă generație, pentru detecția selectivă a HBeAg, bazată pe interacția cu un anticorp specific.

Obiectivul 1 Studiul la nivel de singură moleculă al interacțiunilor dintre HBeAg și anticorpul acestuia, anti-HBeAg, cu ajutorul nanoporului de α -HL.(partea a II-a)

Obiectivul 2 Demonstrarea fezabilității discriminării în timp real a ampretei specifice a moleculelor de HBeAg, utilizând tehnici la nivel de singură-moleculă de detecție stocastică a dimerului HBeAg/anti-HBeAg cu ajutorul nanoporului de α -HL.

Obiectivul 3 Dezvoltarea unei platforme portabile și stabile, bazate pe nanoporul de α -HL, pentru detecția HBeAg în regim ‚point-of-care‘, superioare tehnologiilor existente în ceea ce privește randamentul, afinitatea și selectivitatea (partea I).

Pentru realizarea obiectivelor propuse s-a continuat studierea literaturii relevante în care a fost prezentată activitatea mai multor anticorpi. După achiziționarea unuia dintre anticorpii disponibili comercial, s-a determinat capacitatea de legare atât a HBeAg pur, obținut



din surse comerciale, cât și a celui secretat în mediul de cultură, în urma infecției celulelor HepG2-NTCP cu virusul hepatic B (VHB).

Pentru ELISA, o placă de 96 godeuri a fost cotate utilizând diluții seriale (500-0.015 ng/godeu) de HBeAg (Native Antigen Company, UK) precum și mediu provenit din experimente de infecție in vitro, peste noapte la 4 °C. Ulterior, placa a fost spălată cu PBS suplimentat cu 0.1% Tween-20 (PBS-T) și blocată în lapte 10% timp de 1 h, urmând încă 3 spălări cu PBS-T. Placa a fost apoi incubată cu anticorpul primar anti-HBeAg (1:100, Santa Cruz Biotechnology) timp de 1 h la temperatura camerei, urmând apoi 3 spălări cu PBS-T și incubarea cu anticorp secundar anti-mouse conjugat cu HRP (1:10 000, Santa Cruz Biotechnology) timp de 1 h la temperatura camerei. Probele au fost apoi spălate cu PBS-T de 3 ori. Detecția semnalului s-a realizat colorimetric, prin adăugare de TMB, reacția fiind stopată la 30 min prin adăugarea de H₂SO₄, 1N. Semnalul a fost cuantificat spectrofotometric, citirea făcându-se la 450 nm.

Rezultatele obținute au demonstrat capacitatea anti-HBeAg de recunoaștere atât a HBeAg pur cât și a celui rezultat din infecția cu VHB. Anticorpul validat a fost transferat partenerilor din UAIC pentru optimizarea nanosenzorului.

Etapele proiectului au vizat studiul la nivel de singură moleculă al interacțiunilor dintre HBeAg și anticorpul acestuia, anti-HBeAg, cu ajutorul nanoporului de α -HL. În vederea distingării amprentei specifice a moleculelor de Ab(HBe) și a complexului antigen-anticorp Ab(HBe)-HBeAg, necesar detecției HBeAg pentru dezvoltarea platformei portabile și stabile am elaborat un protocol experimental bazat pe următoarele raționamente de bază: (i) analiza și înțelegerea mecanismului molecular de capturare a moleculelor de Ab(HBe) de către nanopor; (ii) optimizarea parametrilor și condițiilor care favorizează interacțiunea complexului molecular HBeAg/anti-HBeAg cu nanoporul de α -HL; (iii) creșterea sensibilității de detecție prin manipularea parametrilor de concentrație molară; (iv) scăderea raportului zgomot/semnal în vederea creșterii stabilității și sensibilității metodei.

În primă fază, experimentele de electrofiziologie implementate au vizat detecția moleculelor de HBe(Ab), anticorpul moleculei HBeAg, și descrierea amprentei specifice dată de către interacțiunea acestora cu nanoporul proteic de α -HL.

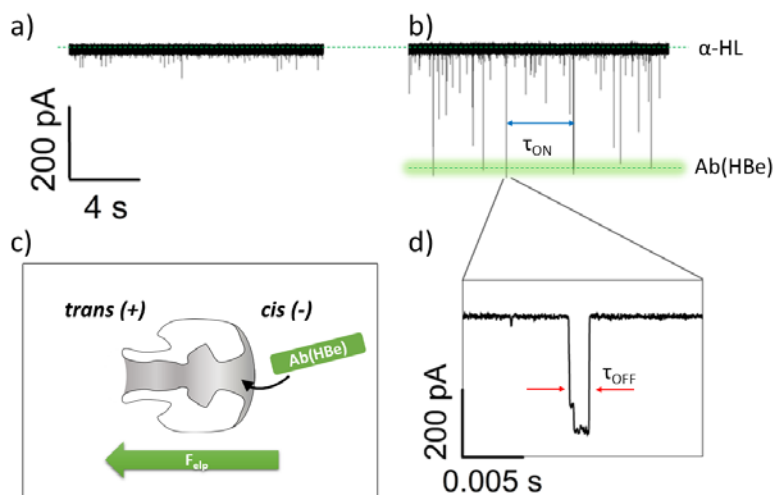


Figura 1 Amprenta specifică a interacțiunii a 65 nM Ab(HBe) adăugate în partea *cis* cu nanoporul de α -HL: a) curentul ionic înregistrat prin porul liber, b) fluctuațiile de curent ionic induse de interacțiunea moleculelor de Ab(HBe) cu nanoporul proteic, c) reprezentare schematică a modului de interacțiune Ab(HBe) - α -HL și d) semnalul specific dat de această interacțiune. Toate înregistrările reprezentate au fost efectuate la un potențial transmembranar de 200 mV.

Experimentele au fost realizate în condiții de pH ușor bazic ($pH = 8$), într-o soluție de 2 M KCl, cu un buffer de 10 mM HEPES. Bistratul lipid care desparte cele două părți ale dispozitivului experimental (denumite convențional, *trans* și *cis*, cea din urmă fiind mereu legată la masă) a fost format din lipide de tip *diphytanoyl phosphatidylcholine* (DPhPC) în care s-a inserat nanoporul heptameric de α -HL prin adăugarea unei soluții monomerice de proteină în partea *cis* a bistratului lipidic.

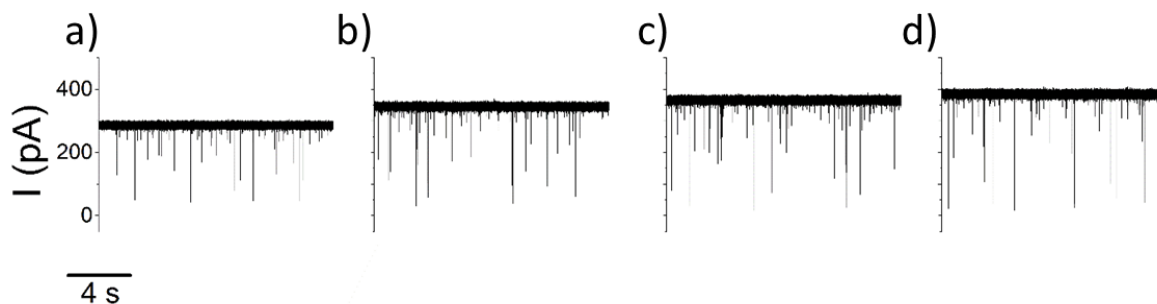


Figura 2 Înregistrări ale fluctuațiilor de curent ionic induse de adăugarea în partea *cis* a 65 nM Ab(HBe), la diferite potențiale transmembranare: a) 150 mV, b) 180 mV, c) 190 mV and d) 200 mV.



În momentul înserării nanoporului în membrana lipidică și aplicarea unei diferențe de potențial se observă apariția unui curent ionic, relativ constant (Figura 1, panel a), iar după adăugarea moleculelor de Ab(HBe) într-o concentrație de 65 nM, în partea *cis* a membranei în care este inserat nanoporul (Figura 1, panel c), se pot observa fluctuații în curentul ionic înregistrat (Figura 1, panel b). Aceste fluctuații de curent ionic sunt o consecință directă a capturării moleculelor de Ab(HBe) în interiorul nanoporului.

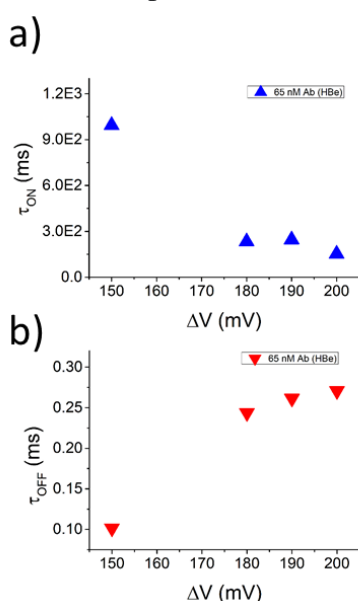


Figura 3 Analiza cantitativă a fluctuațiilor de curent ionic generate de 65 nM Ab(HBe) cu diferența de potențial aplicată: a) τ_{ON} – timpul mediu dintre evenimente succesive (reprezentate cu triunghiuri albastre orientate în sus) și b) τ_{OFF} – timpul de rezidență al moleculelor în interiorul nanoporului.

Toate înregistrările de curent ionic au fost efectuate cu o frecvență de achiziție de 50 kHz, filtrate la o frecvență de 10 kHz, și cu un *gain* de 5 mV/pA. Parametrii ce descriu cinetica de interacțiune a moleculelor de Ab(HBe) cu nanoporul de α -HL sunt reprezentați și în figura 1: τ_{ON} – timpul dintre două evenimente succesive, de capturare de către por a moleculelor (panel b) și τ_{OFF} – timpul de rezidență a moleculei în interiorul nanoporului (panel d). Analiza acestor parametri, în valorile lor medii, ne-au oferit informații despre cinetica de interacțiune specifică pentru Ab(HBe) cu nanoporul.

Ulterior, pentru optimizarea condițiilor de capturare a moleculelor de Ab(HBe) am modificat diferența de potențial aplicată asupra sistemului lipo-proteic. Forța electroforetică



generată de diferența de potențial aplicată reprezintă unul din factorii determinanți ai direcției, ratei de capturare și vitezei moleculelor.

Adăugarea unei concentrații de 65 nM de Ab(HBe) în partea *cis* a sistemului lipo-proteic și aplicarea unei diferențe de potențial crescute, variind în intervalul [150; 200] mV, a condus la generarea unor fluctuații de curent ionic din ce în ce mai frecvente (Figura 2, panelurile a-d).

Analiza statistică a timpilor medii dintre evenimentele de capturarea a moleculelor de Ab(HBe) de către nanoporul proteic (τ_{ON} , Figura 3, panel a), cât și a timpilor medii de rezidență a moleculelor de Ab(HBe) în interiorul acestuia (τ_{OFF} Figura 3, panel b) reflectă cinetica de interacțiune specifică pentru anticorp.

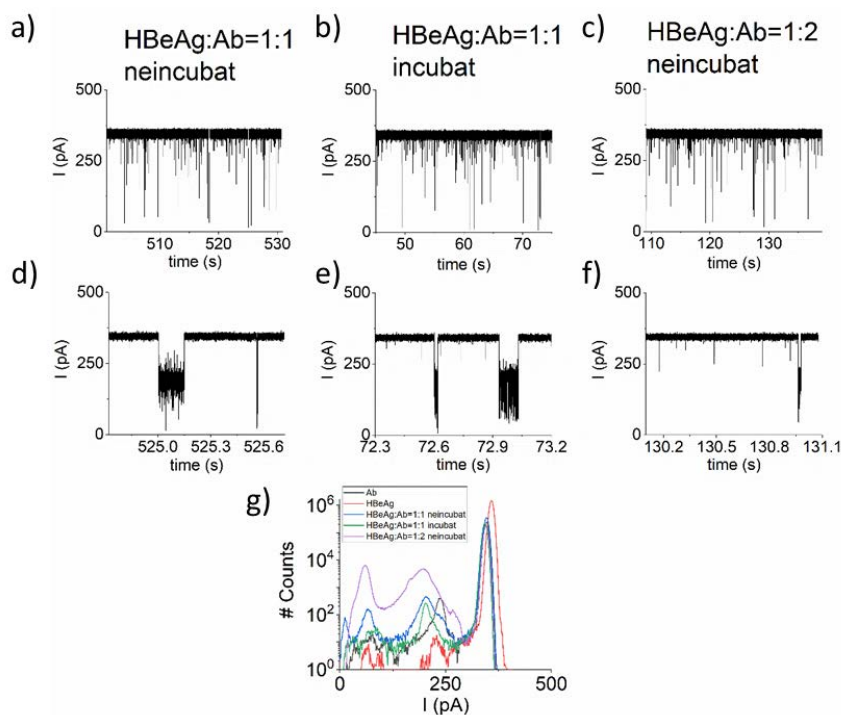


Figura 4 Fluctuațiile de curent ionic și evenimentele specifice înregistrate pentru: HBeAg:Ab(HBe) neincubat, în raport molar de 1:1 (panel a și d); HBeAg:Ab(HBe) incubat, în raport molar de 1:1 (panel b și e) și HBeAg:Ab(HBe) neincubat, în raport molar de 1:2 (panel c și f). Histogramele de amplitudine corespundente pentru fiecare caz de incubare și raport molar raportate la amprenta specifică în amplitudine înregistrată pentru Ab(HBe) reprezentat cu negru și HBeAg reprezentat cu roșu (panel g).

Creșterea diferenței de potențial și implicit a forței electroforetice duce la scăderea timpului mediu dintre evenimente de interacțiune succesive, ceea ce înseamnă creșterea ratei de capturare a moleculelor de către nanopor. Pe de altă parte, timpul mediu de rezidență a



moleculii în interiorul nanoporului crește cu diferența de potențial aplicată, lucru care reflectă că moleculele de Ab(HBe) nu translocă în partea *trans* a nanoporului.

După discriminarea amprentei specifice a anticorpului, s-a trecut la testarea condițiilor experimentale optime pentru obținerea detecției eficiente a antigenului, HBeAg. Astfel că, s-au testat mai multe modalități de formare a complexului molecular anticorp-antigen (HBe(Ab) cu HBeAg), în condiții diferite de incubare și în mai multe raporturi molare. În special, experimentele au vizat identificarea modului cel mai eficient de detecție: (i) incubarea moleculelor de interes pentru aproximativ două ore la o temperatură de 37°C înainte de începerea experimentelor și (ii) adăugarea succesivă a moleculelor în dispozitivul molecular, fără incubare. Înregistrările fluctuațiilor de curent ionic date în cele două cazuri sunt reprezentate în Figura 4, panelurile a și b, precum și un alt parametru modificat, și anume, raportul molar dintre cele două componente ale complexului (panel c).

Am urmărit modificări subtile în amprenta complexului molecular HBe(Ab)-HBeAg în urma interacțiunii acestuia cu nanoporul de α -HL (panelurile d-f), precum și în amplitudinea de blocaj dată de aceste interacțiuni (panel g). Analiza histogramelor de amplitudine specifice celor trei cazuri de preparare a probelor, în comparație cu cele obținute când cele două componente ale complexului au fost adăugate și analizate separat, sugerează apariția unor fluctuații total diferite, cu *peak-uri* suplimentare în fluctuațiile de curent.

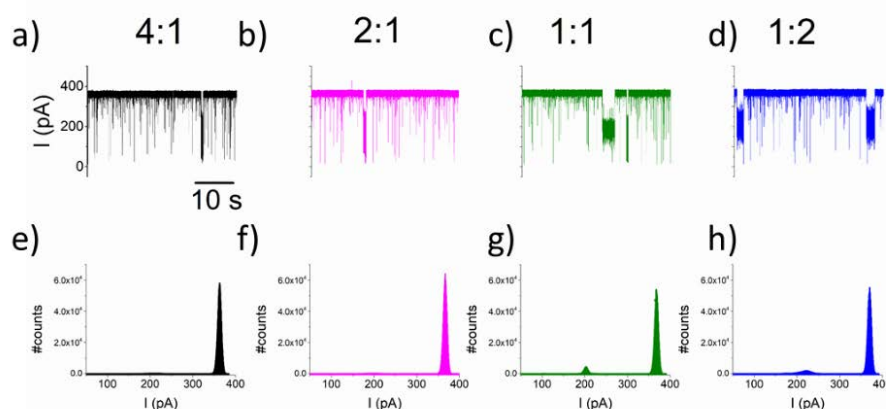


Figura 5 Fluctuațiile de curent ionic și histogramele de amplitudine specifice amestecului moleculelor Ab(HBe):HBeAg neincubat în raport de concentrație molară de: 4:1 (panel a și e), 2:1 (panel b și f), 1:1 (panel c și g), 1:2 (panel d și h). Toate înregistrările și histogramele reprezentate au fost efectuate la un potențial transmembranar de 190 mV.



O analiză mai amănunțită asupra modului în care raportul molar dintre cele două componente ale complexului molecular HBe(Ab):HBeAg influențează detecția antigenului a fost realizată prin efectuarea unor experimente suplimentare, în condiții de neincubare, la mai multe concentrații molare (e.i., HBe(Ab):HBeAg, 4:1; 2:1; 1:1 și respectiv 1:2, Figura 5, panourile a-d).

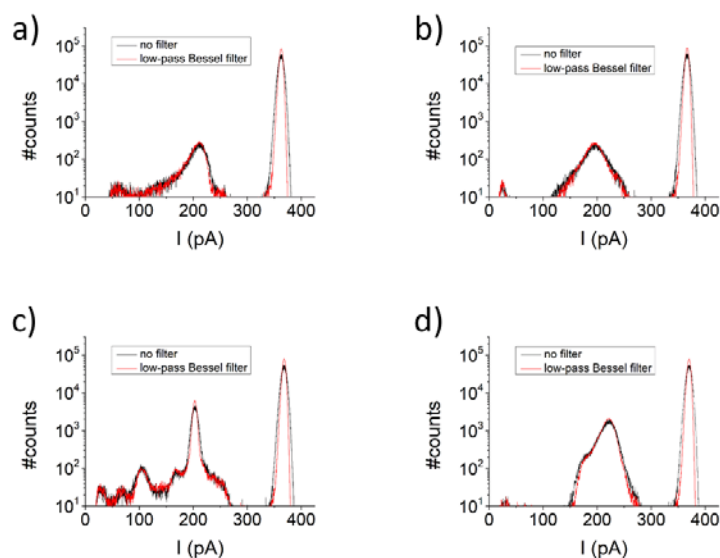


Figura 6 Histogramele de amplitudine specifice amestecului molecular neincubat Ab(HBe):HBeAg, fără filtru (negru) și după aplicarea unui filtru low-pass de tip Bessel de 7000 Hz (roșu) pentru diferite raporturi molare: 4:1 (panel a), 2:1 (panel b), 1:1 (panel c) și 1:2 (panel d). Toate histogramele reprezentate au fost efectuate pentru înregistrări la o diferență de potențial de 190 mV și reprezentate în scală logaritmică.

Conforma histogramelor de amplitudine am observat că raportul molar optim pentru detecția complexului molecular anticorp-antigen poate varia între 1:1 și 1:2 pentru detectorul propus. Raportul zgomot/semnal a fost examinat prin comparația semnalului (fluctuațiile de curent) original înregistrat cu semnalul filtrat cu ajutorul unui filtru de tip *low-pass* Bessel, fixat la 7000 Hz și reprezentat pe scală logaritmică pentru o mai bună vizualizarea a modificărilor (Figura 6).

În concluzie, protocoalele experimentale propuse, analiza statistică cantitativă a parametrilor specifici moleculei anticorp AbHBe și a complexului molecular anticorp-antigen AbHBe-HBeAg a permis optimizarea detecției antigenului și stabilirea parametrilor optimi ce trebuie avuți în vedere pentru dezvoltarea nanoplatfomei stabile și portabile.



Având în vedere că gazda fiziologică pentru replicarea VHB este celula animală, proiectul a prevăzut producerea HBeAg în celule HEK. Ca alternativă mult mai ieftină de producere a proteinelor recombinante, a fost testat totuși și sistemul procariot, pornind de la ipoteza că HBeAg nu suferă modificări postranșionale complexe, specifice doar celulei eucariote (i.e glicozilare) (Fig. 1).

HBV e-antigen (HBeAg)

```
(-10)      (-1)      10      20      30      40      50
SKLCLGWLWG MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDAAALYRD ALESPEHCSP
      60      70      80      90      100     110
HHTALRQAIL CWGDLMTLAT WVGTLNLEDP SRDLVVS YVN TNVGLKFRQL LWFHISCLTF
      120     130     140
GRETVLEYLV SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVV (R)(R)
```

Number of Amino Acids: 159
Molecular Weight: 17,914

Figura 7 Secvența HBeAg.

Astfel, teoretic, există șansa producerii unei proteine funcționale și în sistem procariot, mult mai ușor de manipulat și cu randamente crescute de sinteză proteică atunci când se folosește un sistem inductibil.

Antigenul HBe a fost clonat în vectorul pCi (mamaliene) și pET-24a (bacterii) prin amplificare PCR folosind ca template genomul VHB complet și primeri specifici. Ulterior, o secvență „tag” poli-His a fost atașat la capătul C-terminal al antigenului prin mutageneză direcționată. Inserția secvenței ce codifică HBeAg a fost verificată prin migrare în gel de agaroză (Figura 8) și confirmată prin secvențierea ADN a plasmidelor codificatoare.

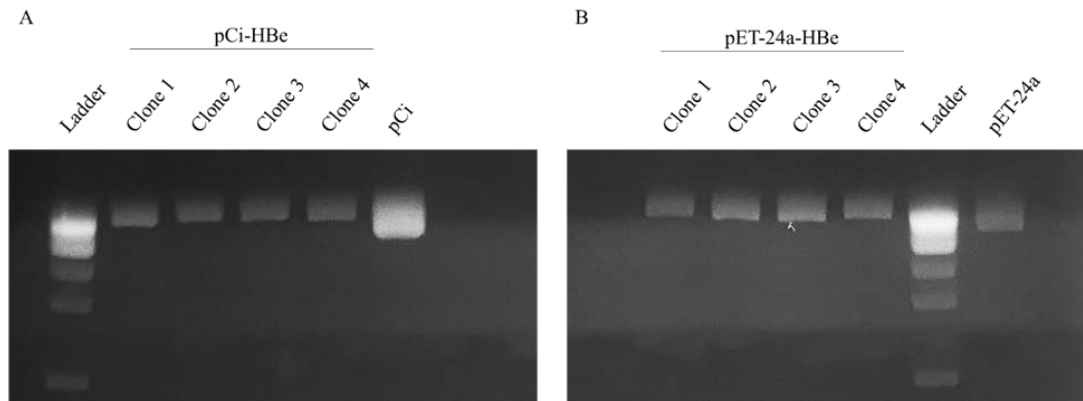


Figura 8 Screening inserție secvența HBeAg în plasmide pentru expresie în celule mamaliene (pCi) (panel A) și bacterii (pET-24a) (panel B).

Pentru expresia în sistem procariot, s-au folosit celule bacteriene *E. coli* DE3-RIL ce conțin copii suplimentare ale codonilor pentru aminoacizii arginină, izoleucină și leucină, asigurând astfel expresia corespunzătoare a antigenului HBe, ce are o secvență bogată în arginină. Celulele DE3-RIL au fost supuse transformării cu plasmidul pET-24a-HBe și ulterior au fost inoculate în mediu LB suplimentat cu kanamicină (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La 3 h post-inocul a fost indusă expresia de protein prin adăugare de IPTG (1 μM). Timpul optim de inducție a fost testat prin prelevare de probe la 1, 2, 3 și 4 h post-inducție și cuantificarea nivelului de proteină prin separare via SDS-PAGE și Comassie Blue Staining. S-a observat apariția unei benzi proteice, corespunzătoare masei HBeAg, care crește în intensitate la 4 h post-inducție (Figura 9).

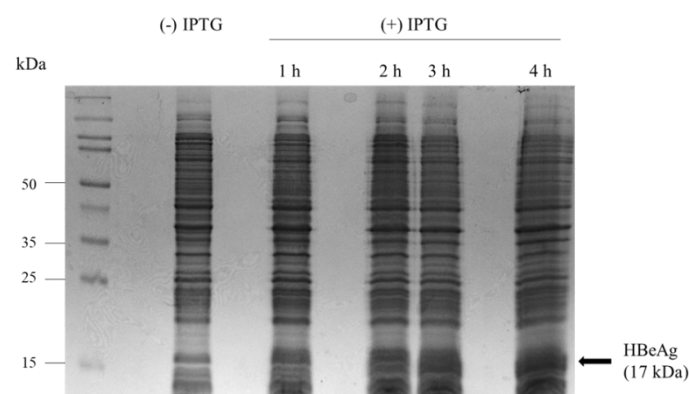


Figura 9 Verificarea expresiei de HBeAg în sistem de expresie procariot, în absența agentului inductor (-IPTG) și la 1, 2, 3, și 4 h post-inducție, (+) IPTG), prin Comassie Blue Staining.



Celulele au fost apoi recoltate prin centrifugare și lizate în buffer adaptat purificării proteinelor pe rășină Ni-NTA (20 mM imidazole, 500 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH = 8) suplimentat cu 10% Triton-X, 0.1% PMSF, lizozimă (0.1 mg/mL), DTT (2 μ M), și cocktail inhibitori proteaze (1X). Proteina HBe a fost purificată prin cromatografie de afinitate cu rășină Ni-NTA Sepharose și eluată cu buffer de eluție ce conține 500 mM imidazol. Frația eluată a fost apoi analizată prin SDS-PAGE și Comassie Blue Staining, observându-se o îmbunătățire semnificativă a purității acesteia (proba „bound”) (Figura 10).

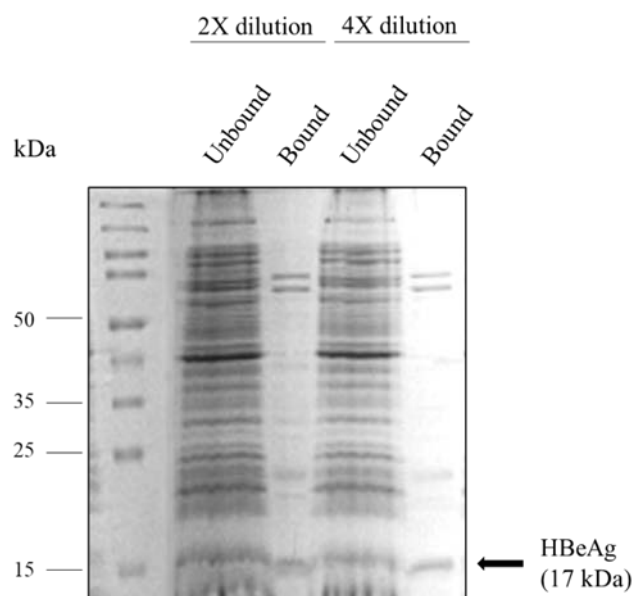


Figura 10 Verificare purificare HBeAg prin cromatografie de afinitate folosind rășină de Ni-NTA Sepharose. Probele au fost diluate de 2X și 4X pentru a verifica capacitatea de legare a rășinei pentru proteină.

Pentru a stabili fara dubiu identitatea proteinei purificate, capacitatea de legare a unui anticorp specific, comercial, anti-HBeAg, a fost testată prin ELISA, care a confirmat că antigenul obținut este recunoscut de anticorpul anti-HBe. Probele obținute post-purificare au fost cuantificate folosind o curbă etalon realizată cu HBeAg pur, comercial, pentru a determina cantitatea de antigen obținută. Astfel, s-a estimat obținerea unei cantități de 1,2 mg/mL HBeAg cu o puritate de ~80%. La data redactării acestui raport, se realizează o a doua etapă de purificare prin cromatografie de excludere moleculară, pentru a ajunge la un nivel de puritate potrivit pentru optimizarea senzorului proteic, urmând ca antigenul să fie transmis partenerilor



pentru analize. Menționăm ca producerea cu succes a HBeAg în sistem procariot, ca proteină solubilă, funcțională este un rezultat în premieră care deschide calea pentru stabilirea unei platforme rentabile de producție a acestui antigen la costuri reduse.

HBeAg a fost, de asemenea, produs în celule mamaliene; la data redactării raportului se testează capacitatea de expresie a antigenului în celule HEK293T aderente, după care se va trece la producția de HBeAg în celule Expi293 în suspensie, pentru purificare folosindu-se protocolalele de lucru deja optimizate.

DISEMINAREA REZULTATELOR

Articole:

1. *The Nanopore-Tweezing-Based, Targeted Detection of Nucleobases on Short Functionalized Peptide Nucleic Acid Sequences*, Dragomir, I.S., Asandei, A., Schiopu, I, Bucataru, I.C., Mereuta, L., Luchian, T., **POLYMERS 2021**, 13 (8), 1210
2. *Single-molecule, hybridization-based strategies for short nucleic acids detection and recognition with nanopores*, Luchian, T.; Mereuta, L.; Park, Y.; Asandei, A.; Schiopu, I., **PROTEOMICS 2021**, e2100046, DOI10.1002/pmic.202100046
3. *Single-Molecule Detection And Manipulation With Biological Nanopores*, Schiopu I., Asandei A., Mereuta L., Dragomir I.S., Bucataru I.C., Luchian T., **Studia Chemia 2021**.
4. *Teaching an old dog new tricks: a lipid membrane-based electric immunosensor for real-time probing of the spike S1 protein subunit from SARS-CoV-2*, Asandei A., Mereuta L., Schiopu I., Park Y., Luchian T., **PROTEOMICS 2021**.

Director de proiect,
Prof. Univ. Dr. Tudor LUCHIAN

Responsabil partener
Dr. Norica Nichita