

Raport științific final

(2020 - 2022)

Competiția:	Proiect experimental demonstrativ - PED 2019
Nr. contract:	365PED
Cod proiect:	PN-III-P2-2.1-PED-2019-0016
Domeniul de cercetare:	1.3 - Biotehnologii
Titlul :	<i>Platformă integrată pentru detecția în timp real a antigenilor virusului hepatitei B, cu ajutorul biosenzorilor proteici // Label-free, real-time detection platform of Hepatitis B Virus antigens with protein biosensors</i>
Acronim:	HEPATVIRDETECT
Data începere proiect:	01/11/2020
Data finalizare proiect:	30/04/2022
Durata (luni):	18
Buget total:	600.000,00
Sursa 1 Bugetul de stat	600.000,00
Sursa 2 Alte surse atrase (cofinanțare):	0,00
Pagina web proiect:	https://www.uaic.ro/hepatvirdetect/
Instituția coordonatoare:	UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" IASI
Director de proiect:	Prof. Univ. Dr. Tudor LUCHIAN
Partener 1 proiect (P1):	INSTITUTUL DE BIOCHIMIE Responsabil proiect P1: CS I Dr. Norica-Beatrice NICHITA

1. Prezentare generală a realizării obiectivelor proiectului, cu punerea în evidență a rezultatelor și gradul de realizare a obiectivelor. Prezentarea trebuie să includă explicații care să justifice diferențele (dacă există) dintre activitățile preconizate și cele realizate.
2. Prezentarea și argumentarea nivelului de maturitate tehnologică (TRL) la finalul proiectului.
3. Gradul de atingere a rezultatelor estimate (prezentarea produsului/tehnologiei sau a serviciului rezultat al proiectului).
4. Impactul rezultatelor obținute, cu sublinierea celui mai semnificativ rezultat obținut.
5. Detalii privind exploatarea și diseminarea rezultatelor proiectului.

6. Prezentarea livrabilelor/indicatorilor obținuți la finalul proiectului comparativ cu cei propuși.

Nr. crt.	Livrabile/indicatori planificați	Nr.	Livrabile/indicatori realizați	Nr.
1.	Model experimental	1	Model experimental	1
2.	Articol	2	Articol	7
	Diseminare prin participare conferinte	1	Diseminare prin participare conferinte	0
3.	Depunere cerere brevet	1	Depunere cerere brevet	1

Notă:

Pe lângă cele menționate mai sus, raportul final trebuie să conțină și o prezentare succintă (2-3 paragrafe) a rezultatelor obținute în cadrul proiectului, rezultate ce urmează a fi diseminate de Autoritatea Contractantă în materiale de promovare a rezultatelor obținute în cadrul programelor de finanțare. Menționăm că acest text trebuie să fie pe înțelesul publicului.

Prezentarea trebuie să fie însoțită de 2-4 poze reprezentative pentru proiect (format JPG).

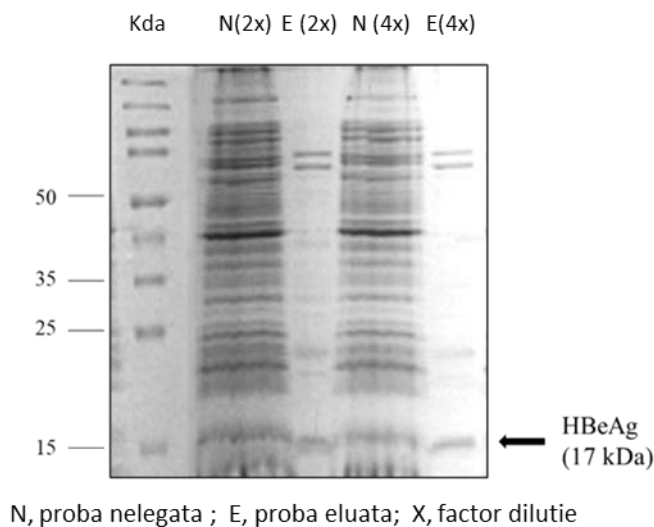
Acestea trebuie să se regăsească și pe pagina web a proiectului.

Virusul Hepatic B (VHB) rămâne o problemă majoră de sănătate publică, cauzând moartea a peste 800.000 de pacienți în fiecare an, la nivel global. Se estimează că aproximativ 3,5% din populația lumii este infectată cronic cu VHB, peste 40% dezvoltând boli hepatice severe, precum ciroza hepatică și cancer hepatocelular.

Una dintre prioritățile Organizației Mondiale a Sănătății (OMS) este eradicarea hepatitei virale până în 2030, sau cel puțin limitarea drastică a acestor infecții. Pentru îndeplinirea acestui deziderat major trebuie însă crescută semnificativ capacitatea de diagnostic (majoritatea acestor infecții rămân azi nedepistate), îmbunătățit accesul la tratament și mărită acoperirea vaccinală, în special în zonele endemice.

Pentru creșterea numărului de pacienți diagnosticați este nevoie de metode sensibile, reproductibile, ușor de manipulat fără să necesite personal medical de înaltă calificare, aplicabile la scală largă. În acest context, **obiectivul principal** al acestui proiect a fost să dezvoltăm un nanosenzor proteic portabil util pentru detecția senzitivă și selectivă a HBeAg prin intermediul interacțiunilor selective dintre antigenii HBV și anticorpi anti-HBe.

Purificarea HBeAg prin cromatografie de afinitate pe Ni-NTA Sepharose



Abordarea experimentală implementată pentru obiectivul urmărit, are la bază analiza interacțiunilor dintre nanoporul proteic și HBeAg care pot fi cuantificate prin intermediul evenimentelor distincte de blocare a curentului ionic mediat de nanopor în condițiile aplicării unui câmp electric transmembranar optim. Pentru a îmbunătăți gradul de senzitivitate a nanosenzorului proteic prin creșterea specificității țintei HBeAg, am explorat interacțiunile specifice dintre nanopor și anticorpi anti-HBeAg. După adăugarea în soluția electrofiziologică a anticorpilor specifici anti-HBeAg, s-au format complexele ne-covalente HBeAg/anti-HBeAg

și interacțiunea acestora cu nanoporul proteic a fost monitorizată prin intermediul modificărilor de amplitudine și durată a evenimentelor de blocare a curentului ionic mediat de nanopor (evenimente înregistrate inițial ca urmare a interacțiunii nanoporului fie cu HBeAg fie cu anti-HBeAg), în funcție de caracteristicile fizice distincte (volum, sarcină electrică, mobilitate) ale dimerilor HBeAg/anti-HBeAg. Analiza statistică a unor astfel de evenimente asociate cu interacțiunea dintre nanoporul proteic și complexe HBeAg/anti-HBeAg, a fost utilă în identificarea cantitativă a prezenței HBeAg din soluția electrolitică. **În concluzie, am intenționat să obținem un grad mare de sensibilitate și selectivitate a tehnicii de detecție propuse, demonstrând aplicabilitatea nanosenzorului proteic pentru probe reale și să punem astfel bazele dezvoltării unui biosenzor portabil utilizând nanopori proteici stabili.**

Proiectul a fost construit pe baza următoarelor obiective: (O₁) *Studiul la nivel de singură moleculă al interacțiunilor dintre HBeAg și anticorpul acestuia, anti-HBeAg, cu ajutorul nanoporului de α -HL;* (O₂) *Demonstrarea fezabilității discriminării în timp real a amprentei 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;* (O₃) *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.*

Rezultatul principal așteptat al acestui proiect a fost **obținerea unui nanosenzor funcțional la nivelul TRL3 (demonstrator experimental în laborator)**, capabil să detecteze un antigen relevant din punct de vedere clinic prin utilizarea tehnologiei de detectare stocastică a nanoporilor. Dincolo de demonstrarea funcționalității de bază a unui astfel de nano-biosenzor nou și așa cum este descris în cele ce urmează, acest proiect și-a propus să valorifice constatările noastre și să le aducă la nivelul următor (TRL3), **în care am încercat să demonstrăm și să validăm un dispozitiv portabil integrat care să permită detectarea HBeAg într-o varietate de probe biologice din lumea reală în cantități mici ($\sim 10^{-15}$ - 10^{-9} grame) și în dispozitive cu volume din domeniul picolitrilor.** De asemenea, o altă aplicație care rezultă din concluziile proiectului au vizat interacțiunile virusului SARS-CoV-2 și anticorpilor lor specifici (ex. anticorpul SARS-CoV-2 spike).

Proiectul a fost structurat în trei etape astfel încât să se poată atinge și îndeplini obiectivele enunțate mai sus.

În prima etapă (2 luni) ne-am propus următoarele activități care fac parte din O₁:

A 1.1 Selecția anticorpului, anti-HBeAg, pentru dezvoltarea imunosenzorului (partea I)

A 1.2 Optimizarea protocoalelor experimentale aplicate în implementarea tehnicilor de electrofiziologie moleculară utilizând nanoporul de α -HL, în vederea deslușirii mecanismului de capturare de către porul de α -HL a moleculelor HBeAg și anti-HbeAg (partea I)

În această primă etapă s-a studiat literatura relevantă în care a fost prezentată activitatea mai multor anticorpi și a început achiziționarea unuia dintre anticorpii disponibili comercial în vederea dezvoltării imunosenzorului. De asemenea, s-au ajustat parametrii experimentali pentru experimentele de electrofiziologie. S-au determinat condițiile optime de interacțiune ale porului proteic de α -HL cu bistratul lipidic astfel încât să se obțină un complex *por proteic – bistrat lipidic* stabil pentru studierea interacțiunii dintre acesta și moleculele de interes. Până la obținerea antigenului HbeAg, am studiat interacțiunea unui alt antigen – componenta proteică S₁ din SARS-CoV-2 – cu porul de α -HL, cu membrana lipidică reconstituită și interacțiunea acestuia cu anticorpul lui specific. Deși legarea SARS-CoV-2 de receptorii ACE2 este principala etapă care mediază infecția celulei gazdă cu acest virus, am observat și demonstrat proprietățile funcționale ale proteinei Spike S₁ care poate interacționa cu membranele lipidice neutre reconstituite și celule epiteliale pulmonare, fără a fi necesară prezența receptorilor, prin declanșarea formării căilor de permeație și trecerea ionilor prin acestea (Figura 1).

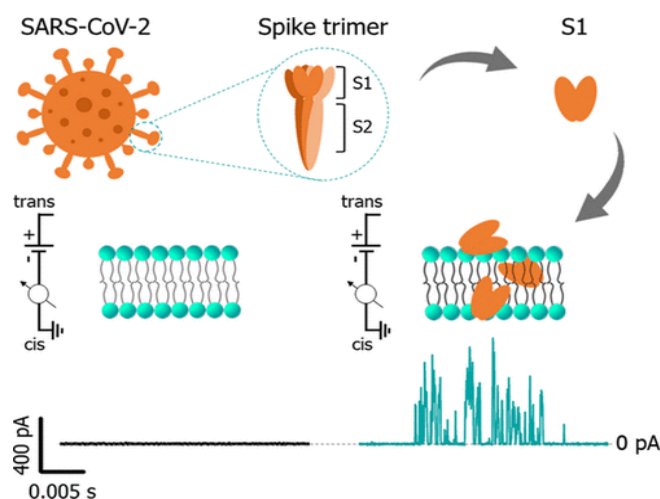


Figura 1. Reprezentarea schematică a interacțiunii componentei proteice S₁ din SARS-CoV-2 cu membrana lipidică. Aceasta se adsoarbe în membrană, fără a necesita prezența unui receptor specific, și formează căi de permeație pentru ioni. (Asandei, A.; *etal. ACS APPLIED MATERIALS & INTERFACES*, 2020, 12(50), 55649-55658).

Această observație a fost făcută în urma experimentelor în care am utilizat porul de α -HL inserat într-o membrană lipidică iar la adăugarea proteinei Spike S₁ solubilizată, aceasta a avut afinitate mai mare pentru bistratul lipidic decât pentru porul proteic (Figura 2).

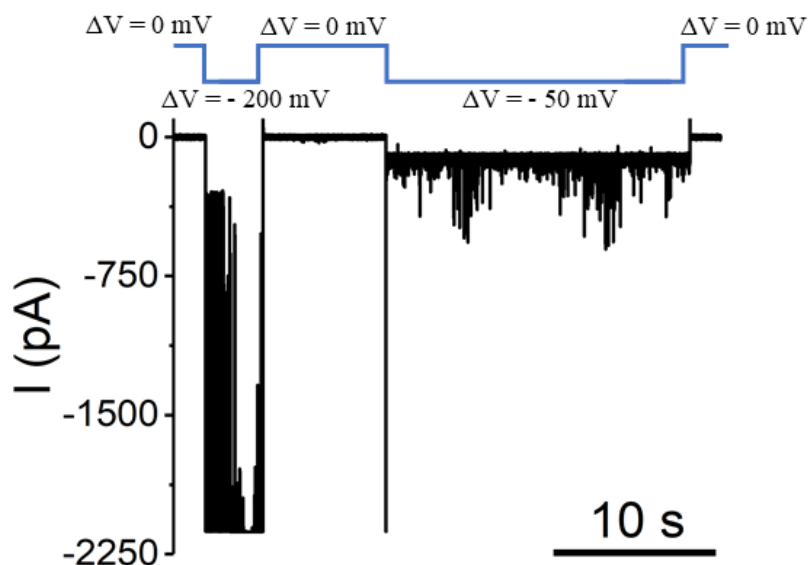


Figura 2. Destabilizarea mecanică indusă de subunitatea SARS CoV-2 S_1 (S_1) și permeabilizarea ulterioară a unei membrane fosfolipidice neutre care conține un singur nanopor α -HL. Înregistrare reprezentativă măsurată la $\Delta V = -200$ mV și $\Delta V = -50$ mV, arată modificările curentului ionic printr-o membrană lipidică care conține un singur nanopor α -HL, la adăugarea pe partea cis a subunității SARS CoV-2 S_1 (S_1) (80 nM). Picurile orientate în jos, văzute mai bine la $\Delta V = -50$ mV, reprezintă activitatea electrică suplimentară a subunității SARS CoV-2 S_1 suprapusă curentului ionic ce trece prin nanoporul deschis. (Asandei, A.; *etal.* ACS APPLIED MATERIALS & INTERFACES, 2020, 12(50), 55649-55658)

Spre deosebire de sistemul de membrană lipidică suprasimplificată folosit aici, celulele umane posedă o bogată diversitate compozițională și chimică a lipidelor membranare; totuși, în virtutea asimetriei lor și a capacității demonstrate de a modula funcția proteinelor, este posibil ca aceste membrane să reprezinte un model bun de studiu al proceselor de infecție virală *in vitro*. Semnificația fiziologică a descoperirilor noastre care dezvăluie comportamentul membranei lipidice în prezența subunităților libere SARS-CoV-2 spike S_1 este încă discutabilă pentru infecția cu SARS-CoV-2. Având în vedere existența unui situs de clivaj pentru furina între subunitățile S_1 și S_2 ale proteinei S a SARS-Cov-2, și disocierea subunității S_1 care pregătește spike-ul pentru infecție, observațiile noastre devin relevante pentru patogeniza observată în timpul dezvoltării Covid-19. Astfel, circulația liberă a subunității S_1 urmată de interacția cu diferite membrane celulare, la distanță mare de locul inițial al infecției ar putea explica o parte din consecințele patologice severe ale infecției cu SARS-CoV-2.

De asemenea, am arătat că anticorpilor monoclonali care se leagă de proteinele SARS-CoV-2 spike S_1 produc o diminuare a activității în membrană a antigenului, dezvăluind oportunități atât pentru detectarea proteinei SARS-CoV-2 spike S_1 , cât și noi perspective în potențialul terapeutic al infecției SARS-CoV-2 din fazele timpurii de atașare la celulele țintă (Figura 3).

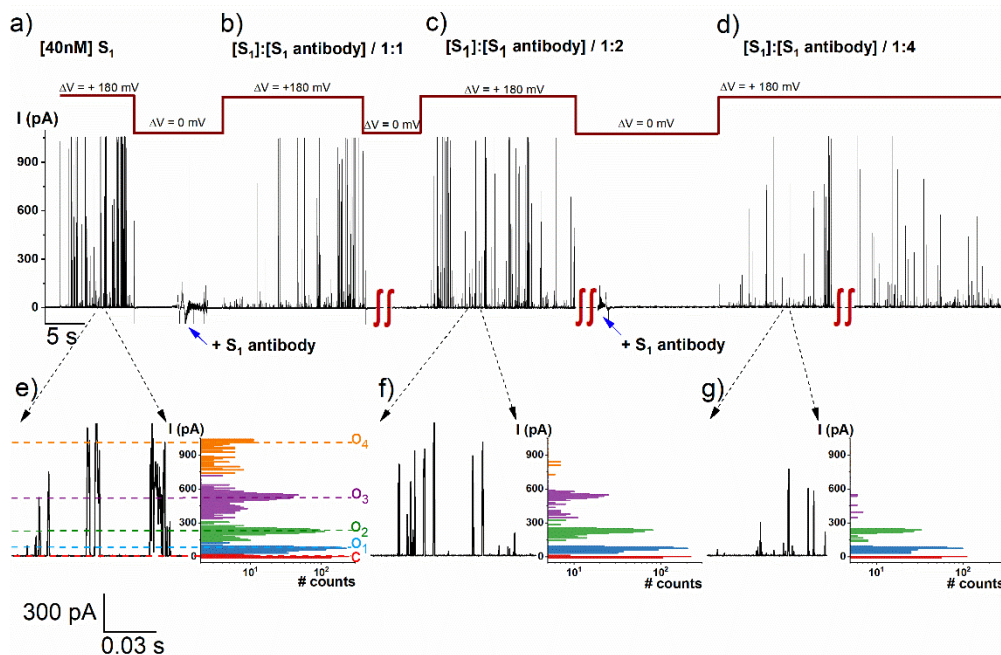


Figura 3. Activitatea în membrană a subunității SARS CoV-2 S₁ (S₁) este inhibată în urma interacțiunii cu un anticorp monoclonal (anticorp S₁). (a) Adăugarea subunității S₁ [40 nM] în compartimentul trans generează fluctuații ale curentului ionic de-a lungul unei membrane lipidice plane, la un potențial transmembranar aplicat de $\Delta V = +180$ mV. Într-o înregistrare din timpul aceluiași experiment, adăugarea ulterioară a anticorpului monoclonal al subunității SARS CoV-2 S₁ (anticorp S₁) în rapoarte molare de 1:1 (b), 1:2 (c) și respectiv 1:4 (d) tot de partea trans a membranei, diminuează activitatea membranară a subunității S₁. Pentru o mai bună reprezentare, astfel de transformări sunt vizibile și în histogramele de amplitudine afișate împreună cu înregistrările mărite selectate, în panourile de mai jos (e) (40 nM S₁), f (anticorp S₁ – S₁ / 1:2) și g (anticorp S₁ – S₁ / 1:4) (Asandei, A.; *etal.* ACS APPLIED MATERIALS & INTERFACES, 2020, 12(50), 55649-55658).

Având în vedere complexitatea ridicată a unei probe din viața reală și pentru un scop similar de detectare a proteinelor virale, paradigma de lucru explorată aici poate fi îmbunătățită prin utilizarea fie a porilor mutați fie a porilor solizi astfel încât să poată fi aplicată pe scară largă în procesul de izolare și identificare a câtor mai mulți antigeni.

Aceste experimente, au pregătit condițiile experimentale pentru realizarea etapei a doua și a treia a acestui proiect.

În etapa a doua (12 luni) și a treia (4 luni) s-a urmărit realizarea următoarelor activități care fac parte din O₁, O₂, O₃.

A 1.1 Selecția anticorpului, anti-HBeAg, pentru dezvoltarea imunosenzorului (partea a II-a).

A 1.2 Optimizarea protocoalelor experimentale aplicate în implementarea tehnicilor de electrofiziologie moleculară utilizând nanoporul de α -HL, în vederea deslușirii mecanismului de capturare de către porul de α -HL a moleculelor HBeAg și anti-HBeAg (partea a II-a).

A 1.3 Monitorizarea frecvenței și a duratei blocajelor de curent cauzate de interacțiunile moleculelor HBeAg și anti-HBeAg cu nanoporul de α -HL și determinarea constantelor de reacție ce descriu cinetica de interacțiune în condițiile variației controlate a parametrilor de pH, temperatură și tărie ionică.

A 1.4 Stabilirea condițiilor optime (pH, tărie ionică, diferență de potential aplicată) care să favorizeze interacțiunea complexului molecular HBeAg/anti-HBeAg cu nanoporul de α -HL, în vederea prelungirii timpului de rezidență al complexului molecular HBeAg/anti-HBeAg în interiorul nanoporului, și care să conducă la identificarea unui model distinctiv, specific interacțiunii complexului antigen-anticorp cu α -HL.

A 2.1 Producerea și purificarea de molecule HBeAg în celule HEK (celulele rinichiului embrionar uman).

A 2.2 Caracterizarea cinetică și termodinamică a interacțiunilor uni-moleculare dintre complexul HBeAg/anti-HBeAg și nanoporul α -HL.

A 2.3 Analiza cantitativă a procesului stocastic de detecție a HBeAg în prezența serului și a altor impurități proteice (i.e., un anticorp nespecific). Evaluarea selectivității nanosenzorului pentru HBeAg.

A 2.4 Trasarea curbei de titrare specifice prezenței moleculelor de HBeAg pentru determinarea concentrației de HBeAg în urma evaluării interacțiunilor dintre HBeAg/anti-HBeAg cu porul proteic de α -HL. Comparatie cu tehnicile macroscopice validate.

A 3.1 Îmbunătățirea pragului de sensibilitate a detecției moleculelor de HBeAg prin creșterea ratei de capturare a complexului HBeAg/anti-HBeAg de către nanoporul de α -HL, utilizând forțele electroosmotice și electroforetice.

A 3.2 Dezvoltarea de algoritmi pentru corelarea automată a caracteristicilor specifice interacțiunilor α -HL – HBeAg/anti-HBeAg cu valorile concentrațiilor de HBeAg.

A 3.3 Studiarea detecției HBeAg prin intermediul unui sistem bazat pe nanopori, portabil, cu raport zgomot/segnal redus și stabilitate ridicată. Comparatie critică cu alte tehnologii existente.

A 3.4 Analiza sensibilității și specificității senzorului nou dezvoltat.

A 3.5 Redactarea unui protocol detaliat și depunerea cererii de brevet pentru detecția HBeAg utilizând tehnologia bazată pe nanopori.

După achiziționarea unuia dintre anticorpii disponibili comercial (Native Antigen Company, UK), s-a determinat capacitatea de legare atât a HBeAg pur, obținut din surse comerciale (ORIGENE, #BIN049), 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.

După obținerea antigenului HBeAg am început studiul la nivel de singură moleculă al interacțiunilor dintre HBeAg și anticorpul acestuia, anti-HBeAg, cu ajutorul nanoporului de α -HL. În vederea distingării ampretei specifice a moleculelor de Ab(HBe) și a complexului antigen-anticorp HBeAg – Ab(HBe), 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 HBeAg și 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 Ab(HBe), anticorpul moleculei HBeAg, și descrierea amprentei specifice dată de către interacțiunea acestora cu nanoporul proteic de α -HL.

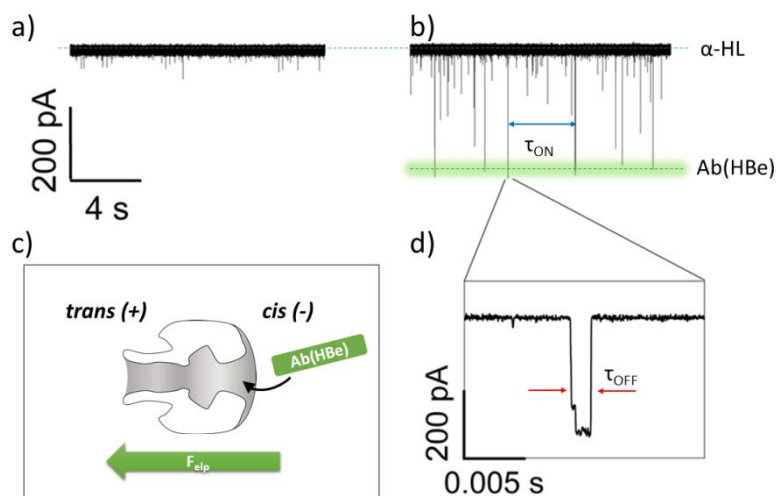


Figura 4 Amprenta specifică a interacțiunii a 65 nM Ab(HBe) adăugate în partea *cis* cu nanoporul de α -HL: a) curentul ionic înregistrat prin porul liber, b) fluctuațiile de curent ionic induse de interacțiunea moleculelor de Ab(HBe) cu nanoporul proteic, c) reprezentare schematică a modului de interacțiune Ab(HBe) - α -HL și d) semnalul specific dat de această interacțiune. Toate înregistrările reprezentate au fost efectuate la un potențial transmembrantar de 200 mV.

Experimentele au fost realizate în condiții de pH ușor bazic ($\text{pH} = 8$), într-o soluție de 2 M KCl, cu un buffer de 10 mM HEPES. Bistratul lipidic 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 monomerică de proteină în partea *cis* a bistratului lipidic.

În momentul inserării nanoporului în membrana lipidică și aplicarea unei diferențe de potențial se observă apariția unui curent ionic, relativ constant (Figura 4, 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 4, panel c), se pot observa fluctuații în curentul ionic înregistrat (Figura 4, panel b). Aceste fluctuații de curent ionic sunt o consecință directă a interacțiunii moleculelor de Ab(HBe) cu nanoporul proteic. 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 4: 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 5, panelurile a-d).

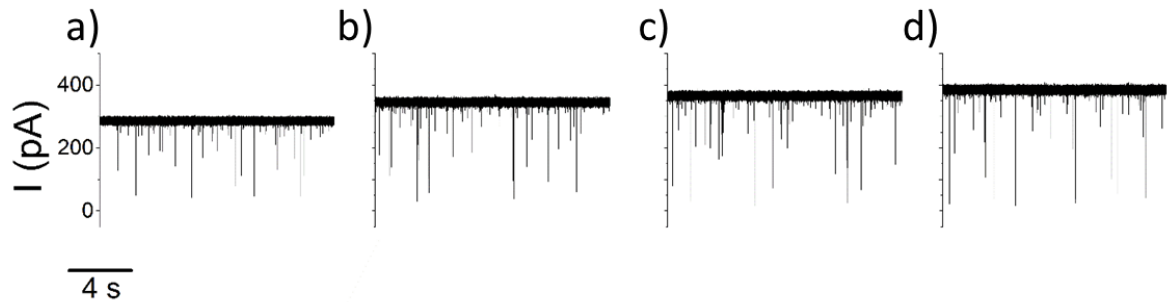


Figura 5 Înregistrări ale fluctuațiilor de curent ionic induse de adăugarea în partea *cis* a 65 nM Ab(HBe), la diferite potențiale transmembranare: a) 150 mV, b) 180 mV, c) 190 mV and d) 200 mV.

Analiza statistică a timpilor medii dintre evenimentele de capturare a moleculelor de Ab(HBe) de către nanoporul proteic (τ_{ON} , Figura 6, panel a), cât și a timpilor medii de rezidență

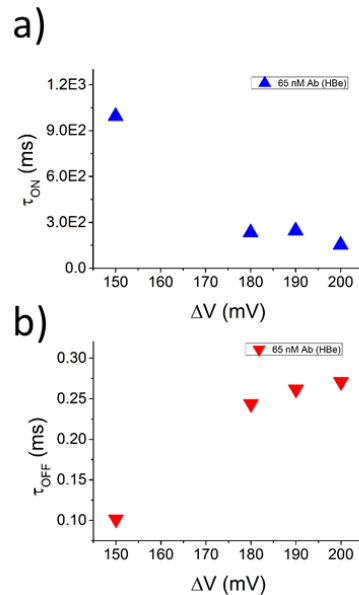


Figura 6 Analiza cantitativă a fluctuațiilor de curent ionic generate de 65 nM Ab(HBe) cu diferența de potențial aplicată: a) τ_{ON} – timpul mediu dintre evenimente succesive (reprezentate cu triunghiuri albastre orientate în sus) și b) τ_{OFF} – timpul de rezidență al moleculelor în interiorul nanoporului.

a moleculelor de Ab(HBe) în interiorul acestuia (τ_{OFF} Figura 6, panel b) reflectă cinetica de interacțiune specifică pentru anticorp.

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

Scopul principal al acestui proiect a fost detecția prezenței antigenului HBeAg cu ajutorul unui nanopor proteic de α -HL, de aceea, pentru optimizarea condițiilor de detecție am continuat seria experimentelor folosind mai întâi antigen HBeAg comercial. Pe scurt, s-a obținut membrana lipidică, s-a adăugat în compartimentul cis proteina în formă monomerică de α -HL și după inserarea unui por heptameric stabil în bistratul lipidic s-a adăugat antigenul HBeAg în concentrație de 75 nM (Figura 7).

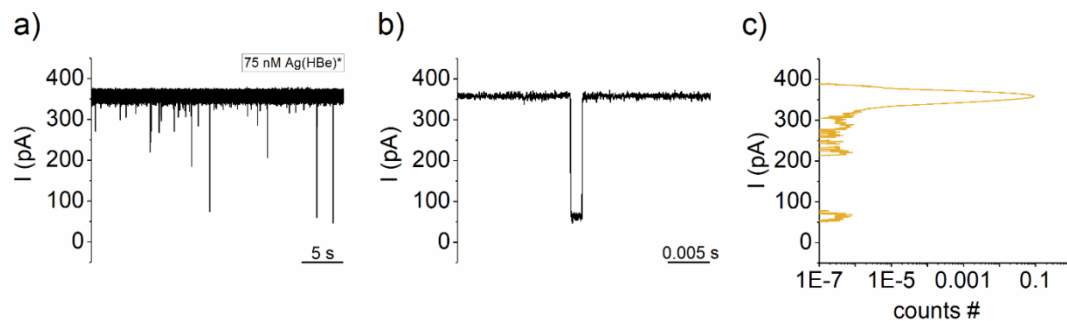


Figura 7 Înregistrări ale fluctuațiilor de curent ionic induse de adăugarea în partea *cis* a 75 nM HBeAg, a) la un potențial transmembranare: de 180 mV, b) semnalul specific dat de interacțiunea dintre porul proteic și moleculele de antigen, c) Histograma de amplitudine ce corespunde ampretei specifice antigenului HBeAg.

Rezultatele analizei timpilor de rezidență și a timpilor dintre două evenimente succesive, parametri ce descriu cinetica de interacțiune specifică dintre por și moleculele de antigen, arată că timpul mediu dintre două evenimente succesive scade cu creșterea potențialului aplicat (crește rata de asociere) iar timpul mediu de rezidență crește cu diferența de potențial ceea ce sugerează că moleculele de antigen au volumul prea mare pentru a depăși zona de constricție a porului și a suferi procesul de translocare (scade rata de disociere o dată cu potențialul) (Figura 8).

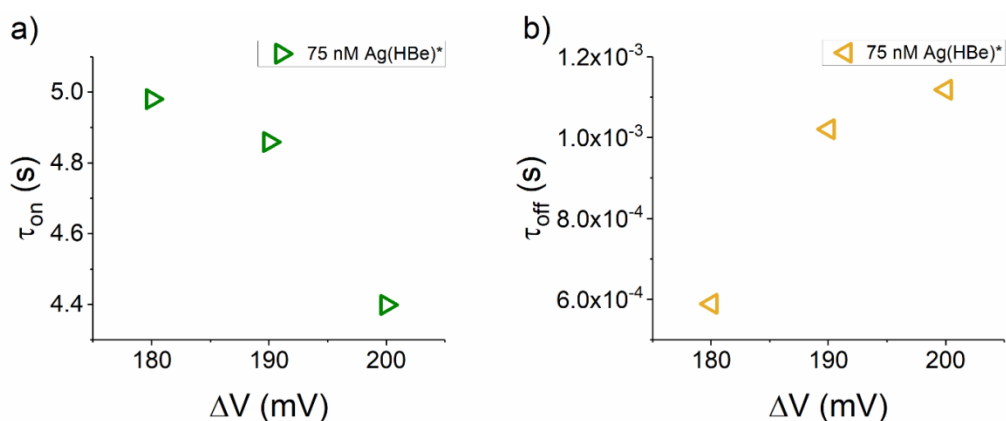


Figura 8 Analiza cantitativă a fluctuațiilor de curent ionic generate de 75 nM HBeAg (comercial) la interacțiunea cu porul de α -HL în funcție de diferența de potențial aplicată: a) τ_{ON} – timpul mediu dintre evenimente succesive (triunghiuri verzi orietate spre dreapta) și b) τ_{OFF} – timpul de rezidență al moleculelor în interiorul nanoporului (triunghiuri portocalii orietate spre stânga).

După discriminarea ampretei specifice a anticorpului, s-a trecut la testarea condițiilor experimentale optime pentru obținerea detecției eficiente a antigenului, HBeAg. Astfel, s-au testat mai multe modalități de formare a complexului molecular anticorp-antigen (HBe(Ab) cu HBeAg (comercial)), 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 9, panelurile a și b, precum și înregistrări corespunzătoare ale unui alt parametru modificat, și anume, raportul molar dintre cele două componente ale complexului (panel c).

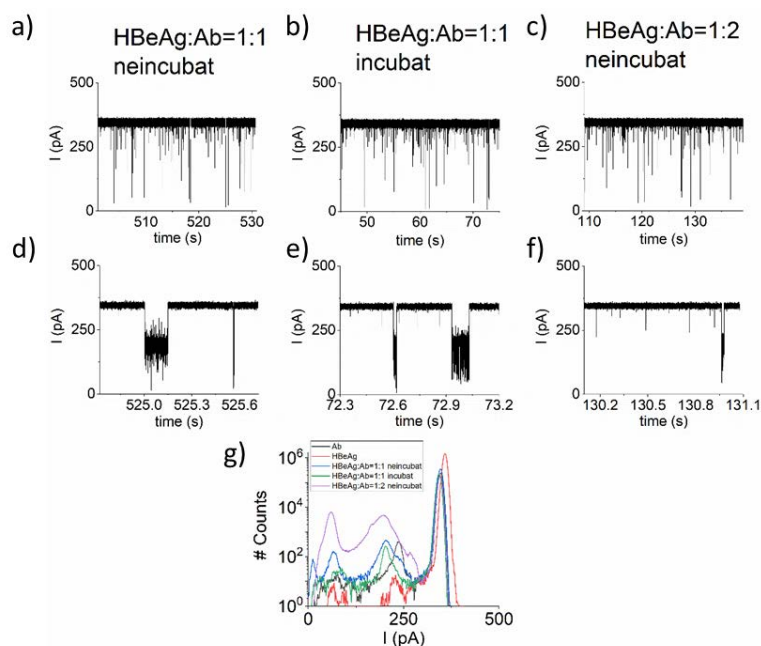


Figura 9 Fluctuațiile de curent ionic și evenimentele specifice înregistrate pentru: HBeAg:Ab(HBe) neincubat, în raport molar de 1:1 (panel a și d); HBeAg:Ab(HBe) incubat, în raport molar de 1:1 (panel b și e) și HBeAg:Ab(HBe) neincubat, în raport molar de 1:2 (panel c și f). Histogramele de amplitudine ce corespund fiecărui 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).

Apoi, 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 arată același semnal specific complexului care este total diferit de cel obținut când cele două componente ale complexului au fost adăugate și analizate separat.

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 10, panelurile a-d).

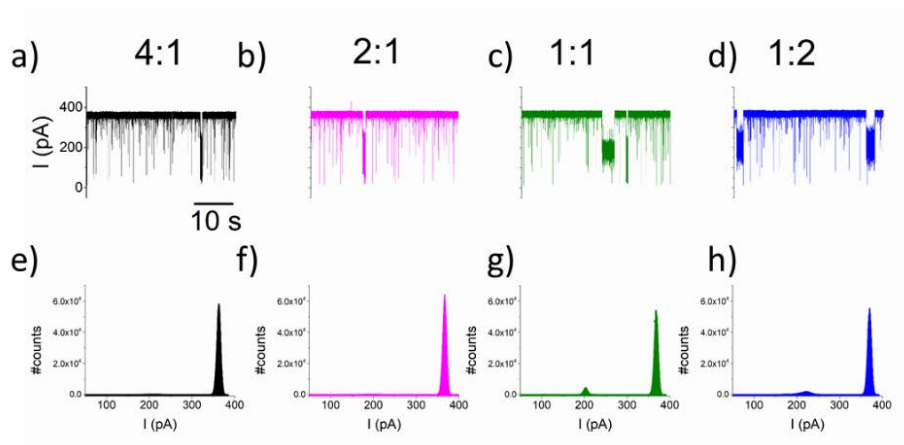


Figura 10 Fluctuațiile de curent ionic și histogramele de amplitudine specifice amestecului moleculelor Ab(HBe):HBeAg neincubat în raport de concentrație molară de: 4:1 (panel a și e), 2:1 (panel b și f), 1:1 (panel c și g), 1:2 (panel d și h). Toate înregistrările și histogramele reprezentate au fost efectuate la un potențial transmembrantar de 190 mV.

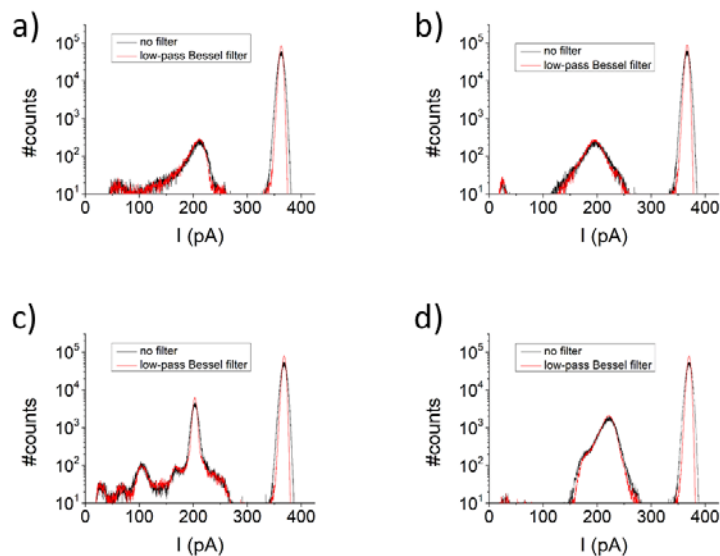


Figura 11 Histogramele de amplitudine specifice amestecului molecular neincubat Ab(HBe):HBeAg, fără filtru (negru) și după aplicarea unui filtru low-pass de tip Bessel de 7000 Hz (roșu) pentru diferite raporturi molare: 4:1 (panel a), 2:1 (panel b), 1:1 (panel c) și 1:2 (panel d). Toate histogramele reprezentate au fost efectuate pentru înregistrările la o diferență de potențial de 190 mV și reprezentate în scală logaritmică.

Conform histogramele 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 ionic) 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 urmărite în semnal (Figura 11).

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 nanoplatformei 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) (Figura 12).

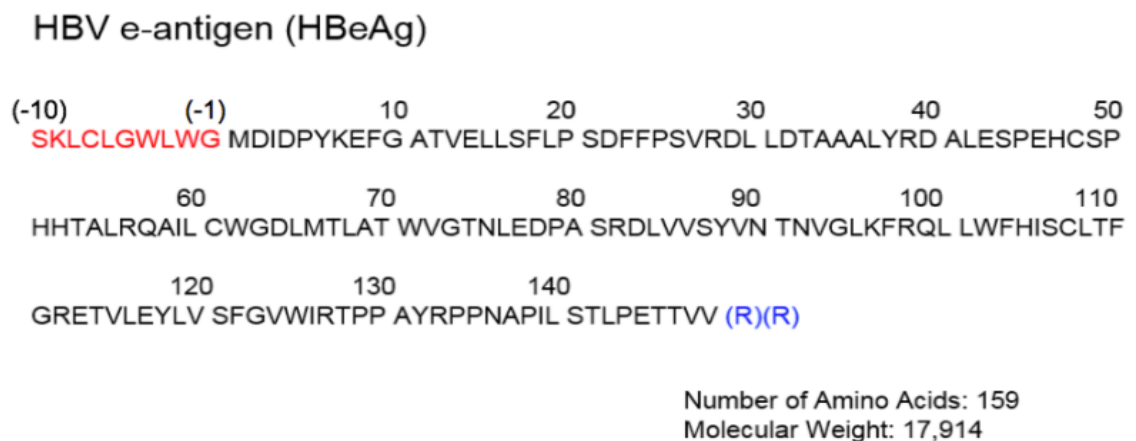


Figura 12 Secvența HBeAg.

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 13) și confirmată prin secvențierea ADN a plasmidelor codificatoare.

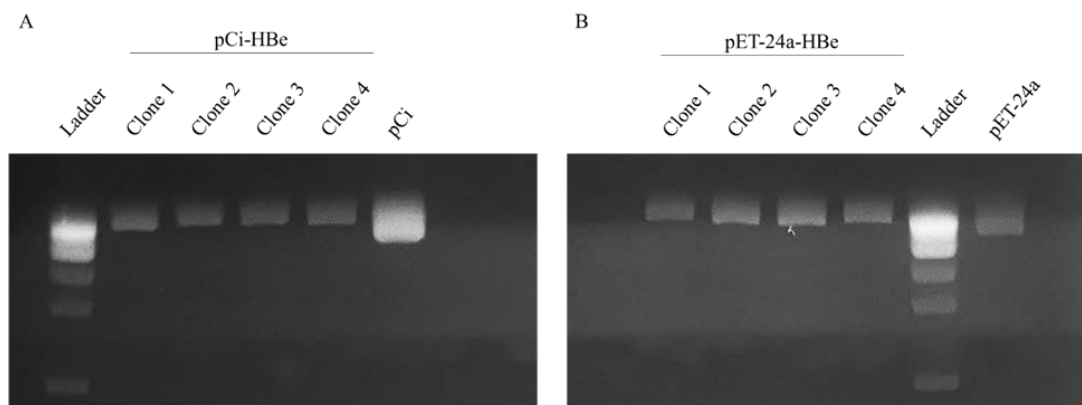


Figura 13 Screening inserție secvența HBeAg în plasmide pentru expresie în celule mamaliene (pCi) (panel A) și bacterii (pET-24a) (panel B).

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 14).

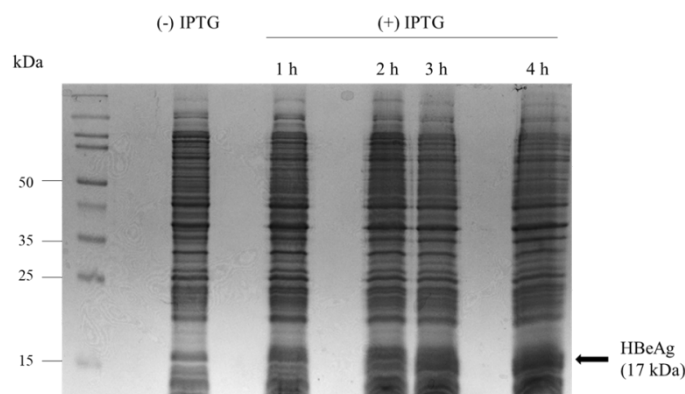


Figura 14 Verificarea expresiei de HBeAg în sistem de expresie procariot, în absența agentului inductor (-IPTG) și la 1, 2, 3, și 4 h post-inducție, (+) IPTG), prin Comassie Blue Staining.

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 μM), 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 15).

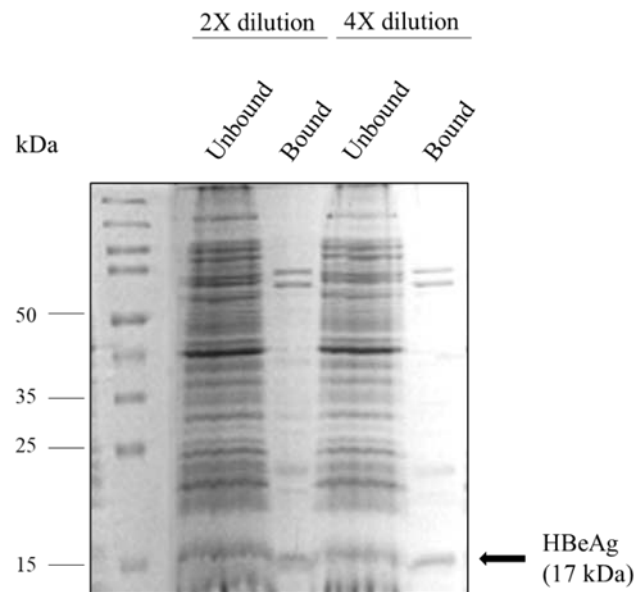


Figura 15 Verificare purificare HBeAg prin cromatografie de afinitate folosind rășină de Ni-NTA Sepharose. Probele au fost diluate de 2X și 4X pentru a verifica capacitatea de legare a rășinei pentru proteină.

Pentru a stabili fără 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%. S-a realizat o a doua etapă de purificare prin cromatografie de excludere moleculară, pentru a ajunge la un nivel de puritate potrivit pentru optimizarea senzorului proteic. **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.**

Producerea HBeAg a fost, de asemenea, testată în celule mamaliene (HEK). În ciuda încercărilor de optimizare, nivelul de producție a proteinei virale a rămas foarte redus, concluzionându-se că purificarea antigenului viral în acest sistem nu este fezabilă.

Din acest motiv și bazat pe rezultatele foarte bune ale expresiei în sistem procariot, coroborate cu datele experimentale care confirmă că HBeAg obținut în acest sistem este perfect funcțional, în ultima etapă a proiectului ne-am concentrat pe optimizarea metodei de purificare.

După trecerea HBeAg pe o rășină Ni-NTA Sepharose în sistem „batch”, proteina eluată cu imidazol (*vide supra*) a fost supusă unei etape suplimentare de purificare, prin cromatografie de excludere moleculară pe coloana HiLoad Superdex 16/200. Așa cum se observă în profilul cromatografic din figura 16, după testarea fracțiilor prin ELISA pentru cuantificarea HBeAg, cea mai mare parte a proteinei precipită în coloană, fiind eluată la volume foarte mari de eluție, în ciuda dimensiunii mici. **Astfel, această metodă nu este potrivită pentru purificarea HBeAg.**

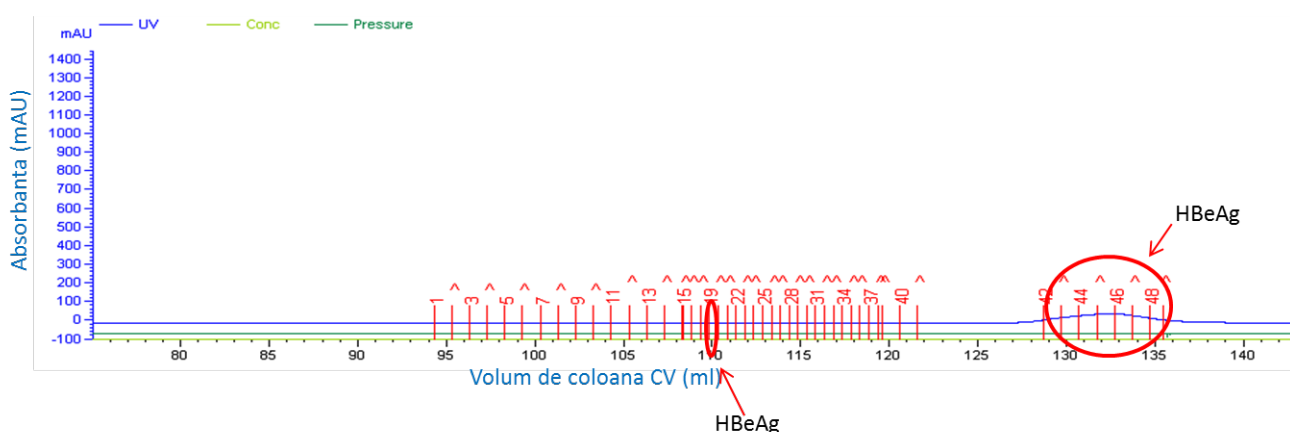


Figura 16 Profilul cromatografic de excludere moleculară pe coloana HiLoad Superdex 16/200. Proteina precipită în coloană, fiind eluată la volume foarte mari de eluție.

Pentru a îmbunătăți puritatea antigenului, s-a optat pentru repetarea cromatografiei de afinitate, dar pe coloana HisTrap Hp1 ml, care poate fi cuplată la un sistem FPLC, astfel presiunea și fluxul probei în timpul procedurii pot fi controlate automat. Eluția antigenului de pe coloană s-a realizat cu o soluție 20 mM Imidazole, 500 mM NaCl, 20 mM Tris HCl, pH 7, ca și în cazul procedurii în „batch”.

Purificarea HBeAg folosind acest sistem s-a dovedit eficientă, rezultând 4 fracții pozitive pentru antigen (Figura 17), care au fost concentrate pe Amicon 10 KDa și reluate în PBS. Cuantificarea antigenului s-a realizat prin ELISA, folosind o curbă standard de antigen pur comercial. Puritatea a fost estimată la ~85% și o producție de ~1,2 mg proteina/ ml cultură bacteriană. Antigenul a fost transferat UAIC pentru analize.

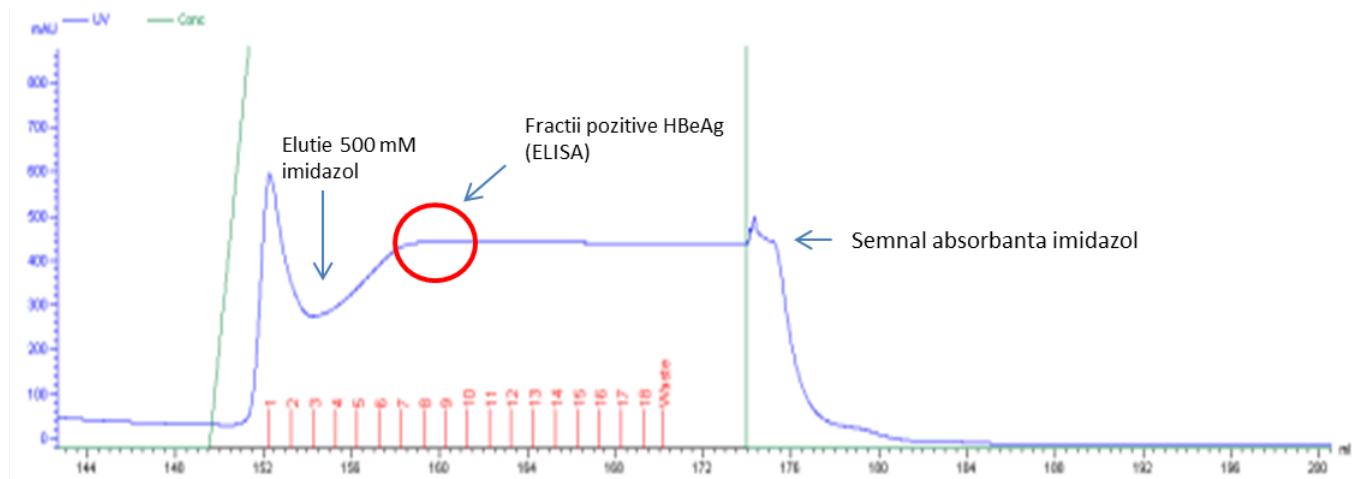


Figura 17 Profilul cromatografic de afinitate, pe coloana HisTrap Hp1 ml cuplată la un sistem FPLC. Au rezultat 4 fracții pozitive pentru antigen care au fost concentrate pe Amicon 10 Kda.

Obținerea 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, în cantități nelimitate, la costuri reduse, astfel, scopul obținerii unui antigen HBe funcțional pentru teste de optimizare a nanoporului fiind îndeplinit.

Cu antigenul astfel obținut am repetat experimentele prezentate mai sus, singura diferență fiind că antigenul utilizat a provenit din experimentele desfășurate în cadrul proiectului

Pe scurt am realizat o curbă doză – răspuns pentru antigen și am observat că o dată cu creșterea concentrației de antigen, timpul de asociere a antigenului cu porul de α -HL scade iar timpul de rezidență în por rămâne constant (Figura 18 și Figura 19)

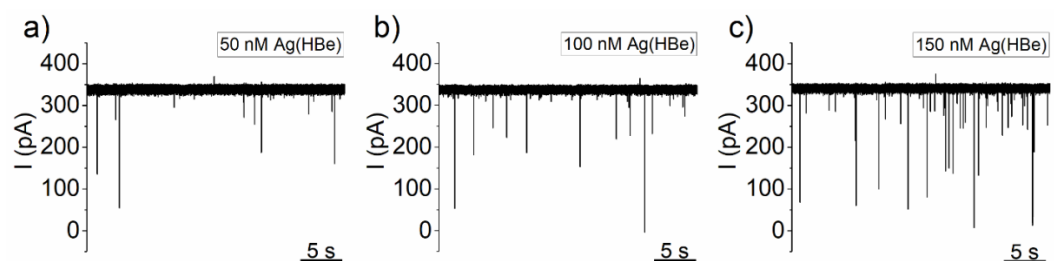


Figura 18 Înregistrări ale fluctuațiilor de curent ionic induse de interacțiunea HBeAg cu porul proteic care a fost adăugat în partea *cis* a porului în concentrație de: a) 50 nM HBeAg, b) 100 nM HBeAg și c) 150 nM HBeAg la un potențial transmembrantar de 180 mV.

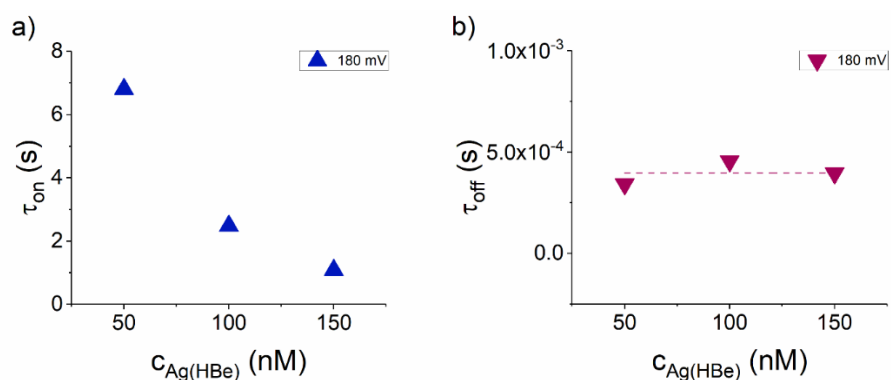


Figura 19 Analiza cantitativă a fluctuațiilor de curent ionic generate la diferite concentrații de HBeAg (purificat) la o diferență de potențial aplicată de 180 mV: a) τ_{ON} – timpul mediu dintre evenimente succesive (triunghiuri albastre orietate în sus) și b) τ_{OFF} – timpul de rezidență al moleculelor în interiorul nanoporului (triunghiuri mov orietate în jos).

O observație importantă în urma acestor experimente a fost că amprenta specifică antigenului fie că a fost din surse comerciale (ORIGENE, #BIN049) fie că a fost purificat prin metoda descrisă mai sus (procedeu inovativ propus și utilizat pentru prima dată în acest proiect) este aceeași. Mai mult, valorile obținute pentru o singură concentrație în cazul antigenului achiziționat de la (ORIGENE, #BIN049) s-au încadrat între valorile obținute în cazul antigenului purificat prin metoda propusă în acest proiect (Figura 20).

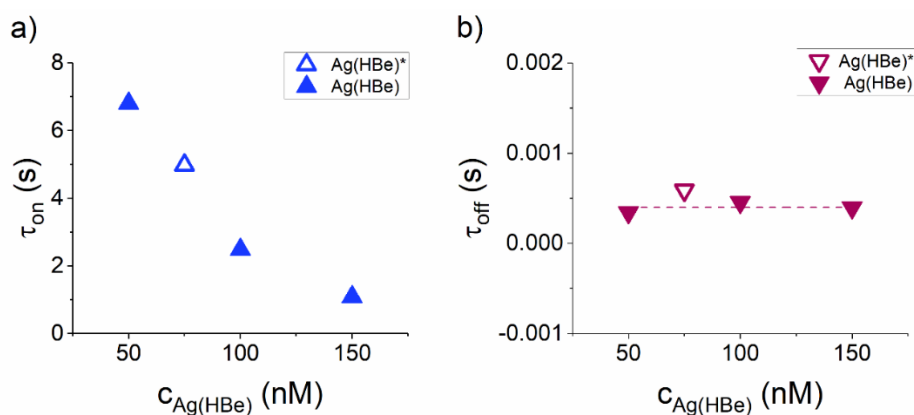


Figura 20. Analiza cantitativă a fluctuațiilor de curent ionic generate pentru realizarea curbei doză – răspuns obținută pentru antigenul purificat în care s-au inserat valorile obținute pentru antigenul comercial (triunghiul gol) la o diferență de potențial aplicată de 180 mV: a) τ_{ON} – timpul mediu dintre evenimente succesive (triunghiuri albastre orietate în sus) și b) τ_{OFF} – timpul de rezidență al moleculelor în interiorul nanoporului (triunghiuri mov orietate în jos).

Am continuat experimentele pentru a vedea dacă are loc interacțiunea dintre antigen și anticorpul specific. Rezultatele au confirmat prezența antigenului prin formarea complexului antigen – anticorp cu aceeași amprentă pe care am obținut-o când am utilizat antigen comercial. Experimentele au fost realizate în aceleași condiții, care au fost enunțate mai sus, iar rezultatele obținute sunt reprezentate în Figurile 21 și 22.

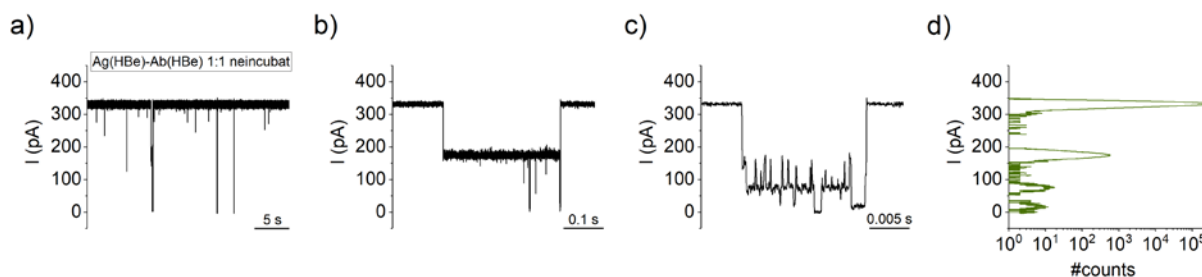


Figura 21 Fluctuațiile de curent ionic (a), amprenta specifică pentru complex (b, c) și histograma de amplitudine specifică amestecului moleculelor Ag(HBe)-Ab(HBe) neincubat în raport de concentrație molară de: 1:1. Înregistrările și histograma reprezentate au fost efectuate la un potențial transmembranar de 180 mV, analiții fiind adăugați în partea cis a membranei.

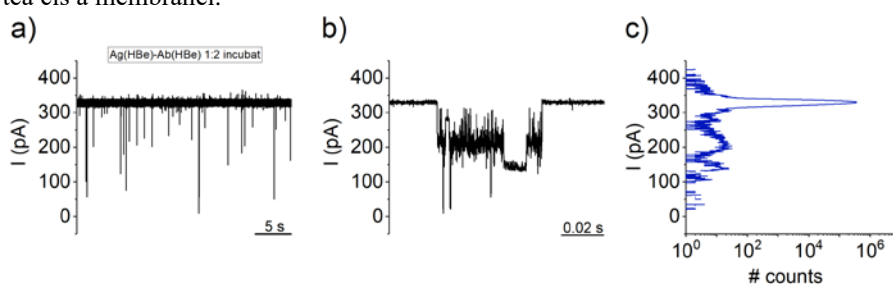


Figura 22 Fluctuațiile de curent ionic (a), amprenta specifică pentru complex (b, c) și histograma de amplitudine specifică amestecului moleculelor Ag(HBe)-Ab(HBe) incubat în raport de concentrație molară de: 1:2. Înregistrările și histograma reprezentate au fost efectuate la un potențial transmembranar de 180 mV.

Ceea ce ne-am propus a fost să reușim să detectăm antigenul HBe, produs în urma infecției cu VHB din probele biologice. Un prim rezultat l-am obținut folosind mediul de cultură provenit de la celule infectate cu VHB în laborator. Acesta este mediu DMEM (Thermo Fischer Scientific) suplimentat cu amino acizi esențiali (1%) și ser fetal bovin (10%). Mediul mai conține și alte peptide sau fragmente proteice secretate de celule, pe lângă antigenul HBe și proteinele de anvelopă virale secretate în urma infecției fiziologice (Figura 23).

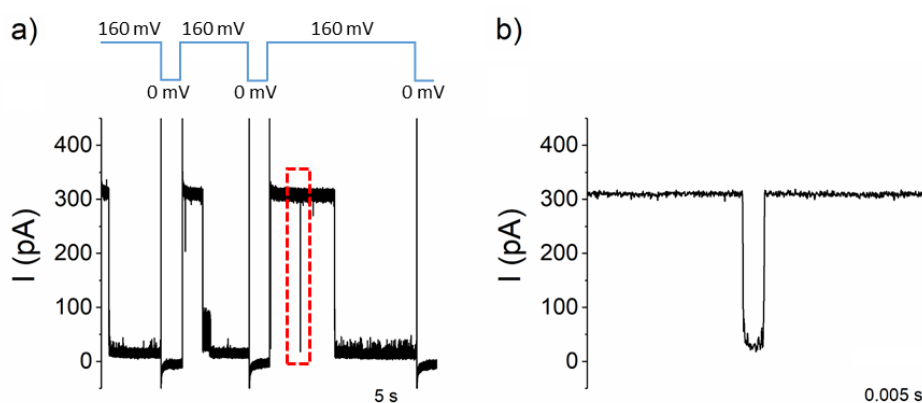


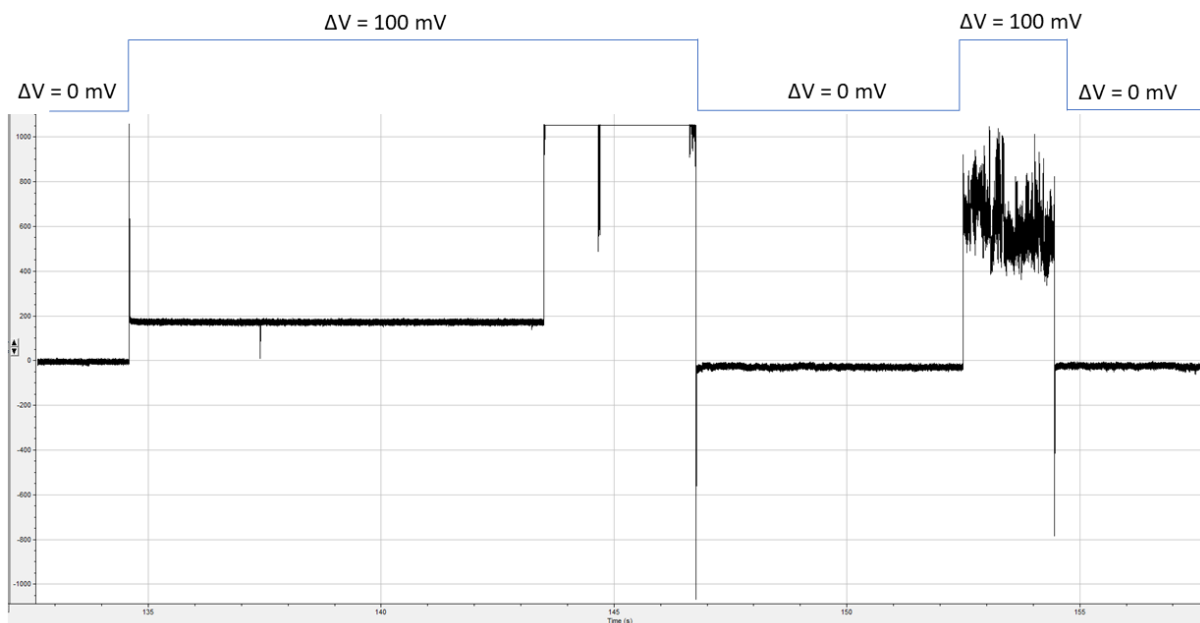
Figura 23. Înregistrarea fluctuațiilor de curent care apar în prezența mediului de cultură provenit de la celulele infectate cu HBV. Din cauza prezenței diferitelor peptide și fragmente proteice, porul se blochează, îngreunând foarte mult procesul de detecție.

În urma acestor observații ne propunem să folosim probe biologice care în prealabil să fie centrifugate, astfel încât fragmentele care nu prezintă interes să fie eliminate.

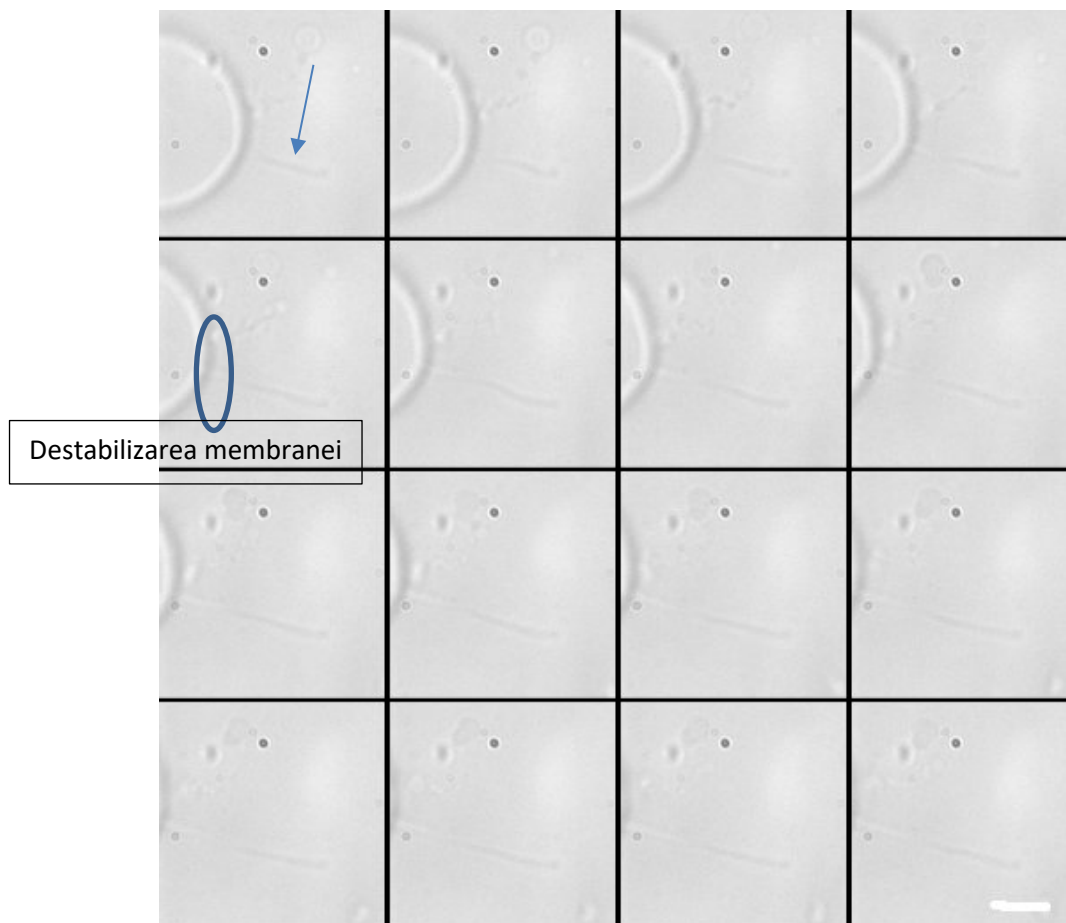
Deși sunt necesare optimizări suplimentare pentru a crește debitul, specificitatea recunoașterii moleculare într-un mediu biologic complex și sensibilitatea sistemului de nanopori pentru a-l apropia de un dispozitiv accesibil, robust, sofisticat, fără instrumente, care să permită screening-ul serologic precis, considerăm că principiul funcționării unui astfel de sistem în laborator (TLR3) a fost demonstrat.

Alte rezultate obținute în cadrul acestui proiect, care au derivat din experimentele realizate, deși nu fac parte din obiectivele propuse sunt cele care au vizat interacțiunea unui virus inactivat cu porul proteic. Din aceste experimente avem două observații foarte importante.

1. Nu am observat interacțiunea VHB cu porul, în schimb la scurt timp după adăugarea acestuia în sistemul experimental, prezența virusului duce la destabilizarea membranei



2. Prin microscopie optică se observă că VHB afectează curbura membranei și induce formațiuni membranare fluide, rezultând invaginarea tubulară care este compusă din lipide DOPC, experiment ce confirmă rezultatele obținute prin electrofiziologie.



Menționăm că aceste rezultate au fost amintite în acest raport pentru importanța lor în înțelegerea modului în care virusul hepatitei B acționează asupra celulelor.

DISEMINAREA REZULTATELOR

Articole:

1. *Non-Receptor-Mediated Lipid Membrane Permeabilization by the SARS-CoV-2 Spike Protein S1 Subunit*, Asandei, A.; Mereuta, L.; Schiopu, I.; Park, J.; Seo, C-H.; Park, Y.; Luchian, T., **ACS APPLIED MATERIALS & INTERFACES**, 2020, 12(50), 55649-55658.
2. *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
3. *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
4. *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**.

5. *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**.
6. *A single-molecule insight into the ionic strength dependent, cationic peptide nucleic acids – oligonucleotides interactions*, Asandei Alina, Loredana Mereuta, Bucataru Ioana C. Park Yoonkyung, Luchian Tudor, **Chemistry: An Asian Journal 2022, Acceptat, DOI 10.1002/asia.202200261**
7. *A programmable nanopore sensor for multiplexed detection of short polynucleotides based on length-variable, poly-arginine-conjugated peptide nucleic acids*, Loredana Mereuta, Asandei Alina, Dragomir Isabela, Park Jonggwan, Park Yoonkyung, Luchian Tudor, **Analytical Chemistry – În Evaluare**

Depunere cerere brevet

Cerere nr A/00172 din data 4.04.2022

Director de proiect,

Prof. Univ. Dr. Tudor LUCHIAN

Responsabil partener

Dr. Norica Nichita

Data: 21.04.2022

Notă:

Pe lângă cele menționate mai sus, raportul final trebuie să conțină și o prezentare succintă (2-3 paragrafe) a rezultatelor obținute în cadrul proiectului, rezultate ce urmează a fi diseminate de Autoritatea Contractantă în materiale de promovare a rezultatelor obținute în cadrul programelor de finanțare. Menționăm că acest text trebuie să fie pe înțelesul publicului.

Prezentarea trebuie să fie însoțită de 2-4 poze reprezentative pentru proiect (format JPG).

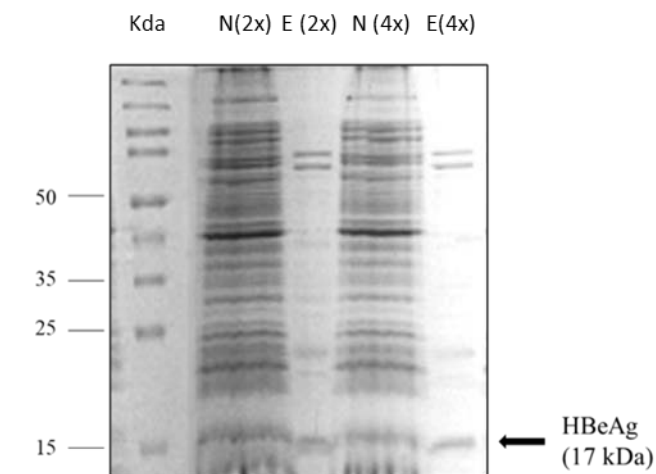
Acestea trebuie să se regăsească și pe pagina web a proiectului.

Virusul Hepatic B (VHB) rămâne o problemă majoră de sănătate publică, cauzând moartea a peste 800.000 de pacienți în fiecare an, la nivel global. Se estimează că aproximativ 3,5% din populația lumii este infectată cronic cu VHB, peste 40% dezvoltând boli hepatice severe, precum ciroza hepatică și cancer hepatocelular. Eradicarea hepatitei virale sau cel puțin limitarea drastică a acestor infecții presupune creșterea semnificativă a capacității de diagnostic (majoritatea acestor infecții rămân azi nedepistate), îmbunătățirea accesului la tratament și mărită acoperirea vaccinală, în special în zonele endemice. Găsirea unor metode de detecție sensibile, reproductibile, ușor de manipulat fără să necesite personal medical de înaltă calificare, aplicabile la scară largă ar avea ca rezultat creșterea numărului de pacienți diagnosticați.

În acest context, **ne-am propus** să dezvoltăm un nanosenzor proteic portabil util pentru detecția sensibilă și selectivă a HBeAg prin intermediul interacțiunilor selective dintre antigenii HBV și anticorpi anti-HBe.

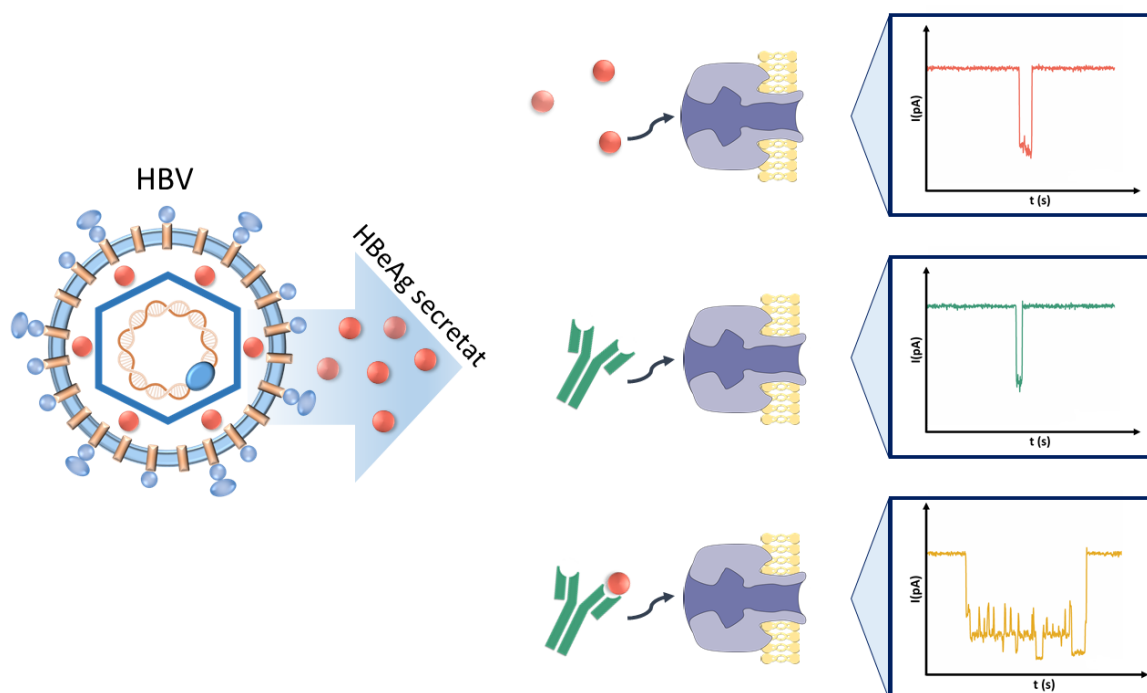
Pentru aceasta am utilizat atât HBeAg pur (comercial) cât și cel rezultat din infecția cu VHB

Purificarea HBeAg prin cromatografie de afinitate pe Ni-NTA Sepharose



N, proba nelegata ; E, proba eluata; X, factor dilutie

Abordarea experimentală are la bază analiza interacțiunilor dintre nanoporul proteic și complexul format dintre antigenul HBeAg și anticorpul specific anti-HBeAg care pot fi cuantificate prin intermediul evenimentelor distincte de blocare a curentului ionic mediat de nanopor în condițiile aplicării unui câmp electric transmembrantar optim (monitorizarea modificărilor de amplitudine și durată a evenimentelor de blocare a curentului ionic mediat de nanopor).



În cadrul acestui proiect, am reușit **producerea cu succes a HBeAg în sistem procariot, ca proteină solubilă, funcțională, aceasta fiind un rezultat în premieră care deschide calea pentru stabilirea unei platforme rentabile de producție a acestui antigen la costuri reduse.**

După obținerea antigenului HBeAg (*in house*) s-a studiat la nivel de singură moleculă interacțiunile dintre HBeAg și anticorpul acestuia, anti-HBeAg, cu ajutorul nanoporului de α -HL. În vederea distingerii amprentei specifice a moleculelor de HBeAg, Ab(HBe) și a complexului antigen-anticorp HBeAg – Ab(HBe), pentru dezvoltarea platformei portabile și stabile s-a elaborat un protocol experimental bazat pe următoarele raționamente de bază: (i) analiza și înțelegerea mecanismului molecular de capturare a moleculelor de HBeAg și 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 urma experimentelor realizate, **deși sunt necesare optimizări suplimentare pentru a crește debitul, specificitatea recunoașterii moleculare într-un mediu biologic complex și sensibilitatea sistemului de nanopori pentru a-l apropia de un dispozitiv accesibil, robust, sofisticat, fără instrumente, care să permită screening-ul serologic precis, considerăm că principiul funcționării unui astfel de sistem în laborator (TLR3) a fost demonstrat.**