

## **Raport științific etapa 1 – mai-decembrie 2020**

Virusul Hepatitelor C (VHC) și B (VHB) constituie o problemă de sănătate globală, deoarece sunt peste 330 de milioane de persoane infectate în lumea întreagă. La nivel global, cca. 15 milioane de pacienți infectați cu VHB sunt co-infectați cu virusul hepatic D (VHD), un viroid care necesită virusul hepatic B pentru producția particulelor infecțioase. Coinfecția VHB/VHD induce cea mai gravă formă de hepatită din cauza replicării accelerate a VHD. Testele de tip EIA (test imunoenzimatic) reprezintă standardul în screeningul pentru detecția anticorpilor anti-VHC a antigenului HBSAg. Un rezultat pozitiv conduce la determinarea concentrației de copii genomice ale VHC/B în ser care confirmă infecția activă. Testele EIA necesită dotări speciale ale laboratorului de analize, colectarea organizată a probelor și calificarea personalului din laborator. În țări cu venit scăzut unde există regiuni fără laboratoare medicale sau personal calificat, o alternativă la testele EIA o reprezintă testele cu detecție rapidă (RDT) (Drain et al., 2014). Majoritatea testelor RDT se bazează pe principiul imunocromatografiei și tehnologiei Lateral Flow Assay (LFA) - testul de curgere laterală, deoarece proba avansează prin curgere capilară. Parametrii testelor actuale sunt satisfăcători în condiții de monoinfecție cu VHC sau VHB (Mane et al., 2019). Dacă în cazul VHB există teste rapide eficiente pentru detecția antigenului viral de anvelopă S (AgHBs), în cazul VHD nu există teste rapide validate pentru detecția anticorpilor anti-VHD. La nivel național se estimează că sunt mai mult de 1 milion de persoane infectate cu VHB, peste 400.000 persoane infectate cu VHC și peste 100.000 persoane infectate VHB/VHD (Predescu et al, 2017, Popescu et al., 2013). Identificarea acestora prin screening cu teste rapide ar putea permite accesul timpuriu la tratament în cazul VHC și VHB. Semnalarea unei posibile coinfecții VHB/VHD ar direcționa gestionarea rapidă a pacienților având în vedere gravitatea prognosticului patologiei hepatice. Obiectivul proiectului este asamblarea și introducerea pe piață a unui test de diagnostic rapid multiplex pentru detecția simultană a antigenului de suprafață al VHB (AgHBs), anticorpilor anti-VHC și anti-VHD (VHC/VHB/VHD).

### **Materiale și metode**

#### **Analiza de secvență pentru optimizarea secvențelor antigenelor**

Alinierea de secvențe au fost efectuate folosind suita Clustal (Larkin et al, 2007) și Ugene (Okonechnikov et al, 2012). Pentru fiecare set de secvențe a fost efectuată o aliniere multiplă folosind următorii parametri: gap opening penalty - 10, gap extension penalty - 0.2 și matricea

de similaritate BLOSUM62. Arborii filogenetici au fost calculati cu suita Clustal folosind algoritmul de clusterizare “neighbour joining” (NJ). Diversele etape au fost automatizate cu unelte dezvoltate specific pentru aceste tipuri de sevente virale.

### **Clonare si plasmide**

Antigenele pentru sinteza au fost proiectate prin metoda descrisa mai sus. Optimizarea codonilor pentru expresie in sistem procariot sau celule de insecte s-a realizat utilizand suita DNAworks. Peptidele au fost sintetizate de Covalab (UK) si resuspendate la o concentratie de 1mg/ml. Secventele ADN au fost sintetizate de Geneart (Thermo, UK). Secventele antigenelor pentru expresie in E coli au fost subclonate in vectorul de expresie procariota pet20b. Secventa VHC E2 (384aa- 656 aa) a fost clonata in vectorul de expresie in celule de insecte pAc5.1\_V5\_HisA. Mutatia N645D a fost efectuata prin metoda PCR de suprapunere si confirmata prin secventiere.

### **Expresia si prificarea proteinelor VHC sistem procariot**

Pentru exprimarea proteinelor core si NS3 s-a transformat o susa de *E. coli* BL 21(DE3). La densitatea optica la 600 nm de 1-1,5 s-a realizat inductia prin adaugare de IPTG pana la o concentratie finala de 1 mM, exceptie facand Core90 la care concentratia de IPTG a fost 2 mM. NS3 a fost exprimata ca proteina de fuziune in C-terminal cu 6 histidine (His Tag). Culturile au fost incubate 3h, la o temperatura de 37°C, mentinand viteza de agitare de ~200 rpm. Celulele au fost recuperate prin centrifugare si procesate imediat sau pastrate la -20°C.

Bacteriile care au exprimat proteina core au fost resuspendate in tampon Tris-HCl 20mM pH 8, NaCl 100mM si lizate prin ultrasonare, pe gheata timp de 2 x 15 min, la amplitudine 100%, cu ciclu 0,4, cu ajutorul unei sonde de 3mm diam (Labsonic M). Ulterior extractele totale (lizatele) au fost supuse centrifugarii pentru separarea extractelor solubile de cele insolubile. Au fost preluate ~40 µg din fiecare extract in care s-a adaugat tampon de proba pentru SDS-PAGE. Acestea au fost separate prin SDS-PAGE in gel de poliacrilamida de 15%. Colorarea s-a realizat cu o solutie coloidala Instant Blue (Sigma).

Antigenul NS3 a fost purificat din extractul solubil pe coloane de Ni-NTA HisTrap (GE Healthcare). Antigenele core au fost purificate prin cromatografie de schimb ionic folosind coloane CM-Sepharose Fast Flow (GE HealthCare).

Antigenele purificate a fost dializate fata de PBS si concentrat cu Amicon ULTRA-4 (Millipore).

## **Expresia și purificarea proteinelor VHD în sistem procariot**

Pentru exprimarea antigenelor VHD, s-a transformat o sursă de *E. coli* BL 21(DE3). La o densitate optică de 600 nm a culturii transformate de 0.6 - 1 s-a realizat inducția prin adăugare de IPTG până la o concentrație finală de 1 mM. Toate cele 3 antigene au fost exprimate ca proteine de fuziune în C-terminal cu 6 histidine (His Tag). Culturile au fost incubate 3h, la o temperatură de 37°C, menținând viteza de agitare de ~200 rpm. Celulele au fost recuperate prin centrifugare și procesate imediat sau păstrate la -20°C.

Bacteriile care au exprimat antigenele VHD au fost resuspendate în tampon 20mM imidazol, 500mM NaCl, 20mM HEPES, 1% Triton și lizate prin ultrasonare, pe gheață timp de 7 x 10 sec, la amplitudine 70%. Ulterior extractele totale (lizatele) au fost supuse centrifugării pentru separarea extractelor solubile de cele insolubile timp de 45 min la 13,000 g. Supernatantul rezultat a fost păstrat la -80°C până la purificare. Au fost preluate ~40 μg din fiecare extract în care s-a adăugat tampon de probă pentru SDS-PAGE. Acestea au fost separate prin SDS-PAGE în gel de poliacrilamidă de 15%. Colorarea s-a realizat cu o soluție coloidală Instant Blue (Sigma). Antigenul 60-140 a fost purificat din extractul solubil pe coloane de Ni-NTA HisTrap (GE Healthcare). Antigenul purificat a fost dializat față de PBS și concentrat cu Amicon ULTRA-4 cutoff 10k (Millipore).

## **Rezultate**

### ***Clonarea și expresia antigenelor VHD (Activitatea 1.1)***

#### *Proiectarea și obținerea vectorilor de expresie procariote a antigenelor VHD*

Virusul Hepatitei D are o diversitate genetică cu șapte genotipuri. Pentru a alege secvențele antigenelor virale cu reprezentativitate maximă s-a elaborat o strategie în două etape: obținerea unei secvențe teoretice globale care să reprezinte o multitudine cât mai mare de secvențe și interpolarea acestei secvențe teoretice în setul care cuprinde genotipul 1 (cel mai prevalent în România) în vederea extragerii secvenței cu probabilitatea de reprezentativitate maximă.

Astfel, a fost extras un set de 979 de secvențe proteice din baza de date Genbank. Aceste secvențe au fost verificate față de bazele de date VHDdb (Usman et al, 2020) și ViralZone (<https://viralzone.expasy.org>). A fost efectuată o aliniere multiplă cu suita Clustal. Pentru delimitarea cât mai exactă a genotipurilor au fost construiți într-o manieră iterativă o serie de

arbori filogenetici cu algoritmul de clusterizare “neighbour joining” (NJ) si o serie de matrici de identitate PIM. Rafinarea arborilor s-a facut prin analiza sub-blocurilor matriceale. Astfel a fost extras un subset de 540 de secvente din genotipul 1. Secventele prezinta o variabilitate de bloc manifestata prin prezenta unei regiuni de ~20 aa la capatul C-terminal. Aceasta regiune a fost eliminata pentru a nu interfera cu calculele de similaritate intrucat nu este intr-o regiune antigenica de interes. Dupa aliniere, a fost obtinuta cate o secventa consensus: HDV-LAg<sub>cons</sub>.

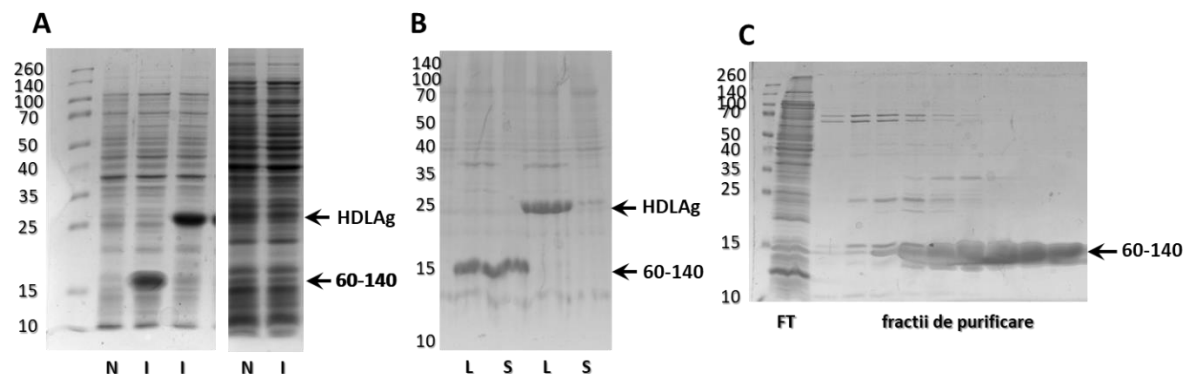
Al doilea pas s-a constituit din extragerea secventelor din genotipul 1 cu scorul de reprezentativitate maxima. Acest scor a fost definit in 3 moduri : suma identitatilor cu celelalte secvente, suma similaritatii cu celelalte secvente si identitatea fata de secventa consensus. Pentru obtinerea acestor scoruri au fost recalculate matricile de identitate PIM si toate 3 au condus la acelasi rezultat : secventa cu ID-ul GeneBank AVO03790.1 si ID-ul UniProt A0A2P1JP13. Secventele antigenelor VHC au fost obtinute printr-o strategie similara in proiectul PED 195/17.08.2017. Secventa antigenelor a fost clonata in vectorul de expresie procariota pet24A dupa cum s-a descris in materiale si metode.

Secventa	Regiune cu antigenicitate crescuta
AVO03790.1 _VHD	1-214
AVO03790.1 _VHD	60-140
AVO03790.1 _VHD	140-214
AY308072_C_P1b_VHC	1_90
AY308072_C_P1b_VHC	1_120
FN435993_NS3_C1b_VHC	1192_1457

Tabel 1. Secventele antigenelor VHD si VHC.

#### *Expresia si purificarea antigenelor VHD in sistem procariot*

Pentru inceput s-a realizat expresia antigenelor VHD in sistem de expresie procariot. Din cele trei antigene s-au exprimat cu succes fragmentele 60-140 si 1-214 (Figura 1A). In continuare s-a determinat solubilitatea celor doua fragmente proteice. In timp ce proteina 1-214 este absenta din fractia solubila, fragmentul 60-140 este total solubil dupa cum se vede in Figura 1B. Antigenul 60-140 a fost purificat din extractul solubil pe coloane de Ni-NTA (Figura 1C).

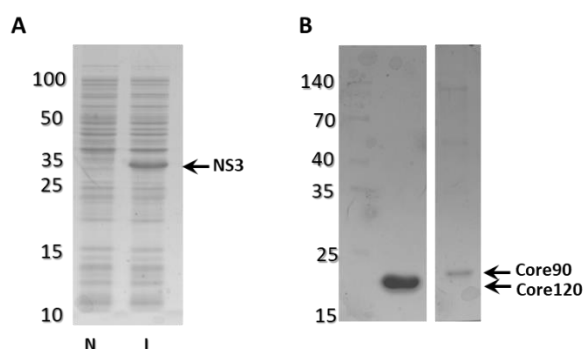


**Figura 1** Expresia si purificarea antigenelor VHD in sistem procariot. A. Lizatele totale ale peletilor celulare care exprima (I) sau nu (N) antigenele 60-140 si 1-214; B. Fractia solubila (S) si lizatul total (L) al peletilor celulare care exprima antigenele 60-140 si 1-214 C. Fractii de elutie ale antigenului 60-140 si fractia care nu a interactionat cu coloana (FT) (Mw – marker molecular Broad Range -BioRad)

### Obținerea antigenelor VHC (Activitatea 1.3)

*Producție de antigene virale HCV în formă pură în vederea testărilor ulterioare de specificitate și sensibilitate*

Antigenul VHD NS3 a fost exprimat in sistem procariot uramand sa fie purificat prin cromatografie de afinitate in sistem Ni-NTA (Figura 2A). Purificarea proteinelor core90 si core120 s-a realizat din extractul insolubil, prin spalarea corpiilor de incluziune, solubilizare si separare prin cromatografie de schimb ionic (Figura2B).



**Figura 2** Expresia si purificarea antigenelor VHC in sistem procariot. Antigene virale au fost exprimate si purificate in sistem procariot dupa cum s-a descris in sectiunea Materiale si Metode. Puritatea lor a fost evaluata prin SDS-PAGE si colorare a gelului. A. Antigenul NS3

in lizat celular indus (I) sau neindus (N) cu IPTG; B. Core90 din elutiile cu NaCl 1M si, respectiv 1.5M si Core120 (Mw – marker molecular Broad Range -BioRad)

### ***Asamblare de teste Elisa pentru fiecare antigen în parte, optimizare protocol de asamblare***

În vederea verificării imunogenității antigenelor *C120 E3*, *His core 90*, respectiv *C HBD Ag* am dezvoltat și optimizat o metodă imunoenzimatică ELISA.

### **Hepatitis Delta Virus ELISA:**

Microplaca ELISA a fost preactivată cu Coating Buffer. După pre-activare se aspiră complet conținutul godeurilor. Pentru acoperirea godeurilor am folosit trei antigene diferite: *C120 E3* într-o concentrație de 5 μg/ml în Coating Buffer, *His core 90* într-o concentrație de 5 μg/ml în Coating Buffer și *C HBD Ag* într-o concentrație de 20 μg/ml în Coating Buffer, cu fiecare acoperind câte 4 strip-uri. Am adăugat câte 100 μl soluție antigen în fiecare din godeurile respective, incubarea a fost peste noapte la 4°C. După incubare, conținutul godeurilor a fost complet aspirată și godeurile au fost blocate cu Soluție Tampon de Blocare. După incubare, conținutul godeurilor a fost complet aspirată.

Pentru diluarea probelor se adaugă 1 μl ser uman la 100 μl diluant de probă, se amestecă prin vortexare.

Se adaugă câte 100 μl din probele diluate în godeurile respective. Se incubează la temperatura camerei timp de 1 oră în întuneric. Se spală fiecare godeu de 5 ori cu 350 μl Soluție Tampon de Spălare. După spălare se aspiră complet conținutul godeurilor.

Se adaugă 100 μl anti-human IgG conjugat cu enzima HRP în fiecare godeu și se incubează la temperatura camerei timp de 15 minute în întuneric. Se spală fiecare godeu de 5 ori cu 350 μl Soluția Tampon de Spălare. Se adaugă 100 μl Soluție de Substrat TMB în fiecare godeu și se incubează la temperatura camerei timp de 20 de minute în întuneric. Se adaugă 50 μl Soluție Stop în fiecare godeu și se citesc valorile densității optice (OD) la 450 și 620 nm la un cititor de stripuri Statfax.

În cazul microplăcii care conține antigenul C120 E3, am obținut semnal bun pentru probele pozitive, iar pentru probe negative am obținut semnal de fundal scăzut (OD<0,61). Comparativ cu kitul comercial însă, intensitatea acestui semnal este mai mică, dar acesta se poate îmbunătăți prin combinarea a diferitelor antigene virale pe placă. În cazul plăcii care conține

His core 90 însă, absorbanțele au fost scăzute, probabil s-a deteriorat proteina în timpul transportului sau trebuie optimizată concentrația pe microplacă.

OD-uri obținute cu metoda optimizată ELISA, comparativ cu un kit comercial:

<b>Ser deidentificat</b>	<b>Kit comercial HCV Ab</b>	<b>Microplacă cu C120 E3</b>	<b>Microplacă cu His core 90</b>
1	2.253	0.176	0.031
2	1.523	0.924	0.018
3	0.806	0.097	0.045
4	1.862	0.927	0.019
5	1.740	1.021	0.036
6	0.054	0.044	0.039
7	2.069	0.092	0.037
8 (negativ)	2.460	0.1	0.023
9	2.489	0.225	0.04
10	1.329	0.843	0.035
11	0.032	0.061	0.067
12	2.105	0.412	0.026
14 (negativ)	0.031	0.025	0.028
15	1.984	0.626	0.024
16	1.405	0.116	0.063
17	3.272	0.588	0.028
18 (negativ)	-	0.03	0.029

### **Evaluarea imunogenității antigenului AgHDs (Actvitatea 1.2)**

Testarea imunogenității antigenului AgHDs cu metoda ELISA, utilizând standarde din kit-uri comerciale și testarea comparativă a imunogenității antigenului AgHDs cu un kit comercial și Elisa in-house au fost efectuate cu kitul optimizat și pe probe deidentificate, pozitive pentru anticorpi anti-HBs. OD-urile măsurate sunt prezentate în tabelul următor. Trebuie specificat că kitul comercial pentru detectarea de anticorpi HDV este un kit de Elisa competitiv, deci OD-uri mici indică prezența anticorpilor în probă. În schimb, cu metoda noastră, prezența anticorpilor este indicat de OD-uri crescute. Controalele pozitive și negative sunt din kitul comercial pentru detectarea anticorpilor HDV.

<b>Probă deidentificate</b>	<b>Elisa cu CHBDaG</b>	<b>Kit comercial delta virus Ab</b>	<b>Kit comercial delta virus Ag</b>
Control negativ	0	1.867	0.039
Control pozitiv	1.599	0.046	3.267
1	3.086	0.038	0.046
2	0.057		
3	0.031		
4	0.063		

### **Bibliografie**

Drain, P.K., Hyle, E.P., Noubary, F., Freedberg, K.A., Wilson. D., Bishai, W.R., Rodriguez, W., Bassett, I.V. Diagnostic point-of-care tests in resource-limited settings. *Lancet Infect Dis.* **2014**, *14*, 239-249.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, *23*, 2947-2948

Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, the UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 2012 *28*: 1166-1167. Doi:10.1093/bioinformatics/bts091

Usman Z, Velkov S, Protzer U, Roggendorf M, Frishman D, Karimzadeh H. HDVdb: A Comprehensive Hepatitis D Virus Database. *Viruses*. 2020 May 14;*12*(5):538. Doi: 10.3390/v12050538. PMID: 32422927; PMCID: PMC7290977.

Coordonator proiect

**Dr Szilard Fejer**

Responsabil partener

**Dr Costin-Ioan Popescu**