



EXPRESSÃO DO ANTÍGENO DA HEPATITE D EM *ESCHERICHIA COLI* PARA DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

FERNANDA SILVA CARNEIRO¹; LUCAS MOREIRA DOS SANTOS²; RAFAEL RODRIGUES³; IGOR POLETTI⁴; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO⁵.

¹Laboratório de Imunologia Aplicada - UFPEL; fernandacarneiro.sc@gmail.com;

²Laboratório de Imunologia Aplicada - UFPEL; lucass1@hotmail.com;

³Laboratório de Imunologia Aplicada - UFPEL; rafaelr458@gmail.com;

⁴Laboratório de Imunologia Aplicada - UFPEL; igor.poletti@hotmail.com.br;

⁵Laboratório de Imunologia Aplicada - UFPEL; fabricio.rochedo@ufpel.edu.br.

1. INTRODUÇÃO

A epidemiologia das hepatites virais corresponde a um desafio de saúde pública, sendo responsáveis por 1,4 milhões de óbitos ao ano no mundo. Entre os anos de 2000 e 2015 foram identificados 665 óbitos no Brasil associados a hepatite D (HDV). No Brasil, há uma concentração de casos HDV principalmente na região norte, com prevalência do genótipo III, devido a sua alta patogenicidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A sua infecção só ocorre na presença do vírus da hepatite B (HBV), apresentando dependência do antígeno de superfície HBsAg para completar o seu ciclo biológico, onde a co-infecção resulta em um grau agudo de infecção tanto da hepatite B como da hepatite D (MASOOD e JOHN, 2017). O HDV é o principal vírus, em comparação aos vírus da hepatite B e C, que pode desenvolver uma hepatite crônica, evoluindo para uma cirrose em até 70% dos casos. A hepatite fulminante neste caso é dez vezes mais comum que as demais (FONSECA, 2002), que além de uma rápida progressão, aumenta os riscos do desenvolvimento de um câncer hepático (NOUREDDIN e GISH, 2014).

A detecção dos anticorpos anti-HDV é um dos métodos utilizados para o diagnóstico da hepatite D, a partir de um ensaio de imunotransferência - um teste bioquímico capaz de detectar proteínas em uma amostra (MASOOD e JOHN, 2017). A detecção do vírus também pode ser feita com a replicação do RNA viral no soro do paciente (GHAMARI, 2012). Ambos métodos de diagnósticos são tecnologias laboriosas e que necessitam de um serviço especializado. A tecnologia do DNA recombinante fornece uma alternativa ao atual diagnóstico, de produção simplificada e de baixo custo.

O presente trabalho objetiva a produção de uma proteína recombinante e a análise de sua expressão em *Escherichia coli*, a fim de futuramente facilitar o diagnóstico do HDV a partir da elaboração de um teste imunocromatográfico rápido e simples.

2. METODOLOGIA

2.1. Escolha da proteína e alinhamento das sequências proteicas

Inicialmente, foi feita uma revisão bibliográfica nos bancos de dados do NCBI/PubMed, que resultou na escolha da proteína HDAg como um potencial antígeno recombinante. As ferramentas BLAST e Vector NTI foram utilizadas para alinhamento das 66 sequências da proteína depositadas no Genbank, com alta

identidade para o genótipo III. O produto do alinhamento foi utilizado para o desenho de um gene sintético.

2.2. Síntese do inserto

A síntese do inserto, bem como a clonagem no vetor de expressão pET28a utilizando as enzimas de restrição *Hind*III e *Eco*RI foi realizada pela empresa Epoch Life Science (EUA).

2.3. Expressão do gene sintético

Para averiguação da expressão do gene sintético, foi escolhido as seguintes cepas de *E. coli* - BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLysS, BL21 (DE3) pLysE, BL21 CodonPlus RP, BL21 star (DE3), C41 (DE3), C43, BL21 Rosetta (DE3), BL21-SI, BL21 CodonPlus (DE3) RIL e pT-TRX.

Foi realizada uma transformação por choque térmico com o plasmídeo recombinante pET28a-S-HDAg3 com cada uma das cepas de *E. coli* mencionadas acima. Posteriormente, as cepas transformadas foram transferidas para 10 mL de meio Luria Bertani (LB) ou meio LB *Low Salt*, destinado a cepa BL21-SI, com 100 µg/mL de canamicina e adicionado mais 100 µg/mL de cloranfenicol nos meios destinados às cepas (DE3) RIL, Rosetta (DE3), BL21(DE3) pLysS, BL21(DE3) pLysE e BL21 CodonPlus RP, onde todas foram cultivadas em agitador orbital (180 rpm, 37°C) por 18 h.

Foi coletado 1 mL do pré-inóculo e transferido para o inóculo, o qual continha 10 mL de meio LB (ou LB *Low Salt*) nas mesmas condições já descritas, que foram cultivados (37°C/ 180 rpm) até atingirem 0,6 de densidade ótica de 600nm e então adicionado 1 mmol/L de β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) para induzir a expressão da proteína recombinante durante 3 h (37°C/ 180rpm).

Alíquotas referentes às frações não-induzidas e induzidas foram centrifugadas (10.000 rpm/ 4 minutos), onde o sobrenadante foi descartado, e adicionado tampão de amostra Laemmli Sample Buffer 5% no *pellet*, para a preparação para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e *Western Blot*.

Após a eletroforese dos géis, o primeiro gel foi corado com azul de *Coomassie* em temperatura ambiente. O segundo gel, após a eletroforese, foi preparado para a transferência para uma membrana de nitrocelulose em tampão de transferência (1h hora/ 100 volts). Posteriormente, uma solução bloqueadora (5% de leite em pó em PBS-T) foi adicionada a membrana (1h sob agitação a temperatura ambiente). Após, foi lavada a membrana com PBS-T e adicionado um anticorpo anti-histidina, em agitação (1 h em temperatura ambiente). Após nova lavagem com PBS-T, foi preparado então uma solução de revelação com substrato de ortofenilenodiamina (OPD) para *Western Blot*, revelando a presença ou ausência da proteína na expressão em cada cepa de *E. coli*.

2.4. Caracterização da solubilidade da proteína

Foi adicionado no *pellet* celular do cultivo induzido que apresentou o maior nível de expressão 2 mL de tampão Akta Wash (0,234% de NaH₂PO₄, 2,92% de NaCl e 0,068% de Imidazole), e mais 100 µg/mL de lisozima, e então incubadas (1h/37°C). Após, foi utilizado um tratamento de ultrassom, a fim de romper as células; foram feitos 6 ciclos de 60 Hz de 20 segundos. Em seguida, foi

centrifugada a solução por 10 minutos a 10.000 rpm. Depois, o sobrenadante foi armazenado, denominado como a fração solúvel da proteína, e o *pellet* foi lavado três vezes com uma solução de PBS 1X e centrifugado após, onde foi adicionado 2 mL de tampão Akta Wash com ureia 6 M, para solubilizar as proteínas dos corpos de inclusão, e incubados *overnight* agitando em uma câmara fria (4°C), perfazendo a fração insolúvel da proteína. Para caracterização das frações solúveis e insolúveis, foi realizada uma corrida em gel de poliacrilamida 12% e feita a técnica de *dot blot*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstram a presença de uma banda cuja massa molecular é de aproximadamente 26 KDa, correspondente ao tamanho predito *in silico* do HDAg (Figura 1).

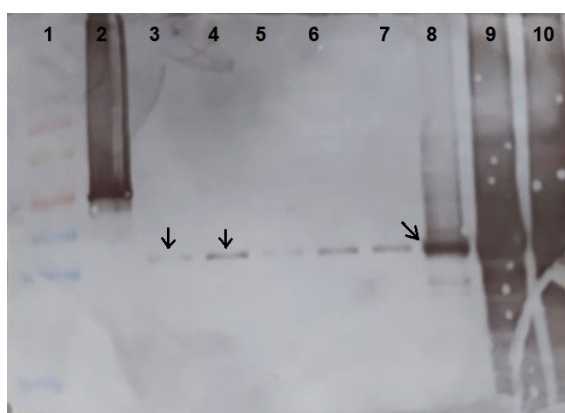


Figura 1. Expressão da proteína S-HDAg em membrana de nitrocelulose pela técnica de *Western blot* na cepa BL21-RP. 1- Marcador de Western blotting Perfect Protein™ (Novagen). 2- Controle positivo. 3- Expressão da proteína 30 minutos após o inóculo. 4- Expressão da proteína 1h após o inóculo. 5- Expressão da proteína após 1h e 30 minutos após o inóculo. 6- Expressão da proteína após atingir a densidade ótica de 0,6 de 600nm. 7- Expressão da proteína não induzida. 8- Expressão da proteína após 1h de indução com IPTG. 9- Expressão da proteína após 2h de indução com IPTG. 10- Expressão da proteína após 3h de indução com IPTG.

A partir da expressão do vetor pET28a-S-HDAg3 nas diferentes cepas de *E. coli* foi possível observar um maior nível de expressão desta proteína na cepa BL21-RP, a qual possui cópias extras do gene *argU*, capaz de reconhecer os códons raros de arginina - AGG e AGA (SAXENA e WALKER, 1992), um dos prováveis motivos de uma maior expressão nesta cepa em comparação às demais, uma vez que o gene HDA possui ambos códons (MIERTZSCHKE e GREINER-STOFFELE, 2003).

Após a caracterização da solubilidade, foi possível obter a proteína recombinante das frações solúveis e insolúveis, contudo uma maior concentração proteica na fração insolúvel foi observada. Devido a característica insolúvel da proteína, se faz necessário um processo de desnaturação através da adição de agentes desnaturantes como a ureia, a fim de solubilizar a proteína. Tal adição pode modificar a estrutura terciária da proteína e, consequentemente, modificar a interação antígeno-anticorpo, mesmo após diálise e remoção do agente desnaturante (YAMAGUSHI e MIYAZAKI, 2014). Alternativas como a redução da temperatura de expressão, redução da concentração do indutor e aumento do

tempo de expressão podem auxiliar na obtenção de maiores concentrações de proteínas solúveis (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY LABORATORY, 2017).

4. CONCLUSÕES

A partir deste trabalho é possível concluir que a expressão do HDAg recombinante (genótipo III) foi possível em *E. coli*, contudo mais estudos devem ser realizados a fim de averiguar a imunogenicidade do antígeno recombinante para a confirmação da existência de uma alternativa viável a atual metodologia de diagnóstico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde. Ministério da Saúde, v. 1, 2017.
- Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde. Ministério da Saúde, v. 2, 2018.
- BONINO, F.; HEERMANN, K.H.; RIZZETTO, M.; GERLICH, W.H. Hepatitis delta virus: protein composition of delta antigen and its hepatitis B virus-derived envelope. **Journal of Virology**, v. 58, p. 45-50, 1986.
- EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY LABORATORY. **Protein Expression**. Europa, [2017?]. Acessado em 26 ago. 2018. Online. Disponível em: https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/protein_expression/ecoli/improving_protein_solubility/index.html
- FONSECA, J.C.F. Hepatite D. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 181-190, 2002.
- GHAMARI, S. *et al.* Prevalence of hepatitis delta virus (HDV) infection in chronic hepatitis B patients with unusual clinical pictures. **Hepatitis monthly**, v. 13, publish online, 2013.
- HUGHES, S.A.; WEDEMEYER, H.; HARRISON, P.M. Hepatitis delta virus. **The Lancet**, v. 378, p. 73-85, 2011.
- LEMPP, F.A.; NI, Y.; URBAN, S. Hepatitis delta virus: insights into a peculiar pathogen and novel treatment options. **Gastroenterology and Hepatology**, v. 13, p. 580-590, 2016.
- MASOOD, U.; JOHN, S. Hepatitis D. **StatPearls**, 2017.
- MIERTZSCHKE, M.; GREINER-STOFFELE, T. The xthA gene product of *Archaeoglobus fulgidus* is an unspecific DNase. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, p. 1838-1849, 2003.
- NOUREDDIN, M.; GISH, R. Hepatitis delta: epidemiology, diagnosis and management 36 years after discovery. **Current Gastroenterology Reports**, v. 16, p. 365, 2013.
- SAXENA, P.; WALKER, R.J. Expression of argU, the *Escherichia coli* gene coding for a rare arginine tRNA. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 1956-1964, 1992.
- WANG, K.S. *et al.* Structure, sequence and expression of the hepatitis delta viral genome. **Nature**, Reino Unido, v. 323, n. 9, p. 508-514, 1986.
- XIN, L.X.; YAO, Y.; DONG, S.Q.; LI, B.S. Expression and purification of recombinant Hepatitis Delta Virus (HDV) Antigen for use in a diagnostic ELISA for HDV infection using the high-density fermentation strategy in *Escherichia coli*. **Biomedical and Environmental Sciences**, China, v. 29, p. 417-423, 2016.
- YAMAGUSHI, H.; MIYAZAKI, M. Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies. **Biomolecules**, v. 4, p. 235-251, 2014.