



Expresión y purificación del antígeno preS1/2 y su utilidad en el estudio de la patogenia de la infección por el virus de la hepatitis B (Expression and purification of preS1/2 antigen and its usefulness in the hepatitis B virus pathogenesis study)

Masyelly Rojas¹, Juan Camilo Valencia-Molina², Daniela Montes-Berrueta^{1,2}, Gery Rosmary Ruiz-Carrillo², Leidith Berrueta-Carrillo¹, Darrell L Peterson³, Lisbeth Berrueta¹✉, Siham Salmen¹✉

¹Instituto de Inmunología Clínica, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela,

²Estudiante de Medicina de la Universidad de los Andes (ULA), Núcleo Mérida.

³Department of Biochemistry and Molecular Biophysics, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia, USA

[ARTÍCULO ORIGINAL]

Recibido: 13 de Octubre de 2012. Aceptado: 23 de Noviembre de 2012.

Resumen

El preS1/2 es parte de las proteínas de envoltura del virus de la hepatitis B (VHB), con funciones importantes en la inmunopatogenia de la enfermedad. Para su estudio es necesario contar con la proteína pura y así dilucidar su participación en el daño generado en el tejido hepático. Para ello se procedió a la expresión del preS1/2 previamente clonado en el vector pET3d, en la cepa de *E coli* HMS174 (DE3), seguido por su purificación mediante columnas de afinidad hacia residuos de histidina (6xhistidina) y finalmente sometidas a liberación de contaminantes mediante el uso de columnas de afinidad hacia endotoxina y filtración por centrifugación, de esta manera utilizarla para evaluar su efecto sobre hepatocitos humanos. El procedimiento utilizado permitió obtener 1,5 mg de proteína pura funcionalmente estable por cada litro de medio de cultivo. En este trabajo se describe un método sencillo de expresión y purificación del preS1/2 recombinante y se evidencia la obtención de un producto intacto, con potencial uso en estudios funcionales y futuros ensayos terapéuticos

Palabras clave

Proteína recombinante, preS1/2, clonaje, expresión, Virus de la hepatitis B.

Abstract

The preS1/2 belongs to the envelope proteins of the hepatitis B virus (HBV), and has an important role in the pathogenesis of the disease. A pure protein is important for their study, and thus elucidates their involvement in the liver tissue damage observed during the diseases. For this purpose preS1/2 previously cloned into the pET3d was expressed in *E. coli* strain HMS174 (DE3), subsequent was purified by affinity columns histidine residues (6xhistidine) and finally treated to release contaminants by using affinity columns endotoxin and filtration by centrifugation, thereby used it to assess their effect on human hepatocytes. The procedure yielded 1,5 mg pure protein per liter of culture medium, functionally stable. In this paper we describe a simple method of expression and purification of preS1/2, which is an intact product with potential use in functional studies and future therapeutic trials

Keywords

Recombinant protein, preS1/2, cloning, expression, Hepatitis B virus

Introducción

La producción de proteínas recombinantes ha revolucionado todas las áreas de la ciencia, debido a que ha permitido el estudio de proteínas puras desde el punto de vista estructural, funcional y de su

relevancia en la patogenia de múltiples enfermedades, conocimientos que han contribuido enormemente con el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, de hecho más de 200 proteínas recombinantes, han sido aprobadas para ser utilizadas con fines terapéuticos

✉ **Autor de correspondencia:** Lisbeth Berrueta Carrillo, correo electrónico: lberruet@ula.ve. y Siham Salmen Halabi, correo electrónico: sihamsa@ula.ve. Instituto de Inmunología Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Venezuela

(1). Existen diversas maneras de clonar y expresar las proteínas recombinantes, y a pesar de que en las últimas tres décadas se han desarrollado varios sistemas no bacterianos (levaduras, sistemas libre de células, baculovirus, etc.), el uso de *E. coli* como sistema de expresión, sigue siendo el preferido (2), debido a que es una de las formas más rápida, económica y fácil de aplicar, además de ser el sistema de expresión utilizado en el 50% de la producción de proteínas recombinantes. Sin embargo, tiene la desventaja que debido a la rápida expresión de las proteínas o a fallas en las modificaciones postraduccionales presentes en las células eucariotas, tales como la glicosilación, formilación, acetilación, entre otras; algunas pueden plegarse inadecuadamente o no plegarse. Esta desventaja se ha ido solventando a través del uso de nuevas estrategias destinadas a preservar la estructura tridimensional de la proteína en estudio (3).

Muchas de las proteínas recombinantes utilizadas provienen de agentes infecciosos, y su uso ha mejorado ostensiblemente, los sistemas diagnósticos y el desarrollo de vacunas (4). El virus de la hepatitis B (VHB), es uno de estos agentes infecciosos cuyo genoma ha sido caracterizado y secuenciado (5). El VHB es uno de los virus ADN más pequeño de la naturaleza, su genoma está compactado en una doble hebra de ADN parcialmente relajada circular, de aproximadamente 3200 nucleótidos, con cuatro marcos de lectura solapados que codifican para: *presS/S*, *preC-C*, *p* y *X*. El *presS/S* codifica para las tres proteínas estructurales de la envoltura: proteína larga (constituida por antígeno S o HBsAg (226 aa), *preS2* (55 aa) y *preS1* (108-119 aa), mediana (antígeno S y *preS2*) y pequeña (sólo el antígeno S) (6). Hallazgos recientes han asociado la presencia de variantes del *preS1/2*, con la cantidad de HBsAg circulantes, con su retención en el retículo de los hepatocitos (7), con la patogenia de la enfermedad y con el desarrollo del carcinoma hepatocelular (8). Adicionalmente, se ha evidenciado que los niveles de HBsAg séricos están en estrecha correlación con la cantidad de *preS1/2* soluble, y se han detectado concentraciones de hasta 100mg/ml del antígeno de superficie en circulación (9).

La proteína de envoltura del HBV, constituida por los tres componentes (S, *preS1* y *preS2*), es sintetizada en el retículo endoplasmático, el HBsAg tiene dos dominios transmembrana y es el encargado del anclaje, mientras que tanto el *preS1* y *preS2*, son los encargados de permitir el plegamiento adecuado de la proteína de envoltura (10, 11), de mediar la

activación transcripcional (12) dependiente PKC/MAPK e incrementar la tasa de proliferación de los hepatocitos (13), así como también incrementa la susceptibilidad del hepatocito a sufrir muerte celular (14). Debido a su importancia en la inmunopatogenia de la infección, en este trabajo describimos detalladamente un procedimiento para la expresión y purificación del *preS1/2* del virus de la hepatitis B, que puede contribuir como guía y punto de partida para su utilización en estudios funcionales y estructurales, y como componente patogénico importante durante la evolución de la enfermedad hepática.

Materiales y métodos

Materiales

Las *Escherichia coli* Top10 y HMS174 (DE3) fueron adquiridas de Stratagene La Jolla, CA. El Medio LB fue adquirido de Sigma, USA. El Isopropyl-b-d-thiogalactopyranoside (IPTG), la ampicilina, el cloramfenicol, el medio de cultivo D-MEM, el suero bovino fetal y el DAPI fueron adquiridos de Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA. El anti-*preS1* y anti-*preS2* del virus de la hepatitis B fue adquirido de Santa Cruz Biotechnology Inc., California, USA. Anti-IgG de ratón conjugado con Rhodamina fue adquirido de Jackson Laboratories, West Grove, PA. La columna IMAC fue adquirida de Profinity-BioRad, Hercules, CA. La columna polymixina B fue adquirida de Detoxi-Gel Pierce, Rockford, IL. Centrifugal filter units Amicon Ultracel fue adquirido de Millipore Corporation.

Clonaje y transformación de *E. coli* con el vector pET3d-*preS1/2*:

Para el clonaje del gen *preS1/2* se utilizó la secuencia ADZ98695.1 del GenBank para el diseño de las siguientes sondas: forward, 5'-GGA TCG AGA TCT CGA TCC CGC-3'; reverse, 5'-GGG GAG ATC TCT ACT AATGGT GAT GGT GAT GGT GGT TCA GCG CAG GGT CCC C-3', que incluyó un sitio de restricción para la endonucleasa BglII, requerida para su inserción en el vector pET3d (15). La plantilla utilizada del ADN del HBV fue adquirida ACURUM y la PCR se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen). El producto amplificado fue purificado, tratado con la endonucleasa al igual que el plásmido y ambos sometidos a ligamiento en presencia de la ligasa T4 (Invitrogen); esta mezcla fue utilizada para transformar la cepa *E. coli* Top10 competente. Una vez transformada la cepa de *E. coli* Top10, fue crecida en medio de agar selectivo con ampicilina (50µg/ml) y después de 18 horas diez colonias fueron expandidas

en medio LB líquido, con el fin de purificar el plásmido, determinar los clones con el inserto y posteriormente enviar a secuenciar al Departamento de Biología Molecular de Virginia Commonwealth University. El plásmido con la secuencia correcta se utilizó para transformar la cepa HMS174 (DE3) de *E. coli* competente mediante choque térmico (16). HMS174 (DE3). El cultivo fue incubado con 3 µl del plásmido pET3d-preS1/2, durante 30 minutos en hielo, luego sometido a choque térmico a 42°C durante 1 minuto, colocadas en hielo inmediatamente y finalmente se le añadió 1 ml de medio LB frío, a fin de ser transferidas a 37°C e incubadas durante 1 hora (16). Pasado este tiempo, un inóculo de 200 µl fue agregado a 10 ml de medio LB líquido con ampicilina (50 µg/ml) y se dejó crecer durante toda la noche a 37°C con agitación (140 rpm) (Lab Companion SI300R). De este cultivo de bacterias, se realizaron alícuotas con glicerol al 10%, para congelarlas a -80°C hasta su uso y otra porción fue utilizada para obtener más plásmido puro.

Una muestra de las células congeladas fue utilizada para inocular 50 ml de medio LB/ampicilina, e incubadas durante toda la noche a 37°C en agitación. Este medio fue luego empleado para inocular 2 litros de LB/ampicilina 5% (p/v) de Glucosa/1mM de MgCl₂, e incubado hasta que el cultivo alcanzara una densidad óptica de 0.600 a 0.800 (A_{600nm}), momento en el que se le añadió 100 µg/ml de IPTG a fin de inducir la síntesis proteica durante las tres horas siguientes. Finalizado este tiempo las células fueron centrifugadas a 5000 rpm (4000xg) y el sedimento congelado a -20°C.

Expresión y purificación de preS1/2

La secuencia del preS1/2 fue analizada utilizando el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/pepinfo/>) a fin de predecir sus características fisicoquímicas, así como también su coeficiente de extinción molar, este último permitió hacer el cálculo aproximado de la concentración proteica. Los sedimentos fueron resuspendidos en el tampón de lisis (volumen total 20ml), compuesto por: 6 ml de STE 2X (50 mM Tris HCl pH 8, 25mM NaCl, 2mM EDTA), 8 ml de triton X100 al 5% (v/v), 100 µl de DTT 100mM, 200µl de PMSF 200mM, 200 µl de lisozima 10mg/ml, 20 µl de aprotinin/leupeptin a 1µg/ml y 20 µl de ortovanadato a 1µM), incubados durante 20 minutos en frío y sonicados en frío con 5 ciclos de 30 segundos, seguidos cada uno de 60 segundos de reposo (Fisher Sonic Modelo 150). Finalmente se añadió urea a una concentración final de 4M y se pasó por el homogenizador (5 pases). El lisado de bacterias se centrifugó a 15000 rpm (14000xg) durante 30 minutos

a 40°C, y el sobrenadante o lisado post-nuclear fue aplicado en la columna IMAC previamente cargada con NiSO₄ (200 mM). Una vez que todo el lisado paso a través de la columna, fue lavada con el tampón A (25 mM Tris pH 8, 300 mM de NaCl y 10mM de Imidazol), hasta que la densidad óptica (A_{280nm}) del tampón colectado a través fue inferior a 0,05. Luego la columna fue tratada con el tampón B o de elusión (25 mM Tris, 300 mM de NaCl, 10mM de Imidazol, 100mM de EDTA, el tampón fue ajustado a pH 5), y el fluido a través de la columna fue colectado en fracciones de 3 ml cada una y la absorbancia monitorizada por el espectrofotómetro (UV 280 nm). Las fracciones se dejaron de coleccionar al momento que la absorbancia fue inferior a 0,05. Se tomó una muestra de cada una de las fracciones a fin de evaluar su pureza mediante electroforesis.

Evaluación mediante SDS-PAGE y Western-blot

Las muestras tomadas de cada una de los pasos del proceso de expresión y purificación, fueron diluidas ½ con el tampón de muestra, hervidas durante 3 minutos y luego sometidas a electroforesis en un gel discontinuo de poliacrilamida al 12% (p/v) (17). La corrida fue inicialmente sometida a 70 voltios hasta atravesar el gen concentrador y luego el voltaje se incrementó a 110 voltios para el corrido en el gen separador. Finalizada la corrida, el gel fue teñido con azul de coomassie.

Una vez visualizada la corrida se procedió a seleccionar las fracciones que se someterían a diálisis durante 48 horas en frío con tres cambios con agua deionizada ultrapura y 2 cambios con tampón Tris 25mM, a fin de eliminar el contenido de urea, EDTA e imidazol. La muestra fue liofilizada durante toda la noche, resuspendida en 2 ml de agua estéril y sometida a columna de afinidad para endotoxina (columna de agarosa acoplada a polymixina B, Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Finalmente, concentrada mediante el uso de columnas Amicon® (Millipore Corporation), esterilizada por filtración (0.22µm), cuantificada y alícuotada. Una muestra de esta preparación final fue sometida a electroforesis, electrotransferencia y revelado mediante Quimioluminiscencia (ECL, Pierce), utilizando anti-preS1 y anti-preS2 (Santa Cruz Biotechnology, CA), para la caracterización definitiva de la proteína purificada.

Evaluación funcional del preS1/2

En vista de que el preS1/2 es la proteína encargada de favorecer el tropismo y entrada del virus a la célula blanco y promover el proceso de muerte

Tabla 1. Características bioquímicas del preS1/2	
Característica	Secuencia
Peso molecular	18 kDa
Número de residuos	174
Carga	5.5
Punto isoelectrico	10.6012
Coefficiente de extinción molar (A280)	29730
Coefficiente de extinción molar (A280) 1mg/ml =	1.628
Improbabilidad de ubicarse en los cuerpos de inclusión	0.893
	mggwsskprkgmgtlnsvnpn lgffpghqldpafgansnnpdw dfnknkdqwpqahqvgvsfg pgftpphgnllgwsppaqgilttv paappastnrqsgrqptpispp lrdshpqamqwnsstfhqalld prvrglyfpaggssstgvnpvptt aspissifsrtdpapn

celular, se trató una línea celular de hepatocitos humanos (HepG2) con 65 µg/ml de preS1/2 durante 96 horas (dosis establecida mediante la realización de una curva dosis/tiempo), a fin de determinar el efecto de la proteína sobre la condensación de la cromatina a través de la tinción con DAPI y su unión e internalización en la célula hepática. Paralelamente, para los ensayos de apoptosis los hepatocitos fueron tratados con el producto de la purificación de bacterias tratados con el vector vacío o con 200ng/ml de anti-Fas (CH11) durante 48 horas (18). Las células

cultivadas en laminillas cubreobjetos estériles, fueron fijadas durante 10 minutos con metanol a -20°C, luego de tres lavados con PBS, las células fueron tratadas con Tritón-X100 a 0,1% (v/v) en PBS, lavadas y teñidas con anti-preS1/2 (1:20), lavadas 5 veces con PBS gelatina y teñidas con anti-IgG de ratón acoplada a rodamina (1:100), luego de tres lavados con PBS gelatina fueron incubadas con DAPI 0,5 µg/ml (1:1000), finalmente las laminillas fueron lavadas tres veces con PBS gelatina, dos con PBS, una vez con agua destilada y se montaron en laminas portaobjeto y se sellaron, a fin de visualizarse a través del microscopio de fluorescencia (LEICA DMR, Microsystems Wetzlar GmbH).

Resultados y discusión

Análisis y purificación del preS1/2

El preS1/2 del virus de la hepatitis B ha sido implicado en la inmunopatogenia de la infección y en los mecanismos de entrada (10) y destrucción de la célula blanco (14, 19), de ahí la importancia de poder tenerla como una proteína pura a fin de profundizar en cada una de estas funciones. El preS1/2 corresponde a una proteína de alrededor de 174 aminoácidos (20) y

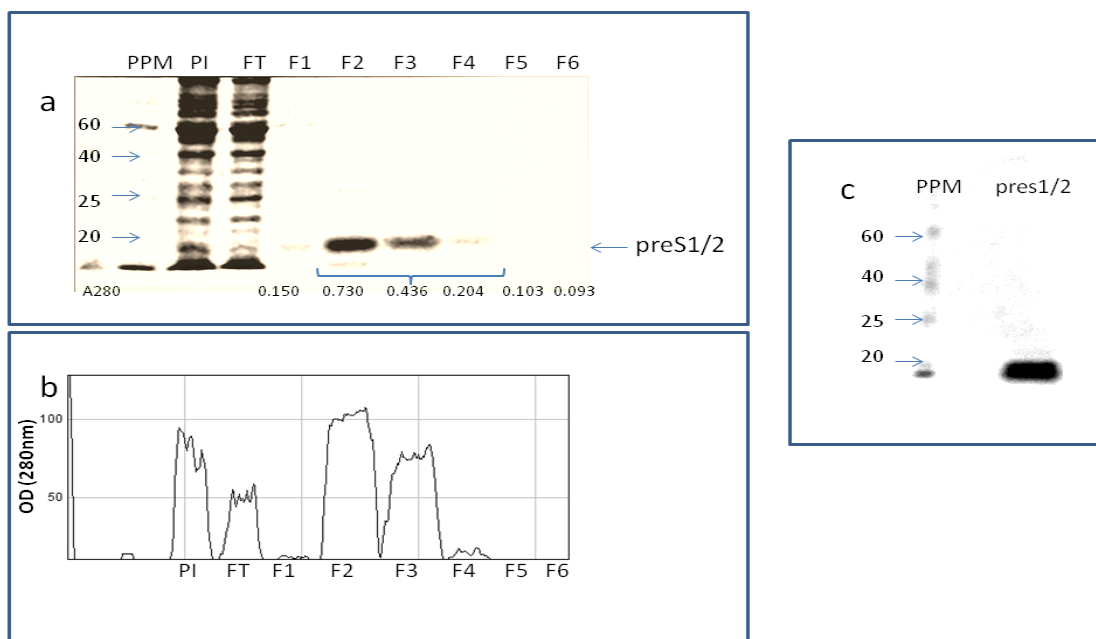


Figura 1. Evaluación bioquímica del preS1/2 recombinante. La figura 1a muestra la corrida electroforética del lisado total post-inducción (PI), fluido a través de la columna (FT), y las 6 fracciones colectadas posterior a la elución (identificadas desde F1 a F6). En la parte inferior a las fracciones se indica las absorbancias obtenida para cada una de ellas. Figura 1b. Muestra análisis densitométrico de la presencia del preS1/2 en cada una de las muestras. La figura 1c, evidencia la corrida electroforética del preS1/2 posterior a la destoxificación, liofilización, filtración y esterilización.

con un peso molecular aproximado de 18 kDa (la tabla 1 resume sus características fisicoquímicas), y según su coeficiente de extinción molar la densidad óptica de 1.628 es el equivalente a 1mg/ml. En la figura 1 se evidencia la expresión del preS1/2 en el lisado post-inducción con IPTG y en las fracciones 2-4 como resultado de la elusión de la columna de níquel (Figuras 1a y 1b). Reportes previos (20) indican que la expresión del preS1/2 presenta dificultades debido a que es altamente susceptible a proteólisis y una porción considerable es expresada en los cuerpos insolubles, debido a esto se decidió utilizar en el tampón de lisis la urea 4M como agente que permite su solubilización y previene la proteólisis (21) y tampón ácido al momento de la elusión. Se evidenció con este método que las fracciones 2-4 (figura 1a) y la final (figura 1c), no tenían contaminantes y sin evidencia de degradación proteica. Las fracciones 2-4 fueron agrupadas para el proceso de diálisis y posterior liofilización. Las proteínas recombinantes expresadas en sistemas bacterianos tales como *E. coli*, tienen el inconveniente de que pueden contener contaminantes como las endotoxinas (22), constituidos principalmente por los lipopolisacáridos (LPS), que se encuentran adosados a la envoltura externa de las bacterias Gram negativas (23), durante el proceso de sonicación los LPS son extensivamente liberados (24), y representa una dificultad en el caso de ensayos biológicos, por lo que se recomienda en estos casos utilizar métodos adicionales para su eliminación (25). Existen varios métodos para eliminar las endotoxinas contaminantes de las proteínas recombinantes dentro de ellos están el uso de Triton-X114 que favorece la formación de micelas donde quedan atrapadas las endotoxinas (26), sin embargo su principal

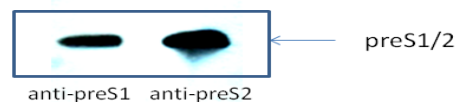


Figura 2. Evaluación inmunogénica del preS1/2 recombinante. Muestra el Western blott revelado por quimioluminiscencia de la proteína preS1/2, que es reconocida por dos anticuerpos monoclonales específicos contra cada uno de los componentes del preS del VHB.

inconveniente es que el Triton-X114 residual es difícil de eliminar. Otro método utilizado, es el uso de las columnas de polymixina B que tienen afinidad hacia los LPS, son fáciles de manejar y no presentan el inconveniente del Triton-X114 (27), así que en este trabajo se decidió utilizar estas columnas. Para ello la suspensión fue aplicada a la columna de polymixina B, se lavó tres veces con agua estéril y estas fracciones colectadas y agrupadas con la muestra original. Debido a que se triplicó el volumen inicial, fueron concentradas mediante centrifugación (Amicon®, Millipore Corporation) y de esta manera eliminar restos de sales presentes en la suspensión. Finalmente la proteína fue esterilizada mediante filtración con una membrana 0,22 estéril. La muestra fue alícuotada y una porción utilizada para cuantificación, electroforesis y Western blott. La concentración final obtenida fue de 1,5 mg/ml (volumen total 2 ml). La figura 1c, evidencia el preS1/2 una vez filtrado y liberado de endotoxinas y sales contaminantes. La identificación final de la proteína se realizó mediante Western blott contra las dos proteínas, mediante el uso de dos anticuerpos monoclonales específicos

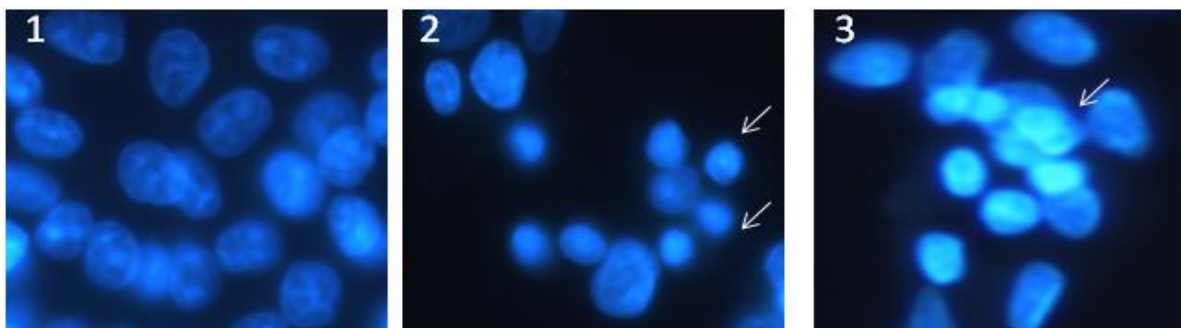


Figura 3. Inducción de la condensación de la cromatina nuclear por el preS1/2 recombinante. Se evidencia los núcleos teñidos con DAPI de células tratadas el producto purificado de bacterias transformadas con el vector vacío, durante 96 h (1), tratadas con anti-Fas (200ng/ml CH11, durante 48 horas) (2) y con preS1/2 recombinante (64µg/ml durante 96h) (3). Las flechas indican las células con la cromatina condensada

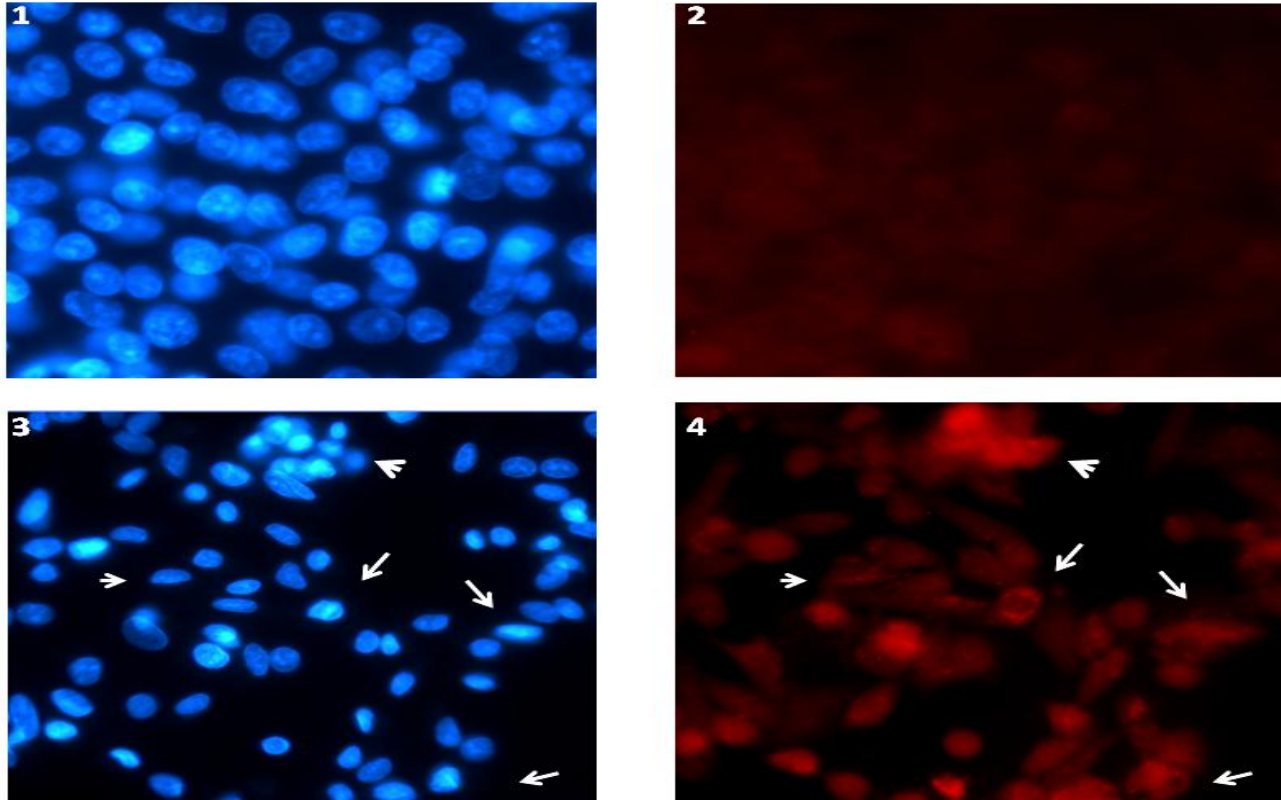


Figura 4. Presencia del preS1/2 recombinante soluble en el interior de los hepatocitos (HepG2). Las células incubadas en ausencia (1 y 2) y en presencia del preS1/2 recombinante (3 y 4) fueron marcadas con anti-preS2 monoclonal y luego con un anti-ratón acoplado a Rodamina. Se evidencia que el preS1/2 es internalizado por los hepatocitos humanos (4). Las flechas indican las células positivas para preS1/2.

contra el preS1 y preS2, en la figura 2 se puede evidenciar que la proteína es identificada por los anticuerpos específicos utilizados.

El preS1/2 purificado preserva su actividad funcional

Dos de las funciones más importantes en las que se ha implicado el preS1/2, es la de marcar el tropismo viral (28, 29) y mediar apoptosis en la célula blanco (19). Por ello se decidió incubar a una línea celular de hepatocitos humanos (HepG2) con el preS1/2 durante 96 h; finalizado este tiempo de incubación las células fueron tenidas a fin de identificar la presencia del preS1/2 en los hepatocitos y evaluar el grado de fragmentación y condensación nuclear, como evidencia de inducción de muerte celular. En la figura 3, se muestra que el preS1/2 purificado es capaz de marcar cambios asociados con la muerte celular de los hepatocitos humanos, asociado con la condensación de la cromatina, similares a los observados en las muestra tratadas con anti-Fas (CH11, un anticuerpo inductor de muerte celular extrínseca). Asimismo, en la figura 4 se muestra

presencia del preS1/2 en el interior de los hepatocitos, con una localización predominantemente citoplasmática y perinuclear, indicando su reconocimiento e internalización por los hepatocitos humanos. Finalmente, estos resultados muestran que este procedimiento es adecuado para la obtención del preS1/2 recombinante, con usos potenciales en estudios biológicos e incluso en ensayos terapéuticos.

Agradecimiento

Este proyecto fue financiado a través del CDCHTA-ULA código M-996-10-07-A

Referencias

1. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nat Biotechnol* 2010; 28:917-24. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
2. Yin J, Li G, Ren X, Herrler G. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J Biotechnol* 2007; 127:335-47. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
3. Francis DM, Page R. Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *Curr Protoc Protein Sci* 2010; Chapter 5:Unit 5 24 1-9. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
4. Egelkroust E, Rajan V, Howard JA. Overproduction of recombinant proteins in plants. *Plant Sci* 2011; 184:83-101. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
5. Schaefer S, Magnius L, Norder H. Under construction: classification of hepatitis B virus genotypes and subgenotypes. *Intervirology* 2009; 52:323-5. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
6. Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* 2007; 13:48-64. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
7. Pollicino T, Amaddeo G, Restuccia A, Raffa G, Alibrandi A, Cutroneo G, Favalaro A, Maimone S, Squadrito G, Raimondo G. Impact of hepatitis B virus (HBV) preS/S genomic variability on HBV surface antigen and HBV DNA serum levels. *Hepatology* 2012;10.1002/hep.25592. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
8. Chen BF, Liu CJ, Jow GM, Chen PJ, Kao JH, Chen DS. High prevalence and mapping of pre-S deletion in hepatitis B virus carriers with progressive liver diseases. *Gastroenterology* 2006; 130:1153-68. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
9. Lian M, Zhou X, Wei L, Qiu S, Zhou T, Li L, Gu X, Luo M, Zheng X. Serum levels of preS antigen (HBpreSAg) in chronic hepatitis B virus infected patients. *Virology* 2007; 4:93. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
10. Bruss V. Hepatitis B virus morphogenesis. *World J Gastroenterol* 2007; 13:65-73. [[PubMed](#)]
11. Bruss V, Vieluf K. Functions of the internal pre-S domain of the large surface protein in hepatitis B virus particle morphogenesis. *J Virol* 1995; 69:6652-7. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
12. Rothmann K, Schnolzer M, Radziwill G, Hildt E, Moelling K, Schaller H. Host cell-virus cross talk: phosphorylation of a hepatitis B virus envelope protein mediates intracellular signaling. *J Virol* 1998; 72:10138-47. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
13. Hildt E, Munz B, Saher G, Reifenberg K, Hofschneider PH. The PreS2 activator MHBs(t) of hepatitis B virus activates c-raf-1/Erk2 signaling in transgenic mice. *EMBO J* 2002; 21:525-35. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
14. Liang X, Qu Z, Zhang Z, Du J, Liu Y, Cui M, Liu H, Gao L, Han L, Liu S, Cao L, Zhao P, Sun W. Blockade of preS2 down-regulates the apoptosis of HepG2.2.15 cells induced by TRAIL. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 369:456-63. [[PubMed](#)]
15. Nunez E, Wei X, Delgado C, Rodriguez-Crespo I, Yelamos B, Gomez-Gutierrez J, Peterson DL, Gavilanes F. Cloning, expression, and purification of histidine-tagged preS domains of hepatitis B virus. *Protein Expr Purif* 2001; 21:183-91. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
16. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. NY 2012.
17. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-5. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
18. Aoudjehane L, Podevin P, Scatton O, Jaffray P, Dusanter-Fourt I, Feldmann G, Massault PP, Grira L, Bringuier A, Dousset B, Chouzenoux S, Soubrane O, Calmus Y, Conti F. Interleukin-4 induces human hepatocyte apoptosis through a Fas-independent pathway. *FASEB J* 2007; 21:1433-44. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
19. Liang X, Du J, Liu Y, Cui M, Ma C, Han L, Qu Z, Zhang Z, Sun Z, Zhang L, Chen YH, Sun W. The hepatitis B virus protein MHBs(t) sensitizes hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis through ERK2. *Apoptosis* 2007; 12:1827-36. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
20. Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, Seyffarth T, Baumgarten H, Gerlich WH. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-S sequence. *J Virol* 1984; 52:396-402. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
21. Sadana A. Review: Protein refolding and inactivation during bioseparation: Bioprocessing implications. *Biotechnol Bioeng* 1995; 48:481-9. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
22. Fraker DL, Stovroff MC, Merino MJ, Norton JA. Tolerance to tumor necrosis factor in rats and the relationship to endotoxin tolerance and toxicity. *J Exp Med* 1988; 168:95-105. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
23. Schletter J, Heine H, Ulmer AJ, Rietschel ET. Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch Microbiol* 1995; 164:383-9. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
24. Salek-Ardakani S, Stuart AD, Arrand JE, Lyons S, Arrand JR, Mackett M. High level expression and purification of the Epstein-Barr virus encoded cytokine viral interleukin 10: efficient removal of endotoxin. *Cytokine* 2002; 17:1-13. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
25. Remick DG, Kunkel RG, Larrick JW, Kunkel SL. Acute in vivo effects of human recombinant tumor necrosis factor. *Lab Invest* 1987; 56:583-90. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
26. Liu S, Tobias R, McClure S, Styba G, Shi Q, Jackowski G. Removal of endotoxin from recombinant protein preparations. *Clin Biochem* 1997; 30:455-63. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
27. Montbriand PM, Malone RW. Improved method for the removal of endotoxin from DNA. *J Biotechnol* 1996; 44:43-6. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
28. Hao Z, Zheng L, Kluwe L, Huang W. Ferritin light chain and squamous cell carcinoma antigen 1 are coreceptors for cellular attachment and entry of hepatitis B virus. *Int J Nanomedicine* 2012; 7:827-34. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
29. Park JH, Choi EA, Cho EW, Lee YJ, Park JM, Na SY, Kim KL. Detection of cellular receptors specific for the hepatitis B virus preS surface protein on cell lines of extrahepatic origin. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 277:246-54. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

Como citar este artículo: Rojas M, Valencia-Molina JC, Montes-Berrueta D, Ruiz-Carrillo GR, Berrueta-Carrillo L, Peterson DL, Berrueta L, Salmen S. Expresión y purificación del antígeno preS1/2 y su utilidad en el estudio de la patogenia de la infección por el virus de la hepatitis B. *Avan Biomed* 2013; 2: 53-9