Egy átlagostól eltérő fiziko-kémiai tulajdonságokkal rendelkező fehérje,

a Hepatitis B vírus X antigén,

immun-biotechnológiai modellvizsgálata

PhD-értekezés

Pál József

PTE-ÁOK Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

Témavezető: Prof. Dr. Németh Péter

PTE-ÁOK Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

P é c s

2005

Bevezetés

A hepatitis B vírus (HBV) a hepadnavírus családba tartozó, enveloppal rendelkező, részlegesen kettőláncú DNS-t tartalmazó vírus. A vírusburokban lévő nukleokapszid tartalmazza a kb. 3.2 kB hosszúságú DNS-t és a polimerázt, mely a komplett DNS mínusz lánc 5' végéhez kovalensen kapcsolódva található. A mínusz lánc négy open reading frame-t (ORF) tartalmaz. Az első ORF a HBV felszíni (pre-S1, pre-S2, S) antigénjeit kódolja. A második ORF-ről a core antigén, a vírus nukleokapszidjának fő komponense szintetizálódik és a szorosan hozzá kapcsolódó HBeAg. A harmadik ORF a vírus polimeráz enzimjét kódolja, mely jelen van a vírus core (HBcAg) partikulumokban, a vírus replikációjának a helyén. A negyedik open reading frame-je által kódolt fehérje az X antigén (HBxAg). Irodalmi adatokból ismert, hogy a HBxAg fehérjeszerkezetét tekintve jelentősen eltér az élő rendszereket felépítő fehérjéktől. A rendkívül konzervatív, 17 kDa-os fehérjére jellemző a nagyfokú hidrofóbicitás. A 154 aminosavból 80 (54%) hidrofób jellegű, amely biológiai rendszerekben egyedülálló fiziko-kémiai szerkezetet jelent, ezért vizsgálata mind az alap, mind a gyakorlati immunológia számára fontos.

A világon több mint 400 millió hepatitis B vírussal (HBV) fertőzött egyént tartanak nyilván (Andrisani 1999, Malik 2000). A hepatitis B vírus által okozott elsődleges fertőzések 10%-a perzisztensé válik. Ezen fertőzések eredménye a tünetmentes hordozói állapot vagy krónikus hepatitis, cirrózis és az elsődleges májrák (primer hepatocellularis karcinóma, PHC) kialakulása. A hepatitis B vírus perinatális transzmissziója egy életen át tartó tünetmentes, de fertőző-hordozó állapotot eredményez, amely óriási epidemiológiai jelentőséggel bír. Megállapítható, hogy a perinatális átadás valószínűsége az elsőszülött gyermekek esetében kb. 55%-os, míg a tünetmentes hordozó anyák későbbi terhességeinél az átadás esélye 40 %. A krónikus B vírusos hepatitisben szenvedő betegeknél 25-30 év alatt alakul ki az elsődleges májrák. A hepatitis B vírus (HBV) fertőzésben a krónikus hordozókká vált betegeknél az elsődleges májrák kialakulásának valószínűsége kétszázszorosa a fertőzésen át nem esettekének. A krónikus hepatitisben és PHC-ban az epidemiológia mortalitási statisztikái konzekvensen évi fél és egy millió közötti halálesetet regisztrálnak. A fejlett országokban a vakcinálás jelentős mértékben csökkentette ugyan az akut megbetegedések számát, de az idült hepatitis és szövődményei, köztük az elsődleges májrák továbbra is súlyos gondokat okoznak. A HBV fertőzés minden közegészségügyi erőfeszítés ellenére továbbra is számottevő, az emberiség nagy hányadát érintő megbetegedés, ami hosszú távú hatásaiban is komoly közegészségügyi gondokat okoz. A közegészségtani-járványügyi problémák megoldásának elősegítése mellett általános pato-biológiai szempontokból is kiemelt fontosságú terület a hepatitis B vírus és a szervezet közötti kölcsönhatások kutatása. A krónikus B vírus fertőzöttekben ugyanis nem csupán az elsődleges májrák fordul elő lényegesen gyakrabban, hanem más vírusfertőzések is, köztük az AIDS előfordulási gyakorisága is jelentősen megnövekszik, ennek oka, hogy hasonlóan terjednek illetve hasonlóak a veszélyeztetett csoportok.

Bár a hepatitis B vírus X protein (HBxAg) szerepét közel egy évtizede felfedezték, az általa indukált transzkripciós mechanizmusok (DNS bázissorrendjében rögzített információ specifikus RNS-szekvenciákba íródik át) részletei korántsem ismertek. Ugyancsak kevés adatunk van arra vonatkozólag is, hogy a B vírusfertőzést követően az idült hepatitis kialakulását milyen immunológiai mechanizmusok befolyásolják. Alapvető kérdés, hogy az akut fertőzésből hogyan alakul ki a krónikus vírushordozó állapot és a májszövet folyamatos destrukciójával járó idült gyulladás. Számos irodalmi adat utal arra, hogy a HBxAg elleni immunválasz az akut fertőzésben és a krónikussá vált hepatitisben szenvedők között eltérő jellegű.

A HBxAg biológiai szerepe még nem teljesen tisztázott, de számos irodalmi adat mutatja a fehérje hatásának változatos formáit a hepatitis B vírus fertőzés során. Számos tudományos adat támogatja azt a tényt, hogy a hepatocelluláris carcinoma indukciójában a HBV X fehér-

jének több más hatásmechanizmusa mellett- szerepe van a celluláris gének transzaktivációja és a p53 funkcionális inaktivációja révén is. Az X fehérje transzaktiválja a HBV core promoterről történő transzkripciót, és mivel a HBV replikációja az erről a promoterről szintetizálódó RNS intermedier útján történik, nyilvánvaló, hogy a HBxAg mediált transzkripció növeli a HBV DNS szintjét a fertőzött sejtekben. A HBxAg azonban képes más virális promotert is transzaktiválni, mint az SV40 korai régió, RSV, HIV-1, HTLV-1. Az utóbbi két vírus esetében ennek a hatásnak az a jelentősége, hogy az AIDS betegek esetében a HBV fertőzés előfordulási aránya csaknem 100%, valamint a HTLV-1 és a HBV között is szoros epidemiológiai kapcsolat van. A HBxAg-nek a humán retrovírusok által okozott betegségek pathogenesisében játszott szerepét alátámasztja az a tény is, hogy a HBV gyakran megfertőzi a perifériás vér mononukleáris sejtjeit, ugyanazt a populációt, amelyet a HIV-1 és a HTLV-1 is. A HBxAg nemcsak heterológ virális, hanem celluláris promotereket is képes transzaktiválni (beta-interferon, c-jun, c-fos, c-myc). Az X fehérje transzaktivációs hatása protein-protein kölcsönhatások alapján valósul meg, ugyanis a fehérje nem kötődik közvetlenül a DNS-hez. Az X reszponzív elemek (XRE) nagy repertoárját írták le, melyek magukba foglalják az AP-1, AP-2, NF-kB, SRF, c/EBP, Ets, ATF1, TFIIB és CREB kötőhelyeket. Direkt kapcsolódása figyelhető meg néhány transzkripciós faktorhoz, mint az Oct1, ATF, ATH2, CREB, Egrl, valamint azokhoz a faktorokhoz, melyek bZIP domaint tartalmaznak. Más esetekben (NF-kB, SRF, Spl) direkt kapcsolatot nem sikerült kimutatni. Ezekben az esetekben transzkripciót befolyásoló hatását indirekt úton fejti ki, komplex szignál-transzdukciós utakat használ. A diacilglicerol (DAG) szintjének növelésével aktiválja a protein kináz C-t (PKC) és a különböző PKC-függő transzkripciós faktorokon keresztül fejti ki hatását (AP-1, AP-2, NF-kB), ami magyarázatul szolgál a HBxAg által indukálható gének nagyfokú variabilitására. A PKC szignál utat használják olyan tumorkeltő anyagok is, mint a különböző növekedési faktorok, mitogének, forbolészterek stb. Befolyásolja a DNS javítást, a sejtciklus folyamatát, az apoptózist stb. Funkciója a sejtműködésben lokalizációjától függően kettős: a citoplazmában a szekunder messenger rendszer szabályozásán, a magban pedig különböző promóterek működésén keresztül hat.

A hepatitis B vírus X fehérjéjének vizsgálata az 1980-as évek második felében került az érdeklődés középpontjába. Kezdetben számos tanulmány született immunhisztokémiai és immunszerológiai módszerek segítségével. Ezekben a szerológiai munkákban elsősorban a keringő anti-HBx ellenes antitestek kimutatása történt, illetve a keringő X antigen kimutatása szérumból immunoblot segítségével poliklonális anti-HBxAg antitest felhasználásával. Az immunisztokémiai munkák többnyire poliklonális anti-HBxAg antitesteket használtak. Átfogó immunszerológiai munka nem született ezekben a kezdeti években. Továbbiakban molekuláris biológiai módszerek segítségével (tranziens sejtvonalak, transzgenikus egerek, RT-PCR, cDNA microarray) vizsgálták az X fehérje biológiai funkcióit.

Míg a HBxAg biológiai funkcióiról egyre több ismeret áll rendelkezésünkre, addig ennek az egyedi fiziko-kémiai tulajdonságokkal rendelkező fehérjének az immunológiai térképezése még nem történt meg. Ennek egyik oka az, hogy a HBxAg izolálása és tisztítása a jellegzetes hidrofób szerkezet miatt nehézségekbe ütközik.

Munkacsoportunknak sikerült elsőként az antigént előállítani és tisztítani olyan mennyiségben, hogy alkalmazásával lehetővé vált monoklonális antitestek kifejlesztése, tesztelése. Így olyan standardizált immunesszéket tudtunk kifejleszteni, amelyek felhasználásával átfogó, összehasonlító immunszerológiai felmérést tudtunk végezni a HBxAg és az ellene termelődött keringő természetes antitestek kapcsolatában.

Az értekezés célkitűzései

Munkám célja kettős volt. Egyrészt elméleti szempontból fontosnak tartottam az anti-HBxAg monoklonális ellenanyagok létrehozását, ennek az egyedi fiziko-kémiai tulajdonságokkal rendelkező fehérjének a további (immunológiai) térképezésére. Ugyanis számos irodalmi adat szerint a HBV genomot hordozó betegekben expresszálódó HBxAg-nek, illetve a vele szemben kialakult immunreaktivitásnak a betegség prognózisa szempontjából alapvető jelentősége van. Az idült májgyulladás, illetve az elsődleges májrák kialakulásának mechanizmusában az immunológiai komponensek tanulmányozásához is elengedhetetlennek látszott ezen ellenanyagcsaládok kifejlesztése és jellemzése. Másrészt fontos szempont volt munkám megkezdésekor egy, a gyakorlati laboratóriumi diagnosztikában hasznosítható immundiagnosztikum kifejlesztése is, mert jelenleg a kereskedelmi forgalomban ilyen ellenanyagok nem állnak rendelkezésre. Mind az immunszerológiai, mind az immunhisztokémiai összehasonlító vizsgálatok végzéséhez alapvető fontosságú volt az ellenanyagok előállítása.

Célkitűzések:

1. A HBxAg immunogenitásának térképezése számítógépes modelleken valamint rekombináns HBxAg és fragmenseinek kifejlesztése a predikciós eredmények alapján.
2. Anti-HBxAg monoklonális ellenanyagok kifejlesztése rekombináns és szintetikus antigének ellen. Az antitestek jellemzése immunszerológiai és immunhisztokémiai módszerekkel.
3. A rekombináns HBxAg antigén ellen előállított monoklonális ellenanyagok epitóp specificitásának meghatározása.
4. Immunhisztokémiai vizsgálatok humán májbiopsziás anyagból származó, formalinfixált, paraffinba ágyazott metszeteken.
5. Immunesszé (un. szendvics ELISA) kifejlesztése, hepatitis B vírus X antigén szérumból való mérésére. A kifejlesztett rekombináns HBxAg fragmensek felhasználásával a hepatitis B vírus X antigénje ellen termelődött természetes antitestek detektálása.
6. Multiparaméteres vizsgálatokra alkalmas, második generációs immunszerológiai módszer kifejlesztése a mikrogyöngy technika felhasználásával a keringő HBxAg mennyiségi meghatározására.

Anyagok és Módszerek

HBxAg immunogenitásának térképezése számítógépes modelleken

A HBxAg molekula antigén determinánsainak vizsgálatát számítógépes elemzés segítségével ((*Wisconsin GCG Programcsomag ProteinStructure* programjából (Genetics Computer Group Inc.,USA)). A *Chou-Fasman* és *Garnier-Ousguthorpe-Robson* másodlagos szerkezet predikciós algoritmust ($P_{hydrophobicity} < 0$; $P_{\beta\text{-turn}} > 1$) (Chou, 1974; Garnier, 1978; Gibrat, 1987; Prevelige, 1990) és a *Jameson-Wolf* antigenitási indexet ($P_{JW\ antigenity} > 1$) (Jameson, 1988) használtuk.

Két peptidszekvenciát (22-31 és 100-114) választottuk ki a további vizsgálatainkhoz. A peptideket megszintetizáltattuk (Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Kémiai Intézet).

Rekombináns HBxAg és fragmensek kifejlesztése

Kísérleteinkhez kétféle úton előállított rekombináns antigéneket alkalmaztunk (Prof. Dr. Molnár János, Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Mikrobiológiai Intézet, Szeged). Az ayw szerotípusú HBV genomból származó X gén (Bichko, 1985) klónozása különböző prokarióta expressziós vektorokban a következő módon történt. Fúziós konstrukciót hoztunk létre, a felhasznált plazmid a pRIT2T (Pharmacia) melyben a fúziós partner a *Staphylococcus* aureus proteinA. Minthogy a pRIT2T fúziós vektor klónozó helyei nem teszik lehetővé a közvetlen klónozást (a proteinA disztális szakasza és az X gén proximális szakasza olvasási kereteit azonos fázisban kell egyesíteni), egy további szubklónt konstruáltunk: A pHBX-46 plazmidból az X gént *Spe*I és *Sma*I enzimekkel kimetszettük és a pUC19 plazmid *Hinc*II és *Xba*I hasító helyei közé klónoztuk. Így létrejött pHBX-8 plazmid, melyből az *Sma*I és *Pst*I enzimekkel kivágott X gén klónozható a pRIT2T fúzós-expressziós vektorba, annak SmaI és PstI által vágott szekvenciájába (a két fúziós partner olvasási kerete megegyezik). A fúziós konstrukció a pRITX-12, melyet *E. coli* N8430 baktérium törzsbe transzformáltuk (Marczinovits, 1997).

A pX-HBxAg konstrukció csak korlátozott mértékben felelt meg a céljainknak. Ugyanis a HIV proteázzal leválasztott terméken a proteinA maradéka zavarhatja az immunológiai reakció specificitását, ezért más génklónozási stratégiát követtünk. (Minthogy egyéb enzim nem alkalmas a fúziós fehérjekomponensek szétválasztására, egyéb génkonstrukciót kellett létrehoznunk.)

Választásunk az u.n. GST gén-fúziós expressziós rendszerre esett. Ez olyan expressziós vektor, melyben IPTG-vel indukálható p_{tac} promoter mögött a *Schistosoma japonicum* glutathion-S-transzferáz (GST) génjét találjuk. Ennek disztális végéhez illeszthető a fúziós proteinként expresszálandó partner-fehérje génje. A fúzió helyét közvetlenül megelőzően a konstrukció a trombin (pGEX-4T-2), vagy az Xa faktor (pGEX-3X) hasító helyét hordozza, így a partnerek *in vitro* a megfelelő enzimmel szétválaszthatók. További előnye a rendszernek, hogy a rekombináns fúziós fehérje a baktérium sejtek lizátumából affinitás kromatográfiával, Glutathione Sepharose 4B gyantán egy lépésben az E. coli fehérjétől kitisztítható és redukált glutationnal a gyantáról eluálható.

Átfedő rekombináns GST-HBxAg fragmensek kifejlesztése

Rekombináns GST-HBxAg (10-143 aminosav).

A HBxAg rekombináns plazmid előállítását korábban közöltük (Marczinovits 1997). Röviden, a pHB320 (Bichko 1985) plazmid *BamH*I-*Fsp*I enzimekkel történő hasítását követően a csonkított X gént a pHSG 395 klónozó vektoron keresztül a pGEX-3X (Marczinovits 1997) fúziós expressziós vektor *BamH*I-*Sma*I restrikciós enzimek hasító helyei közé klónoztuk. Így az X protein 9 és 11 aminosavval lett rövidebb az N- és a C terminális végeken. A klónozási stratégia szerint a rövidebb X fehérje az N-terminális végen 5 (pHSG-395 eredetű) és a C-terminális végen 4 aminosavval (pGEX-3X eredetű) kiegészült. A géntechnnológiai eljárás felhasználásával előállított rövidített rekombináns GST-HBxAg alkalmazásával kiküszöbölhetővé váltak a HBxAg nagyfokú hidrofóbicitásából adódó nehézségek.

Rekombináns GST-HBxAg N-terminális fragmense (10-90 aminosav).

A teljes HBx kódoló régiót, a kiindulási plazmid (pHB320) *Nco*I és *Bgl*II hasítóhelyekkel történő vágása után a pHSG-395 átmeneti klónozó vektor fenti enzimekkel hasított helyére építettük be. Ezután az X gént hordozó pHSG 395 plazmidot *Bgl*II és *EcoR*I enzimekkel vágtuk és a pGEX-3X vektor *BamH*I és *EcoR*I helyére klónoztuk. Igy a pGEX-3XX rekombináns plazmidot kaptuk. A HBx N terminális végét kódoló rekombináns plazmidot, a pGEX-3XX *Ava*I és *EcoR*I hasítását követően, a ragadós végeket Klenow enzimmel feltöltve, intramolekuláris religáció után nyertük.

Rekombináns GST-HBxAg C-terminális átfedő fragmensei (79-143, 79-117, 97-136, 117-143).

A pGEX-3X plazmidot használtuk az átfedő fragmentumokat tartalmazó rekombináns konstrukciók létrehozására. Négy primer párral pGEX-3X vektorba klónozott HBxAg szakaszt templátként használva PCR-t végeztünk. A PCR-t (95°C 3 min; 30 ciklus: 95°C 45 sec, 50°C 30 sec, 72°C 1 min; 72°C 10 min) végeztük. A reakció keverék a következőket tartalmazta: 50 ng templát, 200 nM dNTP, 0.5 nM primer, 1x Pfu puffer, 1 U Pfu polimeráz. A tisztított termékeket *Bam*HI majd *Eco*RI restrikciós enzimekkel emésztettük, pGEX-6P-1 vektorba klónoztuk. Az olvasási keret helyességét mindhárom plazmidnál szekvenálással ellenőriztük (Pal 2003). A rekombináns plazmidokat *E. coli* DH5alfa törzsbe transzformáltuk, IPTG-vel indukáltuk és a rekombináns fúziós fehérjéket glutathione-S transzferáz gélen tisztítottuk Marczinovits és mtsai. 1997. szerint. Az átfedő rekombináns peptideket anti-HBxAg ellenanyagokkal ELISA rendszerben teszteltük.

Szintetikus HBxAg peptidek

A kiválasztott X antigén (22-31, 13-26, 100-114) szekvenciákat a fmoc módszerrel a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Kémiai Intézetében (Dr. Tóth Gábor) kémiailag szintetizálták. A szintetikus peptideket HPLC-vel tisztították és a szekvenciák tömegspektrometriai módszerrel ellenőrizték.

Monoklonális anti-HBxAg ellenanyagok előállítása

Az immunizáláshoz 6-8 hetes, nőstény, BALB/c egereket használtunk. Az egerek (BALB/c) immunizálását az intézetünkben előzetesen kidolgozott protokoll alapján végeztük (Najbauer 1986, Balogh 1994). Az alapimmunizálását (intrakután) komplett Freund adjuvánssal, a megerősítő immunizálást (intrakután és intraperitoneálisan) inkomplett Freund adjuvánssal végeztük. Az antigén ellenes antitestek titerét az immunizált állatok szemzugából vett poliklonális szérumok ELISA vizsgálatával követtük nyomon. Antigénként 20μg/200μl rekombináns proteinA-HBxAg-t (pA-HBxAg), illetve a tireoglobulin-HBxAg$_{13-26}$ (TG-HBxAg$_{13-26}$) szintetikus peptidet használtunk. Két nappal az utolsó immunizálás után végeztük el a sejtfúziót. A hibridómákat Köhler és Milstein (1975) módszere alapján állítottuk elő. A lépsejteket Sp-2/0-Ag14 nemszekretáló, HGRT egér myeloma sejtvonallal (Flow Labs, UK) fuzionáltattuk 4 : 1 arányban, polietilén glikol-t használva (Mw: 6000, Sigma). A sejteket DMEM+10% FCS tartalmú tápoldatban növesztettük. A hibridómákat HAT: hypoxanthin (0,1 mM) thimidin (0,016 mM) és aminopterin ($4x10^{-4}$mM) tartalmú DMEM+20%FCS (Gibco, USA) tápoldaton szelektáltuk. A hibridóma felülúszókat ELISA-val (enzyme linked immunosorbent assay) teszteltük. Antigénként a glutation S transzferáz-HBxAg (GST-HBxAg) és tengeri csiga hemocianin-HBxAg$_{13-26}$ (KLH-HBxAg$_{13-26}$) konstrukciókat használtuk. (Az immunizálás és a hibridóma klónok tesztelésére használt eltérő karrier molekulát tartalmazó konstrukciók alkalmazásával a keresztreakciók a hordozó molekulák ellen kivédhetőek voltak.) A kiválasztott hibridómákat véghigításos módszerrel klónoztuk. A legjobb klónokból, monoklonális ellenanyagot állítottunk elő a további immunszerológiai, és immunhisztokémiai vizsgálatokhoz. Az immunizált állatoktól nyert poliklonális szérumokat szintén felhasználtuk a további vizsgálatainkhoz.

Monoklonális anti-HBxAg ellenanyagok jellemzése

ELISA

A poliklonális és monoklonális ellenanyagokat indirekt ELISA módszerrel teszteltük, melynek során antigénként HBxAg-GST-t, valamint a KLH-HBxAg$_{13-26}$ szintetikus peptidet használtuk. A specificitás kontrollja immunoblottal történt.

Az ELISA vizsgálatokat a következőképpen végeztük: a mikrotitrátor lemezhez (Nunc, USA) egy éjszakán keresztül 4 ºC-on 2μg/ml HBxAg-GST-t, illetve GST-hez fúzionáltatott HBxAg fragmenseket, KLH-HBx$_{13-26,aa.}$ kötünk ki karbonát pufferben (pH 9,6). 0.02 % Tween 20 (Sigma, USA) tartalmú PBS-ben történő háromszori mosás után telítettük a lemezt 0.5 % PBS-zselatinnal. Ezek után 37 ºC-on, 1 órán át inkubáltuk a felülúszókkal, illetve a kifejlesztett tisztított monoklonális antitestekkel 0.5 μg/ml koncentrációban. Háromszori mosás után tormaperoxidázzal jelölt anti-egér Ig-vel (Dako, Dánia) történő, 1 órás inkubáció következett, 37 ºC -on. A mikrotitrátor lemez mosása után a reakciót o-fenilén-diaminnal (Fluka, Németország) hívtuk elő. Az OD értékeket 492 nm-en mértük automata mikrofotométer (Dynatech MR 7000, USA) segítségével.

Izotípus meghatározás

A monoklonális ellenanyagok izotípusát indirekt ELISA módszerrel, Monoclonal Antibody Isotyping Reagent Kit (Sigma) segítségével határoztuk meg, követve a gyári protokoll utasításait.

SDS-poliakrilamid gél elektroforézis és Western blot

A fehérjéket 15 %-os gélen választottuk el Laemmli módszere alapján (1970), Mini-Protean 3 apparátussal (Bio-Rad). Az elválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra (Schleicher and Schuell) blottoltuk 4°C-on egy éjszakán át (Towbin, 1979). A nitrocellulóz membránokat PBS / 0.5 % Tween oldattal mostuk a reakciólépések között. A blottolás hatékonyságát Ponceau festéssel ellenőriztük a membránokon. A nitrocellulózt 2%-os sovány tejporral (Sigma) blokkoltuk PBS-ben egy órán keresztül. Előhíváshoz HRPO esetében DAB (Sigma) vagy ECL (Amersham) reagenst használtuk. Kontroll ellenanyagként biotinált a-FITC monoklonális antitestet használtunk.

Anti-HBxAg monoklonális antitest epitópjának tömegspektrometriai meghatározása

Az antigén, gélben történő tripszines emésztését végeztük (Kele, 1998). Natív elektroforézis után a gél sávokat finoman szétvágjuk. A proteint dithiothreitollal redukáltuk és jodoacetamiddal alkalikus kémhatást állítottuk be (pH 8.0). Tripszin (1: 10 higításban) hozzáadása után a mintákat egy éjszakán keresztül 37 ºC-on inkubáltuk. A peptid-fragmentumokat a gélből kioldottuk (5 % hangyansav, 50 % metilaklohol, 45 % víz). Az egyes peptidek elválasztást HPLC-vel, 4.0 x 250 mm, Nucleosil 5C18 300Å oszlopon végezzük (0.1 % trifluorecetsav 80 %-os vizes acetonitril oldószerekben, 5-95 % 40 min grádiens mellett, 1.0 ml/min átfolyási sebességgel, 215nm-en detektálva). A HPLC-n elválasztott frakciókat (Browne, 1982) ELISA rendszerben teszteltük, a pozitív frakciókat tömegspektrometriai módszerrel analizáltuk. TSQ7000-es tripla-quad tömegspektrométeren vizsgáltuk, nano-ES/MS/MS (Wilm, 1996).

A random peptid könyvtár screenelése

A filamentózus fág pVIII-as köpenyfehérjéjén megjelenített kilenc aminosavas random peptid könyvtár Alessandra Luzzago (IRBM, Roma) nagylelkű ajándéka volt. A fágok dúsítását a korábban leírtak szerint (Parmley és Smith, Gene, 1988, 73: 305; Felici, 1991) végeztük. A petricsészét egy éjszakán át érzékenyítettünk anti-HBxAg antitesttel (40 μg/ml az első, 4 μg/ml a második dúsítási ciklusban). 0.05 % Tween-20-t tartalmazó PBS-el történt mosás,

majd 3% BSA-PBS-el való blokkolás és újabb mosás után, 10^{10} fágot (1% BSA-PBS-el blokkolva) adtunk a lemezhez. 2 órás 37 °C-on végzett inkubáció és Tweent-20-t (0.05 % az első, 0.5 % a második ciklusban) tartalmazó PBS-el történt mosás után, a fágokat eluáltuk (1mg/ml BSA , 0.1 M glycine pH 2.2 HCl), majd neutralizálást követően (2M Tris Base) XL1-Blue *E.coli*-t fertőztünk velük. M13KO7 helper fággal történt felülfertőzés után a fágokat kicsaptuk (16.7 % PEG8000, 3.3 M NaCl) és egy második dúsítási ciklust kezdtünk. A második ciklus után a fágokkal fertőzött majd M13KO7 helper-fággal felülfertőzött XL1-Blue *E.coli* telepeket nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránokat blokkolás után (TBS / 0.05 % Tween-20 / 5 % tejpor) 2 órán át inkubáltuk anti-HBxAg antitesttel (1 μg/ml), majd 1 órán át alkalikus-foszfatáz konjugált anti-egér IgG másodlagos antitesttel. Az előhívást BCIP / NBT szubsztráttal végeztük. Így negyven pozitív klónt választottunk ki, amelyeket ELISA-val tovább teszteltünk, oly módon, hogy a fágokat kötöttük ki a lemezre. Az ELISA alapján tíz klónból DNS-t izoláltunk amit ABI Prism 310-es készüléken megszekvenáltattunk. Eredményünket átfedő rekombináns GST-HBxAg fragmenseken ellenőriztük.

Immunhisztokémiai vizsgálatok humán májbiopsziás anyagból származó, formalin-fixált, paraffinba ágyazott metszeteken

Immunhisztokémiai vizsgálatainkat 72 humán hepatitis B vírus fertőzött májbiopsziás anyagból származó, formalin-fixált, paraffinba ágyazott metszeteken végeztük. A minták megoszlása diagnózis szerint: akut hepatitis (10), krónikus hepatitis (45), máj cirrózis (9) és elsődleges májrák (8) volt. A mintákat a Hisztopatológia Kft. (Dr. Szekeres György), a Baranya Megyei Kórház Kórbonctani Osztálya (Dr. Hegedűs Géza) és a Zala Megyei Kórház Pathológiai Osztálya (Dr. Sipos József) bocsátotta rendelkezésünkre. A metszeteken immunfestést végeztünk streptavidin-biotin peroxidáz komplex (Immunotech Inc., Franciaország) technikával. Első ellenanyagként az intézetünkben előállított monoklonális anti-HBxAg-t (klónszám: 3F6G10, IgG2a), illetve az összehasonlító vizsgálatohoz kereskedelmi forgalomból származó, kecske anti-HBsAg-t és nyúl anti-HBcAg-t (Dakopatts, Dánia) poliklonális ellenanyagokat használtunk. Kontrollnak az IgG2a izotípusú (anti-CD45RO, klón: UCHL-1; Immunotech Inc., France) monoklonális antitestet használtunk.

Humán szérum minták

Szerológiai vizsgálataink során 186 hepatitis B vírus pozitív humán szérumot vizsgáltunk, meg anti-HBxAg sandwich ELISA rendszerünkkel. A szérumok a következő diagnózis megoszlás szerint állíthatók sorba: akut hepatitis (14), krónikus hepatitis (80), tünetmentes HBsAg hordozó terhes nő (80) tünetmentes hordozó (12) és egészséges kontroll (22). A szérumban keringő antigén mennyiségi meghatározása mellet vizsgáltuk a HBxAg fragmensek segítségével a szérumban az X antigén különböző epitópjai ellen termelődött ellenanyagok arányát. A szérumokat a Johan Béla Országos Epidemiológiai Központ, Virológia laboratóriumától és a PTE ÁOK I. Belgyógyászati Klinika Gasztroenterológiai laboratóriumától kaptuk.

Szendvics ELISA

Mikrotitrátor lemezhez egy éjszakán keresztül 4 ºC-on 10μg/ml befogó anti-HBxAg monoklonális ellenanyagot (klón: 3F6/G10) kötöttünk ki karbonát pufferben (pH 9.6). 0.2 %. Tween-20 tartalmú PBS-ben történő háromszori mosás után telítettük a lemezt 0.5 % PBS-zselatinnal (Sigma, USA). A standard sor HBxAg-GST antigént tizenkét léptékű felező hígítását (1 / 10 higítású normál szérummal) pH 2-es glicin pufferben inkubáltuk 56 ºC-on, 10 percig, majd 1M Tris-sel pH 8-9-re állítottuk be. A hepatitis B pozitív és az egészséges kontroll szérumokat 10-es higításban használtuk és hasonlóan kezeltük mint a standard sorhoz használt rekombináns antigént. Ezek után 37 ºC-on, 6 órás inkubáció után biotinált, második *detektáló*

anti-HBxAg monoklonális ellenanyag (klón: 4F1/A9) 1 órás inkubációja következett, 37 ºC -on. A mikrotiter lemez mosása után streptavidin-peroxidáz reakciót o-fenilén-diaminnal hívtuk elő. Az OD értékeket 492 nm-en mértük (Thermo Labsystems IEMS Reader MF, Finland) automata mikrofotométer segítségével. A mért optikai denzítás értékeket a HBxAg mennyiségének meghatározása esetén interpoláltuk a GST-standard kalibrációs görbéhez, az illesztéshez automata kalkulációs programot használtunk. (Labsystems Ascent Software 2.4 for IEMS Reader MF). A sandwich ELISA mérőrendszer specificitását immunoblottal végeztük.

Indirekt ELISA

Az anti-HBxAg antitestek kimutatására indirekt ELISA módszert használtunk. Melynek során antigénként a HBxAg-GST-t, valamint GST-hez fúzionáltatott HBxAg fragmenseket és szintetikus KLH-$HBx_{13\text{-}26,aa}$ peptid konjugátumot használtunk. A GST elleni keresztreakció kizárására minden szérumot teszteltünk GST-re. A protokoll megegyezik a **ELISA alfejezetében** ismertetettel. Az aspecifikus helyek telítése után 37 ºC-on, 1 órán át inkubáltuk a szérumok százszoros higításával. Háromszori mosás után tormaperoxidázzal jelölt anti-humán IgG és IgM-mel (Dako, Dánia) történő, 1 órás inkubáció következett, 37 ºC -on. A mikrotitrator lemez mosása után a reakciót o-fenilén-diaminnal (Fluka, Németország) hívtuk elő. Az OD értékeket 492 nm-en mértük (Thermo Labsystems IEMS Reader MF, Finland) automata mikrofotométer segítségével.

Szendvics típusú mikrogyöngy alapú áramlási citometriai esszé

A szendvics ELISA-ban használt monoklonális antitest párt használtuk egy mikrögyöngy alapú áramlási citometriai mérőmódszer kifejlesztéséhez. Az ELISA rendszerben antigén-kötő anti-HBxAg monoklonális antitestet (3F6/G10) az előzetes protokoll (Carson and Vignali, 1999; Cook, 2001) szerinti előkészített 7.5 nm átmérőjű polystirén mikrogyöngyökre (BD Biosciences USA) kötöttük thiol-maleimid alapú kovalens kötéssel. A jelölt mikrogyöngyöket 4 ºC -on tároltuk. A mikrogyöngyöket használat előtt (1000 gyöngy / minta) mosó pufferben szobahőmérsékleten ultrahanggal (37 kHz, 100 W, 2 min) regeneráltuk. Az összes szérum mintát előkezeltük a szendvics ELISA protokollja alapján. A mintákat 1000-1000 mikrogyönggyel inkubáltuk 4 órán keresztül 37 ºC -on. A minták háromszori mosása után 1 órán keresztül inkubáltuk a mintákat a biotinált antigén-detektáló anti-HBxAg (4F1/A9) monoklonális antitesttel (2ug/ml). Mosási lépések után a mintákat streptavidin-FITC (DAKO) 1 / 100-as higításával inkubáltuk 37 ºC -on 1 órán keresztül. Végül a minták háromszori mosása után FACSCalibur áramlási citométerrel (BD Biosciences USA) mértük meg. Továbbiakban a mért FITC intenzítás értékeket FCAP Array (SoftFlow, Hungary) programmal illesztettük a standard sor értékeire, amely alapján a program megadta a HBxAg szérum koncentrációit.

Statisztikai analízis

A statisztikai analízist és az adatok ábrázolását egy IBM PC kompatibilis személyi számítógépen futtatott SPSS 9.0 (SPSS Inc., 233 S Wacker Drive, Chicago, 60606, Ill., USA) programcsomaggal végeztük. Az ELISA eredményeket regresszió analízisét mind a három csoportban (akut, krónikus és hordozó) minden mintával minden minta ellen mátrixban elvégeztük (N, C, C1, C2, C3, X, $X_{13\text{-}26,}$ HBxAg). A 0.4-nél kisebb abszolút értékű regressziós koeficinenssel ($|R| > 0,4$) rendelkező és/vagy a $P > 0.05$ párokat elvetettük.

Anti-HBxAg antitestek epitópjainak homológia analízise

Homológia analízist végeztünk a HBxAg (gi: 4704317) ellen kifejlesztett antitestjeink ismert epitóp (13–26 és 89–94) szekvenciáival. A szekvenciáinkat lefutattuk BLAST protein adatbázisban (adatbázis mérete 2004 szeptember = 688443072), BLASTP 2.2.9 programot használtuk (Altschul 1997). Az eredményeket Entrez (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) opciók alapján limitáltuk, „hepatitis B virus" [ORGANISM] és „X protein" [PRODUCT] kulcsszavakal.

Eredmények

1. A HBxAg immunogenitásának számítógépes modelleken történő térképezése és a predikciós eredmények alapján kifejlesztett rekombináns HBxAg fragmensek

A számítógépes analízis során a 17 kDa-on tömegű, 154 aminosavból álló fehérje másodlagos szerkezetét a Chou-Fasman és Garnier-Osgothorpe-Robinson predikciós módszerekkel vizsgáltuk. A fehérje szekvenciájának első harmadában, illetve a C-terminális szakaszon találunk csavarodásokat. A 75. aminosavtól a 130.-ig nagy számban találunk alfa-hélixeket. További hélixeket valószínűsített a Chou-Fasman analízis a 10-15 aminosav szekvencia között. A béta lemezes szerkezet a lánc egész hosszúságában megtalálható. A HBxAg glikolizáltsági foka igen alacsony volt. A 154 aminosavból 84 (54 %) volt erősen hidrofób aminosav. Részben ez utóbbi fiziko-kémiai tulajdonsággal magyarázható, hogy a HBxAg fehérjét a hagyományos biokémiai eljárásokkal nem sikerült eddig tisztán izolálni, mert vizes oldatokban könnyen kicsapódik.

A számítógépes modellezés lehetőséget nyújtott az immunreaktivítás szempontjából meghatározónak valószínűsíthető peptid szekvenciák kiválasztására is. A *Jamson és Wolf* antigenitási index alapján két szekvenciát (22-31 és 100-114) választottunk ki a további vizsgálatainkhoz.

Poliklonális ellenanyagaink a 22-31 peptiddel intenzívebb reakciót adtak, mint a 100-114 szekvenciával, ami jól korrelált a számítógépes vizsgálat során kapott predikciónkkal (nem ábrázolt adat). Az anti-HBxAg hibridómák szelekciója során azonban nem kaptunk a szintetikus peptidekkel megfelelően reagáló klónokat.

A peptid szekvenciák kiválasztásával egyidejűleg az X fehérje immunológiai térképezésének elvégzéséhez a predikciós eredményeink alapján további rekombináns X fragmens szekvenciákat határoztunk meg.

Továbbiakban a predikciós eredményekre alapozva a kiválasztott HBxAg fragmensekre primer párokat terveztünk. Négy primer párral pGEX vektorba klónozott HBxAg szakaszt templátként használva PCR-t végeztünk.

A tisztított termékeket *BamH*I majd *EcoR*I restrikciós enzimekkel emésztettük, pGEX vektorba ligáltuk, majd a kapott konstrukciókkal DH5α E.coli-t transzformáltunk. Az olvasási keret helyességét mindhárom plazmidnál szekvenálással ellenőriztük. Az átfedő rekombináns peptideket anti-HBxAg ellenanyaggal ELISA rendszerben teszteltük.

A predikciós technikák kritikai analízisét egy konzervatív fehérje a mitokondriális citrát szintáz (CS) összehasonlító *in silico* és *in vitro* (immunszerológiai) vizsgálati eredményeinek összevetésével is elvégeztük.

2. A rekombináns és szintetikus antigének ellen kifejlesztett anti-HBxAg monoklonális ellenanyagok. Az antitestek immunszerológiai és immunhisztokémiai jellemzése

Két jó növekedési tulajdonságokkal rendelkező, magas affinitású anti-HBxAg szekretáló hibridóma sejtvonalat sikerült előállítanunk. A 3F/G10 klónszámú antitestet kifejlesztése során pA-HBxAg rekombináns antigén molekulával immunizáltunk és GST-HBxAg-re teszteltük a hibridómák által termelt antitesteket a hordozó molekulával való keresztreakció elkerülése miatt.

A másik anti-HBxAg monoklonális antitestet (4F1/A9) tömegspektrometriai és irodalmi adatok alapján egy meghatározott X antigén szekvencia ellen, szintetikus peptid antigén fragmens felhasználásával fejlesztettük ki. Ebben az esetben is a magas specifitás érdekében eltérő hordozó molekulákat használtunk immunizáláshoz (tireoglobulin, TG) és a hibridómák teszteléséhez (tengeri csiga hemocianin, KLH és végül rekombináns GST-HBxAg) használtunk.

Az izotípus meghatározás során a (3F6/G10) klón IgG2a, a másik (4F1/A9) klón IgG1 osztályúnak bizonyult.

Monoklonális antitestek (5 ng/minta) immunreaktivitásának immunszerológiai vizsgálatához a GST-HBxAg-t használtuk fel 200 ng/minta koncentrációban. Mindkét ellenanyag specifitását immunoblottal ellenőriztük, az ábrán látható az anitestek kizárólagos kötődése a cél antigénhez.

Az immuhisztokémiai jellemzés során formalin fixált parafinba ágyazott különböző normál humán szöveteken (tüdő, vese, máj, porc) és törzsfejlődésileg alacsonyabb rendű szervezetek szövetein (földigiliszta, egér) tesztelt 3F6/G10 klónszámú monoklonális antitest nem mutatott semmi keresztreakciót.

Azonban intenzív immunreakciót találtunk humán májbiopsziás mintákban, - amelyek krónikus hepatitis B vírushordozó betegekből származtak - különböző szövettani és sejtszintű elhelyezkedésben.

3. Anti-HBxAg monoklonális ellenanyaggal végzett immunhisztokémiai vizsgálat eredményei hepatitis B vírussal fertőzött betegek májbiopsziás anyagán

A vírussal fertőzött májsejtekben talált HBxAg lokalizációja szerint azonos arányban előfordult citoplazmatikus és nukleáris és egyes eseteken perinukleáris elhelyezkedés is. Néhány másik esetben kizárólagos nukleáris pozitivitást találtunk.

Szövettani elemzésünk során 72 klinikailag ellenőrzött hepatitis B vírushordozó májbiopsziás mintát vizsgáltunk meg. Elemeztük a HBxAg mikroszkopikus megjelenését és a jelölődés intracelluláris lokalizációját az általánosan elfogadott rangsorolás szerint.

A legtöbb HBxAg pozitív esetet a krónikus B vírusos hepatitisben szenvedő betegek csoportjában (86,6 %) találtuk heterogén mikroszkopikus megjelenésben. A biopsziás minták 40-50 %-a mutatott HBxAg pozitivitást az B vírusos: akut hepatitises, májcirrózisos és elsődleges májrákos csoportokban. A HBxAg szövettani és sejtszintű megoszlása változó formákat mutatott minden egyes csoportban.

A pozitív sejtek frekvenciája a krónikus B vírusos hepatitises és elsődleges májrákban volt a legmagasabb, az immunreakció intenzitása az elsődleges májrák csoportjában volt a legerősebb.

Anti-HBxAg immunhisztokémiai jelölődése többnyire citoplazmatikus és nukleáris mintázatot mutatott. Az akut hepatitis és krónikus hepatitis minták többségében a jelölődés góc mintázatot mutatott (lokalizált, jól körülírható HBxAg pozitív területek a citoplazmában). Mérsékelt sejt membrán jelölődést találtunk az egyik krónikus hepatitises esetben szemcsés citoplazmatikus és nukleáris jelölődés mellett. A citoplazmatikus X-antigén jelölődése egyes esetekben kifejezett szemcsézettséget mutatott, diffúz nukleáris pozitivitás mellett. Túlnyomóan nukleáris immun-pozitivitás volt jellemző szórt megjelenési formával egyes krónikus hepatitis mintákban.

Az anti-HBxAg antitesttel jellegzetesen erős és egységes nukleáris immunreakciót találtunk az ép májszövet minden egyes sejtjében májrák esetében, mérsékelt citoplazmatikus jelölődéssel. Kontroll májbiopsziás mintákon antitestünkkel nem kaptunk semmilyen aspecifikus reakciót.

A monoklonális anti-HBxAg antitest immunhisztokémiai jelölődését összehasonlítottuk másik két kereskedelmi forgalomban megvásárolható hepatitis B vírus antigén ellenes (anti-HBsAg és anti-HBcAg) poliklonális antitest reakciójával.

A napi laboratóriumi gyakorlatban az „S" (surface) és „C" (core) antigének vizsgálatát használják az elsődleges diagnózisokra, mint előrejelzési tényezőket. A mi monoklonális antitestünk jelentősen érzékenyebb reakciót mutatott krónikus hepatitises betegek csoportjában, mint az anti-HBsAg és anti-HBcAg antitestek. A további csoportok alacsony mintaszáma miatt egyértelmű következtetést nem vonhatunk le.

4. Anti-HBxAg monoklonális ellenanyag epitópjának meghatározása során kapott eredmények.

Egyik monoklonális ellenanyagunk (klónszám: 3F6/G10, IgG2a), amely alkalmasnak bizonyult mind immunszerológiai, mind immunhisztokémiai vizsgálatokra, közel 100 humán májbiopsziás mintán végzett retrospektív vizsgálat arra utalt, hogy ellenanyagunk egy prognosztikailag fontos epitópot ismer fel, ezért szükségesnek tartottuk ezen monoklonális ellenanyagunk pontos idiotípus specificitásának meghatározását.

A monoklonális ellenanyagok epitóp specifitásának meghatározására számos módszer ismert, ami egyben azt is mutatja, hogy nincs egy általánosan elfogadott, minden antigénre és ellenanyagra alkalmazható technika.

A predikciós vizsgálataink során kiválasztott igen magas antigenitási értékkel rendelkező peptid szekvenciákhoz (26-31 és 100-114) az antitestünk nem kapcsolódott. A peptidek tesztelését ELISA rendszerben végeztük.

Továbbiakban az epitóp vizsgálatát limitált proteolízishez kapcsolt tömegspektrometriával kíséreltük meg. A rekombináns HBxAg részleges proteolízisét tripszines emésztéssel végeztük, a peptideket molekulasúlyuk alapján 215nm-en detektálva, HPLC alkalmazásával elválasztottuk egymástól. A peptid frakciókat ELISA rendszerben teszteltük a 3F6/G10 klónszámú monoklonális antitestünkkel. A pozitív frakciók tömegspektrometriai elemzése alapján egy peptidet ($_{14}$DVLCLRPVGAESR$_{26}$) lehetet meghatározni az első pozitív reakcióban a tripszines emésztés során képződött antigén fragmensek közül. A megszintetizált X fehérje fragmenst viszont az antitestünk nem ismerte fel.

A predikciós és tömegspektrometriai vizsgálataink valószínűleg az antigén szerkezete és e módszerek elvi korlátai miatt nem vezettek eredményre.

Az epitóp meghatározását kilenc aminosavas, filamentózus fág felszínen megjelenített random peptid könyvtár segítségével folytattuk. A monoklonális anti-HBxAg antitestünkkel megszűrtük a random peptid könyvtárat. A vizsgálat eredményeként tíz (10) fág klónt választottunk ki a DNS szekvenálásra. A klónok a szekvenciáinak összehasonlítása alapján kaptunk egy, az LPXXLH-val megegyező szekvenciát. Ez a szekvencia megtalálható a HBxAg elsődleges aminosav szekvenciájának 89.-94. intervallumában.

A kapott eredmény megerősítésére a HBxAg 79.-143. aminosavig terjedő szakaszából - a predikciós modell-vizsgálat eredményeit felhasználva - négy átfedő GST-fúziós peptidet expresszáltattunk *E.coli*-ban, melyeket ELISA-val teszteltünk. Az átfedő fragmensek tesztelése során nem kaptunk reakciót a 97.-136. és a 117.-143. aminosavakat lefedő peptid-fragmensekkel, viszont az előzőleg random peptid könyvtárral meghatározott LPXXLH szekvenciát tartalmazó 79.-117. és a 79.-143. aminosavat tartalmazó peptid-fragmensekhez az antitestünk kapcsolódott. A 3F6/G10 klónszámú monoklonális antitestünk epitópja a HBxAg

aminosav-szekvencia alapján az ($_{89}$LPKVLH$_{94}$) aminosavakat tartalmazza. A meghatározott epitópú 3F6/G10-es klónszámú monoklonális antitestünk 89.-94. aminosav tartományhoz kötődik. A másik 4F1/A9-es antitestünk epitópja - amelyet ismert aminosav-szekvenciájú peptid ellen fejlesztetünk ki - a 13.-26. aminosav között található.

5. A HBxAg és az anti-HBxAg antitestek detektálására kifejlesztett immunesszék. mérési eredményei

Szerológia vizsgálataink során 186 hepatitis B vírus pozitív humán szérumot vizsgáltunk meg. Az antigén mennyiségi meghatározását az általunk kifejlesztett anti-HBxAg szendvics ELISA rendszerrel végeztük el, emellett az előállított HBxAg fragmensek segítségével a szérumban az X antigén különböző epitópjai ellen termelődött ellenanyagok arányát is meghatároztuk.

Első lépésként a monoklonális antitest pár specifitását teszteltük rekombináns HBxAg-el és HBV fertőzött betegekből származó szérum-mintákon immunoblot technika felhasználásával. Az antitestjeink más szérum komponensekkel nem reagáltak.

A vizsgálatot 12 HBV pozitív mintán és 5 HBV negatív mintán végeztük el. Az immunoblot ábrán 3 reprezentatív hepatitis B pozitív és egy hepatitis B negatív mintán az antitestjeink specifitásának vizsgálata látható.

Az immunszerológiai esszé kifejlesztésének első lépéseként homológia vizsgálatot végeztünk a két antitestünk epitóp-szekvenciája, a hepatitis B vírus alcsoportok szekvenciája és a BLAST adatbázis fehérje szekvenciái között. A homológia vizsgálat alapján az antitestjeink felismerési helyei kizárólag a hepatitis B vírus X antigénjében találhatóak és konzervatívak a vírus alcsoportokban.

Szendvics típusú ELISA-t fejlesztettünk ki, a standard sorhoz rekombináns GST-HBxAg-t alkalmaztunk. Előzetes vizsgálatokra alapozva a 3F6/G10 jelű antitestünket alkalmaztuk „befogó” antitestnek és a 4F1/A9 jelű antitestünk lett a „detektáló” antitest. Esszénk optimális érzékenységi tartománya legalacsonyabb 4 ng/ml és a legmagasabb 2000 ng/ml kimutatott értékek közé esik.

A HBxAg detektálását 128 humán szérumban végeztük el. A hepatitis B vírus pozitív minták diagnózisuk szerint a következőképpen csoportosíthatóak: akut hepatitis (14), krónikus hepatitis (80), tünetmentes hordozó (12), a vizsgálatba negatív kontrollként (22) egészséges kontroll szérumot vizsgáltunk meg. Az esszé negatív tartománya a negatív (vak) minta és a kontroll szérumok optikai denzitás értékei és a hozzájuk tartozó standard deviencia kétszeresében volt meghatározva, ng/ml értékben kifejezve 4 ng/ml alatti értékeket negatívnak minősítettük.

A HBxAg-t az akut B vírus fertőzésben szenvedő betegek szérumának 64 %-ban, a krónikus stádiumban lévő betegek szérumának 76 %-ban és a tünetmentes hordozók 50 %-ban tudtuk az esszénkkel detektálni. Az antigén koncentrációja 18.2 ng/ml és 1803.86 ng/ml érékek közé esett. A krónikus stádiumban a pozitív esetek HBxAg koncentrációjában volt a legnagyobb a szórás, a +:0-200 ng/ml-es intenzitási csoportba esik a legtöbb szérum minta, de az 1000 ng/ml feletti HBxAg koncentrációt kizárólag ebben a csoportban detektáltunk. Az akut csoportban az X antigén koncentrációja dominánsan 500-1000 ng/ml határok közé esett. A hepatitis B vírus fertőzött, de tünetmentes hordozói csoportban a vírus X fehérjéjének alacsony 200 ng/ml alatti koncentrációját tudtuk kimutatni.

Az egészséges kontrollok esetében konzekvensen nem tudtunk HBxAg-t kimutatni a szérumból.

Összefüggéseket kerestünk a betegség stádiuma, a keringő antigén mennyisége és a természetes anti-HBxAg IgG illetve IgM izotípusú antitestek epitóp mintázata között. Az emberi szervezetben termelődött anti-HBxAg antitestek feltérképezésére a rekombináns HBxAg-t

(10-143 aminosav) és öt rövidebb rekombiáns fragmensét valamint az N-terminális (13-26 aminosavat tartalmazó) szintetikus peptidet használtunk. Vizsgálatunkat ugyanazokon a szérum mintákon végeztük, amelyeket a keringő antigén mennyiségének meghatározásához alkalmaztunk. Az egyéni eltérések viszonylag egyneműek voltak a titer mintázatban, kivéve a krónikus hepatitises csoport IgG izotípusú anti-HBxAg antitestjei esetében kaptunk karakteres különbségeket. Mindkét izotípusnál a legerősebb anti-HBx választ a leghosszabb rekombináns fragmens (10-143 aminosav) ellen kaptuk. A rekombináns C-terminális fragmens (C1: 79-117 aminosav) része egyértelműen pozitív volt mindkét izotípus esetében a krónikus csoportban, illetve anti-IgG-HBxAg immunválasz során az akut csoportban. A további immunreakciók hasonló jellegűek voltak az akut és a tünetmentes hordozók csoportjaiban. A szintetikus (13-26) aminosavat tartalmazó fragmensre a vizsgált 106 hepatitis B vírus fertőzött beteg szérumából csak öttel kaptunk pozitív reakciót, három IgM választ az akut csoportban és két IgG választ a krónikus csoportban (nem ábrázolt adat).

Természetes anti-HBxAg antitest válasz vizsgálata rekombináns HBxAg szetten.A különböző HBxAg fragmensek elleni természetes anti-HBxAg antitest titer és a HBxAg szérumkoncentrációja között regresszió analízist végeztünk, hogy felfedjünk esetleges rejtett összefüggéseket a betegség stádiuma és a kapott paraméterek között.

Az akut B vírusos hepatitis csoport regresszió analízise során a csoportban az IgM izotípusú antitestek reakciója az összes antigén fragmenssel igen magas korrelációs értéket adott. Az analízis értékei kitüntetett szerepét mutatják a C1-es fragmensnek az IgG típusú immunválaszban, illetve az N-terminális receszív jellegét. Erős összefüggés volt a szérum HBxAg szintje és a leghosszabb (10-143) fragmenssel szembeni antitest specifitás között.

A krónikus B vírusos hepatitis csoport regresszió analízise során IgG dominanciát találtunk ebben a csoportban a C fragmensek preferálásában. Mérsékelt összefüggés kaptunk a HBxAg szérum szintje az IgG válasz között. Az N-terminális preferáltsága is egyértelműen növekedett az akut csoporthoz képest. Viszont az IgM válasz homogenitása elveszett és viszonylagosan kitüntetett N-terminális mellett megjelent a C fragmensek elleni immunválasz korrelációs összefüggéseinek domináns jellege.

A tünetmentes B vírushordozók regresszió analízise során karakterisztikus IgM dominancia tapasztalható a korrelációkban, hangsúlyos C-terminális és mérsékelt N-terminális korrelációk mellett. Viszont az akut csoporthoz képest az IgM válasz heterogenitása figyelhető meg. Az IgG típusú felismerésben a C1 és N-terminális mérsékelt kapcsolata mutatható ki a szérum HBxAg szintje között.

6. A keringő HBxAg mennyiségi meghatározása szendvics típusú áramlási citometriai mikrogyöngy esszével

Az általunk kifejlesztett szendvics típusú áramlási citometriai mikrogyöngy esszében - amelynek módszertani hátterét az előzőleg kialakított szendvics ELISA esszénk adta - ugyanazt a monoklonális antitest párt használtuk és ugyanazt a rekombináns HBxAg-t.
A 3F6/G10 klón által termelt anti-HBxAg monoklonális ellenanyagunkat kötöttük a mikrogyöngyre, majd a 4F1/A9 jelű klón által termelt ellenanyagot floureszceinizotiocianáttal (FITC) jelöltük és detektáló antitestként használtuk. A teszt optimalizálása során hasonló dinamikus tartományt tudtunk meghatározni, mint az ELISA esetében.

A két rendszer összehasonlítása során (32) krónikus B hepatitis beteg szérumát, (80) tünetmentes HBsAg hordozó terhes nő szérumát és (22) egészséges véradónak a szérumát használtuk. Az elemzés eredménye ugyanazt az érzékenységet és szelektivitást mutatta ki mérőrendszerünk mindkét szerológiai adaptációja során. A mérési eredményeink nagy fokban egyeztek a hagyományos szendvics ELISA rendszerben kifejlesztett módszerünkkel kapott eredményekkel a két rendszer korrelációs koeficiense 98.67 %-os lett.

Az eredmények megbeszélése

Munkám során egy nagymértékben hidrofób fehérje a hepatitis B vírus X antigénjét (HBxAg) vizsgáltam. Az immunológiai felismerést befolyásoló molekuláris mikrokörnyezet, ezen belül az antigének alapvető fiziko-kémiai tulajdonságainak tanulmányozása napjaink immunológiai alapkutatásának egyik fontos kérdése, ami a biotechnológia és a rutin diagnosztika számára is döntő fontossággal bír. Az immunreaktivitást meghatározó elektrosztatikus és hidrofil/hidrofób régiók térbeli elhelyezkedése az antigén molekula felszínén mind az immunológiai felismerésben, mind a kiváltott effektor válaszban meghatározó szerepet játszik. Az erősen hidrofób antigénekről általánosságban ismert, hogy nemspecifikus molekuláris kölcsönhatásokat hoznak létre, gyakran maszkírozódnak, kevésbé hozzáférhetők az immunrendszer felismerő molekulái és sejtjei számára, valamint a rejtett epitópok immunogenitása nagymértékben változik. Az eltakart reziduumok antigenitásáról kevés adat áll rendelkezésünkre.

Az epitóptérképezésre többféle módszert, köztük NMR-t és röntgen-krisztallográfiát alkalmaznak, de sikerrel határoztak meg epitópokat limitált proteolízist követő tömegspektrometriás analízissel, polypropilén tűkön szintetizált átfedő peptidekkel végzett ELISA-val, fág felszínen megjelenített random peptid vagy antigén fragmens könyvtárral, illetve rekombináns antigén fragmensekkel és predikciós modellekkel is. Az epitóptérképezésre használt módszerek többsége a szokatlan fiziko-kémiai jellegű antigének és a nem-lineáris epitópok esetében csak korrekciókkal használható. Ezeknek a technikáknak a hatékonyságát növelni lehet az antigén molekulák immunogén régióinak computer modellezésével és valószínűség-számítással. A szokatlan fiziko-kémiai jellegű antigének viszont rontják a klasszikus immunszerológiai és spektometriai technikák alkalmazásának hatékonyságát és csökkentik a számítógépes szerkezetelemzés sikerét. Ezt mi is tapasztaltuk a saját anti-HBxAg monoklonális antitestünk epitóp specifitásának vizsgálata során:

- Mivel az anti-HBxAg hibridómák szelekciója során nem az *in silico* prediktált régióban (a 22-31 és a 100-114 szekvencia) kaptunk pozitivitást a szintetikus peptidekkel végzett kontroll során, epitóptérképezést kellett végeznünk. Az irodalmi adatok szerint a teljes HBxAg szekvencia képes antitestek képzését indukálni HBV fertőzött betegekben, és a 100-114 szekvencia feltételezhetően az immundomináns régióba esik.

- A tömegspektometriai epitóptérképezés nem vezetett eredményre az anti-HBxAg (klónszám: 3F6/G10) monoklonális antitest esetében. Továbbiakban az epitóp szekvenciájának meghatározására filamentózus fág felszínén kifejezett, kilenc aminosavból álló random peptidkönyvtárat alkalmaztunk sikerrel. A meghatározott epitóp szekvencia ($_{89}$LPKVLH$_{94}$) tartalmaz egy tripszin vágási helyet. Így a tömegspektrometriai analízis első lépéseként alkalmazott tripszines emésztés miatt lecsökkent az „epitóp” szekvencia mennyisége, és a szekvenciát tartalmazó fehérje régió hidrofób jellege miatt a további kezelések során kicsapódhatott, ez lehetett az oka a sikertelen tömegspektometriai epitóptérképezésnek.

- Antitestjeink epitópjait tartalmazó szekvenciák - klón: 3F6/G10: (89-94 aminosav) és klón: 4F1/A9: (13-26) - magas antigenitással rendelkeznek Jameson és Wolf antigenitási index alapján (Jameson, 1988). *Chou-Fasman* és *Garnier* algoritmusok alapján, melyek az α-helixek és β-lemezek elhelyezkedését jósolják meg, antitestjeink epitóp szekvenciái az α-helixek és β-lemezek között, azoknak a határán helyezkednek el. Az α-helixek és β-lemezek hidrofóbok, és általában a fehérjék belsejében helyezkednek el. Karplus és Shultz-féle flexibilitási index alapján mindkét szekvencia a HBxAg molekula nagyobb flexibilitású részeibe tartozik, az algoritmus szerint ezek a szekvenciák a felszínen helyezkednek el és így részvételük az immunválaszban valószínűsíthető.

A HBxAg, illetve az antigént specifikusan felismerő monoklonális antitestek létrehozása technikailag nehéz a protein sajátos fiziko-kémiai tulajdonságai miatt mivel a molekula 54%-

ban hidrofób aminosavakból áll. A teljes protein szintetikus előállítása technikai nehézségekbe ütközik mert a HBxAg vizes oldatban kicsapódik. Ugyanakkor a HBxAg izolálása HBV fertőzött humán mintákból különleges eljárást igényel. Korábban a rekombináns HBxAg előállítására MS2-HBxAg-t, illetve leggyakrabban GST-HBxAg-t konstrukciót használtak. A GST-nek mint hordozó molekulának a használhatóságát számos antigén konstrukcióval összehasonlítva vizsgáltuk. Átfogó vizsgálatunk során bebizonyosodott, hogy GST-HBxAg megfelelő paraméterekkel rendelkezik ahhoz, hogy reagensnek használjuk az antitestek teszteléséhez és esszéfejlesztéshez.

Rekombináns HBxAg felhasználásával és a klónok párhuzamos (immunszerológiai és immunhisztokémiai) jellemzésével sikerült kifejlesztenünk olyan monoklonális ellenanyagcsaládot, mely formol-paraffinos, rutin szövettani anyagokon is alkalmas volt immunhisztokémiai vizsgálatokra.

Számos irodalmi adat szerint a HBV genomot hordozó betegekben expresszálódó HBxAg-nek a klinikai diagnózis szempontjából alapvető prognosztikai értéke van. Az irodalomban eddig közölt HBxAg immunhisztokémiai vizsgálatokat többnyire poliklonális, illetve néhány esetben monoklonális ellenanyagokkal végezték. Az adatok egyértelműen arra utalnak, hogy a HBxAg közös markerként szolgál hepatitis B vírusos májgyulladás eseteiben (akut, krónikus, cirrhosis hepatitis), valamint a PHC esetében.

A HBxAg jelenlétét több mint száz paraffinos szövettani anyagon vizsgáltuk. A hepatitis B vírus fertőzött betegek májbiopsziás szövetminták patológiai besorolásuk szerint a következő típusokba tartoztak: akut hepatitis, krónikus hepatitis, cirrózis, primer hepatocelluláris karcinóma. Retrospektív immunhisztokémiai vizsgálatunk során az akut B hepatitisben az X antigénnek körülírt sejtcsoportokra lokalizált jelölődését találtuk, domináns citoplazmatikus és mérsékelt nukleáris festődéssel. Krónikus B hepatitis mintákban az erős pozitív régiók lokalizált előfordulása mellett erősen kiterjedt, szemcsés, citoplazmás és nukleáris pozitivitást is kaptunk. Jelentékeny sejtmembrán pozitivitást találtunk egy krónikus B hepatitises esetben. A cirrózisos esetekben előtérbe került nukleáris pozitivitás mellett mérsékelt citoplazmatikus X antigén jelenlétet tudtunk detektálni. A PHC esetekben jellegzetesen erős nukleáris jelölést mutattunk ki az egész májra kiterjedten.

A különböző szerzők eltérő gyakoriságot találtak a HBxAg pozitivitásban a vizsgált populációtól és az alkalmazott anti-HBxAg ellenanyagoktól függően. Jellegzetes intracelluláris megoszlást találtak poliklonális ellenanyagokkal. A cirrózisos betegek esetében a nukleáris jelölődés 70 %-os, szemben a krónikus hepatitises esetekben talált 5-15 %-os gyakoriságú nukleáris festődéssel. Ez az eltérés a lokalizációban arra utalhat, hogy a HBxAg a krónikus májbetegség típusától függően különböző sejtkomponensekhez kapcsolódik, ezáltal a transzaktivációt szabályozó mechanizmus is eltérő lehet. A citoplazmában található HBxAg valószínűleg jelátviteli utakat befolyásolhat, míg a nukleáris lokalizáció a HBxAg transzkripciós transzaktiváló képességére utalhat. Feltételezhető, hogy a fertőzés korai szakaszában a B vírus különböző mitogén szignálokat aktivál a citoplazmában, majd későbbiekben a sejtmagban közvetlenül lép kapcsolatba különböző transzkripciós faktorokkal.

Immunhisztokémiai eredményeink mind a krónikus hepatitises, mind a PHC-s csoportokban korreláltak az irodalmi adatokkal.

Az általunk kifejlesztett monoklonális ellenanyagokkal tisztázni tudtuk, hogy a HBxAg tömegesen lehet jelen a fertőzött májsejtekben és nemcsak a citoplazmában, hanem a magban is kimutatható, ugyanakkor alapvetően új megfigyelésünk volt, hogy a monoklonális ellenanyagunkkal a HBxAg immunreaktivitásának megváltozását észleltük a sejten belüli lokalizáció függvényében. A krónikus hepatitis B vírus fertőzés során a sejtmag HBxAg pozitivitásának a növekedése a betegség prognózisának rosszabbodását és a primer hepatocelluláris karcinóma kialakulását jelezheti.

Monoklonális antitestünk (klón: 3F6/G10 epitóp: 89-94 HBxAg szekvencia) a HBxAg-nek azonos szekvenciájához kapcsolódik, mint az XAP1/DDB1 (DNS javításban résztvevő fehérje). A HBxAg-DDB1kapcsolat gátolja: a DDB1 fehérje funkcióját, a sejtnövekedést, befolyásolja a sejtek életképességét és fokozza a HBV replikációját. A humán patogén HBV-nek a HBxAg 89.-125. intervalluma fontos immunodomináns régiója és funkcionális szakasza. A predikció alapján antitestünk az antigén felszíni 89-94 determinánsához kapcsolódik. Így kimondhatjuk, hogy a magas szelektivitású antitestünk kitüntetett HBxAg szekvenciához kapcsolódik és ellenanyagunk által felismert epitópnak funkcionális jelentősége van.

Immunhisztokémiai vizsgálataink jelentőségét abban látjuk, hogy olyan epitóp specificitású monoklonális ellenanyagot sikerült előállítanunk, mely a rutin pathológiai gyakorlatban, már fénymikroszkópos szinten is jól használható információt ad a HBV fertőzés mechanizmusáról és várható prognózisáról.

Ugyan a molekuláris biológiai technikák alkalmazhatóak a HBxAg detektálására, azonban a rutin laboratóriumi szolgáltatásokhoz hagyományos immunoesszékre van szükség a nagyszámú mérés elvégzéséhez.

Sikerült két magas affinitású anti-HBxAg monoklonális antitestet kifejlesztenünk, az előzőekben már jellemzett 3F6/G10 klónszámú IgG2a izotípusú (esszénkben befogó antitest, epitóp: 89-94 aminosav szekvencia) és a 4F1/A9 klónszámú IgG1 izotípusú (esszénkben detektáló antitest, epitóp: 13-26 aminosav szekvencia) monoklonális antitesteteket. Az utóbbi antitest epitópjának jellemzésére az alábbi irodalmi adatok ismertek:

A HBV patomechanizmusának vizsgálata során jelentős fontosságú N-terminális régiókat (1-20 és 13-26) is leírtak Ehhez a régióhoz kapcsolódó XAP2 - feltételezett funkciója az X antigén transzaktiváló hatásának gátlása.

Összehasonlító szerológiai vizsgálataink során 208 hepatitis B vírus pozitív humán szérumot vizsgáltunk meg anti-HBxAg szendvics ELISA rendszerünkkel. A szérum HBxAg antigén mennyiségének meghatározása mellett vizsgáltuk a HBxAg fragmensek segítségével az X fehérje különböző epitópjai ellen termelődött természetes ellenanyagok arányát is. Elsőként vizsgáltuk kvantitatív eljárásokkal az összefüggéseket a betegség stádiuma, a keringő antigén mennyisége és az epitóp mintázat között. Egy széles körben és régóta alkalmazott, korrelációs analízist használtunk fel a korszerű adatfeldolgozás segítségével nagyszámú immunszerológiai minta több szempontú kiértékelésére. Az általunk alkalmazott mátrixstatisztikai eljárás segítségével sikerült jól jellemezhető prognosztikai csoportokat kialakítanunk: A hepatitis B vírus fertőzés akut stádiumába tartozó betegek keringő antigén mennyisége homogén képet mutat a csoportban, értéke 500-1000 ng/ml közé esik. A fertőzésnek ebben a stádiumában nincs kitüntetett régiója az IgM típusú immunválasznak, de az IgG típusú válasz során már a C1 (79-117) régió kitüntetett jellege jut érvényre a megfigyelhető N-terminális recesszivítás mellett.

A krónikus csoportban nagy szórást, karakteres különbséget tapasztaltunk a HBxAg mennyisége között, mely valószínűleg a fertőzés perzisztáló, illetve aktív jellegét mutatja. Az immunválaszt vizsgálva a krónikus stádiumban eredményeink IgG dominanciát mutatnak C-terminális (C1 régió) preferálása mellett. Emellett az N-terminális IgG típusú immunfelismerésének érvényre jutását figyelhetjük meg. Azoknál a betegeknél, akiknél érvényre jut az N-terminális negatív reguláló képessége, a krónikus fertőzés valószínűleg perzisztáló jellegűvé válhat. Azokban az esetekben ahol nincs, vagy elhanyagolható az immunválasz az N-terminális ellen feltételezhetően a krónikus fertőzés aktivizálódik. Az IgM típusú immunválaszban az akut stádiumhoz képest a homogenitás eltűnik és itt is C-terminális dominancia jelenik meg. Eredményeink alapján kimondhatjuk, hogy a HBxAg expressziójának mértéke és a kitüntetett C1 (79.-117. aminosav) régió elleni immunválasz intenzitása között szignifikáns kapcsolat van a hepatitis B vírus fertőzés krónikus stádiumában. A HBxAg C-terminálisa

transzaktivációs funkcióval rendelkezik. E régió ellen kapott erős immunválasz és az X antigén erős expressziója a hepatitis B vírus fertőzés rosszindulatú kimenetelét jelezheti.

A tünetmentes hordozók csoportjában karakterisztikus IgM típusú immunválaszt találtunk, hangsúlyos C-terminális és mérsékelt N-terminális korrelációk mellett. Az akut csoporthoz képest az IgM válasz heterogenitása figyelhető meg. Mérsékelt kapcsolat mutatható ki a C1 és N-terminális elleni IgG típusú immunfelismerés és a szérum HBxAg mennyisége között. (Ez utóbbi valószínűleg jelzi, hogy az immun-komplexek IgG antitestekből és HBxAg-ből épülnek fel.) Ez a korreláció mutatja a HBxAg transzaktivációt modósító szerepének gátlását és szerepet játszhat a tünetmentes állapot kialakulásában és fenntartásában.

Az általánosan használt immunszerológiai vizsgálati technikák elsősorban egyedi mérésekre alkalmasak. A klinikai rutin diagnosztikában és a kutatásban egyaránt fontos lehet ugyanazon mintából egyszerre több paraméter párhuzamos meghatározása. Ezt szolgálja a közelmúltban kifejlesztett áramlási citometrián alapuló un. mikrogyöngy technika is. Polisztirén mikrogyöngyöket számos immunesszében használnak hordozóként. Az áramlási citometriai mérések optimálisak nagyszámú minta gyors analízisére.

A kifejlesztett szendvics típusú anti-HBxAg ELISA-val és annak adaptációjával létrehoztunk egy mikroanalitikus immunszerológiai mikrogyöngy alapú áramlási citometriai esszét. Ezt követően elvégeztük e két rendszer összehasonlító vizsgálatát azonos humán szérum mintákon. Az így keletkezett mérési eredmények erős korrelációt mutattak.

A technikai szempontból egy adaptációt jelentő munka új összefüggések feltárására vált alkalmassá és az összeállított biostatisztikai panel további, hasonló klinikai és epidemiológiai feldolgozásokban is alkalmazható lehet.

A 208 klinikailag ellenőrzött szérum mintán végzett immunszerológiai vizsgálatunk eredménye megerősíti az X fehérje szerepét a HBV patomechanizmusában és felveti az HBxAg prognosztikus markerként való használatának előnyét.

Összefoglalás

A hepatitis B vírus (HBV) az egyik leggyakoribb humán patogén, a hepadnavírusok családjába tartozik, enveloppal rendelkezik, részleges kettősláncú DNS-t tartalmaz. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) felmérése szerint az ezredfordulón 400 millió krónikus hepatitis B vírus fertőzött ember élt világszerte. Az elmúlt évtizedben évente fél és egy millió között ingadozott a HBV fertőzés szövődményeiben elhunytak száma. A HBV fertőzés jelentősége abban áll, hogy a krónikus hordozók esetében a primer hepatocelluláris karcinóma (PHC) kialakulásának valószínűsége kétszázszorosára nő. A PHC kialakulásában nagy szerepet tulajdonítanak a hepatitis B vírus X antigénjének (HBxAg), amelyet a vírus negyedik „open reading frame”-je kódol. Ez az antigén rendkívül konzervatív, a 17 kDa-os fehérjére jellemző a nagyfokú hidrofóbicitás, 154 aminosavából 80 (54%) hidrofób jellegű, amely biológiai rendszerekben egyedülálló fiziko-kémiai szerkezetet jelent. A HBxAg egy multifunkcionális szabályzó fehérje, amely jónéhány transzkripciós faktor működését módosítja. Számos irodalmi adat szerint a HBV genomot hordozó betegekben expresszálódó HBxAg-nek a klinikai diagnózis szempontjából alapvető prognosztikai értéke van.

A HBxAg kimutatásának nehézsége annak erősen hidrofób jellegéből következik. Ismert, hogy nem-specifikus molekuláris kölcsönhatásokat hoz létre, gyakran maszkírozódik, kevésbé hozzáférhető a detektáló antitestek számára. Kimutatásához a vizsgált minták speciális kezelése szükséges.

Munkám célja kettős volt. Az első fázisban - a vírus fehérje további immunológiai térképezéséhez és immunszerológiai, immunhisztokémiai vizsgálatához - a hepatitis B vírus X antigénjével reagáló monoklonális ellenanyagokat állítottunk elő. A másik cél a rutin klinikai laboratóriumban hasznosítható immunszerológiai diagnosztikum kifejlesztése volt, mivel je-

lenleg a kereskedelmi forgalomban ilyen antitestek és szerológiai esszék nem állnak rendelkezésre.

Rekombináns HBxAg felhasználásával sikerült kifejlesztenünk olyan monoklonális ellenanyagcsaládot mely formol-paraffinos, rutin szövettani anyagokon is alkalmas volt immunhisztokémiai vizsgálatokra, ill. kombinált alkalmazásukkal lehetővé vált a humán szérumok labordiagnosztikai kvantitatív analízise is.

Antitestjeink funkcionális immundeterminánsokhoz kötődnek. Az egyik antitestünk (klón: 4F1/A9) a HBxAg N-terminális szakaszának 13-26 aminosav régiójához kötődik hasonlóan, mint az XAP2, amelynek a feltételezett funkciója az X antigén transzaktiváló hatásának gátlása. A másik antitestünk (klón: 3F6/G10) epitóp szekvenciája beleesik a DDB1 és a HBxAg kapcsolódási szakaszába (a DDB1 a DNS javításban résztvevő fehérje). A HBxAg-DDB1 kapcsolat gátolja a DDB1 fehérje funkcióját és ezen keresztül befolyásolja a sejtek életképességét, proliferációját és fokozza a HBV replikációt.

Immunhisztokémiai vizsgálataink során a HBxAg pozitivitás jellegzetes sejten belüli megoszlását találtuk. A citoplazma és a sejtmag között a pozitivitás intenzitásában jelentős eltérések mutatkoztak a hepatitis B vírus fertőzés különböző stádiumaiban. Általánosságban megállapítható volt, hogy míg a májcirrózisban és a PHC-ban dominált a sejtmag pozitivitás, addig az akut hepatitisben elsősorban a citoplazma mutatott (granuláris) pozitivitást. A krónikus hepatitisben mind a sejtmagban, mind a citoplazmában (diffúz) intenzív festődés mutatkozott. A krónikus hepatitis B vírus fertőzés során a HBxAg pozitív sejtmagok százalékos arányának a növekedése a betegség prognózisának rosszabbodását és a primer hepatocelluláris karcinóma kialakulásának kezdetét jelezheti.

Szerológiai vizsgálatokat a monoklonális ellenanyagaink kombinált alkalmazásával és az *in silico* predikciós vizsgálati eredményeink alapján kifejlesztett rekombináns HBxAg fragmensek felhasználásával végeztük, ELISA rendszerben, ill. multiparametrikus vizsgálatokhoz is alkalmas mikrogyöngy technikával. A predikciós vizsgálataink során kiválasztott magas antigenitási értékkel rendelkező szintetikus peptid szekvenciákat a poliklonális anti-HBxAg antitestjeink felismerték, ugyanakkor a hibridoma klónjaink által termelt anti-HBxAg antitestek nem. Epitóptérképezést végeztünk különböző metodikák felhasználásával, a filamentózus fágokon expresszáltatot peptidkönyvtár segítségével sikerült az ellenanyagaink által felismert aminosav szekvenciát pontosan meghatározni. A kiválasztott antitestjeink által felismert epitóp szekvenciák kitüntetett régiói a hepatitis B vírus X antigének, a kórlefolyásban fontos szerepet játszó régiókkal reagálnak, ezért alkalmasak prognosztikai vizsgálatokra.

A kifejlesztett ELISA rendszerek segítségével elsőként tanulmányozhattuk a keringő HBxAg mennyisége és az antigén különböző részei ellen termelődött ellenanyagok titere közötti összefüggést kvantitatív módszerrel, nagyszámú mintán. Vizsgálataink során 80 szérummintának, mintánként tizenhat adatát dolgoztuk fel az egymás közti korrelációk felderítésére. A bio-statisztikai feldolgozás alapján újabb adatokat találtunk a fertőzés prognózisának megítélésére: a C1 epitóp (a HBxAg 97-117 aminosav szekvencia) elleni IgG ellenanyagok magas titere és a keringő HBxAg nagy mennyisége között szignifikáns kapcsolat van a hepatitis B vírus fertőzés krónikus stádiumában. Irodalmi adatok szerint a HBxAg C-terminálisa transzaktivációs funkcióval rendelkezik. E régió ellen kapott erős immunválasz és az X antigén erős expressziója a hepatitis B vírus fertőzés rosszindulatú kimenetelét jelezheti.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném hálás köszönetemet kifejezni Dr. Németh Péter professzor úrnak, aki témvezetőmként munkámat mindvégig irányította.

Köszönöm Dr. Marczinovits Ilonának és Dr. Molnár János professzor úrnak munkám során a rekombináns fehérje technikában nyújtott segítségét és folyamatos biztatását.

Köszönettel tartozom Dr. Szekeres Györgynek az immunhiszotkémiai, Dr. Lustyik Györgynek az áramlási citometriai vizsgálatok során nyújtott segítségéért.

Szeretnék köszönetet mondani, továbbá Dr. Berencsi György professzor úrnak és Dr. Pár Alajos professzor úrnak, hogy munkámhoz biztosították a szérummintákat.

Köszönetet mondok:
Dr. Kvell Krisztiánnak és Dr. Boldizsár Ferencnek a kéziratok kritikus átolvasásáért,
Dr. Nyárády Zoltánnak a bio-informatikai munkákban,
Dr. Pálinkás Lászlónak az áramlási citometriában,
Dr. Czömpöly Tamásnak a molekuláris biológiai témájú munkákban,
Dr. Melczer Attilánénak antitestek kifejlesztésében nyújtott segítségért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm munkám során kapott segítséget az Immunológiai és Biotechnológiai Intézet minden dolgozójának.

A munka jelentős részét az **NKFP 1/48/2001,** valamint az **ETT 05-393/2000** pályázati támogatások felhasználásával végezhettem el.

Saját publikációk

Az értekezés témaköréhez közvetlenül kapcsolódó publikációk:

Folyóiratban megjelent közlemények:

1. **Pal J**, Somogyi C, Szmolenszky A A, Szekeres G, Sipos J, Hegedus G, Martzinovits I, Molnar J, Nemeth P. Immunohistochemical assessment and prognostic value of hepatitis B virus X protein in chronic hepatitis and primary hepatocellular carcinomas using anti-HBxAg monoclonal antibody. Pathol Oncol Res. 2001;7(3):178-84
2. **Pal J**, Czompoly T, Nyarady Z, Marczinovits I, Janaky T, Kele Z, Felici F, Nemeth P. Determination of the fine epitope specificity of an anti-hepatitis B virus X protein monoclonal antibody using microanalytical and molecular biological methods. Mol Immunol. 2003 Sep;40(5):241-6
3. **Pal J**, Marczinovits I, Hudecz F, Toth GK, Mezo G, Molnar J, Nemeth P. Modeling of Main Characteristics of Bullous Pemphigoid Antigen-2 (BPAG2) Peptide Structure in Serological Recognition by Autoantibodies. Pathol Oncol Res. 2004;10(1):52-6.
4. Nyarady Z, Czompoly T, Bosze S, Nagy G, Petrohai A, **Pal J**, Hudecz F, Berki T, Nemeth P. Validation of in silico prediction by in vitro immunoserological results of fine epitope mapping on citrate synthase specific autoantibodies. Mol Immunol. 2006 Mar;43(7):830-8.
5. **Pal J**, Pálinkás J, Nyárády Z, Czömpöly T, Marczinovits I, Lustyik Gy, Younes SA, Berencsi Gy, Chen R, Varró R, Pár A, Nemeth P: Sandwich type ELISA and a fluorescent cytometric microbead assay for quantitative determination of Hepatitis B virus X antigen level in human sera. J Immunol Methods. 2005 Nov 30;306(1-2):183-92.
6. **Pal J**, Nyárády Z, Marczinovits I, Pár A, Younes SA, Berencsi Gy, Kvell K, Németh P. Comprehensive regression analysis of hepatitis B virus X antigen level and anti-HBx

antibody titer in the sera of patients with HBV infection. Pathol Oncol Res. 2005 (in press)

Előadások:

1. **Pál J**., Németh P. Anti-HBxAg monoklonális ellenanyaggal végzett immunhisztokémiai vizsgálatok normál szöveteken és hepatitis B vírussal fertőzött betegek májbiopsziás anyagán. 1999. Sümeg XXIX. Membrán–Transzport Konferencia
2. **Pál J**., Németh P. A HBx immunológiai kimutatása májbiopsziás anyagokon. 2000. Budapest, Fiatal Allergiológusok és Klinikai Immunológusok Második Fóruma
3. **Pál J.,** Németh P. Anti-HBxAg monoklonális ellenanyaggal végzett immunhisztokémiai vizsgálatok normál szöveteken és hepatitis B vírussal fertőzött betegek májbiopsziás anyagán.2001. Pécs, MTA PAB, Fiatal Onkológusok Fóruma

Poszterek:

1. **Pál J**., Németh P. Anti-HBxAg monoklonális ellenanyaggal végzett immunhisztokémiai vizsgálatok normál szöveteken és hepatitis B vírussal fertőzött betegek májbiopsziás anyagán. 1999. Sümeg XXIX. Membrán–Transzport Konferencia
2. **Pál J.,** Janáky T., Marczinovits I., Molnár J., Németh P. Anti-HBxAg monoklonális ellenanyag specificitásának meghatározása tömegspekrográfiai és immunológiai módszerekkel. 1999. Bük, Magyar Immunológiai Társaság XXIX. Kongresszusa
3. **Pál J**., Janáky T., Marczinovits I., Molnár J., Németh P. Az anti-HBxAg ellenanyag epitóp térképezése immunológiai és tömegspektrometriai módszerekkel. 2000. XXX. Membrán-Transzport Konferencia

Idézhető absztraktok:

1. Marczinovits I., Hudecz F., Kiss M., Laczkó I., **Pal J**., Tóth G., Molnár J. Fusion constructions of an antigenic epitope exhibit enhanced immunological reaction in an antibody capturing system. 2000. Switzerland, 5th Interlaken Conference on Advances in Production of Recombinant Proteins
2. Janáky T., Kele Z., Marczinovits I., Molnár J., **Pal J**., Németh P. Determination of the structure of recombinant HBx protein and its immunologically active epitope. 2000 Long Beach, California, Proceeding 48th ASMS Conference on mass spectrometry and allied topics
3. Molnar J., Marczinovits I., Hudecz F., **Pal J**.,. Toth G. K, Kiss M., Husz S., Molnar A. Immune reactivity and secondary stucture of an antigenic epitope of the 180 KDa bullous pemphigoid antigen in different macromolecular environments. 2000. 40th American Society for Cell Biology Annual Meeting, San Francisco Supplement to Molecular Biology of the Cell 2000 Volume 11 Dec

Egyéb, az értekezéshez nem kapcsolódó publikációk:

Folyóiratban megjelent közlemények:

1. Engelmann P.; **Pál J**.; Berki T.; Cooper E.L.; Németh P. Earthworm leukocytes react with different mammalian antigen-specific monoclonal antibodies Zoology, October 2002, vol. 105, iss. 3, pp. 257-265(9)

2. Lorand T, Kocsis B, Sohar P, Nagy G, **Jozsef P**, Kispal G, Laszlo R, Prokai L. Synthesis and antibacterial activity of fused Mannich ketones. Eur J Med Chem. 2002 Oct;37(10):803-12
3. Sandor J, Szucs M, Kiss I, Ember I, Csepregi G, Futo J, Vimlati L, **Pal J**, Buki A, Doczi T. [Risk factors for fatal outcome in subdural hemorrhage] Ideggyogy Sz. 2003 Nov 20;56(11-12):386-95. Hungarian.
4. Nagy G, **Pál J**, Bősze Sz, Nyárády Z, Berki T, Subhamay G, Petrohai Á, Czirják L, Né-meth P: Comparative epitope mapping of mitochondrial innermembrane specific autoantibodies which participate in the formation of the immunological homunculus. Immunology Letters 2003 87: 1-3. W27.13
5. Schwarcz A, Bogner P, Meric P, Correze JL, Berente Z, **Pal J**, Gallyas F, Doczi T, Gillet B, Beloeil JC. The existence of biexponential signal decay in magnetic resonance diffusion-weighted imaging appears to be independent of compartmentalization. Magn Reson Med. 2004 Feb;51(2):278-85
6. Kover F, Schwarcz A, **Pal J**, Bogner P, Vajna T, Vadon G, Doczi T. Fast method for longitudinal relaxation time and water content mapping of the human brain on a clinical MR scanner. Acta Neurochir (Wien). 2004 Sep 27
7. Orsolya Farkas, Andrea Tamás, Andrea Zsombok, Dóra Reglődi, **József Pál**, Andras Bü-ki, István Lengvári, John T. Povlishock, Tamás Dóczi. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in a rat model of traumatic brain injury. Regulatory Peptides 2004 Dec 15;123(1-3):69-75.
8. Kovacs L, Marczinovits I, Gyorgy A, Toth GK, Dorgai L, **Pal J**, Molnar J, Pokorny G. Clinical associations of autoantibodies to human muscarinic acetylcholine receptor 3213-228 in primary Sjogren's syndrome. Rheumatology (Oxford). 2005 May 11;
9. Tamás A, Zsombok A, Farkas O, Reglődi D, **Pál J**, Büki A, Lengvrái I, Povlishock JT, Dóczi T. Postinjury administration of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) attenuates traumatically induced axonal injury in rats. J Neurotrauma 2005 (in press)
10. Dóczi T, Schwarcz A, Gallyas F, Bogner P, **Pal J**, Sulyok E, Gomori E, Vajda Z. Regulation of water transport in brain oedema. IIdeggyógyászati Szemle 2005 58 (9-10): 298-304.
11. **Pal J**, Toth Z, Farkas O, Gasz B, Kellenyi L, Doczi T, Gallyas F. Selective induction of ultrastructural (neurofilament) compaction in axons by means of a new head injury paradigm. Journal of Neuroscience Methods 2005
12. Gallyas F, **Pal J**, Farkas O, Dóczi T. The fate of axons subjected to traumatic ultrastructural (neurofilament) compaction. Acta Neuropathological 2005 (in press)

Könyvfejezet:

1. **J. Pál**, A. Büki, A. Zsombok, J. Lück, D. Szellár, T. Dóczi and J.T. Povlishock, Traumatic brain injury evokes axonal injury in the spinal cord 7th International Neurotrauma Symposium Adelaide - Australia -12-16 September, 2004 Proceedings of the INTS. 2004; 111-114.

Immuno-biotechnological model-experiments on

Hepatitis B virus X antigen

a protein with unconventional physico-chemical properties

PhD-thesis

József Pál

University of Pécs
Medical School
Department of Immunology and Biotechnology

Tutor: Péter Németh M.D., Ph.D.

P é c s

2005

Introduction

Hepatitis B virus (HBV) is a major pathogen that chronically infects more than 400 million individuals worldwide. HBV is known as an important cause of acute and chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma (HCC). HCC is one of the most common cancers worldwide, with 250,000 new cases diagnosed each year. Based on epidemiologic studies involving chronic HBV infection, it is estimated that the relative risk of developing HCC for HBV carriers may be 100- to 200-fold higher than that for non-carriers. 500,000 lethal consequences of HBV-related chronic hepatitis or HCC are registered. Perinatal transmission results in lifelong symptomless but infectious carrier status with great epidemiological importance. The probability of perinatal transmissions has been found to be about 55% in the case of first-born babies, and about 40% in the case of later pregnancies of symptomless carrier mothers.

HBV is a small and partially double-stranded circular DNA virus belonging to the hepadnavirus family that includes hepatitis viruses of woodchuck, ground squirrel, Peking duck, *etc*. HBV genome has four open reading frames (ORFs), including envelope genes coding region (*pre-s1*, *pre-s2* and *s* gene coding region), precore (*pc*) gene and core (*c*) gene coding region, polymerase (*p*) gene coding region, X gene coding region. X gene is the smallest and highly conserved open reading frame of HBV. X gene codes for a 17-kda protein (X protein, HBxAg), which is made of 154 amino acids. HBxAg, which has no homologue in the host genome. The X gene is conserved among mammalian hepadnaviruses. HBxAg is a multifunctional viral regulator that modulates transcription, signaling pathways, protein degradation, and cell responses to genotoxic stress and signaling pathways.. These modulations affect viral replication and viral proliferation, directly or indirectly. HBxAg also affects cell cycle checkpoints, cell death, and carcinogenesis. Importantly, HBxAg is a moderate but broad-acting transcriptional transactivator and activates a variety of cellular and viral genes, including proto-oncogenes, such as c-myc, c-fos, and c-jun. However, little is known about the exact role of HBxAg in tumorigenesis. The X proteins of HBV can moderately stimulate transcription of many different viral and cellular transcription elements AP-1, CREB, NF-B and C/EBP. Promoters and enhancers stimulated by HBx typically contain DNA binding sites for NF-_B, AP-1, AP-2, c-EBP, ATF/CREB, or the calcium-activated factor NF-AT. Biochemical evidence for activation of the DNA binding activity of NF-B, AP-1, ATF/CREB, and NF-AT. HBxAg activates cell signaling cascades involving mitogen-activated protein kinase (MAPK) and Janus family tyrosine kinase (JAK) signal transducer and activators of transcription (STAT) pathways.

Aims of the thesis

1. Mapping of HBxAg immunogenity on computer models and developement of recombinant HBxAg fragments based on predicted data.
2. Development of anti-HBxAg monoclonal antibodies against recombinant and synthetic antigens. Characterization of antibodies *via* immuno-serology and immuno-histochemistry.
3. Determination of epitope specificity of monoclonal antibodies produced against recombinant HBxAg antigen
4. Immuno-histochemical studies on formalin fixed and paraffin embedded slides, originated from human liver biopsy.

5. Development of an immunoassay (sandwich ELISA) to measure the X antigen of hepatitis B virus from serum. Detection of natural antibodies produced against the X antigen of hepatitis B virus using the developed recombinant HBxAg fragments.
6. Development of a second generation immuno-serological method available to study multiple parameters, by the use of micro-beads for quantitative measurement of circulatory HBxAg.

Materials and Methods

Antigenity prediction and synthetic peptides

The Chou–Fasman and the Garnier–Osguthorpe–Robson secondary structure predictions of HBX were performed with the Protein Structure program of the Wisconsin-GCG package (Genetics Computer Group Inc., University Research Park, Madison, WI, USA) peptide sequences chosen on the basis of Jameson–Wolf antigenity index were synthesized using fmoc chemistry and purified with HPLC at the Department of Chemistry, Faculty of Medicine, University of Szeged.

Antigens

Two construct of recombinant HBxAg were used (Marczinovits et al. 1997) for monoclonal antibody and assay developments. The hepatitis B virus X gene (HBx) was cloned into the fusion expression vector pRIT2T or into pGEX-3X, resulting a HBx-staphylococcal protein A (HBxAg-pA) or a HBx-GST (HBxAg-GST) fusion gene construct, respectively. Both constructs were expressed in *E.coli* DH5. HBxAg-pA was used for immunization in crude form. Affinity purified HBxAg-GST was used for testing the antibodies.

Recombinant X antigen (10-143. amino acid):

The development of the recombinant construct of HBxAg was described previously (Marczinovits et al., 1997). Briefly, the truncated X gene was obtained by cutting of the pHB320 plasmid with *BamH*I-*Fsp*I restriction enzymes and cloned via the pHSG 395 vector into *BamH*I-*Sma*I restriction sites of the fusion-expression vector pGEX-3X (Amersham Pharmacia Biotech), creating the pGEX-3XXBF recombinant plasmid. The X protein is truncated by nine and eleven amino acids at the N- and C-termini, respectively. According to the cloning strategy, the truncated X protein is flanked by five amino acids at the N-terminus and by four amino acids at the C-terminal, derived from the pHSG 395 and pGEX-3X plasmids, respectively.

N terminal fragment (10-90 amino acid) of HBxAg:

The original plasmid (Bichko et al., 1985) (pHB320) containing the HBV DNA subtype *ayw* was used to subclone the entire HBx coding region between the *Nco*I site (position 1370 on the HBV genome) and *Bgl*II site (position 1986) into the pGEX-3X vector (Amersham Pharmacia Biotech) producing the pGEX-3XX recombinant plasmid. Clones containing only the N-terminal portion of the HBx coding region were obtained by cutting the pGEX-3XX recombinant plasmid with *Ava*I (position 1461 on HBV genome) and *EcoR*I (linker sequence of the vector), blunt-ending with Klenow fragment of DNA polymerase I followed by ligation.

C terminal overlapping fragments:

The pGEX-3XX plasmid was used to produce the recombinant overlapping HBx fragment. Three overlapping parts of the X gene were amplified by PCR using primers with *BamH*I and *EcoR*I restriction sites we published previously (Pal et al., 2003). The fragments were cloned into the pGEX-6P-1 expression vector (Amersham Pharmacia Biotech). Each construct was verified by sequencing.

The recombinant plasmids were transformed into *E. coli* strain DH5α, induced with isopropyl-thio-B-D-galactopyranoside (IPTG) and the recombinant fusion proteins were purified on glutathione-S transferase resin according to Marczinovits et al., 1997.

Synthetic peptide antigens

Peptides of 13-26 amino acids were synthesized using fmoc chemistry and purified by HPLC using routine techniques at the Department of Chemistry, Faculty of Medicine, University of Szeged, Hungary.

Hybridoma development

Female BALB/c mice (Charles River Inc., USA) were immunized repeatedly. The splenocytes of the most responding animal were fused to Sp-2/0-Ag14 (ATTC, USA) mouse myeloma cells according to the method described by Köhler and Milstein (1975). Hybrids were selected on HAT containing culture medium (DMEM, Gibco, USA).

Development of the capture antibody

The affinity purified recombinant HBxAg-glutathione *S*-transferase (GST) construct was the first antigen and the hybridoma clones were characterized by various methods. A clone (3F6/G10) was chosen as the capture antibody. Selectivity was tested in human liver biopsy samples from a retrospective immunohistochemical study.

Development of the detecting monoclonal antibody

Detecting antibody was developed against synthetic peptide fragments (13–26) of HBx. The 13–26 peptide antigen was conjugated to KLH carrier molecules. Balb/c mice (Charles River Laboratories, Raleigh, USA) were sequentially immunized. Hybridomas were produced (Köhler and Milstein, 1975; Najbauer et al., 1986) and cultured in DMEM (Sigma Chemical Co., USA) containing 10% FCS (Gibco, USA). The purified monoclonal antibodies were labeled by biotin (Sigma, USA). The best clone (4F1/A9) was selected for equally highest affinity to the synthetic antigen, to the recombinant HBxAg, and to human serum samples.

Immunoserological characterization by ELISA

Cell culture supernatants were first tested by simple-binding ELISA described by Engvall et Perlman (1972). HBxAg-GST was used as antigen for screening to exclude cross-reactions with the carrier proteins used for immunization.

Microtitre plates (Dynatech, USA) were sensitized with 5μg/ml of recombinant HBxAg in 0.1M bicarbonate buffer, at pH 9,6 overnight at 4°C, PBS-gelatin (0,5%) (Sigma, USA) was used to saturate the free binding sites. The hybridoma supernatants were tested in different dilutions. Reactions were developed by HRPO labeled rabbit anti-mouse Ig (Dakopats, Denmark) and measured by microphotometer (Dynatech MR 7000, USA) at 490 nm wavelength.

The isotype subclasses of the mAbs were determined using a mouse isotype kit (Sigma Chem. Co., USA)

Immunoblot determination

The HBxAg-GST and HBxAg-pA fusion proteins and the glutathione S-transferase (GST) enzyme protein were used for SDS-PAGE electrophoresis (Laemmli, 1970). The samples were run on a 15% polyacrylamide gel and stained with Coomassie blue. Proteins were electrophoretically transferred from the gel to a nitrocellulose paper using a semidry system according to Towbin et al. (1979). The free binding sites of nitrocellulose were saturated with 5% nonfat dried milk (PBS-milk) for 2 hours at room temperature. The membrane was washed three times in washing buffer for 30 min and the hybridoma supernatants were added (1:1000) for 2 hours at room temperature. The samples were washed three times and then incubated with HRPO conjugated goat anti-mouse IgG (Dakopats, Denmark) for 1 hour at room temperature. The reactions were visualized by diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma Chem Co. USA) as substrate.

The sera were boiled for 10 min in SDS sample buffer and were separated by 15% SDS–PAGE using Mini Protean 3 devices (Bio-Rad, Hercules, USA). The gel was transferred to a Hybond ECL membrane (Amersham Biosciences), blocked with 5% non-fat dry milk in PBS for 1 h and incubated with anti-HBX monoclonal antibodies (1:500, 3F6/G10, 4F1/A9) in PBS containing 1% non-fat dry milk. After the membrane was washed three times with PBS, horseradish peroxidase-coupled anti-mouse IgGs (1:5000 Amersham Biosciences) were added and the signal was detected with the ECL Plus Western blotting detection system (Amersham Biosciences) according to the manufacturer's instructions, using Kodak X-ray film.

Immunohistochemical characterization

The specificity of monoclonal anti-HBxAg antibody clones was analyzed in different human tissues. Formaldehyde fixed and paraffin embedded tissue sections from clinically verified B hepatitis positive liver biopsies were used as positive controls. HBV negative, normal and pathologic tissues originating from the tissue bank of Histopathology Ltd. were analyzed during the further immunohistochemical characterization of monoclonal anti-HBxAg clones. An IgG2a (anti-CD45RO, clone UCHL-1; Immunotech Inc., France) monoclonal antibody was used as irrelevant, negative control during the whole immunohistochemical investigations.

Retrospective immunohistochemical study

A retrospective study on needle biopsy specimens from patients with acute viral hepatitis (10), chronic hepatitis (45), liver cirrhosis (9) and surgical biopsy specimens from patients with PHC (8) was performed after the selection of the best anti-HBxAg clone (No. 3F6/G10 with IgG2a isotype). The tissue samples were obtained from the Pathology Service of the County Hospital of Baranya in Pécs, County Hospital of Zala in Zalaegerszeg and from the Histopathology Ltd., Pécs. Formaldehyde-fixed, paraffin embedded sections were stained by polyclonal (goat) biotinilated anti-HBsAg (Dacopatts, Denmark) and biotinilated (rabbit) anti-HBcAg (Dakopatts, Denmark) antibodies. The findings were compared to the results of immunohistochemical investigations by monoclonal anti-HBxAg (IgG2a) antibody. Biotin labeled anti-mouse Ig (Dakopatts, Denmark) was used as secondary antibody in the case of anti-HBxAg. The reactions were developed by the HRPO streptavidin–biotin complex method. Immunostaining was visualized by H_2O_2-amino ethyl carbasol (Sigma Chem. Co., USA) substrate and the sections were then counterstained with hematoxylin. Irrelevant mono-

clonal antibodies as the anti-FITC IgG1[2] and the anti-UCHL-1 IgG2a (Immunotech Inc., France) were used as negative controls.

Epitope determination of the anti-HBxAg 3F6/G10

Limited proteolysis and mass spectrometry

Recombinant X protein was reduced by dithiothreitol, alkylated with iodoacetamide and digested by trypsin in solution (Kele et al., 1998). The peptide fragments were separated on a C18 reversed-phase HPLC column (Nucleosil 5C18, 300 Å) using 40 min linear gradient from 20 to 60% solvent (0.1% trifluoroacetic acid in 80% aqueous acetonitrile) at the flow rate of 1 ml/min solvent. Column effluent was monitored at 215 nm and was collected in 1ml fractions. Binding characteristic of the separated peptides to monoclonal antibody against HBX were tested by ELISA. The amino acid sequence of the fractions showing the highest positive reaction in ELISA was determined by nano-ES/MS/MS using a TSQ 7000 triple quad mass spectrometer (Wilm and Mann, 1996).

Screening of the phage displayed random peptide library

The filamentous phage library displaying nine amino acid random peptides as a fusion to the N-terminal of the M13 major coat protein VIII was constructed previously (Felici et al., 1991), and was a generous gift from Dr. Alessandra Luzzago (Instituto di Ricerche di Biologia Molecolare, Italy). The affinity selection of phages with our anti-HBX Mab was performed using the biopanning technique (Parmley and Smith, 1988). In brief, a plastic petri dish was coated with the Mab overnight (40 and 4 _g/ml in PBS during the first and the second round of panning, respectively), after washing with PBS/0.05% Tween-20 and blocking with a solution containing PBS/3% BSA, 1010 ampicillin transducing unit (ATU) blocked phage was added and incubated for 2 h at 37 ◦C. The plate was washed with PBS/Tween-20 (0.05% in the first or 0.5% in the second round of panning) and the bound phage were eluted with 1 mg/ml BSA/0.1M glycine, pH 2.2. Following neutralization with 2M Tris–base, 10 ml XL1-Blue (O.D.600: 0.5) was infected and plated on LB agar plates containing 50 _g/ml ampicillin. The next day the colonies were scrapped off the plates, were resuspended in 10 ml LB and were superinfected with 1011 plaque forming unit (PFU) M13KO7 helper phage. After an overnight incubation at 37 ◦C phage were precipitated with 16.7% PEG8000/3.3M NaCl twice and resuspended in TBS. Following the second round of panning 10 ml XL1-Blue (O.D.600: 0.5) was infected with 104 ATU phage, superinfected with 1011 PFU M13KO7 helper phage and plated on LB agar plates at a low density to allow immunoscreening to be performed. After 5 h of incubation nitrocellulose membranes were applied and left on the plates overnight. The membranes were blocked with TBS/0.05% Tween-20/5% non-fat dry milk and incubated with the anti-HBX Mab (1 _g/ml in blocking solution) for 2 h. Positive clones were visualized with an AP conjugated anti-mouse IgG secondary antibody.

Serum samples

All sera were obtained from the laboratory services of the First Department of Medicine, Medical Center of the University of Pécs and the Division of Virology, Bela Johan National Center for Epidemiology, Budapest, as residual samples after completion of all laboratory testing. The results obtained with sera of patients suffering from HBV positive acute (14) and chronic (80) hepatitis and those taken from healthy HBV carriers (12) were compared with healthy, HBV negative, serum samples (22) and sera from symptomless HBsAg-carrier pregnant women (80). The sera were pretested for HBV by specific ELISA for HBsAg and HBcAg (Dialab, Hungary).

Low pH pretreatment was used in serum samples before the immunoassays to decompose the immunocomplexes and the non-specific aggregates present in sera stored in the frozen state at –20 °C. GST-HBxAg standard and serum samples were diluted in glycine (pH 2.0, 10 min, 37 °C) and than restored to pH 8.0 in Tris-base to a final dilution of 1:10.

Construction of sandwich type ELISA

Assay conditions were optimized by checkerboard titration of recombinant HBxAg-GST standard. Microtitre plates (Nunc, France) were coated with 100 µl of mouse monoclonal anti-HBx (3F6/G10) antibody at a concentration of 10 µg/ml in 0.05 M bicarbonate buffer (pH 9.6) at 4 °C overnight, followed by 60 min incubation at 37 °C. After repeated washing, the plate with 0.15 M phosphate-buffered saline (PBS) non-specific binding sites was blocked by adding 1% gelatin–PBS (300 µl) at 37 °C for 1 h. Then, the plate was washed four times with PBS–Tween 20 (PBST). Following the last wash, GST-HBxAg standard and serum samples were diluted in glycine buffer (pH 2.0, 10 min, 37 °C) and then restored to pH 8.0 by adding Tris-base to a final dilution of 1:10. The plate was incubated at 37 °C for 4 h. After washing, 100 µl of biotin-conjugated mouse monoclonal anti-HBx (4F1/A9) antibody (2 µg/ml) were added to each well and incubated at 37 °C for 1 h and washed again. Then, 100 µl of streptavidin-horseradish peroxidase (Sigma, USA) diluted to 1:3.000 in PBST were added to each well and incubated at 37 °C for 1 h. Finally, the plate was washed, the color reaction was developed by *ortho*-phenylenediamine (oPD) (Sigma, USA), and was stopped by 0.46 M sulfuric acid (100 µl/well). Optical densities (ODs) were read at 490 nm in a plate reader (Thermo Labsystems IEMS Reader MF, Finland). The levels of HBxAg in the serum samples were interpolated from a GST-HBx standard calibration curve using an automatic calculation program (Labsystems Ascent Software 2.4 for IEMS Reader MF).

ELISA on HBx antigen fragments

Microtitre plates (Nunc, USA) were coated with an even amount of antigens relative to the peptide component of each construct (recombinant protein or synthetic peptide fragment) in 3µg/ml concentration dissolved in 0.1M bicarbonate buffer, pH 9.6 overnight at 4°C. Followed by incubation for 1 hour at 37°C. We washed the plates three times with PBS containing 0.05% Tween 20 (Sigma, USA) and PBS-gelatin (0.5%) (Sigma, USA) treatment was used for 30 min to eliminate the unbound antigen and to saturate the free bindings sites of the assay plates. After a washing step serum samples (1:100 diluted in PBS-Tween 20) were added for 1 hour at 37°C. Following the next wash with PBS-Tween 20, HRPO labeled rabbit anti-human IgG and IgM (DAKO, Denmark) was added to the wells in 1:2000 dilution (Diluted in PBS-Tween 20) and incubated for 1 hour at 37°C .The plates were repeatedly washed with PBS-Tween 20. Enzyme acivity was visualised using o-phenylenediamine (Fluka, Germany) and 0.02% H_2O_2 added in 0.1M citric acid buffer (pH 5.0). The reaction was blocked by sulfuric acid (4M) and the results were counted by a microphotometer (Labsystems Ascent Software 2.4 for IEMS Reader MF) at 490 nm wavelength. The measurements were performed in parallel under standard conditions, the samples were applied in triplicate. The quantitative measurements of serum HBxAg concentrations yielded constant values (the inter-assay variability scatters were less than 5%), the HBx specific antibody measurements showed standard tendencies during the repeated measurements.

Cytometric bead array immunoassay

Microparticles were prepared and coupled to monoclonal antibody as previously described (Carson and Vignali, 1999). Briefly, polystyrene beads, 7.5 nm diameter (BD Biosciences USA), were coupled via a covalent linkage based on thiol-maleimide chemistry with monoclonal anti-HBx (3F6/G10) capture antibody according to the labeling kit and the manufac-

turer's protocol. The labeled microbeads were stored for sequential investigations at +4 °C in storage buffer. Before the measurement, 1000 beads per sample were reconstituted in washing buffer by ultrasound (37 kHz, 100 W, 2 min) at room temperature. Each serum sample was pretreated as described in the ELISA protocol. The samples were incubated with 1000–1000 beads for 4 h at 37 °C. Then, the samples were washed and incubated with biotin conjugated anti-HBx (4F1/A9) detecting antibody (2 µg/ml) for 1 h. After three washing steps, the samples were incubated with streptavidin-FITC (DAKO, Denmark) in 1:100 dilution for 1 h at 37 °C. The samples (after three washing steps) were acquired within 1 h using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences USA) and list mode files were further analyzed with FCAP Array software (SoftFlow, Hungary). Comparing the mean intensity values of the FITC reporter fluorescence of the samples to a standard curve, the software generates quantitative data on the HBxAg concentration in patients' sera.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by Student's *t* test. The data were analyzed with SigmaPlot software 2000 (SPSS Inc., USA)

In silico homology analysis of HBxAg epitopes

In silico analyses was performed to check for known homologies of 13–26 and 89–94 subsequences of HBxAg (gi:4704317). Subsequences were searched against the non-redundant protein database (database size as of September 2004 = 688,443,072) using the BLASTP2.2.9 program (Altschul et al., 1997) (expect = 20000; Matrix PAM30; gap cost existence = 9; extension = 1; word size = 2). Results were limited by the Entrez option: hepatitis B virus [ORGANISM] AND X protein [PRODUCT] (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi).

Results

1. Mapping of HBxAg immunogenity on computer models and developement of recombinant HBxAg fragments based on predicted data.

Computer analysis of the HBX secondary structure with the Chou–Fasman and the Garnier–Osguthorpe–Robson structure predictions revealed that there were a few sequences exhibiting turn structures along the N-terminal half of the molecule and at the C-terminal as well. The sequence between amino acids 75–130 contains alpha-helices. Beta-sheets are predicted all along the polypeptide chain. There are no sites presumed to be glycosylated. The protein contains 84 hydrophobic amino acids amounting to 54% of the whole molecule. On the basis of the Jameson–Wolf antigenity index, two sequences (amino acids 22–31 and 100–114) were chosen and synthesized for further testing. The prediction was controlled immunoserologically with simple binding ELISA technique using synthetic peptides (sequences 22–31 and 100–114) as antigens. Unfortunately, none of the Mabs recognized these epitopes.

2. Anti-HBxAg monoclonal antibodies developed against recombinant and synthetic antigens. Immunoserologically and immunohystochemically characterisation of antibodies.

An anti-HBxAg monoclonal antibody family was developed following the usual way against recombinant hepatitis B virus X protein. Monoclons were selected and characterized immunoserologically and immunohistochemically. Monoclonal IgG2a antibody secreted by

hybridoma clone 3F6/G10 was a like optimal for ELISA, immunoblot and immunocytochemistry. The anti-HBxAg monoclonal antibody recognized (in 5 ng/sample dilution) the recombinant antigen (in 250 ng/sample) as proved by high optical density (OD490 ≥1.000) measured in a simple binding ELISA. 2.3 ng/well antigen concentration (calculated for the X protein) was the minimum antigen level in the optimal measurable range (OD490 ≤0.400). No reactions were found with the fusion partners (GST, and Protein A) or other non-specific mammalian and non-mammalian proteins. Further characterization of anti-HBxAg antibody clone by immunoblot technique showed obvious positivity in the relevant band. The immunohistochemical characterization did not show any positive reaction on different normal human tissues (embryonic and adult) and non-mammalian samples. However, intensive immune reactivity was found in liver biopsy samples from chronic hepatitis B virus carrier patients in different histological and cellular localization. Granular cytoplasmic and nuclear stainings were present in equal density in some cases and an exclusively intense nuclear positivity in some others.

3. Results of immuno-hystochemistry by anti-HBxAg monoclonal antibody on liver-biopsy samples from patients infected by hepatitis B.

Retrospective histopathological analysis was performed on 72 liver biopsy samples of clinically verified hepatitis B virus holding patients. We analyzed the microscopic appearance and the type of intracellular localization of HBxAg immunostaining according to the classification of commonly accepted literature data. The highest number of HBxAg positive cases was found in the group of patients with chronic hepatitis (86.6%) in heterogeneous microscopic appearances. Between 40 to 50% of the biopsy samples showed HBxAg positivity in the groups of acute hepatitis, liver cirrhosis and primary hepatocellular carcinoma. The histologic and cytologic distribution of HBxAg showed various forms in each group. The frequency of positive cells was the highest in chronic hepatitis and PHC, however, the intensity of the immune reactions was ambiguously strongest in the group of PHC samples. Intracellular localization after anti-HBxAg immunostaining showed cytoplasmic and/or nuclear distributions in general, but dominant nuclear positivity was found in PHC. The histological occurrence of labeling with anti-HBxAg monoclonal antibody showed a focal pattern (localized in well-defined groups of HBxAg positive cells between broad negative regions, marked as “L”) in the majority of acute and chronic B hepatitis biopsy samples. Moderate cell membrane staining was found in one chronic B hepatitis case with granular cytoplasmic and heterogeneous nuclear labeling. The cytoplasmic occurrence was granular in some cases, fine granular (diffuse) in the other samples independently from the clinical and histopathologic stages of chronic hepatitis or cirrhosis.. A predominantly nuclear appearance was typical with diffuse histologic pattern in a few chronic hepatitis samples. We found characteristically intense and uniform nuclear immunoreactions with HBxAg antibody in each cell of the entire liver tissue (both in the tumor and in the residual liver) on PHC cases with moderate cytoplasmic labeling. The results of the anti-HBxAg retrospective study on 72 biopsy samples with detailed data of the histologic and cytologic microscopical appearance are summarized. To exclude non-specific nuclear reactions, which could occur in some formaldehyde fixed samples using mouse antibodies, we tested all tissue samples with an irrelevant mouse monoclonal antibody as negative control (anti- UCHL-1 IgG2a) but no false positive immunoreactivity was found. We compared the microscopic immunostaining pattern of monoclonal anti-HBxAg antibody with two commercially available polyclonal antisera against other hepatitis B virus antigens. In the laboratory daily routine the determination of both “s” (surface) and “c” (core) antigens are used for primary diagnosis and as prognostic factors. Our monoclonal antibody showed significantly more sensitive reactions in the group

of chronic hepatitis patients than the HBsAg or HBcAg antibodies. The limited number of the investigated cases in other groups did not allow correct calculations in liver cirrhosis and PHC, but the tendency is clear. The microscopic patterns of HBxAg positivity have been summarized in different histopathological stages of HBV infection-related diseases.

4. Results originated from the epitope mapping of anti-HBxAg monoclonal antibody.

Using our anti-HBX Mab we screened a random peptide library displayed on filamentous phage. Based on the immunoscreening and ELISA tests we chose 10 phage clones for DNA sequencing. A comparison of the deduced amino acid sequences of these clones revealed a consensus sequence of LPxxLH. This sequence can be found in the primary structure of HBX (amino acids 89–94). We found strong reactions with anti-HBX Mab in GST fusion peptides spanning amino acids 79–143 of the HBX. The anti-HBX Mab recognized only the segment representing amino acids 79–117. No reaction was found when peptides containing sequence 97–136 and 117–143 were tested. According to the alignment of the segments only the sequence 79–94 can possibly contain the epitope bound by the anti-HBX Mab. This calculation further supports the results of the random peptide library screen, which identifies the epitope sequence as LPxxLH (amino acids 89–94 of the HBX).

5. Experimental results of immuno-assays developed to detect the HBxAg and anti-HBxAg antibodies.

The selectivity of HBxAg ELISA was tested on 128 human serum samples: the HBV negative samples (22 healthy control sera) were consistently negativein the assay (the OD490 was in all cases under 2SD of the OD value of the blank and the control sera). The presence of the HBxAg on 106 HBV infected patients was detected by ELISA in 64% of acute patients, in 76% of chronic hepatitis patients and in 50% of the healthy carriers. The cut off range was N4 ng/ml according to the results of the healthy controls. (The previous literature data are suggest a similar range. The concentrations were between 18.2 and 1803.86 ng/ml.

We used the recombinant 10-143 HBxAg and other six recombinant antigen fragments and a synthetic N-terminal peptide fragment (13-26) for mapping the antibodies present in the sera of HBV infected patients. Serum samples of acute (14 patients) or chronic hepatitis (80 patients), symptomless carriers (12 patients) and 22 healthy donors were analyzed for anti-HBxAg antibodies of IgG and IgM isotypes.

The HBxAg serum levels were measured by sandwich type ELISA developed previously (Pal et al., under publication). The measured concentrations ranged in a wide spectrum of 18 – 1800 ng/ml. The averages of serum HBxAg concentrations were higher in acute and chronic hepatitis samples than in symptomless carriers; however, individual variations were also elevated in chronic hepatitis patients.

Demonstrates the distribution of serum titers of circulating anti-HBx antibodies of IgG and IgM isotypes. Individual differences were relatively homogenous except for anti-HBx IgG in chronic hepatitis patients. For both the IgG and IgM isotypes, the strongest anti-HBx response was observed against the longest fragment of the recombinant antigens (10-143). The recombinant C terminal fragment (C1: 79-117) was typically positive in chronic hepatitis patients for both IgG and IgM isotypes. IgG antibodies showed strong binding to the same sequence in acute hepatitis and in symptomless carriers. IgM reaction against the rest of analyzed sequences was slightly positive, with minimal individual variations. Healthy controls proved to be consistently non-reactive to all the antigens included in the study.

Correlations between the HBxAg serum concentration and antibody titers against HBxAg fragments were subjected to regression analysis to unveil hidden correlations among different

parameters and groups. The results of regression analysis performed on HBxAg serum concentrations and the antibodies responding to different HBx fragments (both IgG and IgM) as measured in the sera. Reaction of antibodies belonging to the IgM isotype with all HBxAg fragments showed strong correlations with each other in patients with acute hepatitis. IgG antibodies consistently exhibited highly specific recognition of C1 fragments and accordingly, ignorance of the N terminal end. Also there has been a strong correlation between the serum HBxAg level and the antibodies specific to the longest fragment (X: 10-143).
Among the antibodies detected in chronic hepatitis B patients, we have found a high correlation between IgG type antibody responses in the case of C-terminal fragments, but it was missing in the case of N-terminal fragments. There was a moderate correlation between the serum level of HBxAg and the IgG response against the C-terminal fragments and the longest fragment (X: 10-143). The regression analysis revealed that concerning IgM reaction N- and C-terminal fragments were dominant, but no correlation was found with the antigen concentrations in the sera.

The regression analysis results of symptomless HBV carriers showed close similarities to acute hepatitis B patients. In the case of IgM type immune response, there was a strong correlation of antibody titers against C3 and N-terminal fragments. However, correlations for IgM were less homogenous as compared to patients with acute hepatitis, and correlations were found between the serum HBxAg concentration and C1- and N-terminal fragment-specific IgG production. This latter probably indicates that the forming immune complexes are made up of IgG antibodies and HBxAg.

6 Quantitative analysis of circulating HBxAg *via* sandwich-type flowcytometric micro-bead assay.

The microbead assay was tested with the sera of chronic hepatitis patients (32), sera of symptomless HBsAg-carrier pregnant women (80) and healthy individuals (22). demonstrates characteristic positive and negative samples. The results were compared to the results of the ELISA measurements performed in parallel. Comparative analysis of the two assays showed the same sensitivity and selectivity; the correlation coefficient of the data (measured on the same serum samples) was 98.67%. The microbead assay resulted in similar sensitivity as the ELISA.

Discussion

We have studied the hepatitis B virus X antigen (HBxAg), a protein of high hidrophobicity. The molecular micro-environment that influences immune-recognition including the study of basic physico-chemical characteristics of antigens is one of the most important topics of basic immunology studies. This has a great impact on both biotechnology and routine. The 3D localization of the electrostatic and hydrophobic/hydrophylic regions on the surface of the antigen, determines immune reactivity and plays a crucial role in immune recognition and effector mechanisms. It is generally known that antigens, showing strong hydrophobic features, form non-specific molecular connections and so they are often masked. They are hard to reach for the recognition molecules and cells of immune system and the immunogenicity of hidden epitopes changes counts a lot. We have few data on the antigenicity of masked residues.

Various methods like NMR and X-ray crystallography are applied for mapping epitopes. They are successful in defining epitopes by limited proteolysis followed by mass-spec analysis and ELISA on overlapping peptides synthesized on polypropylene needles. Other methods used random libraries of peptides, recombinant antigen fragments or fragments of

antigens, expressed on the surface of phages; also there are model predictions. In the case of non-linear epitopes or antigens exhibiting unusual physico-chemistry, most of the methods used for epitope-mapping can be applied following corrections. The efficiency of these techniques is increased by probability analysis or through computer modeling of the immunogenic regions of the antigen molecules. For antigens with unusual physico-chemical characteristics the efficiency of regular immune-serological or spectrophotometric applications and the success of computer structure analyses is severely impaired. We have also experienced this phenomenon when studying the epitope specificity of our anti-HBxAg monoclonal antibody:

We had to perfrom epitope mapping since the positive results we obtained during the selection of anti-HBxAg hybridomes using synthetic peptides as a control, were not in the region predicted previously *in silico* (sequences 22-31 and 100-114). According to literature, the entire HBxAg sequence is able to induce the production of antibodies in HBV infected patients and the sequence of 100-114 is probably localized in an immunodominant region.

The epitope mapping using mass-spec analysis did not lead to success in the case of anti-HBxAg (clone No.: 3F6/G10) monoclonal antibody. Later on, we successfully used a random peptide library, consisting of nine amino acid residues, expressed on the surface filamentous phages to determine the sequence of the epitope. The defined epitope sequence ($_{89}$LPKVLH$_{94}$) contains a digestion site for tripsin. Following tripsin digestion, during the first step of the mass-spec analysis, the amount of the epitope sequence decreased. It probably coagulated during the treatments as the protein region, containing the sequence, is hydrophobic. This was the reason of the unsuccessful epitope mapping *via* mass-spec analysis.

Sequences containing the epitopes of our antibodies – clone: 3F6/G10: (89-94 residues) and clone: 4F1/A9: (13-26) – have strong antigenic characters based on the index of Jameson and Wolf (Jameson, 1988). According to Chou-Fasman and Garnier algorithms, that predict the localization of α-helices and β-sheets, the epitopes of our antibodies localize on the border between α-helices and β-sheets. The α-helices and β-sheets are hydrophobic and usually situated inside the proteins. Both sequences belong to the regions of higher flexibility of the HBxAg molecule based on the Karplus and Shultz index of flexibility. According to this algorithm these sequences are located on the surface that suggests their involvement in the immune response.

The technique of producing HBxAg and a-HBxAg monoclonal antibodies able to specifically recognize the antigen is difficult because of the unique physico-chemical characters of the protein since 54% of the protein is made up from hydrophobic residues. The synthetic production of the whole-protein is hard as well, because HBxAg precipitates in aqueous solution; also the isolation of HBxAg from HBV infected human samples needs special procedures. Earlier the MS2-HBxAg and most often the GST-HBxAg constructs were used for the production of recombinant HBxAg. We studied the usability of GST as a carrier molecule compared to numerous antigen constructs. It has been proven during our extensive study, that GST-HBxAg has suitable parameters to use it as a reagent to test antibodies and develop assays.

We were successful in developing a family of monoclonal antibodies using recombinant HBxAg and the parallel characterization (immuno-serological and immunohistochemistry) of clones. This family can be used on routine histological samples embedded in formol-paraffine for immunohistochemistry studies.

According to numerous data in the literature, if the HBxAg is expressed in patients carrying the HBV genome, it has clinically significant prognostic value. The HBxAg immunohistochemistry studies published in the literature were mostly carried out using polyclonal and in some cases monoclonal antibodies. Data clearly shows that HBxAg serves

as a common marker in the cases of viral hepatitis B liver infections (acute, chronic, cirrhosis hepatitis) and PHC cases.

We studied the presence of HBxAg on more than one hundred paraffinated histological slides. The patients infected by hepatitis B virus were categorized in the following types based on the pathologic category of liver biopsy: acute hepatitis, chronic hepatitis, cirrhosis and primary hepatocellular carcinoma. We found the localized labeling of X-antigen in defined groups of cells with dominant cytoplasmic and weak nuclear labeling in acute B hepatitis during our retrospective immunohistochemistry studies. We found highly extended, granulated, cytoplasmic and nuclear positive staining besides the localized presence of strong positive regions in chronic hepatitis B samples. We found positive cell membranes in a chronic hepatitis B case. We were also able to detect decreased cytoplasmic presence of X antigen besides the clear nuclear positive signals in cirrhosis cases. We found strong nuclear labeling comprising the entire liver in PHC cases.

Different research groups found different frequency of HBxAg positive signals depending on the population studied and anti-HBxAg antibodies used. In the cases of cirrhosis patients the nuclear labeling was 70%, in contrast to the 5-15% frequency of nuclear staining in chronic hepatitis cases. This difference in the localization may be indicative for the binding of HBxAg to different cell compartments depending on the type of chronic liver disease hereby the control mechanism of transactivation may be different as well. HBxAg in the cytoplasm presumably influences signal transduction pathways, whereas the nuclear localization may refer to the role of transcriptional transactivation of HBxAg. It may be hypothesized that in the early phase of infection the virus activates different mitogen signals in the cytoplasm and later on, it makes direct contact with different transcription factors in the nucleus.

Our results from immunohistochemistry correlated well with the data from literature both in chronic hepatitis and PHC groups.

By using the monoclonal antibodies developed in our lab we could clarify that the HBxAg could be present in large numbers in infected liver cells not only in the cytoplasm but also in the nucleus. We also made a novel observation: by using our monoclonal antibody the HBxAg immunoreactivity changed depending on the intracellular localization. During the chronic hepatitis B infection the increase of the positive HBxAg signals in the nucleus may indicate the deterioration of the prognosis of the disease and the development of primary hepatocellular carcinoma.

Our monoclonal antibody (clone: 3F6/G10 epitope: 89-94 HBxAg sequence) binds to the same sequence of HBxAg as the XAP1/DDB1 (a protein involved in DNA repair). HBxAg-DDB1 binding inhibits the function of DDB1 protein, cell proliferation, influences the viability of cells and increases HBV replication. The HBxAg 89.-125. interval is an important immunodominant and functional region of human pathogen HBV. According to the prediction, our antibody binds to the 89-94 surface determinant of the antigen. We can declare that our antibody binds to specific HBxAg sequences with high selectivity and the epitope recognized by our antibody has functional importance.

We consider our immunohistochemistry studies significant because we were succesful in producing a monoclonal antibody with an epitope specificity that gives applicable information of the mechanism and possible prognosis of HBV infection even at light-microscopy level.

Although techniques of molecular biology can be applied to detect HBxAg but conventional immunoligical assays are needed to manage high numbers of measurements in routine laboratory services.

We managed to develop two monoclonal anti-HBxAg antibodies with high affinity. These monoclonal antibodies, clone 3F6/G10 isotype IgG2a (epitope: 89-94 residues – gripper antibody in our assay) and clone 4F1/A9 isotype IgG1 (epitope:13-26 residues, detection

antibody in our assay) were described earlier. The following data from the literature are known to characterize the epitope of the latter antibody:

During the investigation of the pathomechanism of HBV imoprtant N terminal regions were also described (1-20 and 13-26). The possible function of XAP2 bound to this region is the inhibition of the transactivator effect of X antigen.

We studied 208 hepatitis B positive human sera with our anti-HBxAg sandwich ELISA method during the comparative serologic investigation. Besides the determination of the amount of HBxAg antigen present in the sera we studied the ratio of natural antibodies produced against the different epitopes of X protein with the help of HBxAg fragments. We were the first to use quantitative methods to study the relationship between disease-stage the amount of circulating antigen and the pattern of epitopes. We applied a long-lasting and widely used correlation analysis with the help multiparametric data management for the evaluation of large number of immunoserologic samples. We succeded in defining well characterized prognostic groups with the help of our matrix statistics method. The amount of circulating antigens in patients in the stage of acute phase of hepatitis B infection shows a homogenic picture/ distribution within the group, with its value between 500-1000 ng/ml. The IgM type immune response has no specific region at this stage of infection but during the IgG type response the C1 (79-117) region becomes significant besides the observed N-terminal recessivity.

We experienced a great spreading and characteristic difference in the amounts of HBxAg within the chronic group, which presumably refers to the persistent and active character of the infection. Investigating the immune response in the chronic stage our results shows IgG dominance besides C- terminal (C-1 region) preference. In addition we can observe an increase of N-terminal IgG type immune recognition. In those patients, where the negative regulatory effect of the N-terminus appears the chronic infection may turn into persistent. In those cases where the immune response against the N-terminus is negligible or doesn't exist at all, it is highly likely that the chronic infection becomes active. In the IgM type immune response, compared to the acute stage, the homogenicity disappears, and the C-terminal dominance becomes significant. Based on our results we can declare that there is a significant link between the expression level of HBxAg and the intensity of immune response against the specific C1 (79.-117. residues) region in the chronic stage of hepatitis B infection. The C-terminal region of HBxAg has a transactivator fuction. The strong immune response against this region and the strong expression of X antigen may indicate the malignant improvement of hepatitis B infection.

We found characteristic IgM type immune response with significant C-terminal and moderate N-terminal correlations in patients carrying the disease without symptoms. The heterogeneity of IgM response can be observed compared to the acute group. Moderate connection can be shown between the IgG type immune recognition against C1 and N-terminal and the amount of HBxAg in the serum. (This latter probably indicates that the immune-complexes consist of IgG antibodies and HBxAg.) This correlation indicates the inhibition of transactivation modifying effect of HBxAg and can play a role in the development and conservation of an asymptomic stage.

The generally used immunoserological experimental techniques are feasible for individual measurements. The abilty to define several parallel parameters from the same samples may be relevant in the clinical routine diagnostics and research. One possible choice is the recently developed flow-cytometry based, micro-bead technology. Polystyrene micro-beads are used as carriers in several immune-assays. The measurements applying flow-cytometry are optimal for the quick preliminary analysis of numerous samples.

Through the development of our sandwich-type anti-HBxAg ELISA and its adaptation we offer an immunoserological micro-bead assay for flow-cytometry capable of micro-analysis.

We also performed the comparative study of these two systems on human serum samples of the same origin. The results show strong correlation.

From a technical point of view, this study is an adaptation that can be used to reveal new correlations. The developed bio-statistical panel can help us in clinical and epidemiological analyses.

Our immunoserological measurements on 208 clinically verified serum-samples support the possible role of the hepatitis B virus protein X in the pathomechanism of HBV and suggest the use of HBxAg as a prognostic marker.

Summary

Hepatitis B virus (HBV) is a frequent human pathogen that belongs to the hepadnaviridae family. According to the study of the World Health Organization (WHO), 400 million chronic hepatitis B infected patients lived on the globe at the millennium. The number of dead due to complications of HBV infection fluctuated between 500 000 and one million in the last decade. The main importance of HBV infection is that in the case of chronic carriers, the chance of the developing primary hepatocellular carcinoma (PHC) increases 200 folds. It is accepted that the X antigen of hepatitis B virus (HBxAg) coded by the fourth "open reading frame" of the virus, plays a crucial role in the development of PHC. This antigen is extremely conservative, the 17kDa protein is very hydrophobic. 80 (54%) of the 154 residues are hydrophobic that represents a physico-chemical structure unique in biological systems. The HBxAg is a multifunctional regulatory protein that modulates the function of many transcription factors. According to data in the literature the expressed HBxAg has fundamental prognostic value in the clinical diagnosis in patients carrying the HBV genome.

The complication of indicating HBxAg originates from its strong hydrophobic character. It is well known that it makes non-specific molecular interactions, it is often masked and rarely accessible for detecting antibodies. Specific treatment of the studied samples is needed for its detection.

We had two major goals during this work. In the first step we produced monoclonal antibodies that interact with the X antigen of hepatitis B virus. This was necessary to make further studies of the virus protein, such as immunological-mapping, immune-serology and immune histochemistry. The other goal was to develop an immuno-serological diagnostic for routine clinical laboratories. No such antibodies and serological assays are currently commercially available.

We were successful in developing a family of monoclonal antibodies by using recombinant HBxAg that was ready to use on routine histological samples embedded in formol-paraffine for immunohistochemistry studies. Their combined use enabled us the quantitative analysis of human sera samples.

Our antibodies bind to functional immuno-determinants. One of our antibodies (clone: 4F1/A9) binds to the N-terminal region (13-26 residues) of HBxAg like the XAP2, that has the probable function of inhibiting the transactivation effect of X antigen. The epitope sequence of our other antibody (clone: 3F6/G10) is located in the DDB1 and HBxAg binding (docking) sequence (DDB1 is a protein involved in DNA repair). The HBxAg-DDB1 connection inhibits the function of DDB1 and through this, modulates the viability and proliferation of cells and increases the HBV replication.

We found specific distribution of positive intracellular HBxAg labeling during our immuno-histochemistry studies. Dramatic differences have been demonstrated in the intensity of positive staining between the cytoplasm and nucleus during the different stages of hepatitis

B infection. It could be concluded in general that while nucleic positive signals were dominated during liver cirrhoses and PHC, in acute hepatitis mainly the cytoplasm showed (granular) positive signals. During chronic hepatitis, intensive (diffuse) staining was manifested both in the nucleus and the cytoplasm. During chronic hepatitis B infection the increase in the percentage of HBxAg-positive nuclei may indicate the relapse of the disease and the development of primary hepatocellular carcinoma.

We performed serological studies by different methods: combined application of our monoclonal antibodies, ELISA, using the fragments of recombinant HBxAg, developed by our *in silico* predicted data, microbead technique feasible for multi-parametric studies.

While the synthetic peptide sequences (chosen by our predictive studies) that have high antigen values were recognized by our polyclonal anti-HBxAg antibodies, the anti-HBxAg antibodies originated from our hybridoma clones did not. We used different methods to perform epitope-mapping. We were successful in determining the amino-acid sequence recognized by our antibodies with the help of peptide library expressed on filamentous phages. The defined regions of the HBxAg, recognized by our pre-chosen antibodies, interact with the regions playing important role in the course of the disease therefore they are appropriate for prognostic studies.

We were able to perform quantitative study on a large number of samples with the help of developed ELISA systems for the first time. In this experiment we reveal the connection between the amount of circulating HBxAg and the titer of different antibodies produced against the different regions of the antigen. To explore the correlations we processed 80 samples of sera (sixteen data points per sample) during our studies. We found new data to define the prognosis of the disease based on the bio-statistic process: there is a significant correlation between the high titer of IgG antibodies against the C1 epitope (amino acid sequence 97-117 HBxAg) and the high amount of circulating HBxAg in the chronic stage of hepatitis B virus infection. According to literature data the C terminus of HBxAg has a transactivator function. The strong immune response against this region and the elevated expression of the X antigen may indicate the malignant development of the hepatitis B virus infection.

Publications related to the thesis

1. **Pal J**, Somogyi C, Szmolenszky A A, Szekeres G, Sipos J, Hegedus G, Martzinovits I, Molnar J, Nemeth P. Immunohistochemical assessment and prognostic value of hepatitis B virus X protein in chronic hepatitis and primary hepatocellular carcinomas using anti-HBxAg monoclonal antibody. Pathol Oncol Res. 2001;7(3):178-84
2. **Pal J**, Czompoly T, Nyarady Z, Marczinovits I, Janaky T, Kele Z, Felici F, Nemeth P. Determination of the fine epitope specificity of an anti-hepatitis B virus X protein monoclonal antibody using microanalytical and molecular biological methods. Mol Immunol. 2003 Sep;40(5):241-6
3. **Pal J**, Marczinovits I, Hudecz F, Toth GK, Mezo G, Molnar J, Nemeth P. Modeling of Main Characteristics of Bullous Pemphigoid Antigen-2 (BPAG2) Peptide Structure in Serological Recognition by Autoantibodies. Pathol Oncol Res. 2004;10(1):52-6.
4. Nyarady Z, Czompoly T, Bosze S, Nagy G, Petrohai A, **Pal J**, Hudecz F, Berki T, Nemeth P. Validation of in silico prediction by in vitro immunoserological results of fine epitope mapping on citrate synthase specific autoantibodies. Mol Immunol. 2006 Mar;43(7):830-8.
5. **Pal J**, Pálinkás J, Nyárády Z, Czömpöly T, Marczinovits I, Lustyik Gy, Younes SA, Berencsi Gy, Chen R, Varró R, Pár A, Nemeth P: Sandwich type ELISA and a fluorescent cytometric microbead assay for quantitative determination of Hepatitis B virus X antigen level in human sera. J Immunol Methods. 2005 Nov 30;306(1-2):183-92.
6. **Pal J**, Nyárády Z, Marczinovits I, Pár A, Younes SA, Berencsi Gy, Kvell K, Németh P. Comprehensive regression analysis of hepatitis B virus X antigen level and anti-HBx antibody titer in the sera of patients with HBV infection. Pathol Oncol Res. 2005 (elfogadva)

Publications not related to the thesis

1. Engelmann P.; **Pál J**.; Berki T.; Cooper E.L.; Németh P. Earthworm leukocytes react with different mammalian antigen-specific monoclonal antibodies Zoology, October 2002, vol. 105, iss. 3, pp. 257-265(9)
2. Lorand T, Kocsis B, Sohar P, Nagy G, **Jozsef P**, Kispal G, Laszlo R, Prokai L. Synthesis and antibacterial activity of fused Mannich ketones. Eur J Med Chem. 2002 Oct;37(10):803-12
3. Sandor J, Szucs M, Kiss I, Ember I, Csepregi G, Futo J, Vimlati L, **Pal J**, Buki A, Doczi T. [Risk factors for fatal outcome in subdural hemorrhage] Ideggyogy Sz. 2003 Nov 20;56(11-12):386-95. Hungarian.
4. Nagy G, **Pál J**, Bősze Sz, Nyárády Z, Berki T, Subhamay G, Petrohai Á, Czirják L, Németh P: Comparative epitope mapping of mitochondrial innermembrane specific autoantibodies which participate in the formation of the immunological homunculus. Immunology Letters 2003 87: 1-3. W27.13
5. Schwarcz A, Bogner P, Meric P, Correze JL, Berente Z, **Pal J**, Gallyas F, Doczi T, Gillet B, Beloeil JC. The existence of biexponential signal decay in magnetic resonance diffusion-weighted imaging appears to be independent of compartmentalization. Magn Reson Med. 2004 Feb;51(2):278-85
6. Kover F, Schwarcz A, **Pal J**, Bogner P, Vajna T, Vadon G, Doczi T. Fast method for longitudinal relaxation time and water content mapping of the human brain on a clinical MR scanner. Acta Neurochir (Wien). 2004 Sep 27
7. Orsolya Farkas, Andrea Tamás, Andrea Zsombok, Dóra Reglődi, **József Pál**, Andras Büki, István Lengvári, John T. Povlishock, Tamás Dóczi. Effects of pituitary adenylate

cyclase activating polypeptide in a rat model of traumatic brain injury. Regulatory Peptides 2004 Dec 15;123(1-3):69-75.

8. **Pál**, A. Büki, A. Zsombok, J. Lück, D. Szellár, T. Dóczi and J.T. Povlishock, Traumatic brain injury evokes axonal injury in the spinal cord 7th International Neurotrauma Symposium Adelaide - Australia -12-16 September, 2004 Proceedings of the INTS. 2004; 111-114.
9. Kovacs L, Marczinovits I, Gyorgy A, Toth GK, Dorgai L, **Pal J**, Molnar J, Pokorny G. Clinical associations of autoantibodies to human muscarinic acetylcholine receptor 3213-228 in primary Sjogren's syndrome. Rheumatology (Oxford).2005 Aug;44(8):1021-5
10. Tamás A, Zsombok A, Farkas O, Reglődi D, Pál J, Büki A, Lengvrái I, Povlishock JT, Dóczi T. Postinjury administration of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) attenuates traumatically induced axonal injury in rats. J Neurotrauma 2005 (in press)
11. Dóczi T, Schwarcz A, Gallyas F, Bogner P, **Pal J**, Sulyok E, Gomori E, Vajda Z. Regulation of water transport in brain oedema. IIdeggyógyászati Szemle 2005 58 (9-10): 298-304.
12. Pal J, Toth Z, Farkas O, Gasz B, Kellenyi L, Doczi T, Gallyas F. Selective induction of ultrastructural (neurofilament) compaction in axons by means of a new head injury paradigm. Journal of Neuroscience Methods 2005 Dec 26; [Epub ahead of print]
13. Gallyas F, Pal J, Farkas O, Dóczi T. The fate of axons subjected to traumatic ultrastructural (neurofilament) compaction. Acta Neuropathological 2006 Feb 17; [Epub ahead of print]