

**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 betegeknek 25-30 év alatt alakul ki az elsődleges májrák. A hepatitis B vírus (HBV) fertőzésben a krónikus hordozókká vált betegeknek az elsődleges májrák kialakulásának valószínűsége kétszázszorosa a fertőzésen át nem esettekének. A krónikus hepatitisben és PHC-ban az epidemiológia mortalitási statisztikai következményen évi fél és egy millió közötti halálozást 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 közegészségügyi-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 transzkripció 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 kialakulásán milyen immunológiai mechanizmusok befolyásolják. Alapvető kérdés, hogy az akut fertőzésből hogyan alakul ki a krónikus vírus-hordozó 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 hepatocellularis carcinoma indukációjában 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 rezponzív 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 transzkripció faktorhoz, mint az Oct1, ATF, ATH2, CREB, Egr1, valamint azokhoz a faktorokhoz, melyek bZIP domain tartalmaznak. Más esetekben (NF-kB, SRF, Spl) direkt kapcsolatot nem sikerült kimutatni. Ezekben az esetekben transzkripciót befolyásoló hatását indirekt úton fejt ki, komplex szignál-transzdukciós utakat használ. A diacilglicerol (DAG) szintjének növelésével aktiválja a protein kináz C-t (PKC) és a különböző PKC-függő transzkripció faktorokon keresztül fejt 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 (tranzien 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 tudunk kifejleszteni, amelyek felhasználásával átfogó, összehasonlító immunszerológiai felmérést tudunk 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 expresszálandó 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, formalin-fixált, paraffinba ágyazott metszeteken.
5. Immunszérum (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-Osguthorpe-Robson* másodlagos szerkezet predikciós algoritmust ($P_{\text{hydrophobicity}} < 0$; $P_{\beta\text{-turn}} > 1$) (Chou, 1974; Garnier, 1978; Gibrat, 1987; Prevelige, 1990) és a *Jameson-Wolf* antigenitási indexet ($P_{\text{JW antigenity}} > 1$) (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 *SpeI* és *SmaI* enzimekkel kimetszettük és a pUC19 plazmid *HincII* és *XbaI* hasító helyei közé klónoztuk. Így létrejött pHBX-8 plazmid, melyből az *SmaI* és *PstI* enzimekkel kivágott X gén klónozható a pRIT2T fúziós-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 létrehozunk.)

Választásunk az u.n. GST gén-fúziós expressziós rendszerre esett. Ez olyan expressziós vektor, melyben IPTG-vel indukálható p_{tac} promotor 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 enzimmal 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 *BamHI-FspI* enzimekkel történő hasítását követően a csonkított X gént a pHSG 395 klónozó vektoron keresztül a pGEX-3X (Marczinovits 1997) fúziós expressziós vektor *BamHI-SmaI* 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 géntechnológiai 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) *NcoI* és *Bg/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 *Bg/II* és *EcoRI* enzimekkel vágtuk és a pGEX-3X vektor *BamHI* és *EcoRI* helyére klónoztuk. Így a pGEX-3XX rekombináns plazmidot kaptuk. A HBx N terminális végét kódoló rekombináns plazmidot, a pGEX-3XX *AvaI* és *EcoRI* hasítását követően, a ragadós végeket Klenow enzimmal 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 Szegei Tudományegyetem Orvosi Kémiai Intézetében (Dr. Tóth Gábor) kémiai 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 adjuvánsal, a megerősítő immunizálást (intrakután és intraperitoneálisan) inkomplett Freund adjuvánsal 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-HBxAg₁₃₋₂₆ (TG-HBxAg₁₃₋₂₆) szintetikus peptidet használtunk. Két nappal az utolsó immunizálás után végeztük el a sejt-fúziót. 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 (4×10^{-4} mM) tartalmú DMEM+20%FCS (Gibco, USA) tápoldaton szelektáltuk. A hibridóma felülűzőket ELISA-val (enzyme linked immunosorbent assay) teszteltük. Antigénként a glutation S transzferáz-HBxAg (GST-HBxAg) és tengeri csiga hemocianin-HBxAg₁₃₋₂₆ (KLH-HBxAg₁₃₋₂₆) 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 véghígításos módszerrel klónoztuk. A legjobb klónokból, monoklonális ellenanyagot állítottunk elő a további immunszerezológiai, 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-HBxAg₁₃₋₂₆ szintetikus peptidet használtuk. A specificitás kontrollja immunoblottal történt.

Az ELISA vizsgálatokat a következőképpen végeztük: a mikrotitrátor lemezhez (Nunc, USA) egy éjszakán keresztül 4 °C-on 2 µg/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 °C-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 °C -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 tejjel (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 jodoacetammiddal alkalikus kémhatást állítottuk be (pH 8.0). Tripszin (1: 10 hígításban) hozzáadása után a mintákat egy éjszakán keresztül 37 °C-on inkubáltuk. A peptid-fragmentumokat a gélből kioldottuk (5 % hangyansav, 50 % metilaklohol, 45 % víz). Az egyes peptidok elválasztást HPLC-vel, 4.0 x 250 mm, Nucleosil 5C18 300Å oszlopon végezzük (0.1 % trifluoecetsav 80 %-os vizes acetonitril oldószerekben, 5-95 % 40 min gradiens 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 Tween-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-foszfátáz 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 Patológiai 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 vizsgálathoz 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 mellett vizsgáltuk a HBxAg fragmensek segítségével a szérumban az X antigén különböző epitópjai ellen termelődött ellenanyagok arányát. A szérumokat a Johan Béla Országos Epidemiológiai Központ, Virologia laboratóriumától és a PTE ÁOK I. Belgyógyászati Klinika Gasztroenterológiai laboratóriumától kaptuk.

Szendvics ELISA

Mikrotitrátor lemezhez egy éjszakán keresztül 4 °C-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 hígítású normál szérummal) pH 2-es glicin pufferben inkubáltuk 56 °C-on, 10 percig, majd 1M Tris-sel pH 8-9-re állítottuk be. A hepatitis B pozitív és az egészséges kontroll szérumokat 10-es hígításban használtuk és hasonlóan kezeltük mint a standard sorhoz használt rekombináns antigént. Ezek után 37 °C-on, 6 órás inkubáció után biotinált, második *detektáló*

anti-HBxAg monoklonális ellenanyag (klón: 4F1/A9) 1 órás inkubációja következett, 37 °C -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 denzitás 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 fuzionáltatott HBxAg fragmenseket és szintetikus KLH-HBx_{13-26,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 °C-on, 1 órán át inkubáltuk a szérumok százszoros hígításával. Háromszori mosás után tormaperoxidázzal jelölt anti-humán IgG és IgM-mel (Dako, Dánia) történő, 1 órás inkubáció következett, 37 °C -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 mikrogöngy alapú áramlási citometriai esszé

A szendvics ELISA-ban használt monoklonális antitest párt használtuk egy mikrogöngy 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 mikrogöngyökre (BD Biosciences USA) kötöttük thiol-maleimid alapú kovalens kötéssel. A jelölt mikrogöngyöket 4 °C -on tároltuk. A mikrogöngyöket 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 mikrogönggyel inkubáltuk 4 órán keresztül 37 °C -on. A minták háromszori mosása után 1 órán keresztül inkubáltuk a mintákat a biotínált antigén-detektáló anti-HBxAg (4F1/A9) monoklonális antitesttel (2ug/ml). Mosási lépések után a mintákat streptavidin-FITC (DAKO) 1 / 100-as hígításával inkubáltuk 37 °C -on 1 órán keresztül. Végül a minták háromszori mosása után FACSCalibur áramlási citométerrel (BD Biosciences USA) mértük meg. Továbbiakban a mért FITC intenzitás 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 analízist mind a három csoportban (akut, krónikus és hordozó) minden mintával minden minta ellen mátrixban elvégeztük (N, C, C1, C2, C3, X, X₁₃₋₂₆, HBxAg). A 0.4-nél kisebb abszolút értékű regressziós koefficienssel ($|R| > 0,4$) 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 talá-lunk csavarodásokat. A 75. aminosavtól a 130.-ig nagy számban találunk alfa-hélixeket. To-vábbi 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. Rész-ben ez utóbbi fiziko-kémiai tulajdonsággal magyarázható, hogy a HBxAg fehérjét a hagyó-mányos biokémiai eljárásokkal nem sikerült eddig tisztán izolálni, mert vizes oldatokban könnyen kicsapódik.

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

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 szinteti-kus peptidekkel megfelelően reagáló klónokat.

A peptid szekvenciák kiválasztásával egyidejűleg az X fehérje immunológiai térképezésé-nek elvégzéséhez a predikciós eredményeink alapján további rekombináns X fragmens szek-venciákat 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 *BamHI* majd *EcoRI* restrikciós enzimekkel emésztettük, pGEX vek-torba ligáltuk, majd a kapott konstrukciókkal DH5 α 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 (tiroglobulin, 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 antitestek kizárólagos kötődése a cél antigénhez.

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

Azonban intenzív immunreakciót találtunk humán májbiopsziás mintákban, - amelyek krónikus hepatitis B vírus hordozó 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 vírus hordozó 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 találunk 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 hepatitiszes 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 specificitásának 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 molekulásúlyuk 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 (${}_{14}\text{DVLCLRPVGAESR}_{26}$) 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 megszürtük a random peptid könyvtárat. A vizsgálat eredményeként tíz (10) fág klont 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 (₈₉LPKVLH₉₄) 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 specifikitását 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 specifikitásának 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 esszénkkal detektálni. Az antigén koncentrációja 18.2 ng/ml és 1803.86 ng/ml értékek 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 fehérjének alacsony 200 ng/ml alatti koncentrációját tudtuk kimutatni.

Az egészséges kontrollok esetében konzekvensen nem tudtuk 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 rekombináns 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 hepatitiszes 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 ötlet 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 recesszív 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 vírus hordozók 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 mikrogöngy esszével

Az általunk kifejlesztett szendvics típusú áramlási citometriai mikrogöngy esszében - amelynek módszertani háttérét 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 mikrogöngyre, majd a 4F1/A9 jelű klón által termelt ellenanyagot fluoreszcian-izotiocianáttal (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 alap kutatásának 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 felszínén 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 spektrometriai technikák alkalmazásának hatékonyságát és csökkentik a számítógépes szerkezetelemzés sikerét. Ezt mi is tapasztaltuk a saját anti-HBxAg monoklonális antitestünk epitóp specifikitásának vizsgálata során:

- Mivel az anti-HBxAg hibridómák szelekciója során nem az *in silico* prediktált régióban (a 22-31 és a 100-114 szekvencia) kaptunk pozitívítást 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 tömegspektrometriai 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 (⁸⁹LPKVLH₉₄) 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 tömegspektrometriai 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 előállításának 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 sejtsoportokra 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 pozitívítás 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 pozitívításban 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 transzkripció 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 transzkripció 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 pozitívításának 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 patológiai 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 kifejleszteni, az előzőekben már jellemzett 3F6/G10 klónszámú IgG2a izotípusú (esszékben befogó antitest, epitóp: 89-94 aminosav szekvencia) és a 4F1/A9 klónszámú IgG1 izotípusú (esszékben detektáló antitest, epitóp: 13-26 aminosav szekvencia) monoklonális antitesteket. 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 recesszivitás 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 csoport-hoz képest az IgM válasz heterogenitása figyelhető meg. Mérsékelt kapcsolat mutatható ki a C1 és N-terminális elleni IgG típusú immunfelismerés és a szérumban lévő HBxAg mennyisége között. (Ez utóbbi valószínűleg jelzi, hogy az immun-komplexek IgG antitestekből és HBxAg-ból épülnek fel.) Ez a korreláció mutatja a HBxAg transzaktivációt módosító 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 ún. mikrogyöngy technika is. Polisztrén mikrogyöngyöket számos immunesszében használnak hordozóként. Az áramlási citometriai mérések optimálisak nagyszámú minta gyors analizésére.

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 szérumban. Az így keletkezett mérési eredmények erős korrelációt mutattak.

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

A 208 klinikailag ellenőrzött szérumban 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, envelopppal 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 laboridiagnosztikai 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 mikroyöngy 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 expresszálatot 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-terminális 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 témavezetőként 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 immunhisztokémiai, 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. Pálkás 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**, Pálkás 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 tömegspektrográfiai 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 structure 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, 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. 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. *Ideggyógyászati 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.