

B형 간염 바이러스의 X단백질에 대한 특이항체의 세포 내 발현

아주대학교 의과대학 미생물학교실

진 영 희 · 김 형 일 · 박 선

Expression of Intracellular Single Chain Antibody Specific to Hepatitis B Virus X Protein

Young Hee Jin, Hyung-il Kim and Sun Park

Department of Microbiology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

ABSTRACT

Background: Intracellular antibody specific to hepatitis B virus X protein (HBx) might be useful for studying the role of HBx in hepatocellular carcinogenesis and HBV replication. **Methods:** With variable region genes for H7 monoclonal anti-HBx Ab, we constructed a vector for bacterial expression of single chain Ab (scFv) and a vector for eukaryotic cell expression of it. The expression of H7 scFv and its binding activity against HBx was examined by immunoblotting and immunofluorescence microscopy. **Results:** H7 scFv expressed in bacterial cells retained reactivity to HBx. We demonstrated its intracytoplasmic expression in CosM6 eukaryotic cells. **Conclusion:** This is the first study showing the expression of intracellular anti-HBx Ab in eukaryotic cells. H7 scFv may be a good tool to study the function of HBx in HBV infection. (*Immune Network* 2003;3(1):23-28)

Key Words: Intracellular Ab, hepatitis B virus, X protein

서 론

우리나라에서 높은 유병률을 보이고 있는 B형 간염 바이러스(HBV)는 만성 간염과 간암을 일으킬 수 있다(1). HBV는 3.2 kb의 DNA와 지질의 외막을 가지고 있는 바이러스로서 외막 단백질(s Ag), 캡시드 단백질(core protein), 복제효소(polymerase), X 단백질의 유전자를 가지고 있는데 이 중 X 단백질은 간암 발생과 바이러스의 복제에 관련되어 있어 주목을 끌고 있다(1).

X 단백질에 의한 간암 발생과 관련하여 X 단백질이 세포 주기(cell cycle)의 진행에 영향을 미치고, 종양억제 유전자 P53과 결합하여 기능을 억제하며, 조건에 따라서 세포사를 항진시키거나 억제하고, ras-raf-MAP kinase 신호전달 체계의 활성을 유도하며, transactivator로서 작용

한다는 사실들이 보고되었다(2-7). 이렇게 다양한 기능이 밝혀져 있지만 X 단백질이 간암을 유도하는 구체적인 기전은 아직 명확하지 않다.

복제와 관련된 연구는 서로 상반된 결과를 보여주고 있다. HBV의 복제가 활발하지 않은 보균자에서 분리된 바이러스는 X 단백질의 결손 변이가 관찰된 반면 복제가 활발한 활동성 만성 간염 환자에서는 이러한 변이가 관찰되지 않은 사실에서 X 단백질이 바이러스 복제에 관여할 것이라 하였으며, X 단백질이 세포내 칼슘 증가를 통해 HBV 증식에 관여함을 보인 *in vitro* 실험 결과는 이를 뒷받침하였다(8,9). 반면, X 단백질을 발현하지 않는 HBV transgenic 마우스를 이용한 실험에서는 X 단백질이 바이러스 복제에 필요하지 않다고 하였다(10). 한편, HBV의 동물 모델인 woodchuck에서 X 변이 woodchuck 간염 바이러스가 증식이 활발하지 않으며 증식된 바이러스는 X 유전자의 변이가 수정된 형태를 보인다는 결과는 정상적인 면역 체계가 작용하는 상황에서 X 단백질이 바이러스 증식에 도움을 주는가 하는 또 다른 문제를 제기한다(11).

책임저자 : 박 선, 아주대학교 의과대학 미생물학교실
☎ 442-749, 경기도 수원시 팔달구 원천동 산5
Tel: 031-219-5075, Fax: 031-210-5079
E-mail: sinsun@ajou.ac.kr

이 연구는 Korea Research Foundation Grant (KRF-1998-021-F00206)의 지원으로 수행되었음.

X 단백질의 기능을 억제하는 방법은 HBV에 의한 간암 발생기전과 HBV의 복제에 관련한 연구에 유용하게 이용될 수 있다. 단백질 수준에서 특정 단백질의 기능을 억제하는 방법의 하나로 세포내 항체 발현법이 개발되어 있는데, X 단백질의 발현량이 HBV 감염에서 낮은 수준이므로 세포내 항체는 매우 효과적으로 X 단백질의 기능을 억제할 수 있을 것으로 예측된다. 이제까지 HBV의 외막 단백질과 캡시드 단백질에 대한 세포내 항체가 보고되어 있으나 X 단백질에 대한 세포내 항체는 아직 보고되지 않았다(12,13). 이에는 X 단백질에 대한 특이 항체 유전자를 확보하기가 쉽지 않은 상황이 한 원인으로 작용했을 것이다. 이 연구에서는 우리가 이전의 연구에서 생산한 X 단백질에 대한 단클론 항체 H7(14)의 항체 유전자를 이용하여 세포내 항체 발현 벡터를 생산하고 그 발현을 확인하였다.

재료 및 방법

Prokaryotic H7 scFv expression vector의 생산. H7 중쇄 가변부(VH)와 경쇄 가변부(VL) 유전자가 각각 들어있는 pGEM-T Easy vector (14)를 주형으로 하여 PCR을 시행함으로써 H7 VH와 VL 유전자를 각각 증폭시켰다. 이때 VH 유전자의 증폭을 위해 *Xma*I 인식 서열을 가진 VHU2 (TCCCCCGGGCACAGGTCCAAGTGCAGCAG)와 *Xba*I 인식서열을 가진 VHL4 (GCTCTAGAGGAGACTGTGAGGGTGG) primer가 사용되었고, VL 유전자의 증폭을 위해 *Bg*III 인식 서열을 가진 VKU3 (GAAGATCTTGATGTTGTGATGACCC)와 *Nco*I 인식서열을 가진 VKL2 (CATGCCATGGCGCGCCGATCAGCCCCGTTT) primer가 사용되었다. 증폭된 VH DNA의 *Xma*I과 *Xba*I으로 자른 조각을 pIg20 vector (Dr. B.D. Stollar, Tufts Univ., Mass., USA 제공)에 삽입시켜 pIg20-H7VH를 얻은 다음, *Bg*III와 *Nco*I으로 잘린 VL DNA를 pIg20-H7VH vector에 삽입하여 pIg20-H7scFv를 생산하였다(Fig. 1). 삽입된 H7scFv의 유전자를 염기서열 분석하여 확인하였다. 유사한 방법으로 HBV 외막 단백질에 대한 항체 S2E1 (15)의 중쇄와 경쇄의 가변부 유전자를 pIg20 vector에 삽입하여 pIg20-S2E1scFv를 생산하고 대조군으로 이용하였다. 이때 사용한 primer는 다음과 같다. VHU2, VHL1 (GCTCTAGAGACAGTGACCAGAGTCCC), VKU1 (GAAGATCTCAGGGGACAAAAGTTC), VKL6 (CATGCCATGGTGTGATGATGATCAGCCCCGTTT).

대장균에서 발현된 H7 scFv의 정제. pIg20-scFv로 형질 변환된 대장균(BL21-plyse strain)을 ampicillin 100µg/ml이 함유된 37°C LB 배지에서 배양하고 0.5 mM isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG)로 scFv 발현을 유도하였다. IgG sepharose column을 Tris-saline Tween 20 buffer (50 mM Tris buffer, pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.5% Tween 20)와 5

mM ammonium acetate buffer, pH 5.0로 세척한 다음, 배양액을 원심 분리하여 얻은 상청액을 IgG sepharose column에 반응시켰다. 반응시킨 column에 0.1 M acetic acid (ammonium acetate로 pH 3.4)를 통과시켜 H7scFv를 용출(elution)하였다.

대장균에서 X 단백질의 발현과 정제. Histidine tag가 결합된 X 단백질 발현 vector를 가지고 있는 대장균 (DH5α strain)을 ampicillin 100µg/ml이 함유된 37°C LB 배지에서 배양하고 600 nm에서 흡광도가 0.6~0.7일 때 IPTG를 넣고 실온에서 5시간 더 배양함으로써 X 단백질의 발현을 유도하였다. 대장균을 수확하여 lysis buffer (50 mM Na₂HPO₄ pH8.0, 500 mM NaCl, 10 mM imidazole)에 부유한 후 초음파로 세포를 분쇄하였다. 원심분리하여 회수한 상청액에서 X 단백질은 Ni-NTA column (Qiagen Inc., Hilden, Germany)과 imidazole buffer를 이용하여 정제하였다. 정제된 단백질을 SDS-PAGE하여 19 Kda 부근을 오려 전기 용출(electroelution)하였다. 용출액(eluate)을 4°C에서 1 mM EDTA에서 투석(dialysis)하여 ultrafilterator와 microcon으로 농축하여 사용하였다.

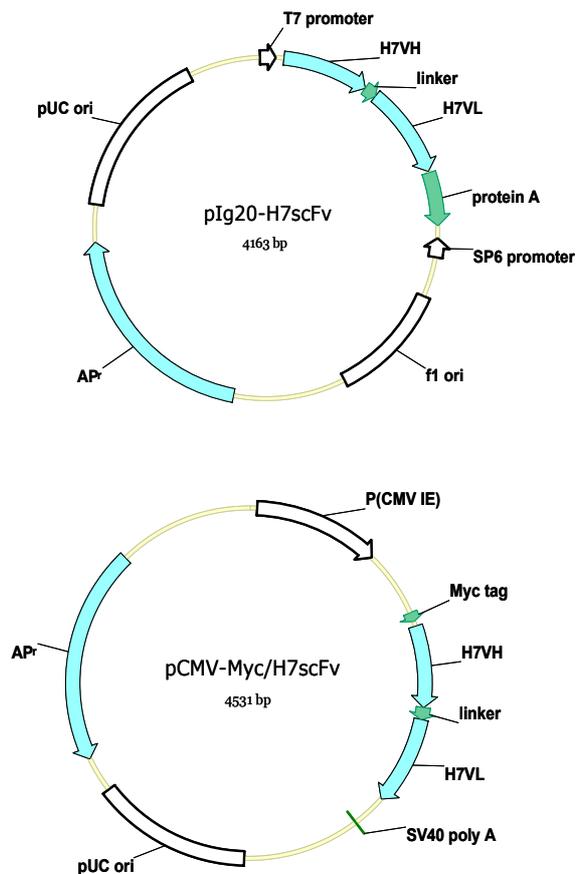


Figure 1. Construction of scFv expression vectors. Genes for H7 VH and VL were inserted into a pIg20 vector. H7 scFv gene was subcloned into a pCMV-Myc vector.

SDS-PAGE와 immunoblotting. 정제된 X 단백질 혹은 세포 용해액을 15% 또는 10% SDS-PAGE로 분리한 후 nitrocellulose membrane으로 전이(transfer)하였다. Membrane을 3% 우혈청 알부민이 함유된 인산완충식염수에 넣고 2시간 동안 실온에 정치한 다음 일차항체와 2시간 동안 반응시켰다. 일차항체로 이용된 것은 대장균에서 발현된 H7 scFv와 대조군으로 이용된 S2E1 scFv(HBV S 항원에 특이한 항체), H7 단클론 항체 혹은 anti-Myc tag Ab이었다. Membrane을 0.05% Tween 20이 함유된 인산완충식염수로 세 번 세척한 후 일차 항체가 대장균에서 발현된 scFv인 경우 membrane을 토끼 항체와 2시간 반응시킨 다음 alkaline phosphatase가 결합된 anti-rabbit Ig Ab와 2시간 반응시켰다. 일차항체가 H7 단클론 항체 또는 anti-Myc tag Ab (ClonTech)인 경우 membrane을 alkaline phosphatase가 결합된 anti-mouse Ig Ab와 2시간 반응시켰다. Membrane을 세척한 다음 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate와 nitroblue tetrazolium 기질과 반응시켰다.

Eukaryotic H7 scFv expression vector의 생산. pIg20-H7scFv를 주형으로 하고 *EcoRI*과 *XhoI* 인식 서열이 각각 들어있는 VH8 (GGAATTCATATGCAGGTCCAAC TGC)과 VKL7 (CCGCTCGAGTTAATGGTGATGATGA TG) primer를 이용하여 PCR을 시행하였다. 증폭된 H7 scFv DNA를 pCMV/Myc (ClonTech)의 *EcoRI*과 *XhoI* site에 삽입하여 pCMV/Myc-H7scFv를 만들었다(Fig. 1). 삽입된 H7scFv의 유전자를 염기서열 분석하여 확인하였다.

H7 scFv의 진핵세포내 발현. Lipofectamine (GibcoBRL)을 이용하여 35 mm petridish에 배양한 COSM6 cell에 pCMV/Myc-H7scFv를 도입시켰다. Immunoblotting으로 H7 scFv의 발현을 검사하기 위하여 48시간 후 세포 용해액을 얻었다. 이때 RIPA buffer (0.15 M NaCl, 10 mM Tris-Cl pH 8.0, 0.1% SDS, 0.5% Deoxycholate, 0.1 mM PMSF, 0.1% Aprotinin)가 이용되었다. 세포 용해액을 10% SDS-PAGE로 분리한 후 nitrocellulose membrane으로 전이(transfer)하였다. 위에 기술한 방법과 anti-Myc tag Ab와 alkaline phosphatase가 결합된 anti-mouse Ig Ab를 이용하여 immunoblotting을 시행하였다.

면역 형광 염색법으로 H7 scFv의 세포 내 발현 위치를 조사하였다. 형질 변환된 COSM6 세포를 48시간 더 배양한 후 4% formaldehyde가 함유된 인산완충식염수에 넣고 15분간 정치함으로써 세포 고정하고, 0.2% Triton X-100이 들어있는 인산 완충 식염수에 15분간 정치하여 세포막의 투과도를 높인 다음 anti-Myc tag Ab와 반응시켰다. 세포를 세척한 후 Cy3가 결합된 anti-mouse Ig Ab로 염색하고 형광현미경으로 관찰하였다.

결 과

H7 scFv의 대장균내 발현과 X 단백질 결합능. 처음 세포내 항체 발현법이 개발되었을 때에는 전체 항체 유전자를 세포 내에서 발현시켰으나, 세포 내의 안정성 및 유전자의 크기 등의 이유로 항원 결합에 중요한 항체의 Fab, 또는 scFv 형태의 유전자를 발현시키는 시도가 있었고, 이후 많은 연구에서 scFv의 형태로 세포내 항체 발현법을 이용하고 있다(16,17).

X 단백질에 대한 항체 H7 유전자로부터 scFv 형태의 항체 발현 벡터를 생산하기 위하여 중쇄와 경쇄를 연결시켜주는 연결(linker) 펩타이드 유전자가 이미 들어있는 벡터 pIg20에 H7의 중쇄와 경쇄의 유전자를 각각 도입하였다(Fig. 1). pIg20은 세균 발현 벡터로서 scFv 유전자의 5' 말단에 세균의 alkaline phosphatase A의 leader 펩타이드 유전자가 있어 scFv가 대장균에서 세포밖으로 분비되도록 한다. 또한 pIg20에는 scFv 유전자의 3' 말단에 protein A 단백질 유전자가 있어 scFv-protein A 융합 단백질로 발현되도록 하여 scFv의 정제와 검출을 쉽게 한다. H7 scFv가 세균에서 발현되며 항원 결합능을 유지하는지 알고자, 만들어진 pIg20-H7scFv를 도입한 대장균의 배양액에서 H7 scFv-protein A 융합 단백질을 IgG-sepharose column을 이용하여 정제하였다. 먼저 SDS-PAGE와 immunoblotting을 시행하여 기대하던 약 35 kd 크기의 band를 검출함으로써 H7 scFv의 발현을 확인하였다(Fig. 2). 다음으로 정제된 H7 scFv와 정제된 X 단백질을 이용하여 immunoblot을 시행한 결과 대조군으로 사용한

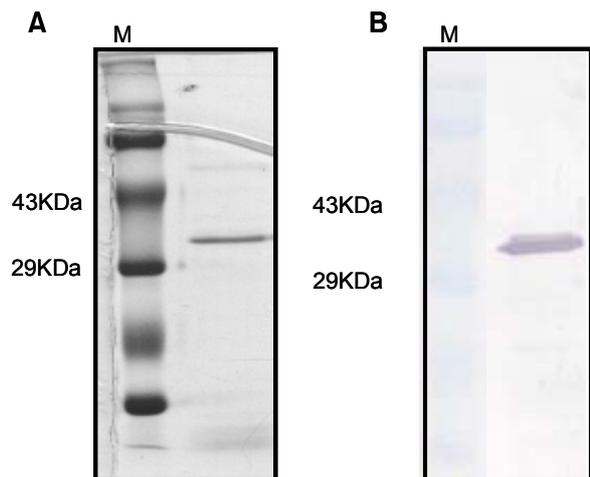


Figure 2. Purification of bacterially expressed H7 scFv. H7 scFv secreted by *E. coli* transformed with pIg20-H7scFv was purified by IgG sepharose column chromatography using the advantage of protein A, the fusion partner of H7 scFv. For immunoblotting, rabbit Ig and alkaline phosphatase conjugated anti-rabbit Ig Ab were used. (A) SDS-PAGE and (B) immunoblot analysis of purified H7 scFv.

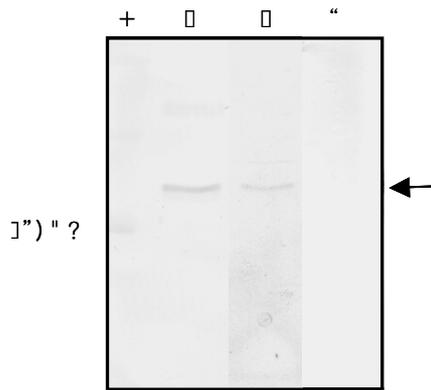


Figure 3. Immunoblot analysis of H7 scFv binding to HBx. HBx was electrophoresed on a SDS-PAGE and transferred to a membrane. The membrane was incubated in the solution containing either purified scFv or H7 control Ab. The bound scFv was visualized with rabbit Ig and alkaline phosphatase conjugated anti-rabbit Ig Ab as described in Methods. The purified H7 scFv (lane 2) but not control S2E1 scFv (lane 3) shows the binding activity to HBx. Purified H7 Ab (lane 1) was used as a positive control.

S2E1 scFv는 X 단백질에 결합하지 않은 반면 H7 scFv는 X 단백질과 결합함을 보임으로써 H7 scFv의 항원 결합능을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

진핵세포 COSM6 세포에서의 H7 scFv의 발현. H7 scFv 세포내 발현 벡터를 만들고자 pIg20-H7scFv를 이용하여 증폭한 H7 scFv 유전자를 pCMV-Myc vector에 도입하였다(Fig. 1). 생산된 pCMV-Myc/H7scFv를 진핵 세포 COSM6에 도입한 후 H7 scFv의 발현을 조사하였다(Fig. 4). 형질 변환된 COSM6 세포의 세포 용해액으로 immunoblotting을 시행한 결과 기대하던 크기인 약 30 kd의 band를 확인할 수 있었고, 형광 항체 염색 결과 COSM6 세포의 세포질에서 H7 scFv가 발현되는 것을 관찰하였다.

고찰

여러 바이러스 단백질과 oncogene 단백질에 대한 세포내 항체가 개발되어 표적 단백질의 기능을 억제하였다고 보고되어 있다. Human immunodeficiency virus Vif protein, matrix protein p17, tat, 그리고 gp120의 CD4-binding 부분에 대한 세포내 항체는 각각 이 바이러스의 증식을 억제하였고, C형 간염 바이러스의 nonstructural 3 protein의 helicase 기능을 나타내는 부분에 대한 세포내 항체는 C형 간염 바이러스의 증식을 억제하였으며, HBV의 캡시드 단백질에 대한 세포내 항체는 HBV의 증식을 억제하고, HBV의 외막 단백질에 대한 세포내 항체는 외막 단백질의 분비를 억제하였다(12,13,18-22). 종양 유전자 단백질 중 ras에 대한 세포내 항체는 ras 신호 전달 과정

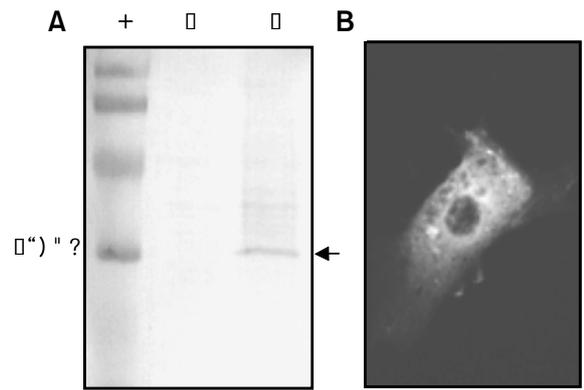


Figure 4. Intracellular expression of H7 scFv in eukaryotic cells. (A). Immunoblot analysis of H7 scFv expression in COSM6 cells transfected with pCMV-Myc-H7scFv (lane 2) using mouse anti-Myc tag Ab and alkaline phosphatase conjugated anti-mouse Ig Ab. As a negative control, cells transfected with pCMV-Myc (lane 1) were used. (B). COSM6 cells transfected with pCMV-Myc-H7scFv were stained with mouse anti-Myc tag Ab and Cy3 conjugated anti-mouse Ig Ab. Negative control (cells transfected with pCMV-Myc) was not shown because there was no signal. (×200).

을 억제하고 nude 마우스에서 종양 크기의 감소를 가져왔으며, 특히 erbB-2에 대한 세포내 항체는 난소암 환자의 새로운 치료 방법으로 이용될 수 있는지 알아보기 위해 phase I 연구까지 마쳐진 상태이다(23,24).

B형 간염 바이러스의 X 단백질은 바이러스의 증식과 간암 발생에서 중요한 역할을 하는 단백질이나 아직 이 단백질에 대한 세포내 항체는 보고되지 않았다. X 단백질의 기능을 억제하고자 이 단백질에 특이한 anti-sense oligonucleotides와 ribozyme이 고안되었으나 이들이 인터페론의 생성을 유도할 수 있으므로 이들에 의한 X 단백질 억제 효과가 인터페론과 함께 작용하여 나타난 결과일 가능성이 배제되어야 하지만 이를 명확히 한 연구는 찾아 볼 수 없다(25,26). 한편, X 단백질에 대한 dominant negative mutant의 개발은 쉽지 않을 것으로 예측된다. 왜냐하면, X 단백질에 의한 유전자 활성화 기능, 세포사 억제 등 많은 기능이 X 단백질의 C 말단 2/3 부분에 의해 일어난다고 보고되어 있는 반면 한 연구에서 X 단백질의 나머지 N 말단 1/3 부분이 간암 발생에 중요한 부분이라고 하였고 간암 조직에서 발현되는 X 단백질은 C 말단이 결실된 형태가 상당히 많았다는 보고가 이를 뒷받침하고 있어 dominant negative mutant로 이용할 수 있는 X 단백질의 형태가 아직 명확하지 않은 상태이기 때문이다(27-31).

이번 연구에서는 본 연구진이 이전의 연구(14)에서 확보한 X 단백질에 대한 단클론 항체 H7의 유전자를 이용하여 scFv형태의 세포내 항체 발현 벡터를 제조하였다. 먼저 항체의 중쇄와 경쇄의 가변부가 linker 펩타이드로

연결된 H7 scFv의 항원 결합능을 알아보고자 대장균에서 생산된 H7 scFv를 X 단백질과 반응시켜 보았다. 양가로 결합할 수 있는 H7 항체에 비하여 단가로 결합하는 H7 scFv가 X 단백질에 대한 반응성이 상대적으로 낮은 것으로 예상되었으나 immunoblotting으로 두 단백질 간의 결합을 확인할 수 있었다. 다음으로 COSM6 진핵 세포에서 H7 scFv가 발현되는 것을 immunoblotting으로 보이고, 면역 형광 현미경검법으로 H7 scFv의 발현 장소가 세포질인 것을 확인하였다. 아쉽게도 본 연구에서는 진핵 세포 내에서 발현된 H7 scFv의 항원 반응성은 확인하지 못하였다. 이를 확인하기 위하여는 X 단백질과 H7 scFv가 같이 발현되는 세포에서 immunoprecipitation을 시행해야 할 것이다(현재 진행 중). 이때 마주치는 어려움은 X 단백질의 발현량이 매우 낮다는 점이다. 한편 H7 scFv의 진핵 세포 내 발현량이 대장균에서처럼 높지 않고 대량 배양하는 데 따른 어려움이 있으므로 진핵 세포 내 발현된 항체를 정제하여 X 단백질과 반응시켜 보고자 시도하지 않았다. 그러나 세균에서 발현된 H7 scFv가 X 단백질과 결합한다는 점과 다른 연구자에 의한 세포 내 항체 발현 연구 결과를 고려할 때 진핵 세포 내에서 발현된 H7 scFv가 X 단백질과 결합하지 않을 가능성은 높지 않다고 생각된다. 본 연구 결과는 X 단백질에 대한 연구에 이용될 수 있는 세포 내 항체 발현법 확립을 위한 첫 시도로서 그 의의가 있다.

참 고 문 헌

- Chisari FV: Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Ann Rev Immunol* 13;29-60, 1995
- Ahn JY, Jung EY, Kwun HJ, Lee CW, Sung YC, Jang KL: Dual effects of hepatitis B virus X protein on the regulation of cell-cycle control depending on the status of cellular p53. *J Gen Virol* 83;2765-2772, 2002
- Terradillos O, de La Coste A, Pollicino T, Neuveut C, Sitterlin D, Lecoœur H, Gougeon ML, Kahn A, Buendia MA: The hepatitis B virus X protein abrogates Bcl-2-mediated protection against Fas apoptosis in the liver. *Oncogene* 21; 377-386, 2002
- Wang XW, Gibson MK, Vermeulen W, Yeh H, Forrester K, Sturzbecher HW, Hoeijmakers JH, Harris CC: Abrogation of p53-induced apoptosis by the hepatitis B virus X gene. *Cancer Res* 55;6012-6016, 1995
- Diao J, Khine AA, Sarangi F, Hsu E, Iorio C, Tibbles LA, Woodgett JR, Penninger J, Richardson CD: X protein of hepatitis B virus inhibits Fas-mediated apoptosis and is associated with up-regulation of the SAPK/JNK pathway. *J Biol Chem* 276;8328-8340, 2001
- Shintani Y, Yotsuyanagi H, Moriya K, Fujie H, Tsutsumi T, Kanegae Y, Kimura S, Saito I, Koike K: Induction of apoptosis after switch-on of the hepatitis B virus X gene mediated by the Cre/loxP recombination system. *J Gen Virol* 80; 3257-3265, 1999
- Klein NP, Schneider RJ: Activation of Src family kinases by hepatitis B virus HBx protein and coupled signaling to Ras. *Mol Cell Biol* 17;6427-6436, 1997
- Fukuda R, Nguyen XT, Ishimura N, Ishihara S, Chowdhury A, Kohge N, Akagi S, Watanabe M, Fukumoto S: X gene and precore region mutations in the hepatitis B virus genome in persons positive for antibody to hepatitis B e antigen: comparison between asymptomatic "healthy" carriers and patients with severe chronic active hepatitis. *J Infect Dis* 172; 1191-1197, 1995
- Bouchard MJ, Wang LH, Schneider RJ: Calcium signaling by HBx protein in hepatitis B virus DNA replication. *Science* 294;2376-2378, 2001
- Reifenberg K, Nusser P, Lohler J, Spindler G, Kuhn C, von Weizsacker F, Kock J: Virus replication and virion export in X-deficient hepatitis B virus transgenic mice. *J Gen Virol* 83;991-996, 2002
- Zhang Z, Torii N, Hu Z, Jacob J, Liang TJ: X-deficient woodchuck hepatitis virus mutants behave like attenuated viruses and induce protective immunity in vivo. *J Clin Invest* 108;1523-1531, 2001
- zu Putlitz J, Skerra A, Wands JR: Intracellular expression of a cloned antibody fragment interferes with hepatitis B virus surface antigen secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 255; 785-791, 1999
- Yamamoto M, Hayashi N, Takehara T, Ueda K, Mita E, Tatsumi T, Sasaki Y, Kasahara A, Hori M: Intracellular single-chain antibody against hepatitis B virus core protein inhibits the replication of hepatitis B virus in cultured cells. *Hepatology* 30;300-307, 1999
- Park OY, Jin YH, Lee M, Shin HJ, Kim HI, Cho H, Yun CW, Youn JK, Park S: Characterization and gene cloning of monoclonal antibody specific for the hepatitis B virus X protein. *Hybridoma* 19;73-80, 2000
- Park OY, Park S, Lee M, Jin YM, Kim HI: Production and gene cloning of monoclonal antibodies directed against S antigen of hepatitis B virus. *Korean J Immunol* 21;115-120, 1999
- Bradbury A, Ruberti F, Wrge T, Amati V, Luzio AD, Gonfloni S, Hoogenboom H, Piccioli P, Biocca S, Cattaneo A: The cloning of hybridoma V regions for their ectopic expression in intracellular and intercellular immunization. In: Borrebaeck CAK ed: *Antibody engineering*, p339, U.S.A., Oxford University press, 1995
- Levin R, Mhashilkar AM, Dorfman T, Bukovsky A, Zani C, Bagley J, Hinkula J, Niedrig M, Albert J, Wahren B, Gottlinger HG, Marasco WA: Inhibition of early and late events of the HIV-1 replication cycle by cytoplasmic Fab intrabodies against the matrix protein, p17. *Mol Med* 3; 96-110, 1997
- Goncalves J, Silva F, Freitas-Vieira A, Santa-Marta M, Malho R, Yang X, Gabuzda D, Barbas C 3rd: Functional neutralization of HIV-1 Vif protein by intracellular immunization inhibits reverse transcription and viral replication. *J Biol Chem* 277;32036-32045, 2002
- Mhashilkar AM, LaVecchio J, Eberhardt B, Porter-Brooks J, Boisot S, Dove JH, Pumphrey C, Li X, Weissmahr RN, Ring DB, Ramstedt U, Marasco WA: Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in vitro in acutely and persistently infected human CD4+ mononuclear cells expressing murine and humanized anti-human immunodeficiency virus type 1 Tat single-chain variable fragment intrabodies. *Hum Gene Ther* 10;1453-1467, 1999
- Levin R, Mhashilkar AM, Dorfman T, Bukovsky A, Zani C, Bagley J, Hinkula J, Niedrig M, Albert J, Wahren B, Gottlinger HG, Marasco WA: Inhibition of early and late events of the HIV-1 replication cycle by cytoplasmic Fab intrabodies against the matrix protein, p17. *Mol Med* 3;96-110, 1997
- Chen SY, Bagley J, Marasco WA: Intracellular antibodies as a new class of therapeutic molecules for gene therapy. *Hum Gene Ther* 5;595-601, 1994

22. Sullivan DE, Mondelli MU, Curiel DT, Krasnykh V, Mikheeva G, Gaglio P, Morris CB, Dash S, Gerber MA: Construction and characterization of an intracellular single-chain human antibody to hepatitis C virus non-structural 3 protein. *J Hepatol* 37;660-668, 2002
 23. Cochet O, Kenigsberg M, Delumeau I, Virone-Oddos A, Multon MC, Fridman WH, Schweighoffer F, Teillaud JL, Tocque B: Intracellular expression of an antibody fragment-neutralizing p21 ras promotes tumor regression. *Cancer Res* 58;1170-1176, 1998
 24. Alvarez RD, Barnes MN, Gomez-Navarro J, Wang M, Strong TV, Arafat W, Arani RB, Johnson MR, Roberts BL, Siegal GP, Curiel DT: A cancer gene therapy approach utilizing an anti-erbB-2 single-chain antibody-encoding adenovirus (AD21): a phase I trial. *Clin Cancer Res* 6;3081-3087, 2000
 25. Weinberg M, Passman M, Kew M, Arbuthnot P: Hammerhead ribozyme-mediated inhibition of hepatitis B virus X gene expression in cultured cells. *J Hepatol* 33;142-151, 2000
 26. Moriya K, Matsukura M, Kurokawa K, Koike K: In vivo inhibition of hepatitis B virus gene expression by antisense phosphorothioate oligonucleotides. *Biochem Biophys Res Commun* 218;217-223, 1996
 27. Kumar M, Jayasuryan N, Kumar R: A truncated mutant (residues 58-140) of the hepatitis B virus X protein retains transactivation function. *Proc Natl Acad Sci USA* 93;5647-5652, 1996
 28. Lee YH, Yun Y: HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signaling. *J Biol Chem* 273;25510-25515, 1998
 29. Gottlob K, Fulco M, Levrero M, Graessmann A: The hepatitis B virus HBx protein inhibits caspase 3 activity. *J Biol Chem* 273;33347-33353, 1998
 30. Gottlob K, Pagano S, Levrero M, Graessmann A: Hepatitis B virus X protein transcription activation domains are neither required nor sufficient for cell transformation. *Cancer Res* 58;3566-3570, 1998
 31. Tu H, Bonura C, Giannini C, Mouly H, Soussan P, Kew M, Paterlini-Brechot P, Brechot C, Kremsdorf D: Biological impact of natural COOH-terminal deletions of hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma tissues *Cancer Res* 61;7803-7810, 2001
-