

UITDRUKKING VAN DIE REKOMBINANTE HEPATITIS B-VIRUS MANTELPROTEÏENE IN EUKARIOTIESE UITDRUKKINGSISTEME

Jacobus Johannes Otto Koekemoer
B.Sc.

Skripsie voorgelê ter gedeeltelike voldoening aan die vereistes van die graad Magister Scientae (Biochemie) in die Fakulteit Natuurwetenskappe aan die Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys, Potchefstroom.

Studieleier: Prof. P.J. Pretorius
Medeleier: Dr. W.N. de Vries

POTCHEFSTROOM
APRIL 1998

INHOUDSOPGAWE

Abstract	1
Opsomming	3

HOOFSUK 1 Literatuuroorsig

1.1	Inleiding	5
1.2	Hepatitis B-infeksie	6
1.3	Subtypes en verspreiding van die hepatitis B-virus	9
1.4	Virusstruktuur	10
1.5	Replisering van die hepatitis B-virus	
1.5.1	Virusgenoom en replisering	11
1.5.2	Transkripsie	14
1.5.3	DNA-sintese en virusreplisering	16
1.6	Voorkoming en beheer van hepatitis B-infeksie	
1.6.1	Aktiewe immunisering	17
1.6.1.1	Ontwikkeling van proteïen-gebaseerde entstowwe	18
1.6.1.2	DNA-gemedieerde vaksinerings	20
1.6.2	Diagnose en behandeling van infeksie	
1.6.2.1	Diagnose	21
1.6.2.2	Behandeling	21
1.7	Doelstelling en benaderingswyse	23

HOOFSUK 2 Transfektering van die UWOV2 (Sf)-sellyn

2.1	Inleiding	25
2.2	Evaluering van die transfeksiemetodes	
2.2.1	Kweking van UWOV2 (Sf)-selle	26
2.2.2	Transfeksie van die UWOV2 (Sf)-sellyn	
2.2.2.1	Bepaling van G418-weerstandbiedendheid	26
2.2.2.2	Transfeksie met kalsiumfosfaat	29
2.2.2.3	Transfeksie deur lipofeksie	33
2.3	Samevatting	35

HOOFSTUK 3 Konstruksie van Baculovirus oordragvektore

3.1	Inleiding	36
3.2	Benaderingswyse	36
3.3	Metodes	
3.3.1	Grootskaalse bereiding van plasmied DNA	38
3.3.2	Ensiematiese modifisering van DNA	38
3.3.3	Herwinning van DNA-fragmente uit agarose gel	39
3.3.4	Transformerings	39
3.3.5	Kleinskaalse bereiding en analise van plasmied DNA	40
3.4	Konstruksie van S-oopleesraam bevattende vektore	40
3.4.1	Konstruksie van pHBsBac3 en pHBsBac4	41
3.4.2	Konstruksie van pHBsBac5	41
3.4.3	Resultate	45
3.5	Samevatting	47

HOOFSTUK 4 Uitdrukking van die mantelproteïene van die hepatitis B-virus in 'n Baculovirus-uitdrukkingstelsel.

4.1	Inleiding	49
4.2	Metodes	
4.2.1	Kweking van Sf 21-selkulture	52
4.2.2	Bereiding van rekombinante AcNPV-klone	
4.2.2.1	Kotransfeksie van Sf 21-weefselkulture	52
4.2.2.2	Isolering van rekombinante AcNPV-klone	53
4.2.2.3	Opskaling van rekombinante AcNPV-klone	55
4.2.3	Uitdrukkingsanalises	
4.2.3.1	Infeksie van Sf 21-selkulture	55
4.2.3.2	Kwantifisering van proteïenuitdrukking met ELISA	55
4.2.3.3	SDS-poliakrielamiedgelelektroforese	56
4.2.3.4	Affiniteitschromatografie van His ₆ -fusieproteïene	57
4.3	Resultate	
4.3.1	Kotransfeksie met wilde tipe AcNPV en pBlueB:acHis-vektore	57
4.3.2	ELISA-bepalings van uitgedrukte rekombinante HBsAg	58
4.3.3	SDS-poliakrielamiedgelelektroforese	60
4.3.4	Affiniteitschromatografie van His ₆ -fusieproteïene	63
4.4	Samevatting	64

HOOFSTUK 5 Bespreking

5.1	Inleiding	66
5.2	Evaluering van die UWOV2 (Sf)-selyn	66
5.3	Uitdrukking van die hepatitis B-virus mantelproteïene in 'n baculovirus / insekselsisteem	68
5.3.1	Konstruksie van pBlueBac His-afgeleide vektore	69
5.3.2	Uitdrukking van die hepatitis B-virus mantelproteïene in Sf 21-insekselle	69
5.4	Samevatting	72
 VERWYSINGS		 73
 AFKORTINGLYS		 83

ABSTRACT

The expression of the proteins constituting the envelope of the hepatitis B virus was investigated. A novel human ovarian cancer cell line, UWOV2 (Sf), was tested for its ability to be transfected with and express the hepatitis B virus surface antigen genes contained in a mammalian expression vector, using the standard protocols of calcium phosphate/DNA co-precipitation and lipofection. Confluent cell cultures were transfected with the vector which also carried the bacterial neomycin resistance gene and selection was applied with the antibiotic gentamycin. Both transfection procedures resulted in isolated foci of cells that survived the selection after all the cells in control cultures died. None of the cells in these foci survived long enough to be multiplied however, and no further analyses could be carried out it.

Positive results were obtained in this laboratory expressing the envelope proteins of the hepatitis B virus in a baculovirus Sf 21-expression system (Strydom 1993). A series of fusion protein expression vectors were constructed for the expression of the three hepatitis B virus envelope proteins as His₆-fusion proteins that could be isolated using affinity chromatography. The three open reading frames coding for the hepatitis B virus envelope proteins had already been cloned into pSP-vectors. These vectors were used to construct three pBlueBac His baculovirus transfer vectors further used in cotransfections. Recombinant baculovirus clones were prepared by cotransfecting linearized wild type *Autographa californica* virus genomic DNA with the three different transfer vectors respectively in Sf 21 cell cultures. Recombinant baculovirus clones were prepared and enriched for recombinants using the plaque-assay technique. Sf 21 cell cultures were infected with selected clones and used to quantify the production of HBsAg carrying proteins. An ELISA test kit was used to quantify both the HBsAg in the cell culture supernatants as well as in cell lysates and in this way clones that showed the highest HBsAg expression were selected. In all cases the amounts of HBsAg were higher in the cell lysates than in the cell culture supernatants.

Cell culture lysates were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and affinity chromatography on a Ni-NTA column. No fusion proteins could be isolated

using this column but proteins with sizes corresponding to that of the envelope proteins of the hepatitis B virus were detected in the total cell culture lysates.

In this study it was shown that all three the hepatitis B virus envelope proteins namely the large, medium and major polypeptides could be produced using insect cells infected with recombinant AcNPV clones. It was further shown that these proteins were produced in both the glycosilated and unglycosilated forms. Because the three open reading frames of the envelope protein genes were used seperately, the transcription of these could be compared. The results obtained showed that transcription did not exclusively start at the first initiation codon but in the case of the preS2-S and preS1-preS2-S open reading frames, also at the second and third in fase initiation codons.

OPSOMMING

Die rekombinante uitdrukking van die proteïene wat die mantel van die hepatitis B-virus uitmaak, is ondersoek. 'n Nuwe menslike kankersellyn, UWOV2 (Sf), is getoets vir transfeksie met en uitdrukking van die hepatitis B-virus oppervlak-antigeengeen gedra in 'n soogdieruitdrukkingsvektor, deur gebruik te maak van die standaardtegnieke van kalsiumfosfaat-DNA kopresipitasie en lipofeksie. Selkultuurmonolae was getransfekteer met hierdie vektor wat ook die bakteriële neomisien-weerstandbiedendheidsgeen bevat en seleksie is toegepas met die antibiotikum gentamisien. Beide die metodes het aanleiding gegee tot die vorming van foki van selle wat die seleksie oorleef het terwyl al die kontrole-selkulture afgesterf het. Geen van hierdie foki het egter lank genoeg oorleef om vermeerder te kon word nie en geen verdere analyses kon uitgevoer word nie.

Positiewe resultate is in hierdie laboratorium verkry met die uitdrukking van die oppervlakproteïene van die hepatitis B-virus in 'n baculovirus Sf-21 uitdrukking-sistiem (Strydom 1993). 'n Reeks fusieproteïen-uitdrukkingsvektore is gekonstrueer vir die uitdrukking van al drie die hepatitis B-virus mantelproteïene as His₆-fusieproteïene wat verder geïsoleer kan word deur gebruik te maak van affiniteitschromatografie. Die drie verskillende ooplesrame van die hepatitis B-virus wat kodeer vir die mantelproteïene was reeds in pSP-vektore gekloneer. Hierdie vektore was gebruik om drie pBlueBac His baculovirus-oordragvektore te konstrueer wat verder gebruik is in kotransfeksies. Rekombinante baculovirusklone is berei deur liniêre wilde tipe *Autographa californica*-virus genom-DNA te kotransfekteer in Sf 21-selkulture, in drie verskillende kotransfeksies, saam met die bogenoemde oordragvektore. Rekombinante baculovirusklone is berei vanuit die drie groepe kotransfeksies en is deur middel van die plaaksuiweringstegniek verryk vir rekombinante baculovirusklone. Sf 21-selkulture is geïnfecteer met geselekteerde klone en gebruik vir kwantifisering van geproduseerde HBsAg-bevattende proteïene. 'n ELISA-toetsstelsel is gebruik om beide die HBsAg in die weefselkultuursupernatante en in lisate van die weefselkulture te kwantifiseer en sodoende is klone uitgekies wat die hoogste HBsAg-uitdrukking getoon het. In al die gevalle was die vlakke van HBsAg hoër in die selkultuurlisate as in die supernatante. Selkultuurlisate is onderwerp

aan SDS-poliakriëlamiedgelelektroforese en affiniteitschromatografie op 'n Ni-NTA kolom. Geen fusieproteïene kon egter geïsoleer word met hierdie kolom nie, maar proteïene met groottes wat ooreenstem met dié van die hepatitis B-virus mantelproteïene is wel waargeneem in die selkultuurlisate.

In hierdie studie is aangetoon dat al drie die hepatitis B-virus mantelproteïene, naamlik die groot-, middel- en hoofpolipeptiede geproduseer kon word in insekselkulture wat geïnfekteer was met rekombinante AcNPV-klone. Dit is verder gevind dat hierdie proteïene in beide die geglikosileerde en ongeglikosileerde vorme geproduseer is. Omdat die drie verskillende oopleesrame wat onderskeidelik kodeer vir die drie mantelproteïene apart gebruik is, kon transkripsie hiervan vergelyk word. Die resultate wat verkry is, het aangedui dat transkripsie nie uitsluitlik begin het by die eerste inisiasiekodon nie, maar in die geval van die preS2-S en preS1-preS2-S oopleesrame, ook by die tweede en derde van die infase inisiasiekodons.

HOOFSTUK 1

LITERATUUROORSIG

1.1 Inleiding

Bestudering van die hepatitis B-virus is onwetend begin deur werk wat uitgevoer is deur Baruch S. Blumberg en sy medewerkers by die Instituut vir Kankernavorsing in Philadelphia. Hy het 'n vreemde antigeen in die serum van 'n Australiese inboorling opgemerk (genoem Au-antigeen) wat in 'n toets gereageer het met teenliggame in die bloed van 'n persoon wat reeds meervoudige bloedoortappings gehad het (Blumberg *et al.*, 1965). 'n Paar jaar het verloop voordat die mikroskopiese ondersoeke van Dane en sy medewerkers (1970) gelei het tot die ontdekking van 42nm-partikels met 'n struktuur wat moontlik dié van 'n volledige viruspartikel kon wees. Op hierdie wyse is vasgestel dat die Au-antigeenbevattende partikels volledige virione of mantelmateriaal is van die virus wat hepatitis B veroorsaak (Dane *et al.*, 1970).

Vandag is hepatitis B 'n wydverspreide siekte met meer as 300 miljoen draers wêreldwyd. Draers kan die virus oordra aan gesonde persone en staan self 'n verhoogde kans om primêre hepatosellulêre karsinoom (PHK) te ontwikkel. PHK alleen veroorsaak jaarliks 250 000 - 1 000 000 sterftes (Robinson en Lutwick 1976; Mackett en Williamson, 1995). In Sub-Sahara Afrika is die insidensie van die siekte die hoogste in die wêreld met 5 - 20% van die algemene populasie wat HBsAg-draers is. In Mosambiek ontwikkel 103.8 per 1000 mans PHK (Kiire, 1990).

In hierdie hoofstuk sal 'n kort oorsig gegee word oor die virus, hepatitis B-infeksie, verspreiding van die infeksie en huidige bekampingsmetodes. Die hoofstuk sal afsluit met die formulering van 'n doelstelling en benaderingswyse vir hierdie studie.

1.2 Hepatitis B-infeksie

Die oordrag van hepatitis B verskil grootliks in patroon tussen verskillende gemeenskappe. In lande waar 'n Westerse lewenstyl gevolg word, is die persone wat geïnfekteer word meestal deel van hoë risiko groepe. Dit sluit in: persone wat in aanraking kom met bloed en bloedprodukte, ontvangers van bloed of bloedprodukte, intraveneuse dwelmgebruikers, homoseksuele en persone met meervoudige seksmaats (Tiollais en Buendia, 1991). In teenstelling hiermee word infeksie in Afrika en ook Suid-Afrika gewoonlik opgedoen deur horisontale verspreiding (Goddard, 1988). Perinatale infeksies kom in 1 - 5% van die gevalle in Afrika voor, maar die algemene vorm van oordrag is horisontaal en infeksies word meestal opgedoen tussen die ouderdomme van 6 maande en 5 - 6 jaar. Daar is dus nie veel sprake van hoë risiko groepe nie en alle kinders loop 'n hoë risiko om die infeksie op te doen (Kiire, 1990). In Tabel 1.1 word die vlakke van infeksie en die maniere van oordrag in verskillende wêreldgebiede opgesom.

Parentale blootstelling aan die hepatitis B-virus lei gewoonlik tot primêre infeksie van die lewer. Die meganisme waarvolgens die virus die hepatosiet uitken en binnedringing is nog nie volledig bekend nie, maar dit word voorgestel dat die groot mantelproteïen-poli-peptied se preS-gebied met 'n hepatosellulêre virale reseptor reageer en sodoende indringing laat begin (Neurath *et al.*, 1986).

Nadat infeksie plaasgevind het volg daar 'n inkubasietydperk van 2 - 6 maande wat in 90% van die gevalle lei tot oorganklike akute hepatitis en in 10% van die gevalle tot chroniese hepatitis B-infeksie (Thomas en Norvick, 1986). Gedurende 'n akute infeksie kan lewerbeskadiging voorkom wat gepaard gaan met abdominale pyn, geelsug en ander simptome en die vlakke van die HBsAg in die serum styg. In die meeste gevalle bly die siekte egter byna heeltemal asimptomaties. Soms kan die infeksie oorgaan in fulminante hepatitis wat 'n snelverlopende vorm van die siekte is en waartydens groot dele van die lewer vernietig kan word as gevolg van die aktiwiteit van sitotoksiese T-limfosiete (Tiollais en Buendia, 1991).

Tabel 1.1 Vlakke en oordrag van HBV-infeksie.

Vlak van infeksie	Geografiese gebied/ populasiegroep	Algemene manier van oordrag
Hoog		
7 - 20% van die populasie is chroniese draers. 70% van volwasse nes was reeds in hulle leeftyd geïnfekteer.	Asië uitsluitend Japan en Indië. Grootste deel van die Midde Ooste. Die Amazone gebied. Meeste van die Pasi-fiese eilandgroepe. Australiese inboorlinge en Maoris. Eskimo's	Byna alle infeksies word as jong kinders opgedoen en min volwasse nes is steeds ongeïnfekteer. Oordrag geskied van kronies geïnfekteerde moeders in die perinatale periode na babas of horisontaal vanaf geïnfekteerde moeders, suigeling of ander individue binne of buite familie-groepe. Persone wat tot adollesensie nog ongeïnfekteer bly, doen gewoonlik die infeksie op deur seksuele kontak.
Intermediêr		
2 - 7% van die populasie is chroniese draers. 20 - 50% van volwasse nes was reeds geïnfekteer.	Indië. Dele van die Midde Ooste. Wes Asië. Japan. Oos en Suid Europa. Suid- en Sentraal-Amerika.	Gemengde patrone van oordrag kom voor in alle ouderdomsgroepe. Oordrag vind meestal plaas tussen jong kinders of jong volwasse nes.
Laag		
Minder as 2% van die populasie is draers en minder as 20% van die volwasse nes was voorheen geïnfekteer.	VSA en Kanada. Wes Europa. Australië. Nieu-Zeeland	Infeksies word meestal as volwasse nes opgedoen alhoewel kinders ook soms geïnfekteer word.

Uit: Mackett (1995).

Nadat die vorming van teenliggame plaasgevind het, gewoonlik teen gebiede op die *a*-determinant van die HBsAg (Bhatnagar *et al.*, 1982), word die infeksie meestal geleidelik opgeklar namate meer teenliggame geproduseer word. Die kliniese simptome verdwyn ook en die persoon bly teenliggame in lae vlakke produseer wat voortdurende immuniteit teen hepatitis B verleen (Tiollais en Buendia, 1991).

Dit kan ook gebeur dat die vlakke van die antigeen in die serum hoog bly en geen teenliggame teen die HBsAg gevorm word nie. Die virus bly dan in die lewer oorleef en die persoon word 'n chroniese draer. Hierdie verskynsel is moontlik die gevolg van 'n swak immuunreaksie teen die virus (Tiollais en Buendia, 1991). Chroniese infeksies

bestaan uit twee fases. Gedurende die eerste fase, wat etlike jare kan duur, repliseer die virus aktief en die serum en liggaamsvloeistowwe is infektief en die HBeAg kom in die serum voor. Gedurende hierdie fase is die serum-transaminasevlakke verhoog en die hepatiese histologie dui op aktiewe inflammasie. Met die tweede fase stop virale replisering en anti-HBe-teenliggame word gevorm terwyl hepatosietklone wat geïntegreerde hepatitis B-virus-DNA bevat, HBsAg uitskei. Serum-transaminasevlakke keer ook terug na normaal en die inflammatoriese aktiwiteit daal (Thomas en Norvick, 1986). In die ergste gevalle van chroniese hepatitis kan lewersirroze ontwikkel en lei tot primêre hepatosellulêre karsinoom (PHK) wat gewoonlik na 30 - 50 jaar van chroniese infeksie ontstaan. Die mees oortuigende bewyse vir die assosiasie van hepatitis B met PHK kom uit die resultate van 'n studie wat onder Taiwanese mans deur Beasley en sy medewerkers gedoen is (1981). Hierdie studie het getoon dat 'n HBsAg-draer se kans 217 maal hoër is om PHK te ontwikkel in vergelyking met 'n nie-draer. Dit is ook waargeneem dat 51% van alle draers sterf weens lewersirroze of PHK, terwyl slegs 2% van die nie-draers hieraan sterf (Beasley *et al.*, 1981).

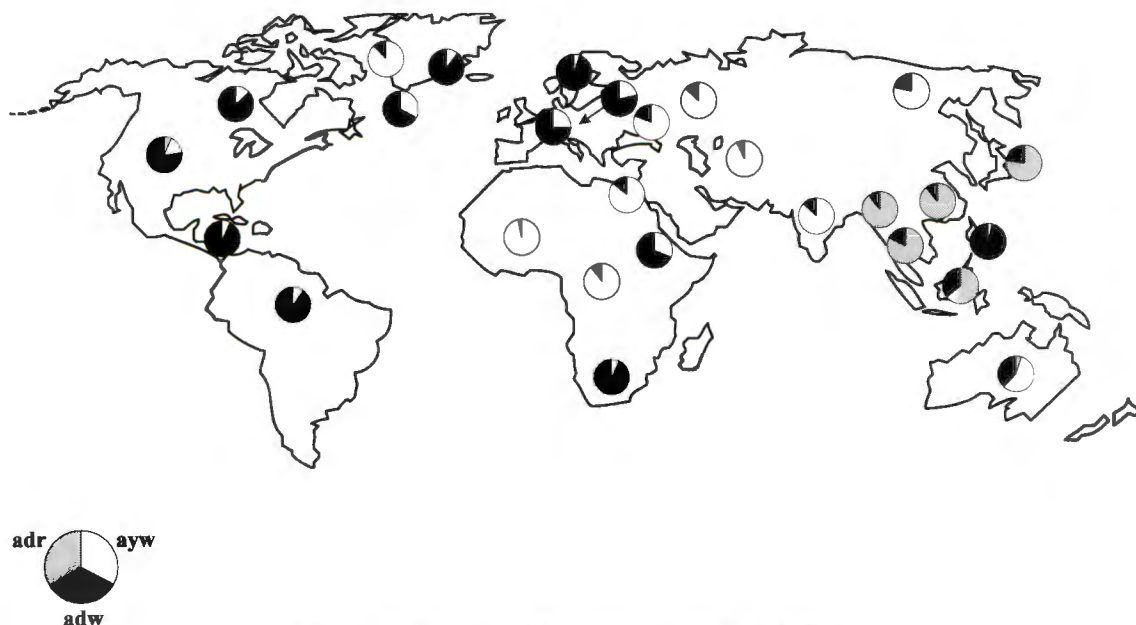
Die volledige meganisme vir die ontstaan van PHK is nog nie opgeklaar nie en kan dus nie onweerlegbaar aan die HBV toegeskryf word nie. Dit is wel bekend dat hepatitis B-virus DNA nie 'n onkogene bevat nie, aangesien PHK eers na 'n lang tydperk van infeksie met die virus ontwikkel (Chisari, 1989b). Baie verklarings wat aangebied word berus op die feit dat die genoom van die hepatitis B-virus in die genoom van die hepatosiet kan integreer. Die gevolge kan dan een van die volgende wees: 'n invoegingsmutasie (Tiollais *et al.*, 1990), aktivering van sellulêre proto-onkogene (Dejean *et al.*, 1986), chromosomale translokasies (Meyer *et al.*, 1992) of transaktivering van ander gene deur die werking van die X-geenprodukte (Yamamoto *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 1994).

'n Ander hipotese oor die vorming van PHK word voorgestel deur Chisari *et al.*, (1989a). In die geval van muise is waargeneem dat die hepatitis B-virus erge lewerskade kan veroorsaak as gevolg van die opeenhoping van die groot mantelproteïen in die endoplasmiese retikulum van hepatosiete (Chisari *et al.*, 1987). Die lewerskade word gevolg deur chroniese regenerasie van hepatosiete wat kan lei tot transkripsionele deregulering en uiteindelik tot hepatosellulêre neoplasmas en PHK.

Hierdie hipotese stel dus voor dat die proliferatiewe respons tot chroniese selbeskadiging in lewerweefsel (wat 'n hoë regeneratiewe kapasiteit het) dit moontlik maak dat meervoudige chromosomale abnormaliteite of ander genetiese veranderinge kan ontstaan (Chisari *et al.*, 1989a).

1.3 Subtipes en verspreiding van die hepatitis B-virus

In die mantel van die hepatitis B-virus kom die polipeptied voor wat die HBs-antigeniese determinant uitmaak. Hierdie antigeen het een groepsesifieke determinant, *a*, wat in alle subtipes van die virus voorkom en waarteen 'n teenliggaamrespons in die mens uitgelok word (Bhatnagar *et al.*, 1982). Verder kom daar subdeterminante voor wat aanleiding gee tot vier hoofsubtipes, adw, adr, ayw en ayr (Le Bouvier *et al.*, 1972). Na die volledige subtipering van meer as vyfduisend serum-monsters is 9 subtipes van die mens hepatitis B-virus gedefinieer, elk met 'n unieke wêreldverspreiding (Couroucé-Pauty *et al.*, 1983). Figuur 1.1 gee 'n aanduiding van die verspreiding van die 3 hoofsubtipes wat voorkom.



Figuur 1.1. Verspreiding van die drie algemeenste HBV-subtipes. Op die kaart word net die verspreiding van die hoofsubtipes adw, adr en ayw aangedui. Die ayr sub tipe is baie skaars en kom slegs met 'n 3.4% insidensie in Viëtnam voor (Couroucé-Pauty *et al.*, 1983). Die figuur is ontleen aan 'n publikasie van die World Health Organization, Geneve 1977.

In suidelike Afrika kom die adw₂-subtipe in 95% van die geïdentifiseerde gevalle voor. Hepatitis B-virusinfeksies is hoogs endemies in ontwikkelende lande en gevolglik ook in Sub-Sahara Afrika. Studies toon dat die vlakke van infeksie tot so hoog as 90% is in sommige dele van Sub-Sahara Afrika (Ayoola, 1988) met 5 - 20% van die populasie wat draers van die HBsAg is (Kiire, 1990). Die totale aantal draers van die hepatitis B-virus-oppervlakantigeen in Suid-Afrika word uit data wat tussen 1986 en 1990 ingesamel is, beraam op 1 475 233. Hiervan is 88% van die swart plattelandse bevolking en 8% van die swart stedelike bevolking. HBV-infeksies is in Suid-Afrika alleen vir tot 14 000 vaksienvoorkombare-sterftes per jaar verantwoordelik (Schoub, 1992).

1.4 Virusstruktuur

'n Dubbellagige partikel met 'n totale deursnee van 42nm en 'n kerngedeelte van 28nm, wat die fisiese eienskappe van 'n moontlike volledige virioon getoon het, is deur Dane en sy medewerkers (1970) in die serum van 'n persoon wat geïnfecteer was waargeneem. Die sferiese partikels kom voor saam met 'n oormaat filamentvormige en sferiese deeltjies van 22nm deursnee en is later bevestig as die infektiewe vorm van hepatitis B (Robinson en Lutwick, 1976).

Die dubbellagige 42nm-deeltjies (Dane-partikels) bestaan uit 'n nukleokapsied wat die HBcAg-determinant dra en omvou word deur die mantelproteïene waarop die HBsAg voorkom. Vervat in die nukleokapsied is die sirkelvormige gedeeltelik dubbelstringige-DNA-genoom, tesame met 'n DNA-gebonde proteïene wat waarskynlik dien as 'n transkripsionele inisieerder (Chisari *et al.*, 1989a) en 'n proteïenkinase aktiwiteit. Die filamente en sferiese 22nm-deeltjies is onvolledige viruspartikels wat uit die mantelproteïene sonder enige inhoud bestaan (Tiollais *et al.*, 1985).

Die HBV-mantel bestaan uit 'n kombinasie van drie glikoproteïene bekend as die hoof-, middel- en groot-mantelproteïene. Die hoofproteïene is 226 aa lank en word gekodeer deur die S-geen en kan ongeglykosileer (P24^S) of geglykosileer deur 'n N-gebonde glikaan op Asn146, voorkom (GP27^S). Die HBsAg-determinant wat op die proteïene

voorkom is 'n konformasie-antigeen wat afhanklik is van disulfiedbinding tussen twee proteïene (Vyas *et al.*, 1972) en dra die aminosuurvolgorde vir die α -groepsdeterminant (Bhatnagar *et al.*, 1982).

Die middelproteïene bestaan uit 281 aa en kan tot verskillende mates geglikosileer word en voorkom as P33^S of GP36^S. Dit word gekodeer deur die preS2 en S-gene wat direk na mekaar in die genoom van die virus geleë is. Proteïene wat deur die preS2-gebied gekodeer word, is waargeneem om verantwoordelik te wees vir die hegting van die virus aan die selmembraan van die hepatoomsellyn, HepG2 (Neurath *et al.*, 1986).

Die grootste proteïene in die mantel word gekodeer deur die opeenvolgende transkripsie van die preS1, preS2 en S-gene en kom ook as 'n geglikosileerde (GP42^S) of ongeglykosileerde (P39^S) proteïene voor. Afhangende van die sub tipe van die virus is dit 389 of 400 aa lank (Tiollais *et al.*, 1985).

Die nukleokapsied bestaan uit een proteïene, die kernproteïene (P22^C) en is verantwoordelik vir twee antigeniese determinante HBcAg en HBeAg. Die HBeAg, wat ook 'n kliniese merker is vir virale replisering, is 'n oplosbare antigeen wat moontlik 'n oorsprong het vanaf die HBcAg. Proteolitiese splyting van die HBcAg in geïnfecteerde hepatosiete word voorgestel as die oorsprong van die HBeAg (Miller, 1987).

1.5 Replisering van die hepatitis B-virus

1.5.1 Virusgenoom en replisering

In die vroeë 1970's is 'n DNA-polimerase aktiwiteit ontdek in serumpreparasies van persone wat HBsAg-positief was (Hirschman *et al.*, 1971; Kaplan *et al.*, 1973). Daar is waargeneem dat die aktiwiteit van die polimerase ensiem, wat geassosieer is met die hepatitis B-antigeen en veral met die Dane partikels (Kaplan *et al.*, 1973), hoër is wanneer die kernpartikels met 'n nie-ioniese detergent van die Dane-partikels vrygestel is. Gevolglik is dit voorgestel dat die DNA-polimerase ensiem in assosiasie met die

kernpartikels voorkom. Daar is ook waargeneem dat die toevoeging van die antibiotika duanomisien en aktinomisien D, DNA-sintese deur hierdie ensiem inhibeer en na aanleiding hiervan is voorgestel dat 'n DNA-templaar tesame met die DNA-polimerase-ensiem in die kerndeeltjie van die virus voorkom (Kaplan *et al.*, 1973).

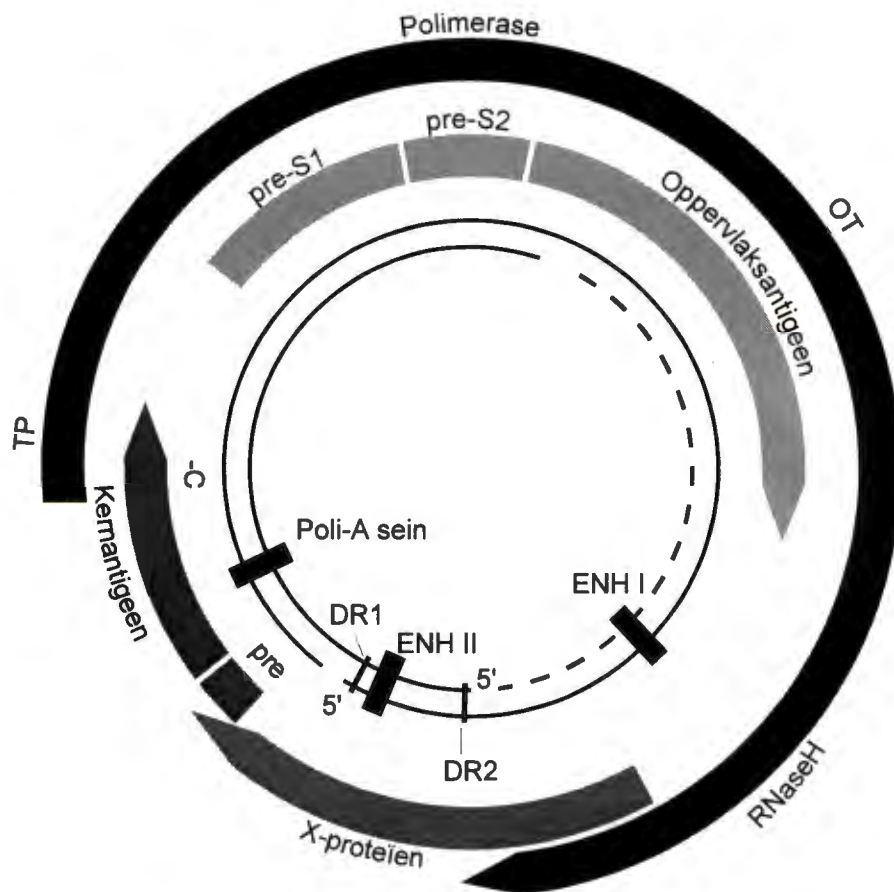
Die gevolgtrekking dat die kernpartikels 'n DNA-templaar tesame met die DNA-polimerase aktiwiteit bevat, is verder bevestig deur die elektronmikroskopiese waarnemings van Robinson *et al.*, (1974). Sirkelvormige dubbelstring-DNA is geïsoleer uit kernpartikels wat vrygestel is vanuit volledige Dane-partikels. Die DNA-molekules wat gefotografeer is, was gemiddeld 0.78µm lank en is bereken om 'n molekulêre gewig van 1.6×10^6 Da te hê. Radioaktiefgemarkte DNA-molekules wat gevorm is deur die kerngeassosieerde polimerase ensiem, was ook van dieselfde grootte as die oorspronklike molekules wat in die kerngedeelte gevind is. Dit het die hipotese dat die kern 'n dubbelstring-DNA molekule bevat, wat as templaar dien vir die virale DNA-polimerase, sterk ondersteun (Robinson *et al.*, 1974).

Die HBV-genoom is een van die kleinste genome wat bekend is vir diervirusse en bestaan uit 'n gedeeltelike dubbelstringige DNA-molekule van ongeveer 3200 kb, afhange van die sub tipe. Een van die uitstaande kenmerke van die genoom is dat een van die stringe, die (+)-string, korter is as die genoamlengte. Gewoonlik beslaan die (+)-string slegs 50 - 80% van die vollengte van die genoom (Tiollais en Buendia, 1991). Die sirkelvormige struktuur van die genoom word in stand gehou deur 'n oorvleueling van die 5'-gebiede van die twee DNA-stringe (Chisari *et al.*, 1989b). By die 5'-punte van beide die (+) en (-)-stringe kom daar direkte herhalingsvolgordes voor (DR1 en DR2, Figuur 1.2) wat 'n belangrike rol speel in die inisiëring van DNA-replisiering (Ganem en Varmus, 1987).

In die genoom kom die vier ooplesrame S, C, P en X voor wat in groot mates oorvleuel. 'n Voorstelling van die genoom met aanduidings van die verskillende gene word in Figuur 1.2 gegee.

Die gene wat kodeer vir die hoof oppervlaksproteïene van die mantel, S, word voorafgegaan deur twee infase koderende gebiede pre-S1 en pre-S2. Die pre-S1-gene

saam met S-geen transleer vir die middelmantelproteïen en al drie die leesraam saam kodeer vir die groot mantelproteïen (Afdeling 1.5). Op dieselfde wyse word die C-leesraam voorafgegaan deur 'n pre-C gebied wat kodeer vir 'n hidrofobiese peptied wat betrokke is by die samestelling van die viruspartikel (Tiollais *et al.*, 1985).



Figuur 1.2. Skematiese voorstelling van die struktuur en organisasie van die HBV-genoom. Die peilpunte dui op die rigting waarin transkripsie plaasvind. Die binneste sirkels stel die kort (+)-string en die lang (-)-stringe voor, met die dikker pyle wat die posisies van die gene aandui. Drie verskillende domeine word op die polimerase oopgelees aangedui. TP = terminale proteïen; OT = omgekeerde transkriptase. DR = direkte herhalings. (Lau en Wright, 1993).

Die langste oopgeleesraam, P, oorvleuel met al die ander leesraam en beslaan 687 basepare in die geval van die adw₂-subtipe (Marion en Robinson, 1983). Dit kodeer vir 'n histidienryke proteïen met 'n molekulêre massa van ongeveer 90 000 en het baie gebiede van ooreenkoms met die *pol*-geenprodukte van retrovirsusse (Tiollais *et al.*, 1985). Drie domeine met verskillende voorgestelde aktiwiteite kom voor (Figuur 1.2): 'n terminale proteïen (TP) wat nodig is vir replisering en verpakking by die

aminosuurterminus, 'n omgekeerde transkriptase (OT) en 'n RNase H-aktiwiteit albei betrokke by replisering van die virus (Lau en Wright, 1993).

Geen X kodeer vir 'n basiese proteïen van 154 aminosure wat bekend is om 'n rol te speel in transkripsionele transaktivering (Koike en Takada, 1995). Die X-proteïen trans-aktiveer virale sowel as sellulêre gene alhoewel dit nog nie bewys is dat dit enige DNA-bindingsaktiwiteit het nie. Die betrokkenheid van die X-proteïen by hepatosellulêre karsinoom (Afdeling 1.2) is bevestig deur verskeie eksperimentele gegewens (Kim *et al.*, 1991; Koike, 1995). Dit word voorgestel dat die transaktivering- en onkogeenfunksies van die proteïen gemanifesteer word deur proteïen-proteïen interaksies met sellulêre faktore (Koike en Takada, 1995).

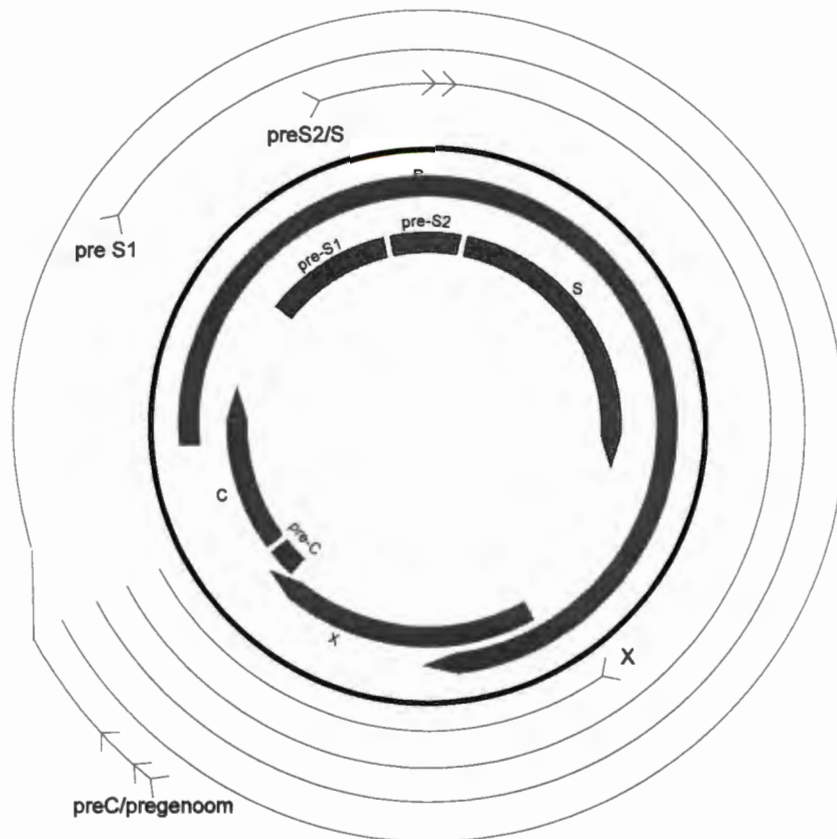
In die genoom is ook twee transkripsionele versterkergebiede geïdentifiseer, ENH I en ENH II (Figuur 1.2). ENH I is weefsel-spesifiek en funksioneer net in hepatosiete waar bindingsproteïene en lewerspesifieke faktore daaraan bind (Lau en Wright, 1993). Die funksie van ENH II is die stimulering van die oppervlakantigeengeenpromotors. 'n Enkele poliadenileringssein waar transkripsie getermineer word, is ook geïdentifiseer in die gebied wat vir die kapsiedproteïen kodeer (Figuur 1.2).

1.5.2 Transkripsie

Die transkripsie van die virale genoom lewer RNA-molekules met 'n tweeledige funksie: eerstens dien dit as boodskappers vir die sintese van proteïene en tweedens dien dit as templaats vir die produksie van nuwe genomiese DNA deur middel van omgekeerde transkripsie.

Vier klasse mRNA's is geïdentifiseer waarvan twee, nl. die genomiese (3.5 kb RNA) en die subgenomiese (2.1 kb RNA) transkripgroepe, die volopste is (Schaller en Fischer, 1991). Omdat die transkripsie van die genomiese (3.5 kb) RNA-templaats eers getermineer word wanneer die poli-A sein die tweede keer bereik word, is hierdie transkrip langer as genooomlengte (Figuur 1.3). Twee tipes genomiese transkripte word geïdentifiseer met die verskil dat die een effens langer is as die ander en die pre-C

translasie-inisiasiesetel bevat. Laasgenoemde is bekend as die pre-kern-mRNA en kodeer vir die proteïen wat na sekresie en modifikasie oorsprong gee aan die HB_eAg (Ganem, 1991).



Figuur 1.3 Transkripsionele kaart van die HBV-genoom. Die breë pyle dui die posisies van die verskillende gene in die genoom aan en die dun lyne die 5'-begin(>) en 3'-eindpunte van die RNA-transkripte wat beskryf word in Afdeling 1.5.2 (Schaller en Fischer, 1991).

Die korter C/pregenoom-mRNA transkrip dien as boodskapper vir translasië van die kapsied- en die polimeraseproteïene en ook as 'n templaar vir die sintese van die DNA-genoom nadat verpakking daarvan in die kernpartikel plaasgevind het.

Subgenomiese RNA-transkripte met wisselende lengtes (Figuur 1.3) is verantwoordelik vir die produksie van die middel-mantelproteïen (preS2-S-translasie) en die hoof-mantelproteïen (S-translasie). Transkripsie van beide die RNA-molekules word waarskynlik gedryf deur 'n promotor wat stroomop van die pre-S2 gebied voorkom (Schaller en Fischer, 1991).

Behalwe die genomiese en subgenomiese transkripte, kom daar ook die pre-S1 (2.4 kb RNA) transkrip en die X-transkrip, met 'n lengte van ongeveer 0.9 kb, voor. Die pre-S1-RNA is die templaar vir die sintese van die groot mantelproteïen (preS1-preS2-S translase). Die pre-S1 promotor is hoogs lewerspesifiek en die minste aktief van al die HBV-promotors.

Die 0.9 kb RNA wat as boodskapper dien vir translase van die X-geenprodukt, word drasties onderdruk tydens normale kondisies van virale replisering en is net waarneembaar tydens uitdrukking van meervoudige genoomkonstrukte of vektore wat HBV-DNA bevat (Schaller en Fischer, 1991).

1.5.3 DNA-sintese en virusreplisering

Een van die grootste deurbrake wat gemaak is ten opsigte van die bestudering van die HBV en die genetica daarvan, was die ontdekking van soortgelyke virusse in ander vertebrate naamlik die Virginiese marmot (Summers *et al.*, 1978), die Beechey grondeekhoring (Marion *et al.*, 1980) en die Pekingees (Mason *et al.*, 1980). Die navorsing van Summers en Mason (1982) het gelei tot die opklaring van die meganisme van virale replisering, wat plaasvind deur middel van 'n RNA-intermediêr, na bestudering van die eend-HBV in geïnfecteerde eendlewer.

Nadat die virion die gasheersel binnegedring het, word die (+)-DNA string verleng tot genoomlengte en die struktuur van die genoom word verander van 'n ontspanne sirkelvorm na kovalent-geslote sirkelvormige DNA (cccDNA) deur die ligering van die 5' en 3'-punte van die (-)-string en verlenging van die (+)-string (Chisari *et al.*, 1989b; Seeger *et al.*, 1991). Hierna word die genoom na die kern van die sel vervoer waar sellulêre RNA-polimerase II onder andere die 3.5 kb RNA-pregenoom transkribeer vanaf die (-)-DNA string (Tiollais en Buendia, 1991).

Die pregenoom-RNA word na die sitoplasma vervoer waar dit verpak word in 'n nuutgevormde kapsied tesame met die ensieme wat nodig is vir die omgekeerde transkripsie en polimerase aktiwiteit (Chisari *et al.*, 1989b). In die kapsied gebruik die

omgekeerde transkriptase die RNA-pregenoom as templaar en begin sintese van 'n nuwe (-)-DNA string by die 3'-DR1 met die terminale proteïene van die polimerase geenproduk wat dien as voorvoerder. Terwyl DNA-sintese plaasvind, word die RNA-templaar gedegradeer deur die RNaseH-aktiwiteit van die polimerase geenproduk. Die sintese van die (+)-string DNA begin by die 3'-punt van DR2 en duur voort om 'n oop sirkelvormige DNA-molekule as produk te lewer (Lau en Wright, 1993).

Terwyl DNA-replisering in die sitoplasma plaasvind, word die kapsied omvou in 'n mantel wanneer dit die sel verlaat. Sodra dit gebeur word verlenging van die (+)-DNA string gestaak en gevolglik is die (+)-DNA onvolledig en van variërende lengte (Tiollais en Buendia, 1991).

Uitskeiding van die HBV-virion is afhanklik van die interaksie tussen die kernpartikel en die oppervlaksproteïene wat die mantel uitmaak (Bruss en Ganem, 1991). Die samestelling van HBsAg in silindriese of sferiese 22nm-partikels geskied intrasellulêr in die endoplasmiese retikulum waar dit bly totdat dit deur die Golgi-kompleks uitgeskei word (Patzner *et al.*, 1986). Samestelling en uitskeiding van die volledige virus geskied na omvouing van die nukleokapsied deur die groot-, middel- en hoofmantelproteïene terwyl dit in die endoplasmiese retikulum inbeweeg (Bruss en Ganem, 1991). Dit kom voor of die tempo van uitskeiding bepaal word deur die groot proteïene (P39) deurdat dit sekresie van die HBsAg inhibeer en sodoende die vorming van volledige hepatitis B-virione bevorder.

1.6 Voorkoming en beheer van hepatitis B-infeksie

1.6.1 Aktiewe immunisering

Dit word reeds oor die algemeen besef dat immunisering, veral as deel van die WHO se uitgebreide program van immunisering (EPI), die enigste manier is om die wêreldwye voorkoms van hepatitis B te bekamp en moontlik uit te roei. Op die oomblik het 80 lande hulself reeds bereidwillig verklaar om teen 1997 'n hepatitis B-vaksine in te sluit as deel van hulle nasionale immuniseringsprogramme. Die toepassing van immu-

niseringsprogramme verander ook deesdae as gevolg van die mislukking van die “hoë risiko groep”-strategie en meeste geïndustrialiseerde lande in Europa, Noord-Amerika en Asië staan nou roetine immunisering van alle babas voor (Maynard, 1990; Kane, 1996).

In Afrika is die massa-immunisering van alle babas veral gewens en word dit ook beskou as die belangrikste manier om die verspreiding van die infeksie te bekamp en inkorporasie van hepatitis B vaksinerings as deel van die EPI, is die mees koste effektiewe manier om die hoë voorkoms van draers te verlaag (Kiire *et al.*, 1990).

1.6.1.1 Ontwikkeling van proteïen-gabaseerde entstowwe

Beskerming van 'n mens teen serumhepatitis (later bekend as hepatitis B-virus infeksie) deur immunisering, is die eeste keer suksesvol uitgevoer deur Saul Krugman en medewerkers (1971) nadat hulle waargeneem het dat die infektiwiteit van die serum van 'n serumhepatitis pasiënt vernietig word deur dit in water te kook, sonder dat die antigenisiteit daarvan verlore gaan (Krugman *et al.*, 1970). Kinders is geïnokuleer met 'n verdunning van infektiewe hepatitis B-serum nadat dit geïnaktiveer is deur dit te kook. Die vaksinerings is getoets deur kinders in te spuit met onbehandelde hepatitis B-serum. Die voorkoms van hepatitis geassosieerde antigeen (HBsAg) en hepatitis geassosieerde teenliggame (anti-HBs) asook lewerfunksie is gemoniteer en na aanleiding van die verskil tussen vlakke van die bogenoemde parameters in onderskeidelik geïmmuniseerde- en kontrolepasiënte, is bewys dat die aktiewe immunisering geslaag het (Krugman *et al.*, 1971). Kort hierna het verskeie ander groepe dieselfde resultate gekry deur gebruik te maak van geïnaktiveerde plasma afgeleide hepatitis B-entstowwe (Hillerman *et al.*, 1975; Purcell en Gerin, 1975).

'n Hepatitis B-entstof, vervaardig van die plasma van geïnfekteerde persone, is gevolglik vir die eerste keer in 1981 gelisensieer met die onderskeiding dat dit die eerste menslike anti-kanker entstof en die eerste entstof wat van menslike plasma geproduseer, was (Maynard, 1990). Die enigste nadeel van hierdie tipe entstowwe is

die beperking in die beskikbaarheid van menslike serum, die omslagtige suiwering- en inaktiveringstappe en die toetsing daarvan in proefdiere (Tiollais *et al.*, 1985).

Met die koms van die rekombinante DNA-tegnologie het dit ook 'n toepassing gevind in die produksie van rekombinante hepatitis B-proteïene. Bakterieë kan hierdie proteïene op grootskaal uitdruk, maar omdat die immunogenisiteit van die proteïen in mense baie afhanklik is van die tersiêre struktuur daarvan, (Vyas *et al.*, 1972; Mishiro *et al.*, 1980) is dit nie geskik vir immunisering nie.

Gisselle en soogdierselle is bevind om geskikte eukariotiese uitdrukkingstelsels te wees vir die oppervlakantigene. Die proteïene aggregeer in partikels wat fisies ooreenstem met dié wat in plasma voorkom (Dubois *et al.*, 1980; Valenzuela *et al.*, 1982) en toon immunologiese aktiwiteit (Miyanojara *et al.*, 1983). Entstowwe afgelei van rekombinant-uitgedrukte proteïene, bekend as tweede generasie vaksine, is getoets in sjimpansees en het die diere volledig beskerm teen daging met die virus (McAleer *et al.*, 1984). Toetse in mense het ook getoon dat die immuunrespons wat verkry word net so goed of selfs beter is as met entstowwe wat uit plasma berei is (Bruguera *et al.*, 1989; Butterly *et al.*, 1989; Most *et al.*, 1992).

Die volgende belangrike stap in die ontwikkeling van rekombinante entstowwe was die uitdrukking van rekombinante proteïene wat meer immunogenies is as dié wat verkry word deur slegs die S-geen uit te druk. Muis wat geïmmuniseer is met 'n proteïen wat die pre-S2 geenproduk ook bevat het, het 'n verhoogde immuunreaksie getoon (Milich *et al.*, 1985a) en in muisrasse waar 'n immuunreaksie nie uitgelok kon word nie, is dit oorkom deur immunisering met proteïene wat die pre-S2 gebied insluit (Milich *et al.*, 1985b) of beide die pre-S1 en pre-S2 proteïene insluit (Milich *et al.*, 1986). 'n Entstof wat die middelproteïen (pre-S2+S) van die hepatitis B-virus bevat, is aangetoon om veilig en effektief te wees in muis, marmotte (Hazama *et al.*, 1989) en sjimpansees (Fujisawa *et al.*, 1990). Op hierdie wyse het die derde generasie van hepatitis B-entstowwe ontstaan.

Beide die gis-uitgedrukte (Suzuki *et al.*, 1994) en soogdiersel-uitgedrukte (Yap *et al.*, 1992; Coursaget *et al.*, 1992) rekombinante vaksine is waargeneem om veilig en

effektief te wees vir menslike gebruik. In Suid-Afrika is daar tans drie verskillende bereidings beskikbaar wat vir hepatitis B-immunisering gebruik kan word. 'n Hittegeïnaktiveerde plasma-bereide entstof "Hepaccine-B Vaccine" (Biovac) en twee rekombinante gis-uitgedrukte entstowwe nl. "Energix B" (SmithKline Beecham) en "H-B-Vax II" (Logos) (MIMS Desk Reference 1996).

1.6.1.2 DNA-gemedieerde vaksinerings

'n Nuwe manier van aktiewe immunisering wat deesdae ondersoek word, is DNA-gemedieerde immunisering teen die HBsAg. Die vaksinerings berus op die produksie van teenliggame teen proteïene wat gevorm word na die *in vivo* uitdrukking van 'n plasmied DNA-vektor. In hierdie geval word die proefdier ingespuut met 'n vektor wat kodeer vir die proteïene waarteen die teenliggaamrespons verlang word en geen proteïene word self toegedien nie.

Muise wat intramuskulêr ingespuut is met DNA wat kodeer vir die verskillende HBV-mantelproteïene, het teenliggaamresponse getoon wat vergelykbaar is met dié wat verkry word na natuurlike infeksie (Davis *et al.*, 1993; Michel *et al.*, 1995). Die eerste teenliggame is na 1-2 weke na inspuiting waargeneem met titers wat na 4-8 weke hoogtepunte bereik het. Sonder die verdere toediening van DNA was teenliggame teenwoordig tot 6 maande na die eerste toediening.

Plasmied DNA wat kodeer vir die hoof- en middelmantelproteïene is ook gebruik om sjimpasees intramuskulêr in te spuit. Groep- en sub tipe- sowel as preS2-spesifieke teenliggame is gevorm teen vlakke wat hoog genoeg was om die diere te kon beskerm teen infeksie. Vergelyking met antigeen-gebaseerde entstowwe dui daarop dat DNA-gebaseerde immunisering baie belofte inhou as 'n moontlike vorm van voorkomende beheer van HBV-infeksie (Davis *et al.*, 1996).

1.6.2 Diagnose en behandeling van infeksie

1.6.2.1 Diagnose

Toetse vir die teenwoordigheid van die HBsAg is tans die gewildste tegniek vir diagnose van HBV-infeksie, alhoewel die formaat van sulke toetse steeds verander en verbeter word. 'n Groot verskeidenheid van toetssisteme maak gebruik van monoklonale teenliggame om die HBsAg op te spoor. Die enigste voorsienbare probleem is variasie wat kan voorkom in die aminosuurvolgorde van die antigeniese determinant *a*.

Geïnfekteerde hepatosiete skei ook die HBeAg uit en die opsporing hiervan in die serum is 'n betroubare aanduiding van viremie. Teenliggame teen die nukleokapsied (HBcAg) word geproduseer kort na infeksie en is 'n waardevolle merker vir akute hepatitis B- infeksie. Direkte opsporing van HBV-DNA is die oortuigendste metode vir aanduiding van die hepatitis B-virus en kan gedoen word met spesifieke HBV-DNA-peilers, of deur gebruik te maak van die polimerase kettingreaksie (Harrison *et al.*, 1996).

1.6.2.2 Behandeling

Benewens navorsing wat gedoen word oor die voorkoming van infeksie, word daar ook gekyk na maniere om reeds geïnfekteerde persone te behandel. Een van die eerste middels wat waargeneem is om 'n effek te hê op infeksie, was α -interferon (Greenberg *et al.*, 1976). Daaglikse behandeling met hierdie proteïen het die infeksie laat verdwyn of geïnhibeer in meer as 'n derde van pasiënte wat chroniese draers was (Tiollais en Buendia, 1991).

Ander vorme van immunostimulering wat ook ondersoek word, is β - en γ -interferon (Caselmann *et al.*, 1989), levamisool (Ruiz-Moreno *et al.*, 1993), timosien (Mutchnick *et al.*, 1991), terapie met anti-HBs teenliggame (Lever *et al.*, 1990), beenmurg-oorplantings (Reed *et al.*, 1991), granulosietmakrofaag koloniestimulerende-faktor (Martin *et al.*, 1993) en interleukin-2 (Kakumu *et al.*, 1988).

Verskeie chemiese middels wat inmeng met virale DNA-replisering, hoofsaaklik deur middel van nukleosiedanaloeë, is ook reeds ondersoek met mindere of meerdere mates van sukses (Suzuki *et al.*, 1988; Jacyna en Thomas, 1990; Meisel *et al.*, 1990; Matthes *et al.*, 1990).

Onderdrukking van virale geenuitdrukking word ook geteiken as 'n moontlike terapie vir chroniese infeksie. Goodarzi *et al.*, (1990) het ongemodifiseerde en fosforotioaat-gemodifiseerde antisin-oligodeoksienukleotiede, wat gerig was teen die pre-S en S-gebiede, gebruik om 'n hepatoma selyn te transfekteer en gevind dat HBsAg produksie met tot 90% geïnhibeer kon word. In 'n ander geval is 'n DNA-draersisteem wat geteiken is teen reseptore op hepatosiete, gebruik om lewerspesifieke teikening van antisin oligodeoksie-nukleotiede te bewerk. Dit het veroorsaak dat die antisin-DNA twaalf maal vinniger opgeneem is as ongemodifiseerde DNA (Wu en Wu, 1992).

Nadat Korba *et al.*, (1994) 'n groot verskeidenheid antisin-oligodeoksienukleotiede wat gerig was teen verskillende teikengebiede op die HBV-genoom, getoets het, is gevind dat oligodeoksienukleotiede gerig teen die HBV-enkapsuleringssein, die effektiëste onderdrukkers was van replisering.

Die eerste *in vivo* studies is gedoen in Pekingende. Eendhepatosieteskulture is aanvanklik gebruik om verskillende antisin-oligodeoksinukleotiede te toets en die grootste mate van sukses is verkry met 'n oligodeoksinukleotied gerig teen die 5'-gebied van die pre-S geen. Hierdie antisin oligodeoksinukleotiede is gebruik om jong eende wat geïnfekteer was met DHBV te behandel. Resultate het 'n dosis afhanklike inhibisie van virale DNA-replisering getoon, met 'n byna volkome eliminering van virale DNA wanneer die eende daaglik behandel was met 'n dosis van 20 µg/g liggaamsgewig. Suksesvolle inhibering van geenuitdrukking is ook bewys deur die verdwyning van pre-S en S-antigene (DHBsAg) uit die serum en pre-C en C-antigene (DHBcAg) uit die lewers van die eende (Offensperger *et al.*, 1993).

1.7 Doelstelling en benaderingswyse

Hierdie studie maak 'n deel uit van 'n meer omvattende studie om vas te stel of dit moontlik sou wees om die drie verskillende mantelproteïene van die hepatitis B-virus in 'n soogdierselsisteem uit te druk en dit te suiwer. Die doel hiervan is om gebruik te maak van moderne rekombinante DNA-tegnologie om eksperimenteel vas te stel of dit moontlik sou wees om 'n rekombinante vorm van die antigeniese proteïene van die hepatitis B-virus, nl. die drie oppervlaksproteïene, uit te druk in 'n vorm wat struktureel nader verwant is aan dié van die wilde tipe virus en sodoende 'n hoër antigenisiteit sal vertoon in immunologiese studies.

Die oorhoofse doelstelling van navorsing wat hier aangebied word kan gevolglik gestel word as die uitdrukking en isolering van die hepatitis B-virusmantelproteïene in 'n stabiele weefselkultuursisteem deur gebruik te maak van tegnieke om die gekose weefselkulture te transformeer met spesifieke uitdruktingsvektore wat geskik is vir die betrokke sisteem(e). Vir hierdie doel is die volgende probleemstellings geformuleer:

1. Is die gekose sellyn transfekteerbaar met standaardtegnieke van transfeksie soos lipofeksie en kalsiumfosfaat-DNA-kopresipitasie?
2. Indien die sellyn wel met die vektor transfekteerbaar is, sal die rekombinante proteïene stabiel uitgedruk word?
3. Kan seleksie toegepas word met behulp van die geenprodukte waarvoor die gekose uitdruktingsvektor kodeer?
4. As uitdrukking van die rekombinante proteïene plaasvind, teen watter vlakke word dit geproduseer?

Namate die studie verloop het, het dit geblyk dat daar potensiaal is in die uitdrukking van die hepatitis B-virusmantelproteïene in die Sf 21/baculovirus sisteem (Strydom, 1993) en die fokus is verskuif na die bestudering van die uitdrukking van rekombinante HBsAg-draende proteïene deur hierdie inksellyn. In hierdie stadium was dit reeds

vasgestel dat die insekselle hoër vlakke van die HBsAg produseer as 'n CHO-sellyn wat getoets is (Strydom 1993) en die doel was om te kyk na die aard van die rekombinante hepatitis B-virusproteïene, aangesien vorige studies na uitdrukking slegs gegrond was op die teenwoordigheid van die hepatitis B-oppervlakantigeen soos vasgestel deur ELISA. 'n Nuwe doelwitstelling is op hierdie stadium geformuleer as: Die bepaling van die grootte van uitgedrukte rekombinante mantelproteïene van die hepatitis B-virus soos geproduseer in 'n Sf 21/baculovirus sisteem, asook die analisering van transkripsie van die drie oppervlaksproteïen-ooplesrame wat in die genoom bestaan.

Daar is gevolglik ten doel gestel om die rekombinante proteïene uit te druk en te suiwer en vas te stel of (a) elke gekloneerde ooplesraam oorsprong sal gee aan een of meer rekombinante proteïene in die gevalle van die preS2-S en preS1-preS2-S ooplesrame en (b) of die grootte daarvan ooreenstem met dié van natuurlike HBV-proteïene. Deur hierdie vrae te beantwoord sal vasgestel kan word of die proteïenprodukte van hierdie sisteem gebruik kan word in die veredere navorsing ten opsigte van 'n rekombinante hepatitis B-virus vaksine. As die proteïen wat uitgedruk word nie oor die regte primêre, sekondêre en tersiêre struktuur beskik nie, kan dit nie as 'n vaksine gebruik word nie. Dit is ook belangrik om uit te vind of een rekombinante AcNPV wat oor aldie die oppervlaksproteïengene beskik kan oorsprong gee tot meer as een rekombinante proteïen deurdat verskillende posisies van inisiasie van transkripsie uitgeken word. Sodoende kan slegs een rekombinante kloon oorsprong gee tot aldie die verskillende hepatitis B-virus mantelproteïene, wat beslis voordelig sal wees in die lig van vaksinebereiding. Aangesien DNA- en RNA-analises reeds op hierdie sisteem uitgevoer is (Strydom, 1993), is dit nie weer herhaal nie.

HOOFSTUK 2

TRANSFEKTERING VAN DIE UWOV2 (Sf)-SELLYN

2.1 Inleiding

Die doelstelling van hierdie ondersoek was om die hepatitis B-virusoppervlakantigene in 'n eukariotiese sellyn uit te druk en vir hierdie doel is die geskiktheid van die UWOV2 (Sf)-sellyn ondersoek. Hierdie sellyn, wat 'n ovariumkanker-sellyn is, is gekies omdat: (1) Dit is wenslik om die hepatitis B-virusoppervlakantigene in 'n soogdierselsisteem uit te druk (die natuurlike gasheer van die virus is mens lewerselle) aangesien dit meer waarskynlik 'n proteïen met die regte konformasie en gevolglik ook die gewenste antigenisiteit sal produseer. (2) Dit 'n ewiglewende sellyn is en kan dus aangewend word vir die produksie van rekombinante proteïene in 'n weefselkultuursisteem. (3) UWOV2 (Sf)-selle groei en vermeerder in 'n chemies gedefinieerde medium sonder die toevoeging van fetale kalfserum wat nodig is vir die hegting en vermeerdering van die meeste soogdiersellyne wat as weefselkulture gekweek word (Golombick *et al.* 1990). Laasgenoemde is 'n groot voordeel omdat enige rekombinante proteïen wat in die medium vrygestel word, makliker geïsoleer kan word omdat die medium self 'n baie lae proteïeninhoud het.

Aangesien daar geen inligting beskikbaar was oor die transfekterbaarheid van hierdie sellyn nie, moes eers vasgestel word of transfeksie wel moontlik is deur middel van standaardtegnieke van lipofeksie en kalsiumfosfaat-DNA-kopresipitering wat in hierdie laboratorium gebruik word. Die kalsiumfosfaatgemedieerde transfeksie van DNA is een van die algemeenste metodes wat gebruik word om soogdierselle te transfekter (Graham en Van der Eb, 1973; Gorman *et al.*, 1983; Yen *et al.*, 1988 en Kriegler, 1993). Lipofeksie is as 'n transfeksiemetode gekies aangesien dit in die literatuur beskryf word as 'n metode wat gewoonlik baie maklik uitvoerbaar is en ook in meeste gevalle meer effektief is as kalsiumfosfaat transfeksies (Somasundaram *et al.*, 1992). Beide metodes

is ook al gebruik om hepatitis B virus-DNA oor te dra na rot hepatosiete (Diot *et al.*, 1992).

2.2 Evaluering van die transfeksiemetodes

2.2.1 Kweking van UWOV2 (Sf)-selle

UWOV2 (Sf)-selle is verkry vanuit die buikvloeistof van 'n 52-jarige Koukasiese vrou wat gediagnoseer is met ovariumkanker en wat reeds chemoterapie ondergaan het. Die selle is oorspronklik in Ham se F-12 medium gekweek, maar daar is waargeneem dat 'n sublyn, genoem UWOV2 (Sf), in 'n serumvrye gedefinieerde medium, naamlik KSLMS gegroei het (Golombick *et al.* 1990).

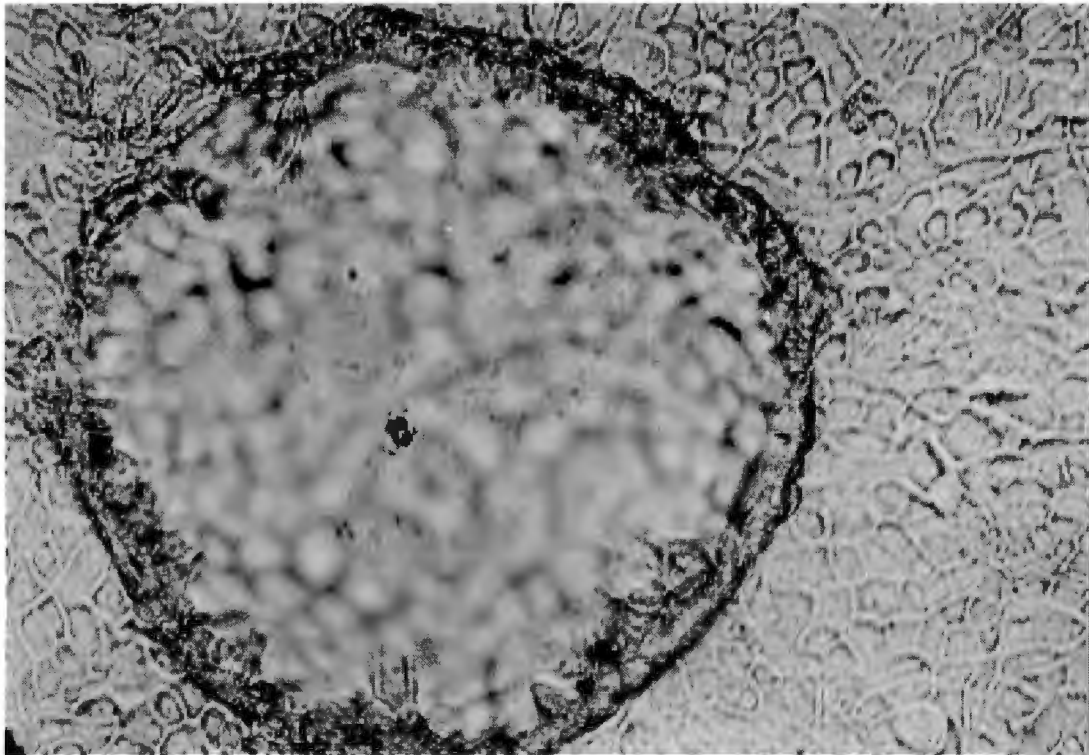
UWOV2 (Sf)-weefselkulture is gekweek in 25 cm²-flesse in KSLMS-medium (Highveld Biologicals) sonder antibiotika as monolaagkulture by 37°C in atmosferiese lug met 5% CO₂. UWOV2 (Sf)-selle groei in monolae, maar daar is ook die verskynsel van lokale meerlagige groei wanneer die selle vir lang periodes in serumvrye medium gekweek word. Hierdie “koepels” is gebiede waar die selle in meerlagige strukture oor mekaar groei (Fig. 2.1).

Nadat die monolaag 60 - 80% volgroei was, is dit deur middel van tripsinering in subkulture verdeel in 'n 1:3 verhouding in nuwe weefselkultuurflesse met vars KSLMS-medium. Die verhouding waarin subkulture verdeel is, was aanvanklik 1:5, maar daar is ondervind dat die subkulture baie stadig groei en die verhouding is toe verlaag na 1:3.

2.2.2 Transfeksie van die UWOV2 (Sf)-sellyn.

2.2.2.1 Bepaling van G418-weerstandbiedendheid.

Die effektiwiteit van die transfeksiemetodes is bepaal deur die oordrag van die bakteriële neomisien-weerstandbiedendheidsgeen, wat voorkom in die plasmied wat

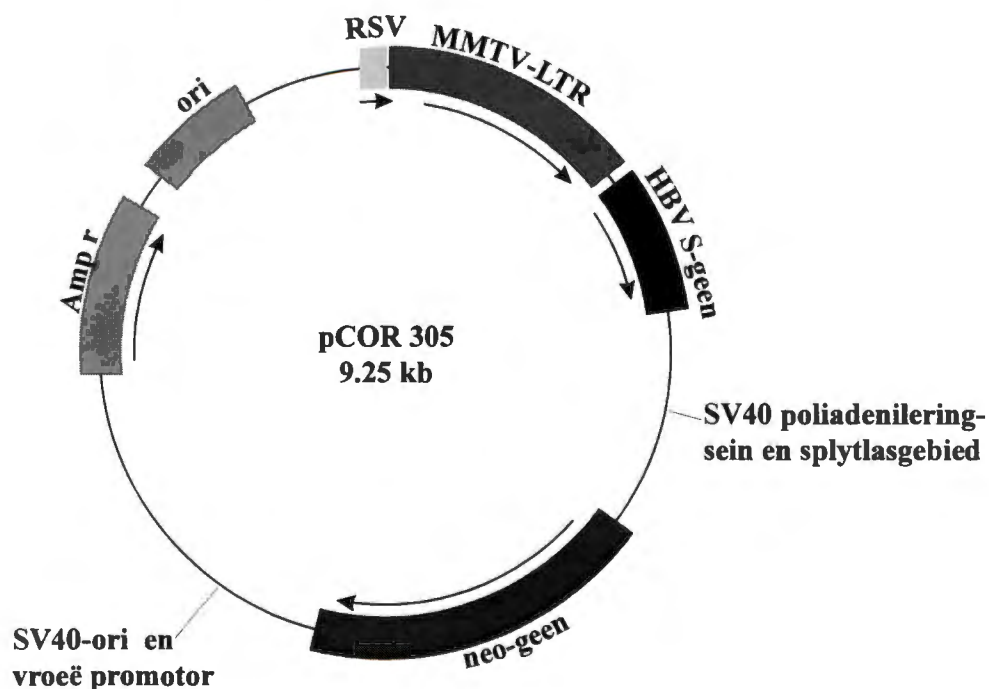


Figuur 2.1 'n Gebied waar UWOV2 (Sf)-selle meerlagig groei en omring word deur 'n normale monolaag (80X vergroting).

gebruik is, te monitor. Hierdie plasmied bevat die neo-geen, afkomstig vanaf *Tn5* van *E. coli*. Die seleksie is gebaseer op die sensitiwiteit van ongetransfekteerde selle vir die antibiotikum G418. Hierdie antibiotikum is 'n 2-deoksistreptamienverbinding wat struktureel verwant is aan gentamisien, maar dit het 'n inhiberende effek teen 'n wyer reeks pro- en eukariotiese organismes. Dit inhibeer proteïensintese deur interaksie met die 80S-ribosoom eenheid en kan geïnaktiveer word deur die bakteriese fosfotransferase ensiem APH(3')I, wat gekodeer word deur die bakteriese transponeerbare element *Tn601(903)* (Jimenez en Davies, 1980; Bar-Nun *et al.*, 1983). Die plasmied wat gebruik is vir die transfeksie, pCOR 305, is 'n soogdiersel-uitdrukkingsvektor wat gekonstrueer is deur Strydom (1993) deur gebruik te maak van die pMAMneo-luc vektor en die hepatitis B-virus S-geen daarin te ligger (Fig. 2.2). Daar is besluit om hierdie vektor te gebruik omdat dit oorspronklik gekonstrueer is as 'n vektor vir die uitdrukking van die hoofmantelproteïen in CHO-selle en dus later in die studie ook vir hierdie doel in UWOV2(Sf)-selle gebruik kon word.

Nadat die betrokke transfeksietegniek uitgevoer is, is die selmonolaag aan medium wat toksiese konsentrasies G418 bevat, blootgestel en die aanname dat slegs selle wat die

neomisien-weerstandbiedendheidsgeen bevat en uitdruk sal kan oorleef, is gebruik om te selekteer vir getransfekteerde selle.



Figuur 2.2 'n Skematiese voorstelling van pCOR 305. Hierdie plasmied is gebruik om die transfekteerbaarheid van die UWOV2 (Sf)-sellyn te toets. Die plasmied bevat die S-geen van die hepatitis B-virus wat kodeer vir die hoofmantelproteïen en die *neo*-geen wat oorsprong gee aan G418 weerstandbiedendheid in soogdierselle.

Voordat die weefselkulture aan G418 seleksie onderwerp kon word, moes die toleransie van die selle teenoor G418 eers vasgestel word om te bepaal wat die laagste konsentrasie van G418 is wat toksies is vir UWOV2 (Sf)-selle. Om te verseker dat betroubare seleksieresultate verkry kon word, moes die konsentrasie G418 in die medium hoog genoeg wees om alle ongetransfekteerde selle te dood, maar selle wat die *neo*-geen uitdruk moes kan oorleef. Vir die vasstelling van hierdie G418 konsentrasie is van 'n konsentrasiereeks gebruik gemaak. Die konsentrasies wat gebruik is, was 0, 200, 300, 400, 500 en 600 μg G418/ml KSLMS-media. Konstante hoeveelhede UWOV2 (Sf)-selle is na tripsinering in verskillende putte van 'n 6-put weefselkultuurplaat gevoeg en medium met die betrokke konsentrasie G418 is elke 48-uur vervang terwyl die selle by 37°C geïnkubeer is. Die resultate van die eksperiment word in Tabel 2.1 saamgevat. Die teenwoordigheid van lewende selle is mikroskopies vasgestel. Om te bepaal watter van die putte na blootstelling aan G418 lewende selle ingehad het, is die kulture vir 'n verdere tydperk van sewe dae met antibiotikumvrye

medium by 37°C geïnkubeer. Die putte is mikroskopies ondersoek vir die teenwoordigheid van foki van lewende UWOV2 (Sf)-selle.

Tabel 2.1 Oorlewing van UWOV2 (Sf) selle in media met verskillende konsentrasies van die antibiotikum G418.

Konsentrasie G418 µg/ml	Dae van blootstelling aan G418-bevattende medium.				
	2	4	6	8	10
600	L	L	L	X	X
500	L	L	L	X	X
400	L	L	L	X	X
300	L	L	L	L	X
200	L	L	L	L	L
0	L	L	L	L	L

L dui op die teenwoordigheid van selle wat die toediening van die antibiotikum oorleef het en X dui op die totale afwesigheid van lewende selle na die verdere tydperk van inkubasie.

Volgens hierdie resultate is die laagste konsentrasie G418 wat alle selle na tien dae gedood het, 300µg G418 per ml KSLMS-medium. Alle seleksiestappe wat verder gedoen is, is daarom met 300 µg/ml G418 uitgevoer.

Plasmied DNA wat vir transfeksies gebruik is, is grootskaals berei in *E. coli* K12 MC1061 volgens die standaardmetode wat in hierdie laboratorium gebruik word (Strydom, 1993). Plasmied DNA is in Roberts-buffer (6mM Tris-HCl pH 7.5; 6mM NaCl; 0.1mM EDTA) gesuspendeer en die konsentrasie daarvan is bepaal deur UV-spektroskopie by 260nm deur gebruik te maak van 'n uitwissingskoëffisiënt van 20 mg⁻¹.ml.cm⁻¹ (Sambrook *et al.*, 1989).

2.2.2.2 Transfeksie met kalsiumfosfaat

Hierdie tegniek is ontwikkel deur Graham en Van der Eb vir die transformering van selle met adenovirus-DNA (Graham en Van der Eb, 1973) en berus op 'n chemiese reaksie waartydens 'n kalsiumfosfaatpresipitaat vorm waarin die DNA vasgevang word.

Die presipitaat word op die selle gevoeg en adsorbeer dan aan die seloppervlak waarna dit deur die selle opgeneem kan word. Volgens Loyter (1982) is CaP_i 'n baie effektiewe fasiliteerder van geenoordrag om drie redes: eerstens verhoog dit die konsentrasie van DNA op die seloppervlak deur middel van presipitasie, terselfdertyd beskerm dit die DNA teen serum nukleases en daar is ook aanduidings dat CaP_i fagositose induseer en daardeur DNA opname in die sel in aanhelp. Eksogene DNA wat op die manier tesame met die fyn presipitaat van kalsiumfosfaat in die sel opgeneem word, kan in die kern van die sel eindig waar dit tot uitdrukking kan kom.

Die pH waarby die presipitaat gevorm word is 'n kritiese faktor. As die pH te laag is, word geen presipitaat gevorm nie, terwyl 'n te hoë pH weer 'n korrelrige presipitaat lewer wat nie deur die selle opgeneem kan word nie; die optimum pH vir die reaksie is tussen pH 7.1 en 7.5. Nog 'n belangrike faktor is die konsentrasie van die DNA in die transfeksiemengsel. Deur DNA met 'n fluoreserende stof te merk en die opname daarvan in muis Ltk⁺ Aprt⁻-selle te moniteer, is 'n optimum konsentrasie van DNA in die reaksiemengsel bepaal. Daar is bevind dat wanneer die DNA-konsentrasie hoër is as die optimum, adsorpsie van die kalsiumfosfaatkompleks steeds plaasvind, maar baie minder DNA word in die sitoplasma opgeneem (Loyter *et al.*, 1982).

Die metode wat deur Ausubel *et al.*, (1989) beskryf is, is in hierdie studie gevolg. Dit bestaan uit twee dele waarvan die eerste die vermenging van DNA in HBS-buffer (16.4g NaCl; 11.9g Hepes; 0.21g Na_2HPO_4 ; maak op tot 1 Liter; pH 7.05) met CaCl_2 is, om 'n fyn kalsiumfosfaatpresipitaat [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] te vorm waarin die plasmied DNA vasgevang word. Die volgende stap is om die presipitaat drupsgewys oor die selmonolaag te voeg, waarna dit op die seloppervlak te lande kom en in die selle opgeneem kan word (Graham en Van der Eb, 1973).

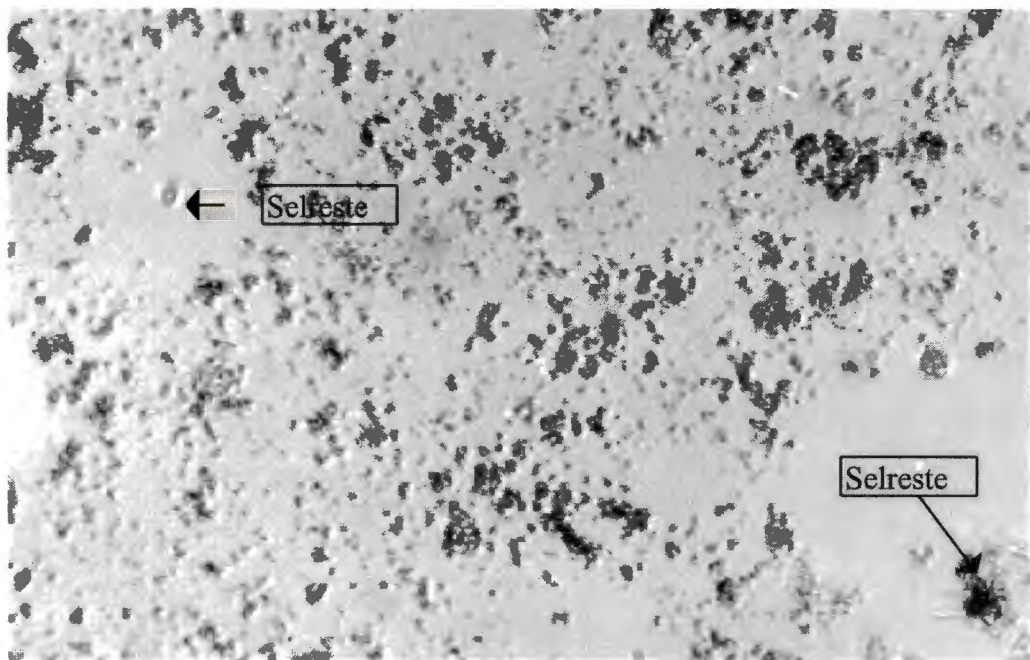
Na afloop van die eerste rondte is waargeneem dat die transfeksie-effektiwiteit baie laag was. Tydens 'n mikroskopiese ondersoek is waargeneem dat daar 'n baie growwe, korrelrige presipitaat op die seloppervlak gevorm het, wat moontlik die rede was vir die lae transfeksie effektiwiteit. Die medium waarin die transfeksie gedoen is, het beide NaH_2PO_4 en Na_2HPO_4 bevat, wat moontlik bygedra het tot die vorming van die korrelrige presipitaat deur te reageer met die kalsiumchloried. Gevolglik is besluit om

die metode te wysig deur die HBS-buffer te vervang met 'n fosfaatvrye transfeksiebuffer (25mM HEPES pH 7.1; 140mM NaCl; 125mM CaCl₂). Nog 'n verandering is aangebring sodat die kalsiumfosfaat-DNA-kopresipitaat eers gevorm is wanneer die reagentie oor die sellag gemeng word en nie vooraf nie.

Die prosedure is as volg verander: Vyf mikrogram DNA is in 0.75 ml van die transfeksiebuffer gesuspendeer en vir 10 sekondes deeglik gemeng. Alle medium is van die selmonolae afgetrek en vervang met 0.75 ml vars KSLMS-medium. Die DNA-transfeksiebuffermengsel is drupsgewys oor die sellag versprei waarna die kultuur vir 5 uur by 37°C geïnkubeer is. Hierna is die sellag met steriele PBS gespoel, vars medium is bygevoeg en is dit by 37°C geïnkubeer.

Seleksie van getransfekteerde selle is 48 uur na transfeksie begin. Al die medium is vervang met KSLMS-medium wat 300µg/ml G418 bevat het. Om te verseker dat die G418 aktief gebly het, is die medium elke 72 uur vervang met vars, G418-bevattende medium. Seleksie is vir 14 dae volgehou waarna die eksperimentele flesse vergelyk is met die kontroleflesse. Na verloop van seleksie is die kontroleflesse mikroskopies ondersoek en daar is geen lewende selle op die oppervlak van enige van die flesse, of gesuspendeer in die medium waargeneem nie (Figuur 2.3). In van die eksperimentele flesse was daar egter 'n aantal foki van lewende selle sigbaar (Figuur 2.4). Die selle was aan die bodem van die fles geheg, maar was baie yl versprei in sekere gebiede van die weefselkultuurfles. Figuur 2.4 dui 'n gebied aan waar 'n aantal lewende selle voorkom in een van die weefselkultuurflesse waarin transfeksie en seleksie uitgevoer is.

Die volgende stap was om die getransfekteerde selle te isoleer en te vermeerder sodat suiwer klone verkry kon word. Die fles is gespoel met 'n oplossing van 125mM EDTA in PBS (pH 8.0), om enige oorblywende kalsiumfosfaat op te los en van die flesoppervlak te verwyder. Hierna is die selle van die fles losgemaak deur tripsinering en oorgedra na 96-put weefselkultuurplate om die getransfekteerde selle van mekaar te skei en die onderskeie klone op grootskaal te kweek.

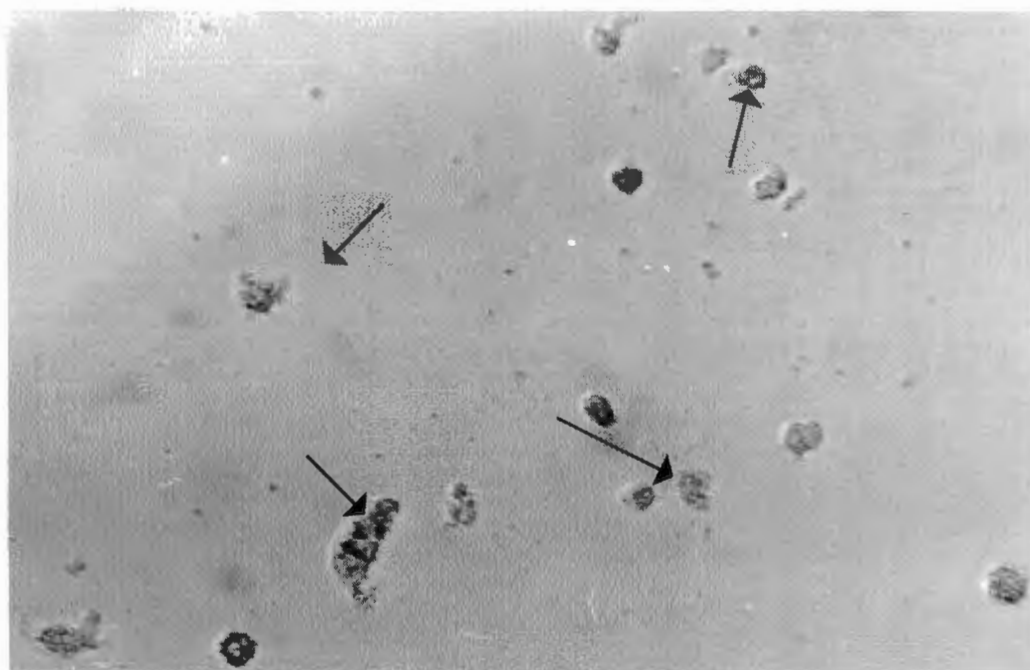


Figuur 2.3 Oppervlak van die kontroleflles. Selreste kom voor tussen die fyn kalsiumfosfaat wat gepresipiteer het op die oppervlak van die sellaag en weefselkultuurflles. Die foto is na 14 dae van seleksie geneem (80 X vergroting).



Figuur 2.4 G418-weerstandbiedende selle. Lewende selle word tussen die selreste met pyltjies aangedui (80X vergroting).

Met die eerste poging is ervaar dat geen van die getransfekteerde selle geheg of vermeerder het na 'n tydperk van 5 dae nie en na 8 dae was daar geen lewende selle in die putte waarneembaar nie. Die eksperiment is herhaal en wysigings is aangebring. Die selle is nie aan tripsinering onderwerp nie, om sodoende te probeer om die selle eers te laat vermeerder voordat klone geïsoleer word. Ook in hierdie geval het die selle gedurende 'n tydperk van ongeveer drie weke na transfeksie weggekwyn totdat daar geen lewende selle teenwoordig was nie (Figuur 2.5).



Figuur 2.5 G418-weerstandbiedende selle 22 dae na transfeksie. Die selle het oorspronklik G418-seleksie oorleef, maar het later afgesterf en na ongeveer 22 dae was geen lewende selle meer sigbaar nie. In die foto (80X vergroting) dui pyltjies die oorblyfsels van die selle aan. Aangesien die fles met EDTA gespoel is, is daar geen kalsuimfosfaatpresipitaat sigbaar nie.

2.2.2.3 Transfeksie deur lipofeksie

Die reagens Lipofectin (Gibco, BRL) is gebruik vir lipofeksie volgens die metode voorgeskryf deur die vervaardigers vir die transfektering van gehegte selle. Lipofectin is 'n 1:1 (w/w) liposoomformulasie van die kationiese lipied N-[1-(2,3-dioleïeloksi)propiel]-n,n,n-trimetielammoniumchloried (DOTMA) en dioleoïelfosfotidietanolamien (DOPE).

Lipofeksie is 'n baie eenvoudige tegniek met hoë reproduseerbaarheid en is waargeneem om 5 tot >100 maal meer effektief te wees as DEAE-dekstraan of kalsiumfosfaat gebaseerde transfeksietegnieke (Feigner *et al.*, 1987). Die metode berus op die vorming van liposome waarmee DNA kan reageer om liposome te vorm waarin DNA vasgevang is. Hierdie liposome versmelt dan met selmembrane in weefselkulture om sodoende die eksogene DNA na die sitoplasma oor te dra (Feigner *et al.*, 1987).

UWOV2 (Sf)-selle is in 25cm²-weefselkultuurflesse gevoeg teen 'n digtheid van ongeveer 1×10^5 selle per fles en by 37°C vir 48 uur geïnkubeer. Twee oplossings is berei: die eerste het 5µg DNA in 'n finale volume van 100µl KSLMS-medium bevat en die tweede 10µl Lipofectin-reagens in 'n finale volume van 100µl KSLMS-medium. Die twee oplossings is gemeng en vir 15 minute by kamertemperatuur geïnkubeer terwyl die sellae met skoon KSLMS-medium gewas is. Hierna is die liposoom-suspensie tot 2ml aangevul met KSLMS-medium en liggies gemeng waarna dit oor die selle gedrup is. Die selle is vir agt uur by 37°C geïnkubeer in 'n 5% CO₂ inkubator waarna die DNA-bevattende medium afgetrek is en vervang is met vars KSLMS-medium. Inkubasie is voortgesit by 37°C vir 48 uur waarna met seleksie begin is.



Figuur 2.6 Selle wat seleksie oorleef het. Na lipofeksie met die plasmied pCOR 305 het die selle 14 dae van seleksie met G418-bevattende KSLMS-medium oorleef (80X vergroting).

Na lipofeksie is seleksie vir 14 dae toegepas met G418 soos beskryf in Afdeling 2.2.2.2. Geen lewende selle is by die negatiewe kontroles waargeneem nie, maar in die eksperimentele flesse het lewende UWOV2 (Sf)-selle na seleksie voorgekom (Figuur 2.6). Die klone kon egter net soos in die geval van die kalsiumfosfaat-transfeksie (Afdeling 2.2.2.2) nie geïsoleer of verder gekweek word nie.

2.3 Samevatting

Omdat lipofeksie en kalsiumfosfaat-DNA-kopresipitasie suksesvol toegepas is vir die transfeksie van 'n verskeidenheid selteipes, is die moontlikheid ondersoek om UWOV2 (Sf)-selle met hierdie metodes te transfekteer. Hierdie ondersoek kon egter nie enduit gevoer word nie omdat die oorlewende selle na transfeksie en seleksie onder die omstandighede wat toegepas is, nie sodanig vermeerder kon word sodat DNA- en proteïenanalises uitgevoer kon word nie.

Na aanleiding van resultate wat in hierdie laboratorium verkry is met die gebruik van *Spodoptera frugiperda* (Sf 21) selle as uitdrukkingstelsel (Strydom, 1993) is besluit om verder ondersoek te doen na die Baculovirus-inseksel uitdrukking van hepatitis B-virusoppervlakantigene. In die hoofstukke wat volg word beskryf hoe vektore gekonstrueer is vir uitdrukking van die hepatitis B-virusoppervlakantigene in Sf 21-insekselle en hoe uitdrukking van rekombinante proteïene getoets is.

HOOFSTUK 3

KONSTRUKSIE VAN BACULOVIRUS OORDRAGVEKTORE

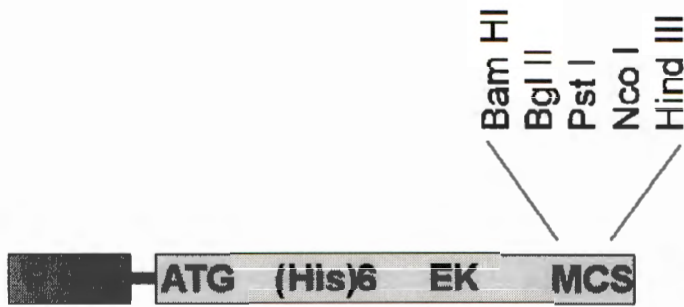
3.1 Inleiding

Baculovirus-sisteme is reeds suksesvol gebruik vir die uitdrukking van 'n groot aantal rekombinante proteïene (O'Reilly *et al.*, 1992) insluitend hepatitis B-virus oppervlakproteïene (Kang *et al.*, 1987; Lanford *et al.*, 1988; Takehara *et al.*, 1988). In hierdie laboratorium is die uitdrukkingsvektor pBlueBac ook reeds suksesvol gebruik om die HBsAg in Sf 21-selkulture uit te druk (Strydom, 1993). Vir die uitdrukking van die hepatitis B-fusieproteïene is hierdie sisteem met pBlueBacHis as uitdrukkingsvektor gekies. In hierdie hoofstuk word die konstruksie van die vektore wat in die kotransfeksie van die insekselkulture gebruik is, beskryf.

3.2 Benaderingswyse

Die **Xpress System** (Invitrogen) Baculovirus-uitdrukkingsstelsel is gekies om die hepatitis B-virusoppervlakproteïene in *Spodoptera frugiperda* (Sf 21-) insekselle uit te druk. Hierdie stelsel maak gebruik van die vektor pBlueBacHis wat verskil van die voorganger pBlueBac in die opsig dat 'n inisiasiekodon en 'n gebied wat vir ses histidienresidue kodeer, gevolg deur 'n enterokinase uitkenningspunt, voor die kloneringspunt ingevoeg is (Figuur 3.1).

Die polihedrienpromotor (pPH) rig uitdrukking van die gekloneerde geen beginnende by die ATG-kodon van die vektor en sodoende word 'n fusieproteïen gevorm wat 'n vektorgekodeerde polipeptied met 'n histidienmerker aan die aminotermus bevat. Die doel hiervan is om die suiwing van die rekombinante proteïene te vergemaklik deur middel van geïmmobiliseerde metaal-affiniteitschromatografie op 'n kolom-matriks waaraan Ni⁺²-ione geheg is (Hochuli *et al.*, 1987).



Figuur 3.1 Skematiese voorstelling van die kloneringsgebied van die uitdrukkingsvektor **pBlueBacHis**. P PH = Polihedrien promotor; ATG = Vektor-gekodeerde inisiasiekodon; EK = Uitkenningspunt vir Enterokinase ensiem; MCS = Meervoudige Kloneringspunt

Die volledige nukleïensuurvolgorde van die vektor is bekend en in Figuur 3.2 word 'n gedeelte daarvan gegee tesame met die afgeleide aminosuurvolgorde en domeine van belang.

CCTATAAATCAT ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT
 Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly

ATG GCT AGC ATG ACT GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC
 Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr

Bam HI **Bgl II** **Pst I** **Nco I**

GAC GAT GAC GAT AAG|GAT CCG AGC TCG A|GA TCT GCA|GCT GGT AC|C
 Asp Asp Asp Asp Lys_↑ Asp Pro Ser Ser Arg Ser Ala Ala Gly Thr

Enterokinase uitkenningspunt

Hind III

ATG GAA TTC GA|A GCT T

Met Glu Phe Glu Ala

Figuur 3.2 Die DNA-volgorde van 'n gedeelte van **pBlueBacHisB**. Gekloneerde DNA kan by enige van die aangeduide restriksie ensiem snitpunte ingevoeg word. Die vektorgekodeerde deel van die fusieproteïen wat gevorm word kan deur middel van die aangeduide uitkenningspunt verwyder word deur die proteolitiese ensiem enterokinase.

Die uitgangsplasmied pBlueBacHis is op grootskaal gekweek in die gasheer wat saam met die pBlueBacHis-vektore veskaf is, die *E.coli* Top10 stam (Invitrogen).

3.3 Metodes

Tydens die konstruksie van die Baculovirus-vektore is van die volgende metodes gebruik gemaak. In Afdeling 3.4 sal slegs na die hierdie metodes verwys word.

3.3.1 Groot skaalse bereiding van plasmied DNA

Plasmied DNA wat gebruik is vir die konstruksie van die uitdrukkingsvektore en die daaropvolgende transfektering van Sf 21- insekselle, is groot skaals berei en geïsoleer deur gebruik te maak van die "Plasmid Midi Kit" (Qiagen Inc). Die gasheerkultuur is in SOB-medium gekweek totdat die absorbansiewaarde van die kultuur by 600nm 'n waarde van 1.0 - 1.5 bereik het. Alkaliese lise van die selle is uitgevoer met SDS in die teenwoordigheid van RNase A waarna die selreste deur sentrifugering verwyder is. Die plasmiedbevattende supernatant is oor 'n kolom gevoeg met 'n hars van gemodifiseerde silikagel wat optree as 'n anioonuitruiler en die plasmied DNA daaraan laat bind. Na die voorgeskrewe wasstappe is suiwer plasmied DNA vanaf die hars geëlueer met 'n hoë-sout buffer (1.25M NaCl; 50mM Tris/HCl; 15% Etanol) by pH 8.5. Die plasmied DNA is in 0.7 volume isopropanol gepresipiteer en deur sentrifugering herwin waarna dit met 70% etanol gewas is. Na droging is dit in Roberts-buffer gesuspendeer en die konsentrasie van die plasmied DNA is UV-spektrofotometries bepaal (Ausubel *et al.*, 1989).

3.3.2 Ensiematiese modifisering van DNA

Restriksie-endonukleasesnitte is uitgevoer volgens die voorskrifte wat deur die vervaardigers (Boehringer Mannheim) verskaf word. Die plasmied DNA is in die voorgeskrewe buffer met die betrokke ensiem by 37°C vir ongeveer 3 ure geïnkubeer of totdat die vertering volledig plaasgevind het, soos bepaal deur agarose gelelektroforese. Waar dit nodig was om die oorhangende 5'-termini van 'n DNA-fragment of vektor op te vul om stomptermi te lewer, is gebruik gemaak van die Klenow-ensiem. Die DNA-fragment is met 0.1 mM dNTPs in 1X NT-buffer saam met 0.5 eenhede van die Klenow

-ensiem by 24°C vir twee uur geïnkubeer. Om te verhoed dat die vektore se termini met hulself ligger, is dit met kalfderm alkaliese fosfatase behandel om die fosfaatgroepe op die 5' termini te verwyder. Die reaksie is uitgevoer deur die plasmied DNA saam met CIP-buffer (25mM Tris-HCl; 1mM MgCl₂; 0.1mM ZnCl₂ pH 7.6) in die teenwoordigheid van 2 eenhede van die ensiem te inkubeer. Om uitstaande 5'-termini te defosfateer is die reaksiemengsel vir 30 minute by 37°C geïnkubeer waarna daar weer 2 eenhede ensiem bygevoeg is en die inkubasiestap herhaal is.

Nadat die vektore en fragmente vir ligering voorberei is, is die konsentrasies daarvan bepaal deur dit te vergelyk met 'n DNA konsentrasiereeks wat in 'n 1% agarosegel geëlektroforeer is. Ekwimolêre hoeveelhede van die vektor en fragment is bymekaar gevoeg en saam met ligasebuffer (20mM Tris-HCl; 1mM EDTA; 5mM ditioeritriol) en 1-3 eenhede T4-DNA ligase oornag geïnkubeer by 18°C.

3.3.3 Herwinning van DNA-fragmente uit agarose gel

Om die DNA-fragmente te isoleer nadat restriksie-ensiemsnitte uitgevoer is, is dit in 'n 1%-agarosegel geëlektroforeer. Omdat die molekulêre massa van die S-geen bevattende fragmente heelwat kleiner was as die vektor-fragment, kon dit gerieflik op hierdie manier geskei word. Die suiwer fragmente is telkens vanuit die agarose gel verwyder deur dit uit te sny en met behulp van die "Qiaex DNA Gel Extraction Kit" (Qiagen Inc.) uit die gel te herwin. Hierdie metode is ook gebruik om DNA te suiwer nadat defosfatering (Afdeling 3.3.2) uitgevoer is.

3.3.4 Transformerings

Kompetente *E. coli* selle is berei soos beskryf in die **Invitrogen** handleiding wat saam met die *E. coli*-kultuur ontvang is en is in 200µl-hoeveelhede by -70°C bewaar. Voor gebruik is die selle op ys ontdooi en in 20µl-hoeveelhede in steriele 1.5ml-buise gepipetteer. Twee mikroliter van die ligeringsmengsel is liggies vermeng met die kompetente selle en dan vir 20 minute op ys gelaat.

Die suspensie is hierna vir 5 minute by 37°C geplaas en met 200µl voorafverhitte LB-voedingsop(10g triptoon; 5g gisektrak; 5g NaCl per Liter) vermeng en vir 'n verdere 30 minute by 37°C geïnkubeer. Volumes van 100µl is op LB-voedingsagarplate wat 50µg/ml ampicillien bevat geplaas en is daarna oornag by 37°C geïnkubeer. Getransformeerde kolonies is daarna gekies om deur middel van restriksie-ensiemanalises die plasmied DNA te ondersoek en te bepaal watter klone die korrekte plasmiedkonstruk bevat het. Bakteriese klone wat die korrekte plasmied-konstrukte bevat het, is in LB-voedingsop gekweek en in dieselfde medium wat 15% gliserol bevat het, vinnig gevries in 'n etanol-droë ys mengsel. Hierdie klone word by -70°C bewaar.

3.3.5 Kleinskaalse bereiding en analise van plasmied DNA

Getransformeerde bakteriese klone is op kleinskaal gekweek vir die isolering van plasmied DNA vir restriksie-ensiemanalises volgens die metode wat beskryf is deur Sambrook *et al.*,(1989). Die metode behels die kweking van geselekteerde bakteriese kolonies in 5ml ampicillien-bevattende LB-voedingsop. Die bakterieë is met lisosiem geliseer waarna die selreste met behulp van sentrifugering verwyder is. Die plasmied DNA is met isopropanol uit die supernatant gepresipiteer, gedroog en in Roberts-buffer gesuspendeer en met verskeie restriksie-endonukleases behandel vir karakterisering.

3.4. Konstruksie van S-oopleesraam bevattende vektore

Soos reeds genoem, is plasmiede wat die gekloneerde oopleesrame van die drie verskillende oppervlakproteïengene van die hepatitis B-virus bevat, gebruik. Die geenfragmente van belang is met die geskikte restriksie-endonukleases uitgesny en in die kloneringspunt van die pBlueBacHis-vektor geligeer.

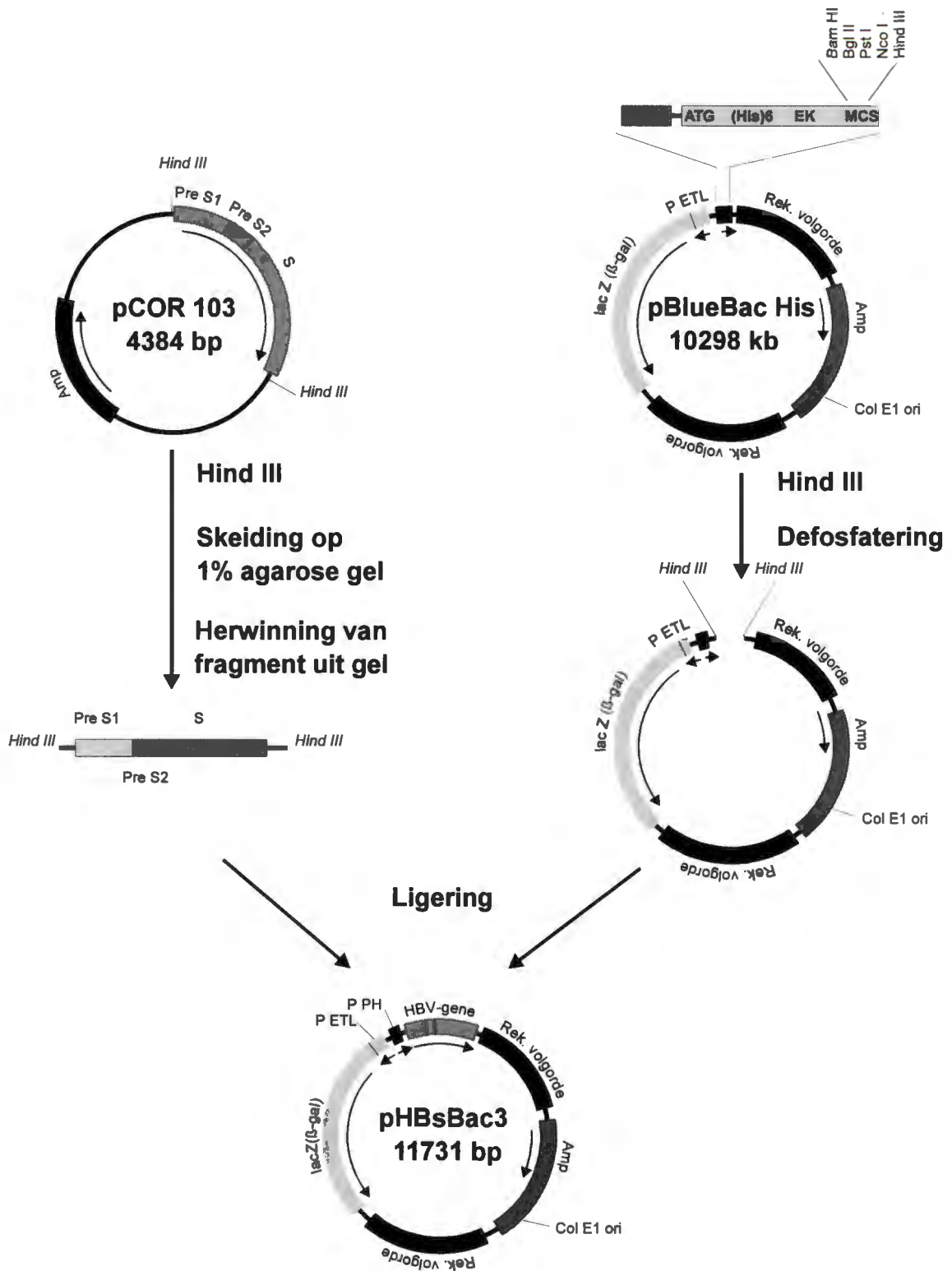
3.4.1 Konstruksie van pHBsBac3 en pHBsBac4

Die eerste Baculovirus-uitdrukkingsvektor wat gekonstrueer is, bevat die volledige gebied wat kodeer vir die groot oppervlakproteïen van die HBV, m.a.w die preS1, preS2 en S-geengebiede. Die restriksie-ensiem Hind III is gebruik om die fragment van 1427bp uit pCOR 103 te isoleer. Aangesien die inisiasiepunt van transkripsie in die vektor stroomop van die kloneringspunt is, moes verseker word dat die ingevoegde fragment in fase met die reeds bestaande leesraam geligeer word. Om dit te bewerk, is drie vektore nl. pBlueBacHis A, pBlueBacHis B en pBlueBacHis C deur **Invitrogen** verskaf. Die kloneringsgebiede van hierdie vektore verskil sodanig dat elk van die restriksie-ensiemsnitpunte in die kloneringsgebied die vektor kan oopsny in enige van die drie moontlike leesrame, afhangende of vektor A, B of C gebruik word.

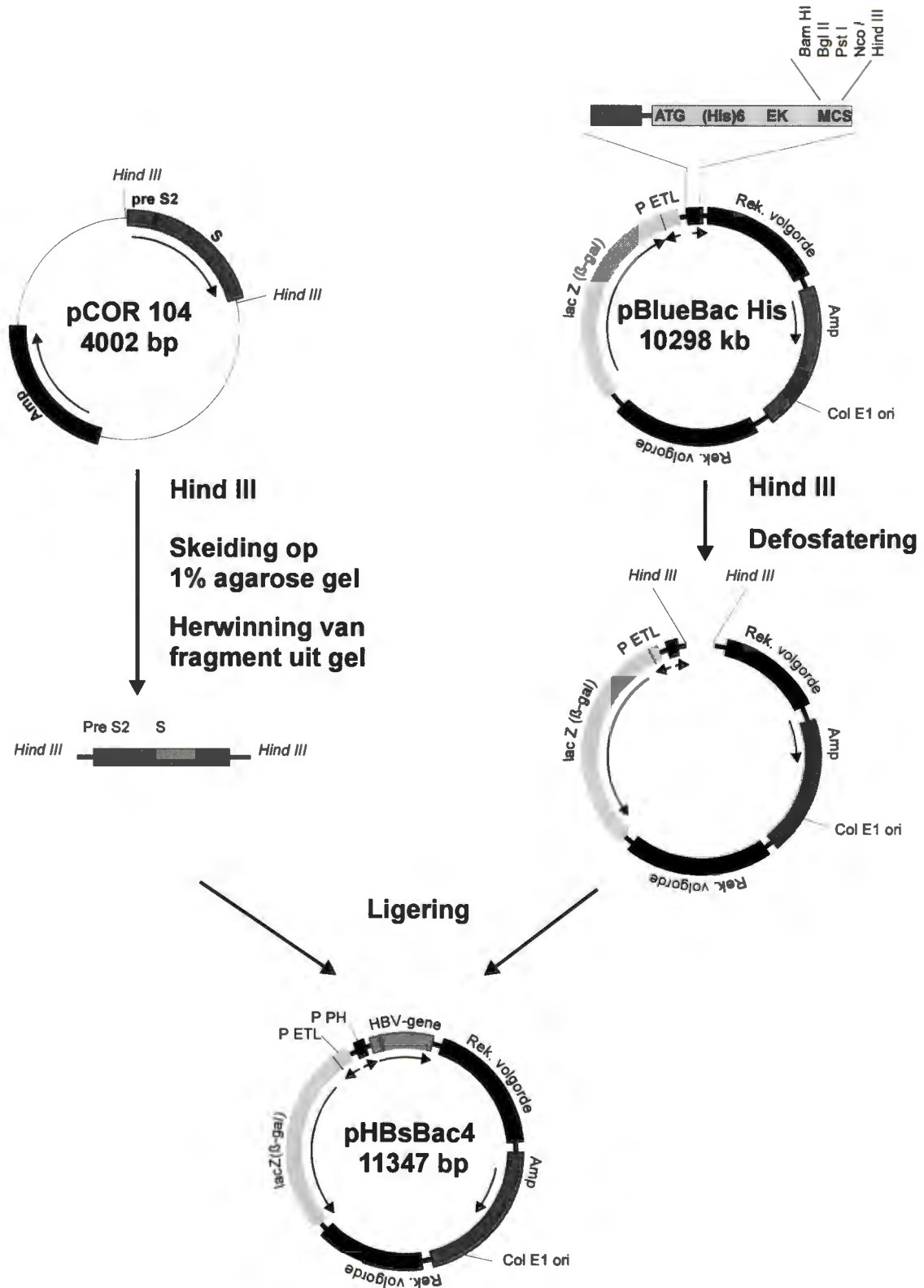
Na bestudering van die volgordes is vasgestel dat die fragment wat met Hind III uit pCOR 103 gesny is, in die pBlueBacHis A vektor geligeer moet word nadat dit met Hind III oopgesny is en gedefosfateer is. Na afloop van die ligeringstap is transformering van kompetente *E.coli* (Top 10) selle uitgevoer en die transformante is met geselekteerde restriksie-ensieme geanaliseer. Figuur 3.3 gee 'n skematiese voorstelling van die strategie wat gevolg is om pHBsBac3 te konstrueer. Die konstruksie van die baculovirus oordragvektor wat slegs die preS2- en S-geengebiede van die HBV bevat, pHBsBac4, is uitgevoer deur dieselfde strategie as hierbo te volg (Figuur 3.4). Die verskil was slegs in die plasmied wat gebruik is as bron van die HBV-gene preS2 en S, naamlik pCOR 104. Die vektor bevat die preS2- en S-gene met Hind III snitpunte aan weerskante. Hierdie fragment is in die vektor pBlueBac His C geligeer.

3.4.2 Konstruksie van pHBsBac5

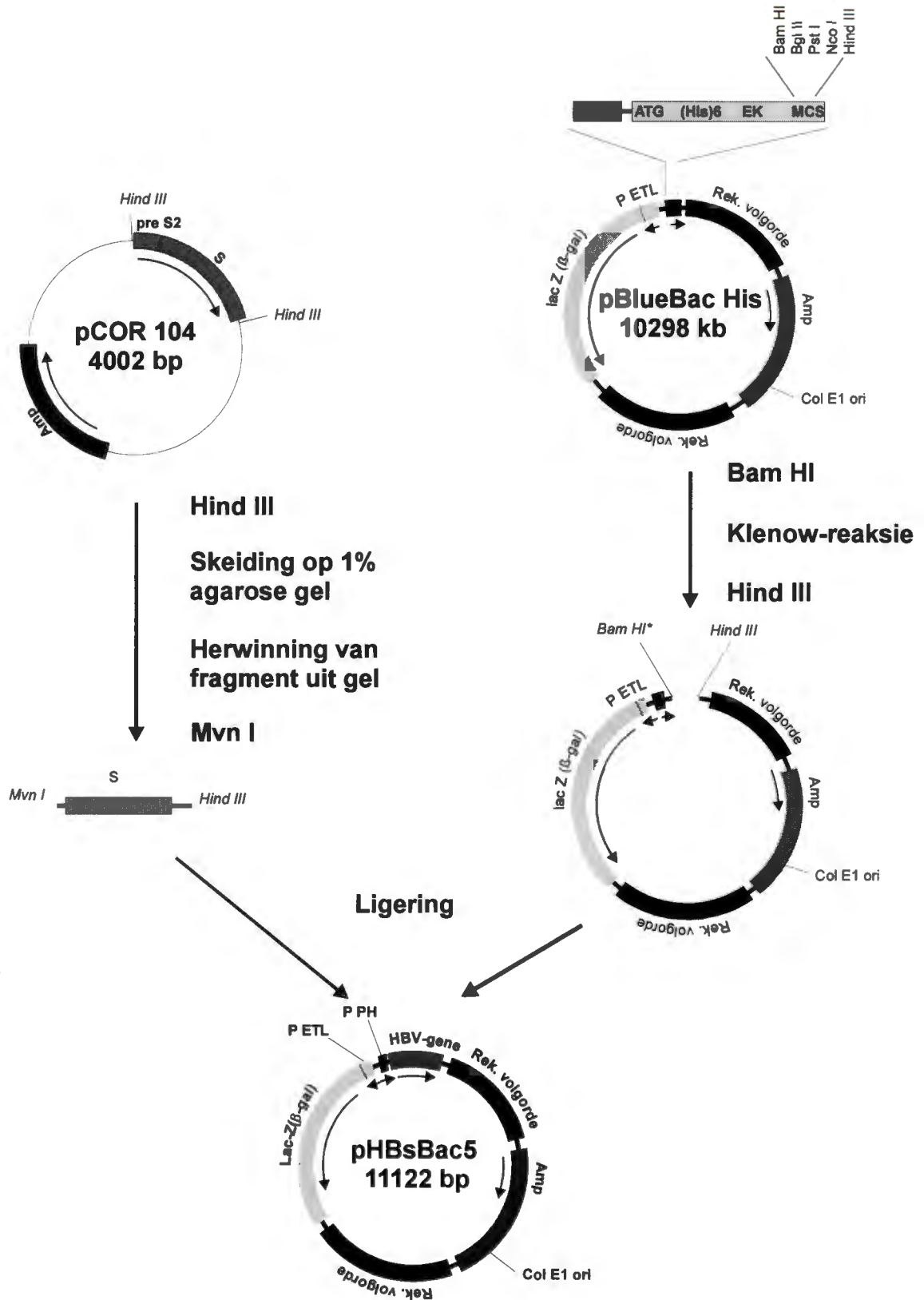
Die strategie vir die konstruksie van die laaste vektor wat slegs die S-geen van die HBV bevat, het verskil van die vorige twee gevalle in die opsig dat dieselfde restriksie-ensiemsnitpunte nie aan weerskante van die S-geen beskikbaar was nie. Die S-geen is met twee verskillende ensieme uitgesny, naamlik Mvn I en Hind III. Die uitgesnyde fragment het dus 'n stomp terminus aan die 5'-kant en 'n Hind III-punt aan die 3'-kant.



Figuur 3.3 Konstruksie van pHBsBac3. Die plasmied pCOR 103, wat die preS1, preS2 en S-gene bevat, is gebruik om aldrie die gene met 'n enkele HindIII-vertering te isoleer waarna dit in die uitdrukkingsvektor pBlueBac His wat met Hind III oopgesny is geligeer is. Die plasmied pHBsBac3 toon aan waar die HBV-oppervlakproteïengene in die uitdrukkingsvektor geleë is. Rekombinasie volgorde omsluit die gebied wat bedoel is vir oordrag na die genoom van die AcNPV.



Figuur 3.4 Konstruksie van pHsBac4. Die plasmied pCOR 104 wat die pre S2 en S-geengebiede tussen twee Hind III uitkenningspunte bevat is gebruik om die gene uit te sny waarna dit in die Hind III snitpunt van die pBlueBac His vektor geligier is. Rekombinasie volgorde omsluit die gebied wat bedoel is vir oordrag na die genoom van die AcNPV.

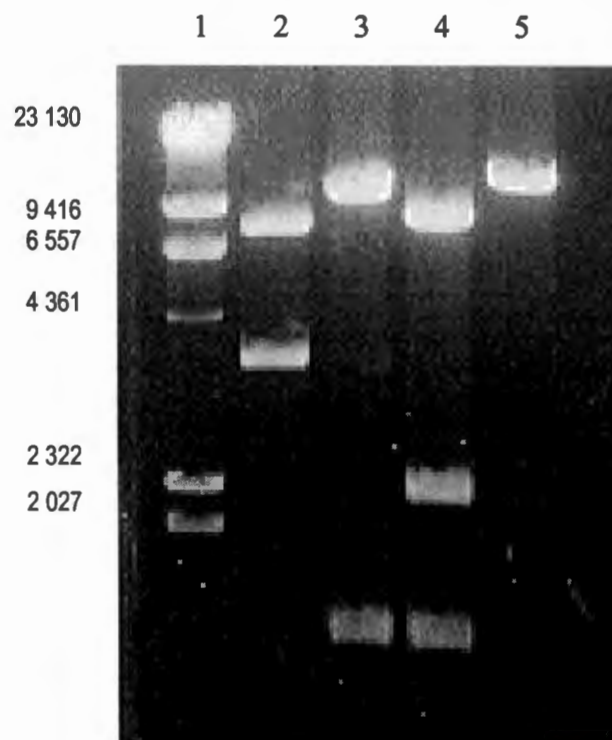


Figuur 3.5 Konstruksie van pHBsBac5. Nadat die preS2-S gene met HindIII uit pCOR 104 gesny is, is die preS2-gebied verwyder deur Mvn I vertering. Die 5' oorhange van die vektor wat met Bam HI oopgesny is, is met die Klenow-reaksie opgevul en dit is met HindIII behandel sodat die S-geenfragment daarin kan ligger. Rekombinasie volgordes omsluit die gebied wat bedoel is vir oordrag na die genoom van die AcNPV.

Die pBlueBacHis B vektor is met Bam HI behandel waarna die oorhangende termini opgevolg is deur middel van die Klenow-ensiemreaksie. Hierna is 'n gedeelte van die vektor verwyder met die ensiem Hind III om 'n vektor te lewer waarvan die een terminus stomp is en die ander met 'n Hind III-punt eindig (Fig 3.5). Sodoende kon die S-geen in fase met die bestaande leesraam in die vektor geliggeer word.

3.4.3 Resultate

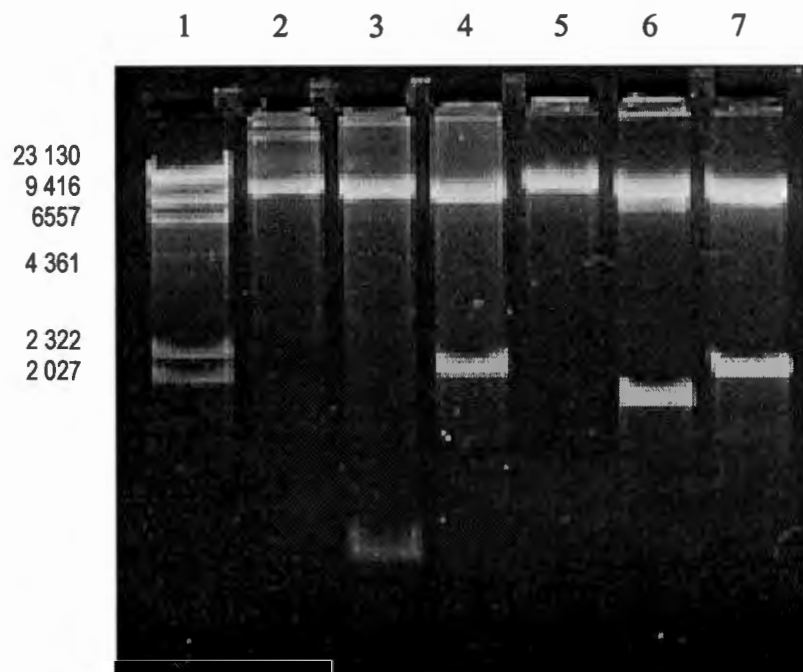
Na konstruksie van die bogenoemde drie vektore is die plasmied DNA op grootskaal berei, gesuiwer en met spesifieke restriksie-endonukleases behandel. Aangesien die posisies waar die restriksie-ensieme die DNA sny bekend is, kon die fragmentgroottes teoreties bereken word. Die ensiembehandelde DNA is op 'n 1% agarose gel geëlektroforeer, saam met Hind III behandelde faag- λ DNA as groottestandaard. In Figuur 3.6 word die resultaat van die ensiemkartering van pHBsBac3 gegee. In baan 2 is die 439bp fragment nie sigbaar in die foto nie. Die fragmentgroottes wat verkry is, dui aan dat die fragment van die regte lengte in die regte oriëntasie ingevoeg het.



Figuur 3.6 Restriksie-ensiemkarakterisering toegepas op pHBsBac3. Die restriksie ensieme wat gebruik is, is: Baan 2: Eco RI, Baan 3: Hind III, Baan 4: Eco RV, Baan 5: Spe I. Baan 1 bevat 'n λ Hind III standaard met die groottes van die bande aan die linkerkant aangedui.

Die ensiem Eco RI sny die vektor in die ingevoegde fragment en is aangewend om die oriëntasie van die invoeging te bepaal. Indien die invoeging in die teenoorgesteide oriëntasie plaasgevind het, sou die fragmentgroottes in baan 2 anders gewees het: 7184, 3545 en 1002 bp (Tabel 3.1). Die bande in die gel het ooreengestem met die verwagte groottes, binne die noukeurigheidsgrense van agarose gelelektroforese, en die konstruk is aanvaar as korrek.

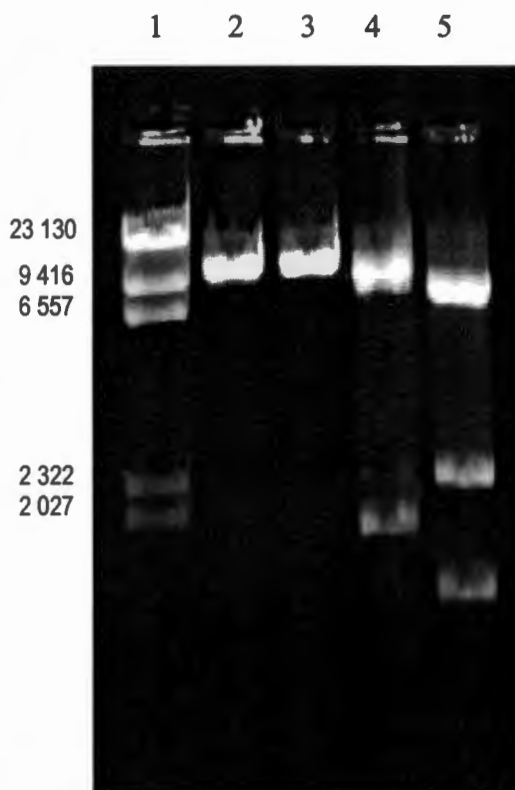
Dieselfde analises is gedoen op die plasmied pHBsBac4 (Tabel 3.1) met die ensieme soos aangedui in Figuur 3.7. In hierdie geval is 'n plasmied waarin die invoeging in die teenoorgestelde oriëntasie ingevoeg is, ook behandel met dieselfde restriksie-ensiem (bane 5 - 7).



Figuur 3.7 Restriksie-ensiemkarakterisering toegepas op pHBsBac4. Baan 2: Sca I, Baan 3: Sau I, Baan 4: Nhe I, Bane 5-7: Dieselfde snitte op 'n vektor met die invoeging in verkeerde oriëntasie. Baan 1 bevat 'n λ Hind III standaard met die groottes van die bande aan die linkerkant aangedui.

Die fragmentgroottes wat in die gel waargeneem is, het ooreengestem met die teoreties berekende waardes en die konstruk is as korrek beskou. In dié geval is die restriksie-endonuklease Sau I-gebruik om die oriëntasie van die invoeging te bepaal. Baan 6 op die gel toon die resultaat van 'n Sau I-vertering van 'n vektor met die invoeging in die teenoorgestelde oriëntasie.

DNA van pHBsBac5 is ook gekweek en aan restriksie-endonuklease vertering onderwerp en die resultaat word in Figuur 3.8 gegee. Na aanleiding van die groottes van die fragmente (Tabel 3.1) in die gel is die konstruk as korrek aanvaar en gebruik in die kotransfeksies soos beskryf in Hoofstuk 4.



Figuur 3.8 Restriksie-ensiemkarakterisering toegepas op pHBsBac5: Baan 2: Eco RI, Baan 3: Spe I, Baan 4: Nhe I, Baan 5: Eco RV. Baan 1 bevat 'n λ Hind III standaard met die groottes van die bande aan die linkerkant aangedui.

3.5 Samevatting

Die drie uitdrukkingsvektore is suksesvol gekonstrueer en met ensiemkartering gekontroleer waarna dit gebruik is om bakterieë te transformeer. Hierdie bakteriese klone is by -70°C bewaar en is gebruik vir die grootskaalse kweking van plasmied DNA vir kotransfeksie van Sf 21-insekselle. Hoofstuk 4 handel oor die gebruik van hierdie vektore vir die rekombinante uitdrukking van die verskillende mantelproteïene van die hepatitis B-virus.

Tabel 3.1 Teoretiese en eksperimentele fragmentgroottes*

Plasmied	Baan	Teoretiese fragmentgrootte	Eksperimentele fragmentgrootte
pHBsBac3	2	7747 3545 436	7700 3500 Nie sigbaar
	3	10304 1427	10290 1400
	4	8087 2226 1418	8050 2200 1380
	5	11731	11730
pHBsBac4	2	11347	11300
	3	10544 803	10550 740
	4	9267 2080	9240 2050
	5	11347	11450
Teenoorgestelde oriëntasie	6	9952 1179	9470 1140
	7	9267 2080	9250 2060
pHBsBac5	2	11122	10450
	3	11122	10600
	4	9267 1855	9400 2000
	5	7478 2226 1418	7200 2200 1300

* Fragmentgroottes word in basepare gegee.

HOOFSTUK 4

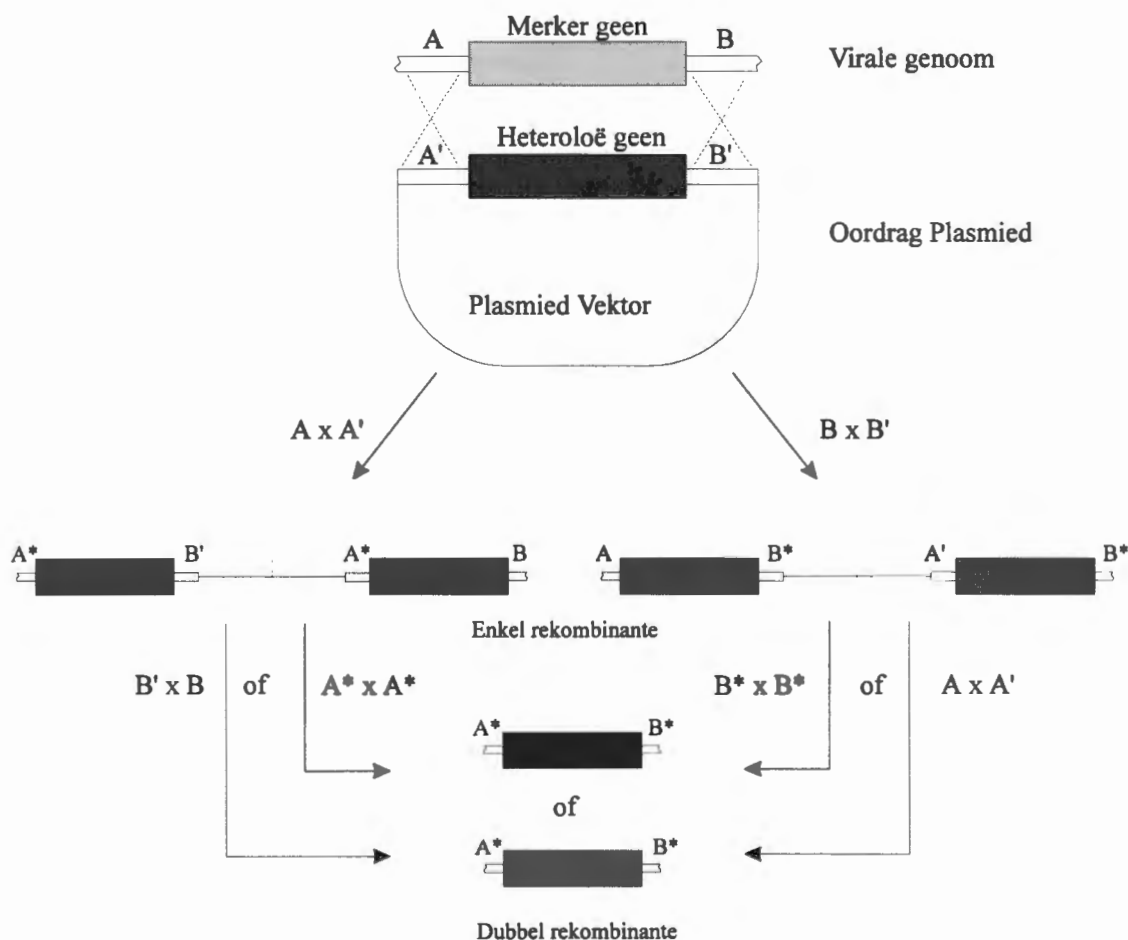
UITDRUKKING VAN DIE MANTELPROTEÏENE VAN DIE HEPATITIS B-VIRUS IN 'N BACULOVIRUS-UITDRUKKING- SISTEEM

4.1 Inleiding

Die familie Baculoviridae is 'n groep van dubbelstring-DNA virusse met 'n genoamlengte wat wissel van 80 tot 220 kb en sluit 'n aantal natuurlike patogene van verskeie Arthropoda in. Die virus wat in hierdie studie gebruik is, is bekend as die *Autographa californica* nukleêre polihedrose virus (AcNPV) en maak deel uit van die subgroep nukleêre polihedrose virusse wat die organisme *Autographa californica* as natuurlike gasheer het (Emery, 1991). Gebruik van hierdie virus as 'n meganisme om heteroloë gene in insekselle uit te druk, is die resultaat van navorsing wat gedoen is deur Miller en Smith (1981) en deur Smith en medewerkers (1983).

Wat die virus geskik maak vir die uitdrukking van rekombinante proteïene, het te doen met die feit dat dit natuurlik in twee fenotipes voorkom, nl. as 'n ekstrasellulêre vorm en as insluitingsliggame (polihedra) wat uit 'n proteïenmatriks bestaan waarin viruspartikels vasgevang is (Maiorella *et al.*, 1988; Fraser, 1992). Die proteïenmatriks waarin die viruspartikels voorkom, is die strukturele proteïen polihedrien wat deur die *polh*-geen gekodeer word en nie noodsaaklik is vir virusreplisering nie. Dit kom tot uitdrukking in die baie laat fase van infeksie, bekend as die okklusiefase, waartydens die virus verpak word in die polihedrienmatriks. Polihedra versamel in die kern van die gasheersel en kan tot 50% van die totale proteïene uitmaak tydens die sterfte van 'n geïnfekteerde larwe (Maiorella *et al.*, 1988). Strategieë is gevolglik ontwikkel om gebruik te maak van die hoë aktiwiteit van die polihedrienpromotor om heteroloë gene in die plek van polihedrien in insekselle te produseer. Omdat die Baculovirusgenoom relatief groot is en daar waarskynlik geen unieke restriksie-ensiemsnitpunte voorkom nie, is klonering van gene direk in die genoom bykans onmoontlik en die strategie van

alleliese vervanging is vir dié sisteem ontwikkel (Smith *et al.*, 1983; Pennock *et al.*, 1984 en Maeda *et al.*, 1985). Dit behels die vervanging van 'n spesifieke nie-essensiële geen in die ouervirus deur 'n heteroloë geen in 'n oordragvektor. In die meeste gevalle is die geen wat vervang word die polihedriengeen aangesien dit 'n nie-essensiële geen is wat baie hoë uitdrukking vertoon. Die oordragvektor bevat die gekloneerde geen(e) en promotor van belang tussen volgordes wat die geen teiken vir alleliese vervanging in 'n spesifieke gebied in die genoom van die Baculovirus (Figuur 4.1).



Figuur 4.1. Alleliese vervanging in AcNPV-virusgenoom. Die rekombinasiegebeure wat kan plaasvind wanneer die virale genoom van die ouervirus saam met 'n oordragvektor in insekselle gekotransfekteer word. A en A' en B en B' is ooreenstemmende volgordes wat onderskeidelik in die virale genoom en op die oordragvektor voorkom. Die doel hiervan is om die rekombinasie te rig na die gebied van die virale genoom wat vervang moet word deur die heteroloë geen(e). Die nageslag wat dan voorkom, bevat, tussen 'n oormaat van wilde tipe AcNPV en dubbele rekombinante wat weer die genotipe van die wilde tipe AcNPV bevat, ook dubbele rekombinante wat die merkergeen in plek van die heteroloë geen in die genoom het (O'Reilly *et al.*, 1992).

Nadat die genoom van die ouervirus en die oordragvektor in insekselle gekotransfekteer is, is sellulêre ensieme verantwoordelik vir rekombinasiegebeure en d.m.v. homoloë rekombinasie word die gekloneerde geen(e) gebruik om die geteikende alleel in die Baculovirusgenoom te vervang (O'Reilly *et al.*, 1992). Dit gee aanleiding tot die ontstaan van rekombinante virusse met die gekloneerde geen(e) wat 'n nie-essensiële geen in die virus vervang het. Hierdie rekombinante nageslag kan dan met normale weefselkultuurtegnieke in die gasheer insekselle vermeerder word.

Die Baculovirus-uitdrukkingstelsel het verskeie eienskappe wat dit geskik maak vir die uitdrukking van heteroloë gene:

- Die gene kom tot uitdrukking in 'n eukariotiese stelsel met al die nodige post-translasionele modifikasies.
- Hoë vlakke van uitdrukking van rekombinante proteïene word gewoonlik verkry waar van hierdie stelsel gebruik gemaak word, tot soveel as 600 mg/L (Maiorella *et al.*, 1988).
- Omdat uitdrukking onder beheer is van 'n baie laat promotor, kom die heteroloë geen ook laat, tydens die okklusiefase, tot uitdrukking. Die teenwoordigheid van vreemde proteïene sal dus 'n minimale effek hê op normale repliseringsgebeure en sal nie op dié wyse die replisering van die rekombinante virus inhibeer nie.
- Proteïene wat hittelabel is en oneffektief in soogdierselsisteme by 37°C uitgedruk word, kan meer suksesvol by 27°C uitgedruk word.
- Groot DNA-invoegings van tot 15kb is al in hierdie stelsel uitgedruk.
- Die uitdrukking van baie laat gene in die Baculovirus, o.a. die polihedriengeen, gaan nie gepaard met splytlassing nie en cDNA kan geredelik uitgedruk word.
- Die Baculovirus-stelsel is 'n eenvoudige stelsel om mee te werk en die AcNPV-virus is helper onafhanklik (O'Reilly *et al.*, 1992).

In hierdie hoofstuk word beskryf hoe te werk gegaan is om die gekloneerde gene preS1, preS2 en S, (Hoofstuk 3) van die hepatitis B-virus in die Baculovirus/inseksel stelsel uit te druk. Kortliks kan die stappe wat gevolg is opgesom word as: 1) Kotransfeksie van wilde tipe AcNPV genomiese DNA en die betrokke oordragvektor in insekselkulture; 2) Isolering en suiwering deur middel van plaaksuiweringstegniek van

die AcNPV-klone wat die rekombinante genotipe vertoon; 3) Infektering van Sf 21-monolae met rekombinate virus vir proteïenanalises; 4) Vergelyking van die hoeveelheid HBsAg geproduseer deur die verskillende klone met behulp van ELISA; 5) Gebruik van geselekteerde klone om rekombinante proteïene uit te druk in Sf 21-selmonolae; 6) Analise van proteïenmonsters deur elektroforese op denaturende poliakriëlamiedgelle.

4.2 Metodes

4.2.1 Kweking van Sf 21-selkulture.

Spodoptera frugiperda (Sf 21) insekselle is gekweek as monolaagkulture in Grace se insekmedium wat aangevul is met gishidrolisaat (3.3g/L) en laktalbumienhidrolisaat (3.3g/L) (Highveld Biologicals), verder na verwys as insekmedium. Met die byvoeging van 7%(v/v) fetale kalfserum (Highveld Biological), is die medium voltooi om volledige insekmedium te gee. Alle inkubasiestappe, tensy by kamertemperatuur, is uitgevoer in 'n inkubator by 27°C in atmosferiese lug. Subkulture is verkry deur monolae wat volgroei was met 'n pipet los te spoel van die oppervlak van die weefselkultuurfles en die selle te verdeel in nuwe flesse. Wanneer dit nodig was om die selle te tel, is 'n geskikte verdunning van die selsuspensie in 'n 1:1 verhouding gemeng met 0.4%(m/v) tripaanblou kleurstof en vir 5 min. by kamertemperatuur gelaat. Seltellings is gedoen onder 40 x vergroting van 'n ligmikroskoop met behulp van 'n standaard hemositometer.

4.2.2 Bereiding van rekombinante AcNPV-klone

4.2.2.1 Kotransfeksie van Sf 21-weefselkulture

Geliniariseerde wilde tipe AcNPV-DNA (Ivitrogen Inc.) is gebruik saam met die oordragvektore pHBsBac3, -4, of -5 waarin die betrokke HBV-gene gekloneer is (Afdeling 3.4.1 en 3.4.2), om Sf 21- weefselkulture te kotransfekteer. Geliniariseerde

DNA is gebruik omdat waargeneem is dat dit na kotransfeksie 'n hoër verhouding van rekombinante virusse tot wilde tipe virusse in die nageslag tot gevolg het (Kitts *et al.*, 1990).

Kotransfektering is uitgevoer volgens die metode wat beskryf is deur O'Reilly (1992) vir die kotransfektering van insekweefselkulture deur lipofeksie. Sf 21-selle is geplaas teen 'n digtheid van 8×10^5 selle per plaat in 60mm-weefselkultuurplate in 5ml medium en vir 4 ure geïnkubeer om te heg aan die weefselkultuurplaat. Een mikrogram wilde tipe AcNPV-DNA is saam met 4 mikrogram van die betrokke oordragvektor in 1.5 ml medium gemeng terwyl 30 μ l van die liposoomsuspensie ook met 1.5 ml serumvrye medium gemeng is in 'n polistireenbuis. Die twee oplossings is bymekaar gevoeg en gemeng waarna dit versigtig oor die sellae versprei is. Drie 60mm-kultuurplate is gebruik vir kotransfeksie met elke oordragvektor. Na vier ure van inkubasie by kamertemperatuur is die DNA/liposoommengsel afgetrek en vervang met 2 ml volledige insekmedium en die kulture is geïnkubeer. Na vyf dae is die selkulture aan 'n vinnige siklus van bevriesing by -70°C en ontdooiing by 37°C blootgestel om sodoende die vrystelling van die virusnageslag uit die selle te verhoog. Die weefselkultuur-supernatant is afgetrek en aan sentrifugering vir 5 minute by $1\ 000 \times g$ onderwerp om alle selreste te presipiteer. Hierdie supernatante is vir die isolasie van rekombinante AcNPV-klone gebruik.

4.2.2.2 Isolering van rekombinante AcNPV-klone

Virusklone is geïsoleer deur die plaaksuiweringstegniek toe te pas in inkselmonolae. Die protokol wat gevolg is (O'Reilly *et al.*, 1992) is 'n modifisering van die metode wat ontwikkel is vir gebruik met die Baculovirussisteem deur Lee en Miller (1978).

Voordat die isolering van klone begin is, is die titer van die virus in die voorafbereide supernatant bepaal deur middel van plaakessaiëring. Sf 21-selle in die logaritmiëse groeifase (24 uur na passasie) is in 60mm-weefselkultuurplate geplaas teen 'n digtheid van 2×10^6 selle per plaat en vir 4 ure geïnkubeer sodat die selle aan die oppervlak van die plaat kan heg. Om spoedige selhegting te bevorder is medium sonder serum

gebruik (O'Reilly *et al.*, 1992). Die medium is hierna afgetrek van die sellae en onderskeidelik vervang met 500µl hoeveelhede van 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} en 10^{-7} -verdunnings van die supernatant. Na een uur inkubasie by kamertemperatuur met ligte roering is die supernatant verwyder en vervang met 4 ml van 'n steriele 0.5% agarose-oplossing wat by 45°C gehou is. Die agarose (Seaplaque, FMC) is vooraf berei tot 5% in ddH₂O en ge-outoklafeer waarna dit 10 maal verdun is met voorafverhitte volledige insekmedium. Nadat die agarose gestol het, is die kulture by 27°C geïnkubeer.

Sodra plake in die selmonolae verskyn het, gewoonlik na 3 - 6 dae p.i., is daar 'n soortgelyke agarose-oplossing opgemaak waarby die kleurstof neutraalrooi (50 µg/ml) gevoeg is en dit bo-oor die vorige agaroselaag gegiet is. Die kulture is oornag geïnkubeer en ondersoek onder 'n disseksiemikroskoop. Plake het duidelik vertoon as helder sones in die selmonolaag wat rooi vertoon het a.g.v die teenwoordigheid van die kleurstof wat slegs lewende selle kleur. Die titer van die AcNPV is bepaal vanuit die gemiddelde tellings van die aantal plake wat verkry is vir die verskillende verdunnings.

Om die rekombinante AcNPV-klone te isoleer, is plaak-essaiëring weer gebruik soos hierbo beskryf vir titerbepaling, maar met die enigste uitsondering die weglating van die laag agarose met neutraalrooi. Die virusbevattende supernatant is verdun totdat daar ongeveer 200 plaakvormende eenhede per milliliter teenwoordig was en 500µl hiervan is gebruik vir die infeksie van die selmonolae (100 pfu per 2×10^6 selle). Omdat die isolering van rekombinante virusklone gebaseer was op die uitdrukking van die *lacZ*-geen, is die agarose opgemaak met 120 µg/ml X-gal. Gevolglik sal die uitgedukte β-galaktosidase-ensiem 'n blou kleurverandering van die X-gal in die oorliggende agar tot gevolg hê.

Na inkubasie van ongeveer 3 - 6 dae is plake met 'n blou kleur in die oorliggende agarose gekies as moontlike rekombinante en met behulp van 'n steriele pasteurpipet is 'n agaroseprop, wat van die viruspartikels bevat het, van die plake afgetrek en in 1ml insekmedium geplaas. Die medium is vinnig gemeng met 'n vorteksmasjien om die viruspartikels uit die agarose vry te stel. Van die virusklone wat op die wyse geïsoleer is, is 10^{-2} en 10^{-3} -verdunnings gemaak wat weer gebruik is vir plaaksuiwerings. Die proses is vir nog drie rondtes herhaal om te verryk vir suiwer rekombinante virusklone.

4.2.2.3 Opskaling van rekombinante AcNPV-klone

Die virusklone is vermeerder in 35mm-weefselkultuurplate met 10^6 selle elk in 2ml insekmedium. Vyfhonderd mikroliter van die geïsoleerde virusklone, gesuspendeer in insekmedium, is oor die selle versprei en vir een uur by kamertemperatuur gelaat. Hierna is 2 ml volledige medium by elke plaat gevoeg en die selkultuur is by 27°C geïnkubeer. Die weefselkultuursupernatant is na 4 dae afgetrek, gesentrifugeer vir 5 minute teen $1\ 000 \times g$ en in 1ml hoeveelhede verdeel om by 4°C gebêre te word. Van hierdie supernatante is gebruik as bron van rekombinante AcNPV vir die infeksie van Sf21- weefselkulture.

4.2.3 Uitdrukkingsanalises

4.2.3.1 Infeksie van Sf 21-selkulture

Nadat die titer van die opgeskaalde virusklone bepaal is soos beskryf in Afdeling 4.3.2, is dit verdun in insekmedium tot ongeveer 4×10^7 plaakvormende eenhede/ml. Selmonolae (1×10^6 selle per 35mm-weefselkultuurfles) is geïnfekteer met 0.5ml van hierdie suspensie en vir 4 uur by kamertemperatuur liggies geroer. Die kulture is aangevul met 1.5 ml volledige medium en vir 72 uur geïnkubeer waarna proteïenanalises gedoen is.

4.2.3.2 Kwantifisering van proteïenuitdrukking met ELISA

Aangesien die gene wat in die oordragvektore gekloneer is die HBV-gene is wat kodeer vir die mantelproteïene van die virus, is verwag dat die uitgedrukte rekombinante proteïene ook die HBsAg sal bevat. Dit was dus moontlik om met behulp van 'n kommersiële ELISA-sisteem "Monolisa ag HBS" (Sanofi) die uitdrukking van rekombinante proteïene te kwantifiseer en sodoende rekombinante AcNPV-klone wat hoë uitdrukking deur Sf21-selle lewer, te identifiseer.

Aparte analyses is uitgevoer op die selkultuursupernatante en op 'n lisaat van die geïnfekteerde inekselle. Die supernatante is van die kulture afgetrek en by -70°C gestoor. Soos beskryf (Afdeling 1.4), is die antigenisiteit van die proteïene wat die oppervlakantigeen uitmaak afhanklik van die sekondêre struktuur daarvan. Om te verhoed dat die antigenisiteit van die rekombinante proteïene verlore gaan deur moontlike denaturasie, is die selle nie met enige detergens geliseer nie, maar slegs aan 'n vries-ontdooi siklus onderwerp. Die lisaat is hierna deur 'n spuitnaald gespuit waarna dit gesentrifugeer is teen $10\,000 \times g$ om alle selreste te verwyder. Die bostand van hierdie stap is verder geanaliseer as die sellisaat. Die metode wat deur die vervaardigers verskaf is, is gevolg om $100\mu\text{l}$ hoeveelhede van die kultuur-supernatante en sellisate te analiseer met die ELISA-sisteem.

4.2.3.3 SDS-Poliakrielamiedgelelektroforese

Rekombinante AcNPV-klone is op grond van die voorafgaande ELISA-bepalings geselekteer vir hoë HBsAg-uitdrukking en gebruik om 25 cm^2 -weefselkultuurflesse, elk met ongeveer 2.5×10^6 selle, te infekteer met 1.5 ml van die verdunde virussuspensie (4×10^7 pfu/ml). Na 4 uur inkubasie by kamertemperatuur is die weefselkultuur aangevul met 1.5 ml volledige insekmedium en by 27°C geïnkubeer.

Na 72 uur is die selkulture in die teenwoordigheid van die weefselkultuursupernatant aan lisering onderwerp. Om alle rekombinante proteïene wat moontlik in interne membrane in die selle vasgevang was, ook vry te stel, is lisering uitgevoer met $50\mu\text{l}$ van 'n SDS-buffer (0.2%(v/v)SDS, 62.5mM Tris-HCl pH 6.7) in die weefselkultuurflesse waarby verskillende protease-inhibeerders vooraf gevoeg is (PMSF $100\mu\text{g/ml}$; pepstatien A $1\mu\text{g/ml}$; leupeptien $0.5\mu\text{g/ml}$). Vir gelelektroforese is die sekondêre struktuur van die proteïene nie van belang nie en detergens kon gebruik word vir lisering. Die lisaat is onderwerp aan sentrifugering en die supernatant van hierdie stap is gebruik vir elektroforese op denaturerende poliakrielamiedgelle.

Die monsters en gelle is voorberei soos beskryf (Sambrook *et al.*, 1989 en O'Reilly *et al.*, 1992) volgens die metode van Laemmli (1970). 10% SDS-bevattende poliakriel-

amiedgelle van 70mm x 80mm is gebruik om 20µl van die gedensureerde monsters teen 'n spanning van 90 V te elektroforeer.

4.2.3.4 Affiniteitschromatografie van His₆-fusieproteïene

Die proteïene wat deur die inekselle uitgedruk is, behoort elkeen die (His₆)-merkers aan die aminotermus te hê. Isolering van die proteïene is uitgevoer met behulp van 'n kolom wat 1ml van 'n Ni-NTA hars (Qiagen) bevat het. Die protokol is gevolg soos beskryf deur die vervaardigers van die Xpress-System Baculovirus uitdrukkingstelsel (Invitrogen, 1994) en die vervaardigers van die Ni-NTA agarose-hars wat in die kolom gebruik is (Henco, 1991).

Tien milliliter van die onderskeie monsters (in 8M ureum) is in 5ml hoeveelhede op die kolom gevoeg. Sellulêre proteïene is van die kolom afgewas waarna enige gebonde proteïene van die kolom geëlueer is met 8ml hoeveelhede van buffers wat uit 'n konsentrasiereeks van imidasool (20mM, 50mM, 100mM en 200mM) bestaan het. Fraksies van ongeveer 1ml is versamel en met 'n spektrofotometer by 280nm geanaliseer. Die fraksies met die hoogste absorpsiewaardes is telkens gepeel en met verdamping onder vakuum gekonsentreer tot ongeveer 300 µl. Hierdie monsters is aan SDS-poliakriëlamied-gelelektroforese onderwerp.

4.3 Resultate

4.3.1 Kotransfeksie met wilde tipe AcNPV en pBlueBac His-vektore

Na kotransfeksie en inkubasie is verskeie plake wat blou vertoon het in teenstelling met die oormaat kleurlose plake, in die selmonolae waargeneem. Omdat die beskikbaarheid van die liniêre wilde-tipe AcNPV-DNA beperk was, is die kotransfeksie met elke oordragvektor slegs op drie kulture (60mm-weefselkultuurplate met 8×10^5 selle elk) uitgevoer. Die grootste hoeveelhede rekombinante plake het voorgekom waar die

oordragvektore pHBsBac4 en pHBsBac5 gebruik is. Tabel 4.1 gee 'n opsomming van die aantal plake wat na elke kotransfeksie waargeneem is.

Tabel 4.1 Die aantal rekombinante plake verkry in Sf 21-selmonolae na een rondte van kotransfeksie met drie verskillende Baculovirus-oordragvektore.

pHBsBac3			Totaal	Gemiddeld
3 / 10	0 / 13	2 / 14	5	1.7
pHBsBac4				
4 / 24	6 / 38	9 / 32	19	6.3
pHBsBac5				
7 / 33	4 / 11	0 / 11	11	3.7

Die waardes in die tabel verwys na die aantal plake wat die rekombinante fenotipe vertoon het teenoor die totale aantal plake wat in die monolaag voorgekom het.

Dit was nie moontlik om al die plake vanuit die agarose te verwyder nie en die totale aantal voorlopige rekombinante AcNPV-kclone wat verder gebruik is, was minder as die totale wat in Tabel 4.1 gegee word. Hierdie voorlopige rekombinante AcNPV-kclone is verder in Sf 21-selkulture gesuiwer deur drie rondtes van plaaksuiwering en opgeskaal soos beskryf (Afdeling 4.3.2 en 4.3.3). Die resultaat hiervan was 'n groot hoeveelheid rekombinante AcNPV-kclone wat verder met 'n ELISA-sisteem geanaliseer kon word om uitdrukking van die HBsAg te bevestig.

4.3.2 ELISA-bepalings van uitgedrukte rekombinante HBsAg

Nadat die prosedure gevolg is soos beskryf deur die vervaardiger van die ELISA-sisteem, is die absorpsiewaardes van die verskillende monsters (Afdeling 4.4.2) gemeet. Die waardes is gebruik om met behulp van 'n standaard verdunningsreeks van HBsAg die hoeveelheid rekombinante HBsAg deur verskillende kclone geproduseer met mekaar te vergelyk. Vir hierdie rede is die waardes bereken as die hoeveelheid HBsAg uitgedruk per mg totale proteïene in elk van die selkulture wat met verskillende rekombinante AcNPV-kclone geïnfekteer is.

Die ELISA-waardes is soos volg verwerk:

$$\text{Hoeveelheid rekombinante HBsAg} = \frac{\text{HBsAg soos bepaal vanaf standaardkurve (ng)}}{\text{Totale hoeveelheid proteïene in monster (mg)}}$$

In Tabela 4.2, 4.3 en 4.4 word van die hoogste waardes wat verkry is met elke oordragvektor, opgesom.

Tabel 4.2 ELISA-gebaseerde kwantifisering van HBsAg* uitgedruk deur infeksie van Sf 21-selkulture met verskillende rekombinante AcNPV-klone wat die hepatitis B-virus S-geen bevat.

Oordragvektor/ Kloonnommer	ng HBsAg / mg Totale proteïene (Media)	ng HBsAg / mg Totale proteïene (Sellisaat)	Totaal
pHBsBac5			
1	178	653	831
2	154	543	697
3	133	511	644
4	206	528	734
5	145	323	468
6	87	471	558
7	163	469	632
8	95	218	313
9	88	648	736
10	101	398	499

Die gemiddelde waarde wat deur Strydom (1993) verkry was, is: 1096ng/mg Totale proteïene.

Tabel 4.3 ELISA-gebaseerde kwantifisering van HBsAg* uitgedruk deur infeksie van Sf 21-selkulture met verskillende rekombinante AcNPV-klone wat die hepatitis B-virus preS2 en S-gene bevat.

Oordragvektor/ Kloonnommer	ng HBsAg / mg Totale proteïene (Media)	ng HBsAg / mg Totale proteïene (Sellisaat)	Totaal
pHBsBac4			
1	298	840	1138
2	311	578	889
3	245	987	1232
4	253	545	798
5	147	633	780
6	264	358	622
7	283	342	625
8	375	741	1116
9	279	851	1130
10	188	587	775

Die gemiddelde waarde wat deur Strydom (1993) verkry was, is: 937ng/mg Totale proteïene.

Tabel 4.4 ELISA-gebaseerde kwantifisering van HBsAg* uitgedruk deur infeksie van Sf 21-selkulture met verskillende rekombinante AcNPV-kclone wat die hepatitis B-virus preS1, preS2 en S-gene bevat.

Oordragvektor/ Kloonnommer	ng HBsAg / mg Totale proteïene (Media)	ng HBsAg / mg Totale proteïene (Sellisaat)	Totaal
pHBsBac3			
1	44	607	651
2	56	599	655
3	96	969	1065
4	66	932	998
5	54	504	558
6	102	832	934
7	45	973	1018
8	75	778	853
9	65	611	676
10	49	468	517

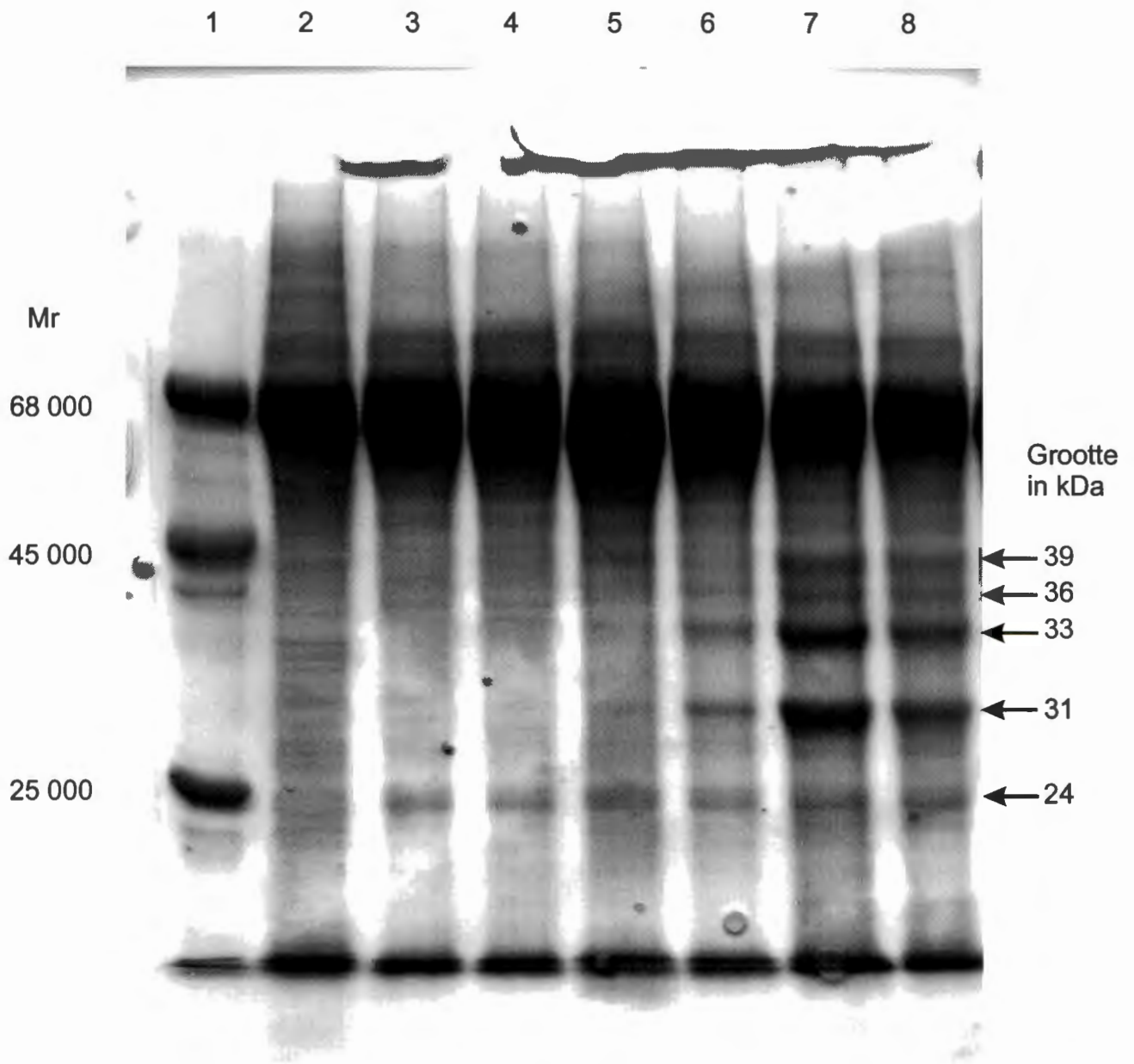
Die gemiddelde waarde wat deur Strydom (1993) verkry was, is: 537ng/mg Totale roteïene.

* Kwantifisering van die HBsAg-draende proteïene is gedoen met behulp van 'n standaardreeks wat opgemaak is uit verdunnings van 'n 105 ng/ml HBsAg-oplossing wat verkry is vanaf die Natalse Immunologiese Instituut. Die hoeveelheid sellulêre proteïene is spektrofotometries bepaal met behulp van die "Bicinchoninic acid protein assay kit" (Sigma).

4.3.3 SDS-poliakrielamiedgelelektroforese

Die monsters is na voorbereiding saam met proteïen grootte-standaarde op 'n 10% SDS-bevattende poliakrielamiedgel gelaai en is na elektroforese aan kleuring met Coomassie-briljantblou kleurstof onderwerp. Van die monsters wat geanaliseer is, het duidelike bande getoon by groottes wat ooreenstem met dit wat verwag word vir die drie verskillende hepatitis B-virus mantelproteïene (Figuur 4.2). Monsters wat verteenwoordigend is van die uitdrukking van die drie verskillende transfeksies (pHBsBac3, pHBsBac4 en pHBsBac5) is op een gel ge-elektroforeer.

In die gel wat in Figuur 4.2 afgebeeld word, bevat baan 1 die groottestandaarde soos aangedui en baan 2 die sellisaat van 'n Sf 21- kultuur wat geïnfecteer was met 'n rekombinante kloon wat slegs die *lac-z*-geen bevat in plek van die *polh*-geen en as kontrole verskaf is deur die vervaardigers van die uitdrukkingstelsel.



Figuur 4.2 Denaturerende gelelektroforese van sellisate van Sf 21-selkulture wat met rekombinante AcNPV geïnfecteer was. Baan 2 bevat 'n monster van 'n kultuur wat met wilde tipe AcNPV geïnfecteer is. Bane 3 en 4 verteenwoordig die pHBsBac5 rekombinant, bane 5 en 6 die pHBsBac4 rekombinant en bane 7 en 8 die pHBsBac3 rekombinante AcNPV-klone. Aan die regterkant dui pyltjies die proteïenbande van belang aan.

In bane 3 en 4 (Figuur 4.2) kom bande voor met 'n benaderde grootte van 24 kDa wat ooreenstem met dié van die ongeglykosileerde vorm van die hoofmantelproteïen van die

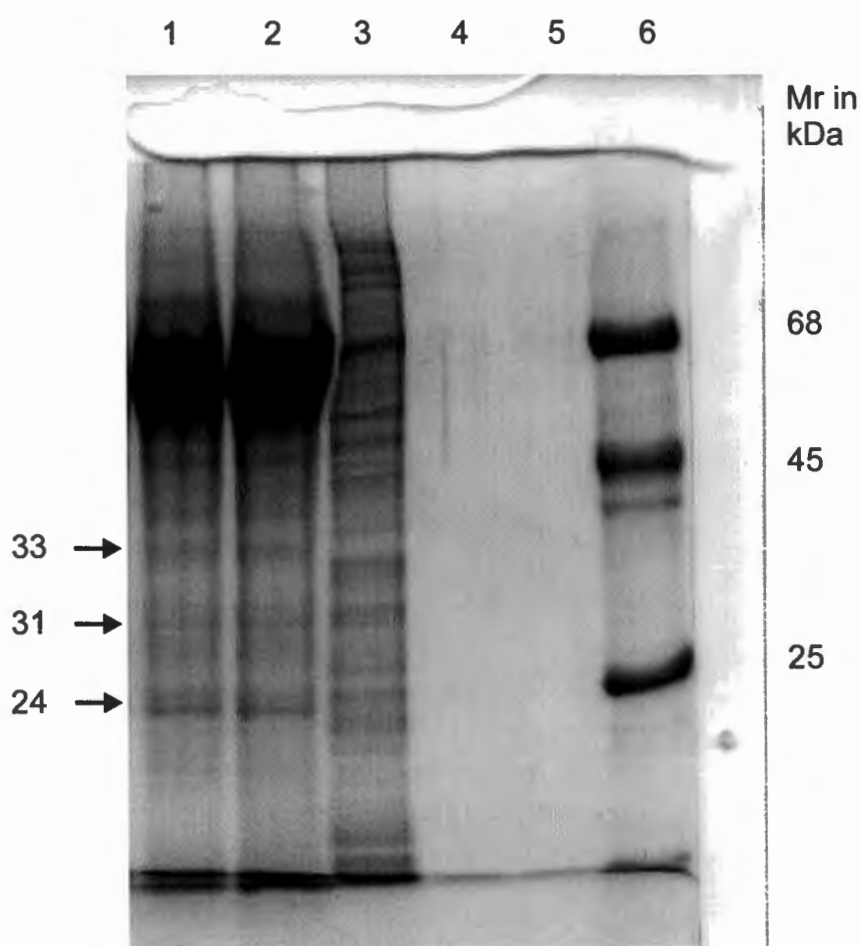
hepatitis B-virus, die produk van S-geenuitdrukking. Geen proteïene was by 'n grootte van 27 kDa, die grootte van die geglikosileerde hoofmantelproteïene, sigbaar nie.

In bane 5 en 6 (Figuur 4.2) het drie bande van belang voorgekom: Die eerste twee was afkomstig vanaf die uitdrukking van die aaneenlopende preS2- en S-oopleesrame en is proteïene met onderskeidelike groottes van 31 kDa en 33 kDa. Hierdie groottes stem ooreen met die van die geglikosileerde en ongeglikosileerde vorme van die middel mantelproteïene (Afdeling 1.4). Die ander proteïene van belang is dié met 'n berekende grootte van ongeveer 24 kDa en word geproduseer as gevolg van transkripsie van slegs die S-geen. 'n Baie dowwe band is ook sigbaar by 'n posisie van 36 kDa. Hierdie is 'n baie klein hoeveelheid proteïene wat ooreenstem in grootte met die mees geglikosileerde vorm van die middel mantelproteïene van die hepatitis B-virus.

Bane 7 en 8 (Figuur 4.2) bevat monsters afkomstig van infeksie met rekombinante AcNPV-klone wat berei is met die oordragvektor wat aldrie die mantelproteïengene nl. preS1, preS2 en S bevat. Uitdrukking van hierdie gene het gelei tot die produksie van 24, 31, 33 en 36 kDa proteïene. Proteïene met groottes van 33 en 31 kDa was baie prominent en stem ooreen met die twee glikovorme van die proteïene wat gevorm word na preS2- en S-translering. Die 24 kDa hoofmantelproteïene is ook sigbaar in beide bane 7 en 8. Die resolusie van die gel was 'n beperkende faktor in die bepaling van die grootte van die proteïene en die grootte van die proteïene by die posisie van ongeveer 39 kDa kan nie presies vasgestel word nie, maar dit kan met redelike sekerheid aangeneem word dat dit die ongeglikosileerde groot mantelproteïene van die hepatitis B-virus is. In hierdie geval was die geglikosileerde vorm van hierdie proteïene met 'n grootte van 42 kDa ook nie sigbaar nie. Dit is hier belangrik om daarop te wys dat die waardes wat verkry is in Tabela 4.2 - 4.4 nie sal korreleer met die hoeveelheid proteïene soos dit voorkom in die proteïengel nie aangesien die waardes bereken is per hoeveelheid totale proteïene en die groottes van die selkulture wat gebruik is vir die analyses op die SDS-poliakriel-amiedgelle verskil het.

4.3.4 Affiniteitschromatografie van His₆-fusieproteïene

Nadat verskillende fraksies vanuit die affiniteitskolom versamel en gekonsentreer is, is dit saam met 'n kontrolemonster en totale sellisate van kulture wat met rekombinante AcNPV-klone geïnfekteer was, op 'n 10% SDS-poliakrielamiedgel geëlektroforeer om 'n vergelyking te tref tussen die totale proteïene en die geïsoleerde hepatitis B-virus mantelproteïene. Aangesien dit moontlik is dat sommige histidienryke sellulêre proteïene ook aan die Ni-NTA kolom kan bind, was 'n kontrole, in hierdie geval 'n lisaat van ongeïnfekteerde Sf 21-selle, ook geanaliseer (Baan 3, Figuur 4.3).



Figuur 4.3 SDS-poliakrielamiedgelektroforese van proteïenmonsters voor en nadat Ni-NTA affiniteitschromatografie uitgevoer is. Bane 1 en 2 bevat monsters waarin die rekombinante proteïene, aangedui met die pyltjies by groottes 33, 31 en 24 kDa, voorkom. Geen proteïene kom voor in bane 4 en 5 na eluering van die kolom met die imidasoolbuffers nie. Baan 3 bevat die lisaat van die kontrole Sf 21- kultuur soos beskryf in Afdeling 4.5.4. Baan 6 bevat proteïenstandaarde met massas soos aangedui.

In die bane wat slegs van die rekombinante His₆-gemerkte proteïene verwag is, bane 4 en 5, is geen betekenisvolle proteïenbande waargeneem nie (Figuur 4.3), terwyl bane 1 en 2 duidelike bande bevat met groottes van 24, 31 en 33 kDa, wat ooreenstem met die groottes van die middel- en hoofmantelproteïene van die hepatitis B-virus.

4.4 Samevatting

Rekombinate AcNPV-klone is berei deur gebruik te maak van rekombinasiegebeure in die Sf 21-gasheerselle nadat wilde tipe AcNPV genomiese-DNA en drie verskillende oordragplasmiede gebruik is vir kotransfeksie van die Sf 21-selle. Met die hulp van 'n kommersiële ELISA-toetsstelsel is vasgestel watter van die klone wat geselekteer is op grond van blou/wit seleksie, die hoogste uitdrukking van rekombinante HBsAg in die inkselle tot gevolg gehad het.

Nadat geselekteerde klone gebruik is om Sf 21-selkulture te infekteer, is monsters van sellisate op SDS-poliakriëlamiedgelle geëlektroforeer. Infeksie met aldrie pHBsBac-klon afgeleide AcNPV-klone het proteïene gelever wat in grootte ooreenstem met die van die hepatitis B-virus mantelproteïene.

Die resultate wat waargeneem is, word opgesom:

- 1 Die vlakke van HBsAg produksie is effens laer as wat voorheen in hierdie laboratorium verkry is deur gebruik te maak van 'n Baculovirus/inseksel-uitdrukkingsstelsel (Strydom, 1993).
- 2 Die hoeveelheid rekombinante HBsAg wat uitgeskei was in die medium was minder as die wat vrygestel is na lisering van die selle deur bevriesing en ontdooiing. Hierdie verskynsel was veral merkbaar in die geval van die groot mantelproteïen.

- 3.1 Infeksie met die geselekteerde rekombinante AcNPV-klone, het in al drie gevalle gelei tot die uitdrukking van rekombinante proteïene wat in grootte ooreenstem met wilde tipe hepatitis B-virus mantelproteïene.
- 3.2 Uitdrukking van die S-geen het slegs gelei tot die produksie van die ongeglykosileerde hoof mantelproteïen met 'n grootte van 24 kDa. Uitdrukking van die preS1-preS2-S-leesraam het ook gelei tot 'n proteïen met 'n grootte in die omgewing van 39 kDa en geen proteïen van 42 kDa was sigbaar nie. In die geval van die translasie van die preS2-S-leesraam, die middel mantelproteïen, was daar egter aanduidings van proteïene met groottes van al drie die glikovorme nl. 31, 33 en 36 kDa.
- 3.3 Waar die verskillende glikovorme van die mantelproteïene geproduseer was, was dit opmerklik dat die hoeveelheid proteïene gevorm, soos afgelei van die elektroforesegel, meer was in die geval van die ongeglykosileerde vorm as in die van die geglykosileerde vorme.
- 4 Waar die selkulture geïnfekteer was met AcNPV-klone wat die groter ooplesrame bevat het (pre-S2-S en preS1-preS2-S), is afsonderlike uitdrukking van die S-geen en preS2-S-gene ook waargeneem. Dit wil sê in die geval van die preS2-S ooplesraam is beide die hoof- en middelmantelproteïene gevorm en in die geval van die preS1-preS2-S ooplesraam is die hoof-, middel- en groot mantelproteïene gevorm.
- 5 Volgens Figuur 4.2 is dit duidelik dat die uitdrukking van die preS2-S gebied sterker was waar die preS1-gebied ook teenwoordig was, bane 7 en 8, as wanneer slegs die preS2-S-gene teenwoordig was.
- 6 As gevolg van 'n onbekende rede kon geen van die rekombinante proteïene gesuiwer word deur gebruik te maak van die Ni-NTA kolom materiaal nie. Na eluering met die imidasoolbufferreeks was geen proteïene waarneembaar op SDS-poliakriëlamiedgelle nie.

HOOFTUK 5

BESPREKING

5.1 Inleiding

In Hoofstuk twee is die suksesvolle gebruik van rekombinante HBsAg as 'n entstof teen hepatitis B-virus infeksie breedvoerig bespreek. Die hoofdoelstelling van hierdie projek was die daarstelling van 'n sisteem vir die stabiele produksie van HBsAg-bevattende proteïene wat moontlik later getoets kon word vir gebruik as 'n vaksine teen hepatitis B-virus infeksie. Die eerste onderafdeling van die projek wat hier beskryf is, was die bepaling van die geskiktheid van 'n nuwe kankersellyn, UWOV2(Sf), vir transfeksie met en uitdrukking van die hepatitis B-virus oppervlakantigeeneen. Nadat dit gevind is dat hierdie sellyn nie vir hierdie doel geskik was nie, is die projek gewysig na die voortsetting van 'n vorige studie in hierdie laboratorium, nl. die uitdrukking van die hepatitis B-virus mantelproteïene in 'n Baculovirus / inkselsisteem.

5.2 Evaluering van die UWOV2 (Sf)-sellyn

UWOV2(Sf)-weefselkulture, wat die vermoë het om in 'n serumvrye, chemies gedefinieerde medium voort te bestaan (Golombick *et al.*, 1990), is getoets vir transfekteerbaarheid met die standaardtegnieke van kalsiumfosfaat/DNA-kopresipitering en lipofeksie. Geen data van vorige pogings om hierdie sellyn te gebruik in enige transfeksie-eksperiment was beskikbaar nie aangesien die sellyn slegs 'n kort tyd voor die aanvang van hierdie projek gevestig is. Die enigste toetse wat op die sellyn uitgevoer was, was studies van die morfologie van die selle, kariatiperings en die gebruik van verskillende media met en sonder serum waartydens die sublyn gevestig is waarmee in hierdie studie gewerk is (Golombick *et al.*, 1990).

'n Tegniek wat ontwikkel is deur Graham en Van der Eb (1973), naamlik die transfeksie van soogdierselle deur gebruik te maak van 'n kalsiumfosfaatpresipitaat waarin eksogene DNA vasgevang is, is vergelyk met lipofeksie waartydens DNA wat

deur 'n liposoom omvou word aan die sitoplasma oorgedra word (Felgner *et al.*, 1987). Na beide kalsiumfosfaatgemedieerde transfeksie (Afdeling 2.2.2.2) en lipofeksie (Afdeling 2.2.2.3) was daar selle wat, in teenstelling met dié in die kontroleselle, oorleef het nadat seleksie toegepas is. Pogings om die foki van oorlewende selle te vermeerder was egter onsuksesvol en geen analyses ten opsigte van die teenwoordigheid van DNA, mRNA of proteïene kon uitgevoer word nie.

Op grond van die feit dat sekere UWOV2(Sf)-selle die seleksiestappe met G418 oorleef het (Afdelings 2.2.2.2 en 2.2.2.3), kan daar aangeneem word dat hierdie selle wel die *neo*-geen, afkomstig van die plasmied waarmee die transfeksie uitgevoer is, bevat en uitgedruk het. Daar kon egter nie eksperimenteel aangetoon word dat hierdie sellyn wel die plasmied DNA opgeneem het of enige rekombinante hepatitis B-proteïene geproduseer het nie. Die UWOV2(Sf)-sellyn is daarom nie verder in hierdie studie gebruik nie.

Dit is moeilik om te verklaar hoekom hierdie selle, nadat dit klaarblyklik getransfekteer was met die plasmiedvektor, afgesterf het. Een verklaring wat aangebied kan word, is die moontlikheid dat die vektor, wat ook die hepatitis B-virus S-geen bevat het, oorsprong gegee het tot die sintese van proteïene wat die selle nadelig beïnvloed het. Uit die literatuur is dit bekend dat die hepatitis B-virus mantelproteïene in die endoplasmiese retikulum van die gasheersel kan vassit en sodoende lei tot selbeskadiging (Chisari *et al.*, 1987).

'n Ander rede wat meer waarskynlik is en ook kan lei tot inhibering van selvermeerdering, is die verskynsel dat die UWOV2(Sf)-sellyn vinniger groei en vermeerder waar groter hoeveelhede van die selle na aan mekaar groei in 'n kultuur. Uit persoonlike waarnemings is dit gevind dat selvermeerdering deur 'n sloerfase gaan nadat die kultuur verdeel en vars medium bygevoeg is. Die selvermeerdering het stadig plaasgevind in teenstelling met kulture waar monolae meer volgroei was (Afdeling 2.2.1). Dit is dus moontlik dat die hoeveelheid selle wat na seleksie in die kultuur oorgebly het te min was om die medium sodanig te kondisioneer met groei- en hegtingsfaktore dat die nodige selgroei en verdeling kon plaasvind.

Verdere studies kan moontlik gedoen word met 'n tegniek wat 'n baie hoër transfeksie-effektiwiteit het en sodoende 'n groter persentasie selle kan lewer wat seleksie oorleef.

Daar kan ook gekyk word na die gebruik van 'n ryker medium as die KSLMS-medium of 'n medium wat aangevul is met reeds gekondisioneerde medium, om selgroei aan te help tydens die beginfase van vermeerdering van geselekteerde klone.

5.3 Uitdrukking van die hepatitis B-virus mantelproteïene in 'n Baculovirus / insekstelsisteem

In die afgelope paar jaar is Baculovirus-geïnfekteerde inseksele gevestig as 'n maklik hanteerbare, helper onafhanklike eukariotiese sisteem waarin relatief groot geenprodukte effektief uitgedruk kan word. Uitdrukking van heteroloë proteïene kan met die gebruik van standaard virologiese- en selkultuurtegnieke in 'n kort tyd verkry word (Miller, 1988; Maeda, 1989; Fraser, 1992). Dit is ook bevestig dat hierdie tegniek toegepas kan word vir die uitdrukking van die mantelproteïene van die hepatitis B-virus en dat die gevormde 22nm-deeltjies struktureel ooreenstem met die 22nm-deeltjies wat voorkom tydens natuurlike infeksie (Kang *et al.*, 1987; Lanford *et al.*, 1988).

Attanasio en sy medewerkers (1991) het die immunogenisiteit van HBsAg, geproduseer in 'n inksel / baculovirus-uitdrukkingstelsiem, in muise vergelyk met dié geproduseer deur 'n gis-uitdrukkingstelsiem. Resultate het getoon dat dieselfde hoeveelheid van die inksel-geproduseerde HBsAg nodig was om 'n gelykwaardige respons in die muise te lewer as die gis-geproduseerde HBsAg.

Nadat die gekloneerde gene van die hepatitis B-virus mantelproteïene met die aktiewe HBsAg in hierdie laboratorium in hierdie sisteem uitgedruk is (Strydom, 1993), is besluit om die studie voort te sit en die uitgedrukte proteïene verder te karakteriseer ten opsigte van die grootte en hoeveelheid van die rekombinante materiaal wat uitgedruk word.

5.3.1 Konstruksie van pBlueBac His - afgeleide vektore

Drie vektore, nl. pHBsBac3, pHBsBac4 en pHBsBac5 wat onderskeidelik die geklooneerde preS1, preS2 en S-gene, die preS2 en S-gene en slegs die S-gene van die hepatitis B-virus bevat, is suksesvol gekonstrueer deur gebruik te maak van rekombinante DNA-tegnologie (Afdeling 3.4). Aldrie die vektore is gevind om die korrekte invoegings in die korrekte oriëntasie te bevat soos vasgestel deur restriksie-ensiem karakterisering.

Die vektore is op so 'n wyse gekonstrueer dat die drie verskillende hepatitis B-virus mantelproteïene apart in die Baculovirus/ insekselsisteem uitgedruk kan word, onder beheer van die sterk polihedrienpromotor afkomstig van die AcNPV (Afdelings 3.4.1 en 3.4.2). Die oordragvektor wat gekies is om die gene in te kloneer, bevat volgens aan die 5'-kant van die kloneringsgebied wat kodeer vir die uitdrukking van fusieproteïene wat ses histidien-residue aan die aminoterminus bevat. Sulke fusieproteïene kan dan geïsoleer word deur binding aan agarose kolommateriaal waaraan Ni^{+2} -ione geheg is.

5.3.2 Uitdrukking van die hepatitis B-virus mantelproteïene in Sf 21-insekselle

Soos voorheen genoem (Afdeling 5.3), is die rekombinante vorm van die hepatitis B-virus oppervlakantigeen reeds in hierdie laboratorium uitgedruk. Met DNA- en mRNA-analises is die geenkopiegetalle en die relatiewe transkripsvlakke vir hierdie sisteem bevestig en die hoeveelheid HBsAg-reaktiewe materiaal wat in die insekselle uitgedruk is, is bepaal (Strydom 1993). Die doel van die voortsetting van die uitdrukkingsanalises met His₆-gemarkte proteïene, was om eerstens vas te stel of die uitgedrukte proteïene se molekulêre massas ooreenstem met dié van die hepatitis B-virus, en tweedens om vas te stel hoe die verskillende ooplesrame uitgedruk word.

Tydens hierdie ondersoek is gevind dat die uitdrukkingsvlakke van die HBsAg deur die insekselle laer is as wat vroeër met 'n grootliks identiese sisteem in hierdie laboratorium verkry is (Strydom, 1993). Dit kan egter verwag word dat die waardes sal verskil aangesien: i) Die oordragvektore verskil het. Vektore wat 'n fusieproteïen vorm met 'n enterokinase uitkenningspunt en 6 histidienresidue aan die aminoterminus van die

rekombinante proteïen, is in hierdie geval gebruik. ii) Die weefselkulture (Sf 21-insekselle) was ongeveer 2 jaar ouer en dit is ook waarskynlik dat dit 'n invloed kon hê op die groei en vermeerdering van die selle in weefselkultuur. iii) 'n Klein aantal rekombinante AcNPV-klone is ondersoek vir uitdrukking van die HBsAg. Die feit dat 'n fusieproteïen geproduseer word, word nie as 'n moontlike rede beskou vir laer vlakke van uitdrukking nie.

Evaluering van die resultate van die ELISA-bepaling het duidelik getoon dat die hoeveelheid HBsAg-reaktiewe materiaal (rekombinante oppervlakproteïene) wat in die medium uitgeskei was, baie laag was in vergelyking met die hoeveelhede wat vrygestel was na lisering van die selkulture met 'n detergens (Afdeling 4.4.2). Dieselfde is bevind deur Lanford en medewerkers (1989) nadat eerstens die S-geen alleen en tweedens die preS-S gene uitgedruk is in insekselle deur gebruik te maak van die Baculovirus-uitdrukkingstelsel. Hulle het waargeneem dat die proteïene in die membrane van die endoplasmiese retikulum vasgesit het en slegs gedeeltelik in die lumen van die endoplasmiese retikulum uitgeskei was. In hierdie geval is die oppervlakproteïene ook vrygestel deur gebruik te maak van 'n detergens voordat dit gesuiwer kon word (Lanford *et al.*, 1989).

Na analisering van die rekombinante proteïene op SDS-poliakrielamied gelle (Afdeling 4.5.3) is waargeneem dat die proteïene wat voorheen aangetoon is om HBsAg-reaktiewe materiaal te wees (Strydom, 1993), ook in grootte ooreenstem met die mantelproteïene van die hepatitis B-virus (Afdeling 4.6). Nog 'n belangrike waarneming was dat die proteïene in verskillende glikovorme geproduseer word (Afdeling 4.5.3) soos ook bevind deur ander navorsers in soortgelyke sisteme (Kang *et al.*, 1987; Lanford *et al.*, 1988; Lanford *et al.*, 1989). Die feit dat transkripsie nie noodwendig by die eerste inisiasie-kodon begin nie en dat beide die preS2-S polipeptied en die S-polipeptied vanaf 'n preS2-S oopleesraam getransleer word, is ook in die literatuur bevestig (Scully en Kang, 1988).

Na elektroforese van die proteïene, is waargeneem dat daar in sommige gevalle baie prominente proteïenbande was wat ooreenstem met die preS2-S polipeptiede van die hepatitis B-virus, wanneer die preS1-volgorde ingesluit was in die oordragvektor (Figuur 4.2). Die rede hiervoor is waarskynlik dat die teenwoordigheid van die preS1-promotor in die preS1-gebied (Afdeling 1.5.2) die transkripsie van die daaropvolgende

preS2-S oopreesraam versterk en sodoende meer van die preS2-S polipeptied produseer as wanneer slegs die preS2- en S-gene teenwoordig is. Onlangse waarnemings deur Kim en medewerkers (1997) bevestig hierdie verskynsel van transkripsionele aktivering deur die preS1-volgordes van die hepatitis B-virus. Nadat die preS1-gebied gekoppel was aan merkergene, is dit bevind dat uitdrukking van die merkergene aansienlik verhoog is in beide giste en soogdierselle en die afleiding is gemaak dat die pre-S1-gebied, gekoppel aan die bindingsdomein van transkripsiefaktore, 'n besliste aktivering van transkripsie tot gevolg het (Kim *et al.*, 1997).

Alhoewel die proteïene nie deur affiniteitschromatografie geïsoleer kon word nie (Afdeling 4.5.4), is dit volgens elektroforese van totale sellulêre proteïene (Afdeling 4.5.3) vasgestel dat die rekombinante mantelproteïene nou ooreenstem met die groottes wat in die literatuur aangedui word vir die hepatitis B-virus mantelproteïene (Tiollais *et al.*, 1985).

Die volgende logiese stap in die bevestiging van die struktuur van die rekombinante proteïene van die hepatitis B-virus sal die elektronmikroskopiese studie van die produkte van die Sf 21-selkulture wees. Indien die uitgedrukte proteïen oor die korrekte primêre en sekondêre strukture beskik behoort die posttranslasionele aktiwiteit van die gasheer insekselle moontlik die gesogte 22 nm deeltjies tot gevolg te hê.

Om die verspreiding van hepatitis B-virusinfeksies te bekamp, word aanvaar dat 'n geskikte en effektiewe entstof uiters nodig is. Die rekombinante DNA-tegnologie het tegnieke daargestel om met behulp van verskillende soorte selkulture die immunogeniese proteïene van die hepatitis B-virus op grootskaal uit te druk en te gebruik as entstof (Afdeling 1.6.1.1). Dit het mettertyd aan die lig gekom dat die insluiting van die preS1 en preS2-gebiede in rekombinante entstowwe die immunogenisiteit daarvan aansienlik kan verhoog (Milich *et al.*, 1985a, Milich *et al.*, 1985b en Milich *et al.*, 1986). Uitdrukking van die proteïen wat gekodeer word deur die preS-gebiede in 'n rekombinante sisteem is dus 'n baie groot voordeel indien daar gepoog word om 'n hoogs immunogeniese proteïen daar te stel.

5.4 Samevatting

Samevattend kan gesê word dat die probleemstelling wat aan die begin van hierdie studie geformuleer is ten opsigte van die gebruik van 'n kankersellyn as meganisme vir die uitdrukking van rekombinante hepatitis B-virus oppervlakproteïene, beantwoord is. Alhoewel hierdie selle getransfekteer en geselekteer kon word is dit tog teleurstellend dat dit nie verder gekweek en geanaliseer kon word nie.

Die bepaling ten opsigte van die groottes van die rekombinante hepatitis B-virus mantelproteïene uitgedruk in inkselle met behulp van die Baculovirusstelsel, is ook suksesvol uitgevoer en daar is nog 'n stap verder beweeg in die bevestiging dat die HBsAg wat deur die selle uitgedruk is, na alle waarskynlikheid wel rekombinante hepatitis B-virus oppervlakantigene is.

VERWYSINGS

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. en Struhl, K. *eds.* 1989. Current protocols in molecular biology. New York, N.Y. : Wiley Interscience.
- Attanasio, R., Lanford, R.E., Dilley, D., Stunz, G.W., Notvall, L., Henderson, A.B. en Kennedy, R.C. 1991. Immunogenicity of hepatitis B virus surface antigen derived from the baculovirus expression vector system: a mouse potency study. *Biologicals*, 19(4):347-353.
- Ayoola, E.A. 1988. Viral hepatitis in Africa. (*In* Zuckerman *ed.* Viral hepatitis and liver disease. New York: Alan R. Liss Inc. p.161-169).
- Bar-Nun, S., Shneyour, Y. en Beckmann, J.S. 1983. G-418, an elongation inhibitor of 80 S ribosomes. *Biochem Biophys Acta*, 741(1):123-127.
- Beasley, R.P., Hwang, L-Y., Lin, C-C. en Chien, C-S. 1981. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. *Lancet*, ii:1129-1133.
- Bhatnagar, P.K., Papas, E., Blum, H.E., Milich, D.R., Nitecki, D., Karels, M.J. en Vyas, G.N. 1982. Immune response to synthetic analogues of hepatitis B surface antigen specific for the *a* determinant. *Proceedings of the national academy of sciences. USA*, 79:4400-4404.
- Blumberg, B.S., Alter, H.J. en Visnich, S. 1965. A "New" antigen in leukemia sera. *Journal of the American medical association*, 191:101-106.
- Bruguera, M., Cremades, M., Rodicio, J.L., Alcazar, J.M., Oliver, A., Del-Rio, G. en Esteban-Mur, R. 1989. Immunogenicity of a yeast derived hepatitis B vaccine in haemodialysis patients. *American journal of medicine*, (3A):S30-32.
- Bruss, V. en Ganem, D. 1991. The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proceedings of the national academy of sciences. USA*, 88:1059-1063.
- Butterly, L., Watkins, E. en Dienstag, J.L. 1989. Recombinant-yeast-derived hepatitis B vaccine in healthy adults: safety and two-year immunogenicity of early investigative lots of vaccine. *Journal of medical virology*, 27(2):155-159.
- Caselmann, W.H., Eisenberg, J., Hofschneider, P.H. en Koshy, R. 1989. Beta- and gamma-interferon in chronic active hepatitis B: A pilot trail of short term combination therapy. *Gastroenterology*, 96:449-455.
- Chisari, F.V., Filippi, P., McLachlan, A., Popper, H., Pinkert, C.A., Palmiter, R.D. en Brinster, R.L. 1987. Structural and pathological effects of synthesis of hepatitis B virus large polypeptide in transgenic mice. *Proceedings of the national academy of sciences, USA*, 84:6909-6913.

- Chisari, F.V., Klopchin, K., Moriyama, T., Pasquinelli, C., Dunsford, H.A., Sell, S., Pinkert, C.A., Brinster, R.L. en Palmiter, R.D. 1989a. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell*, 59:1145-1156.
- Chisari, F.V., Ferrari, C. en Mondelli, M.U. 1989b. Hepatitis B virus structure and biology. *Microbial pathogenesis*, 6:311-325.
- Couroucé-Pauty, A-M., Pal on, A. en Soulier, J.P. 1983. Distribution of HBsAg subtypes in the world. *Vox Sang*, 44:197-211.
- Coursaget, P., Bringer, L., Sarr, G., Bourdil, C., Fritzell, B., Blondeau, C., Yvonnet, B., Chiron, J.P., Jeanne, E, Guindo, S. en Diop-Mar, I. 1992. Comparative immunogenicity in children of mammalian cell-derived recombinant hepatitis B vaccine and plasma-derived hepatitis B vaccine. *Vaccine*, 10(6):379-382.
- Dane, D.S., Cameron, C.H. en Briggs, M. 1970. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*, i:695-698.
- Davis, H.L., McCluskie, M.J., Gerins, J.L. en Purcell, R.H. 1996. DNA vaccine for hepatitis B: evidence for immunogenicity in chimpanzees and comparison with other vaccines. *Proceedings of the national academy of sciences, USA*, 93:7213-7218.
- Davis, H.L., Michel, M-L. en Whalen, R.G. 1993. DNA-based immunization for hepatitis B induces continuous secretion of antigen and high levels of circulating antibody. *Human molecular genetics*, 2:1847-1851.
- Dejean, A., Bougueleret, L., Grzeschik, K.H. en Tiollais, P. 1986. Hepatitis B virus DNA integration in a sequence homologous to v-erb-A and steroid receptor genes in a hepatocellular carcinoma. *Nature*, 322(6074):70-72.
- Diot, C., Gripon, P., Rissel, M. en Gugen-Guillouzo, C. 1992. Replication of hepatitis B virus in differentiated adult rat hepatocytes transfected with cloned viral DNA. *Journal of medical virology*, 36:93-100.
- Dubois, M-F., Pourcel, C., Rousset, S., Chany, C. en Tiollais, P. 1980. Excretion of hepatitis B surface antigen particles from mouse cells transformed with cloned viral DNA. *Proceedings of the national academy of sciences USA*, 77(8):4549-4553.
- Emery, V.C. 1991. Baculovirus expression vectors: Choice of expression vector. (*In* Collins, M. *ed.* Methods in molecular biology, Vol.8: Practical molecular virology: viral vectors for gene expression. Clifton, NJ: The Humana press Inc.)
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. en Danielsen, M. 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the national academy of sciences USA*, 84:7413-7414.
- Fraser, M.J. 1992. The baculovirus-infected insect cell as a eukaryotic expression system. (*In* Muzyczka, N. *ed.* Current topics in microbiology and immunology, Vol 158: Viral expression vectors. Berlin: Springer-Verlag.)

- Fujisawa, Y., Shun'ichi, K., Van Eerd, P.M.C.A., Schellekens, H. en Kakinuma, A. 1990. Protective efficacy of a novel hepatitis B vaccine consisting of M (pre-S2 +S) protein particles (a third generation vaccine). *Vaccine*, 8:192-198.
- Ganem, D. 1991. Assembly of hepadnaviral virions and subviral particles. (*In* Mason, W.S. en Seeger, C. *eds.* Current topics in microbiology and immunology, vol. 168. Berlin: Springer-Verlag. p. 61-83).
- Ganem, D. en Varmus, H.E. 1987. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annual reviews in biochemistry*, 56:651-693.
- Goddard, J. 1988. Hepatitis B infection in the South African context. *Nursing RSA Verpleging*, 3(1):15-16.
- Golombick, T., Dansey, R., Bezwoda, W.R. en Rosendorff, J. 1990. Establishment and characterization of two new human ovarian cancer cell lines UWOV1 and UWOV2 and a subline UWOV2 (Sf) growing in serum-free conditions: growth characteristics, biochemical, and cytogenic studies. *In vitro cellular developmental biology*, 26:477-454.
- Goodarzi, G., Gross, S.C., Tewari, A. en Watabe, A. 1990. Antisense oligodeoxynucleotides inhibit the expression of the gene for hepatitis B virus surface antigen. *Journal of general virology*, 71:3021-3025.
- Gorman, C.M., Padmanabhan, R. en Howard, B.H. 1983. High efficiency DNA-mediated transformation of primate cells. *Science*, 221:551-553.
- Graham, F.L. en Van der Eb, A. J. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, 52:456-467.
- Greenberg, H.B., Pollard, R.B., Lutwick, L.I., Gregory, P.B., Robinson, W.S. en Merigan, T.C. 1976. Effect of human leukocyte interferon on hepatitis B infection in patients with chronic active hepatitis. *New England journal of medicine*, 295:517-522.
- Harrison, T.J. 1996. Current issues in the diagnosis of hepatitis B and C virus infections. *Clinical and diagnostic virology*, 5:187-190.
- Hazama, M., Takaoki, M., Ohfune, K., Hinuma, S. en Fujisawa, Y. 1989. Immunogenicity of a new type of yeast-derived hepatitis B vaccine consisting of M (pre-S2 + S) protein particles. *Vaccine*, 7(6): 567-573.
- Henco, K. 1991. The QIAexpressionist. May 1991. QIAGEN Inc. Chatsworth, CA.: DIAGEN.
- Hillerman, M.R., Buynak, E.B. en Roehm, R.R. 1975. Purified and inactivated human hepatitis B vaccine. A progress report. *American journal of medical science*, 270:401-404.
- Hirschman, S.Z., Vernace, S.J. en Schaffner, F. 1971. DNA polymerase in preparations containing Australia antigen. *Lancet i*:1099-1103.

- Hochuli, E., Döbeli, H. en Schacher, A. 1987. New metal chelate adsorbant selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *Journal of chromatography*, 411:177-184.
- Invitrogen Corporation (1994). Baculovirus protein expression system pBlueBacHis: A manual of methods for expression of polyhistidine-containing recombinant proteins using the pBlueBacHis vector system. Version 1.4. San Diego, CA.: Invitrogen Co.
- Jacyna, M.R. en Thomas, H.C. 1990 Antiviral therapy: hepatitis B. *British medical bulletin*, 46:368-382.
- Jimenez, A. en Davies, J. 1980. Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*. *Nature*, 287:869-871.
- Kakumu, S., Fuji, A., Yoshioka, K., Tahara, H., Ohtani, Y., Hirofuji, H., Murase, K. en Aoi, T. 1988. Pilot study of recombinant interleukin 2 for chronic type B hepatitis. *Hepatology*, 8(3):487-492.
- Kane, M.A. 1996. Global status of hepatitis B immunisation. *Lancet*, 348:696.
- Kang, C.Y., Bishop, D.H.L., Seo, J-S., Matsuura, Y. en Choe, M. 1987. Secretion of particles of hepatitis B surface antigen from insect cells using a Baculovirus vector. *Journal of general virology*, 68:2607-2613.
- Kaplan, P.M., Greenman, R.L., Gerin, J.L., Purcell, R.H. en Robinson, W.S. 1973. DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *Journal of virology*, 12:995-1005.
- Kim, C-M., Koike, K., Saito, I., Miyamura, T. en Gilbert, J. 1991. Hbx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature*, 351:317-320.
- Kim, H.S., Ryu, C.J. en Hong, H.J. 1997. Hepatitis B virus preS1 functions as a transcriptional activation domain. *Journal of general virology*, 78(5):1083-1086.
- Kiire C.F. and the African regional study group. 1990. Hepatitis B infection in sub-Saharan Africa. *Vaccine*, 8 Supplement:S107-S112.
- Kitts, P.A., Ayres, M.D. en Possee, R.D. 1990. Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery of recombinant virus expression vectors. *Nucleic acids research*, 18(9):5667-5672.
- Koike, K. 1995. Hepatitis B virus Hbx gene and hepatocarcinogenesis. *Intervirology*, 38:134-142.
- Koike, K. en Takada, S. 1995. Biochemistry and function of hepatitis B virus x protein. *Intervirology*, 38:89-99.
- Korba, B., Wells, F., Jones, K., Engle, R., Buckler-White, A. en Gerin, J. 1994. Inhibition of hepatitis B virus replication in vitro by antisense oligonucleotides. *Antiviral research*, 23(suppl 1):78A.

- Kriegler, M.P. 1993. Gene transfer and expression: a laboratory manual. New York, N.Y. : Stockton Press.
- Krugman, S., Giles, J.P. en Hammond, J. 1970. Hepatitis virus: Effect of heat on the infectivity of the MS-2 and MS-2 strains. *Journal of infectious disease*, 122:432-436.
- Krugman, S., Giles, J.P. en Hammond, J. 1971. Viral hepatitis, type B (MS-2 strain). Studies on active immunisation. *Journal of the American medical association*, 217(1):41-45.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- Lanford, R.E., Kennedy, R.C., Dreesman, G.R., Eichberg, J.W., Notvall, L., Luckow, V.A. en Summers, M.D. 1988. (In Zuckerman *ed.* Viral hepatitis and liver disease. New York: Alan R. Liss Inc. p.372-378).
- Lanford, R.E., Luckow, V., Kennedy, R.C., Dreesman, G.R., Notvall, L. en Summers, M.D. 1989. Expression and characterization of hepatitis B virus surface antigen polypeptides in insect cells with a Baculovirus expression system. *Journal of virology*, 63(4):1549-1557.
- Lau, J.Y.N. en Wright, T.L. 1993. Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. *Lancet*, 342:1335-1340.
- Le Bouvier, G.L., McCollum, R.W., Hierholzer, W.J., Irwin, G.R., Krugman, S en Giles, J.P. 1972. Subtypes of Australia antigen and hepatitis-B virus. *Journal of the American medical association*, 222(8):928-930.
- Lee, H.H. en Miller, L.K. 1978. Isolation of genotypic variants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of virology*, 27(3):754-767.
- Lever, A.M.L., Waters, J. en Brook, M.G. 1990. Monoclonal antibody to HBsAg for chronic hepatitis B virus infection with hypogammaglobulinaemia. *Lancet*, 335:1529.
- Loyter, A., Scangos, G.A. en Ruddle, F.H. 1982. Mechanisms of DNA uptake by mammalian cells: fate of exogenously added DNA monitored by the use of fluorescent dyes. *Proceedings of the national academy of sciences USA*, 79:422-426.
- Mackett, M. en Williamson, J.D. 1995. Human vaccines and vaccination. Oxford: BIOS Scientific Publishers.
- Maeda, S. 1989. Expression of foreign genes in insects using Baculovirus vectors. *Annual reviews in entomology*, 34:351-372.
- Maeda, S., Kawai, T., Obinata, M., Fujiwara, H., Horiuchi, T., Saeki, Y., Sato, Y. en Furusawa, M. 1985. Production of human α -interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature*, 315:592-594.
- Maiorella, B., Inlow, D., Shauger, A. en Harano, D. 1988. Large-scale insect cell-culture for recombinant protein production. *Bio/Technology*. 6:1406-1410.

- Marion, P.L., Oshiro, L.S., Reghery, D.S., Scullard, G.H. en Robinson, W.S. 1980. A virus of Beechy ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proceedings of the national academy of sciences USA*, 77:2941-2945.
- Marion, P.L. en Robinson, W.S. 1983. Hepadna viruses: hepatitis B and related viruses. (*In*. Current topics in microbiology and immunology. Vol. 105. Berlin: Springer-Verlag. p. 99-121).
- Martin, J., Bosch, O., Moraleda, G., Bartolome, J., Quirog, J.A. en Carreno, V. 1993. Pilot study of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the treatment of chronic hepatitis B. *Hepatology*, 18:775-780.
- Mason, W.S., Seal, G. en Summers, J. 1980. Virus of Peking ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *Journal of virology*, 36:829-836.
- Matthes, E., Langen, P., von Janta-Lipinski, M., Will, H., Schröder, H.C., Merz, M., Weiler, B.E. en Müller, W.E.G. 1990. Potent inhibition of hepatitis B virus production *in vitro* by modified pyrimidine nucleosides. *Antimicrobial agents in chemotherapy*, 34:1986-1990.
- Maynard, J.E. 1990. Hepatitis B: global importance and need for control. *Vaccine*, 8 (Supplement):S18-20.
- McAleer, W.J., Buynak, E.B., Maigetter, R.Z., Wampler, D.E., Miller, W.J. en Hillerman, M.R. 1984. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature*, 307:178-180.
- Meisel, H., Reimer, K., von Janta-Lipinski, M., Bärwolff, D. en Matthes, E. 1990. Inhibition of hepatitis B virus DNA by 3'-fluorothymidine triphosphate and other modified nucleoside triphosphate analogs. *Journal of medical virology*, 30:137-144.
- Meyer, M., Wiedorn, K.H., Hofchneider, P.H., Koshy, R. en Caselmann, W.H. 1992. A chromosome 17:7 translocation is associated with a hepatitis B virus DNA integration in human hepatocellular carcinoma DNA. *Hepatology*, 15(4):665-671.
- Michel, M.L., Davis, H.L., Schleef, M., Mancini, M., Tiollais, P. en Whalen, R.G. 1995. DNA-mediated immunization to the hepatitis B surface antigen in mice: aspects of the humoral response mimic hepatitis B viral infection in humans. *Proceedings of the national academy of sciences USA*, 92:5307-5311.
- Milich, D.R., Thornton, G.B., Neurath, A.R., Kent, S.B.H., Michel, M.L., Tiollais, P. en Chisari, F.V. 1985a. Enhanced immunogenicity of the pre-S region of hepatitis B surface antigen. *Science*, 228:1195-1199.
- Milich, D.R., McNamara, M.K., McLachlan, A., Thornton, G.B. en Chisari, F.V. 1985b. Distinct H-2-linked regulation of T-cell responses to the pre-S and S regions of the same hepatitis B surface antigen polypeptide allows circumvention of non-responsiveness to the S region. *Proceedings of the national academy of sciences USA*, 82:8168-8172.

- Milich, D.R., McLachlan, A., Chisari, F.V., Kent, S.B.H., en Thornton, G.B. 1986. Immune response to the pre-S(1) region of hepatitis B surface antigen (HBsAg): a pre-S(1) specific T cell response can bypass nonresponsiveness to the pre-S(2) and S regions of HBsAg. *Journal of immunology*, 137:315-322.
- Miller, L.K. 1981. A virus vector for genetic engineering in invertebrates. (In Panopoulos, N. *ed.* Genetic engineering in plant sciences. New York: Praeger.)
- Miller, L.K. 1988. Baculoviruses as gene expression vectors. *Annual reviews of microbiology*, 42:177-199.
- Miller, R.H. 1987. Proteolytic self-cleavage of hepatitis B virus core protein may generate serum e antigen. *Science*, 236:722-724.
- MIMS Desk Reference. 1996. Vol 31. Snyman, J *ed.* Pretoria.
- Mishiro, S., Imai, M., Takahashi, K., Machida, A., Gotanda, T., Miyakawa, Y. en Mayumi, M. 1980. A 49,000-Dalton polypeptide bearing all antigenic determinants and full immunogenicity of 22-nm hepatitis B surface antigen particles. *Journal of immunology*, 124(4):1589-1593.
- Miyanohara, A., Toh-e, A., Nozaki, C., Hanmada, F., Ohtomo, N. en Matsubara, K. 1983. Expression of hepatitis B surface antigen gene in yeast. *Proceedings of the national academy of sciences USA*, 80:1-5.
- Most, J., Larcher, C., Vogetseder, W., Prodinger, W.M., Huemer, H.P., Ebenbichler, C.F. en Dierich, M.P. 1992. Recombinant versus plasma-derived hepatitis B vaccine: comparison of immunogenicity in medical students. *Vaccine*, 10(11):740-741.
- Mutchnick, M.G., Appelman, H.D., Chung, H.T. Aragona, E., Gupta, T.P., Cummings, G.D., Waggoner, J.G., Hoffnagle, J.H. en Shafritz, D.A. 1991. Thymosin treatment of chronic hepatitis B: A placebo-controlled pilot trial. *Hepatology*, 14:409-415
- Neurath, A.R., Kent, S.B.H., Strik, N., en Parker, K. 1986. Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell*, 46:429-436.
- Offensperger, W-B., Offensperger, S., Walter, E., Teubner, K., Igloi, G., Blum, H.E. en Gerok, W. 1993. *In vivo* inhibition of duck hepatitis B virus replication and gene expression by phosphorothioate-modified antisense oligodeoxynucleotides. *EMBO journal*, 12:1257-1262.
- O'Reilly, D.R., Miller, L.K., Luckow, V.A. 1992. Baculovirus expression vectors: a laboratory manual. New York, N.Y. : W.H. Freeman.
- Patzer, E.J., Nakamura, G.R., Simonsen, C.C., Levinson, A.D. en Brands, R. 1986. Intracellular assembly and packaging of hepatitis B surface antigen particles occur in the endoplasmic reticulum. *Journal of virology*, 58(3):884-892.
- Pennock, G.D., Shoemaker, C. en Miller, L.K. 1984. Strong and regulated expression of *Escherichia coli* β -galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. *Molecular and cellular biology*, 4:399-406.

- Purcell, R.E. en Gerin, J.L. 1975. Hepatitis B subunit vaccine: a preliminary report of safety and efficacy in chimpanzees. *American journal of medical science*, 270:395-399.
- Reed, E.C., Myerson, D., Corey, L. en Myers, J.D. 1991. Allogenic marrow transplantation in patients positive for hepatitis B surface antigen. *Blood*, 77:195-200.
- Robinson, W.S., Clayton, D.A. en Greenman, R.L. 1974. DNA of a human hepatitis B virus candidate. *Journal of virology*, 12(2):384-391.
- Robinson, W.S. en Lutwick, L.I. 1976. The virus of hepatitis, type B. *The New England journal of medicine*, 295(21):1168.
- Ruiz-Moreno, M., Garcia, R., Rua, M.J., Serrano, B., Moraleda, G., Feijoo, E., Bartolome, J., Ortiz, F., Castillo, I. en Carreno, V. 1993. Levamisole and interferon in children with chronic hepatitis B. *Hepatology*, 18:264-269.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. en Maniatis, T. 1989. Molecular cloning : a laboratory manual. 2nd ed. New York, N.Y. : Cold Spring Harbour.
- Schaller, H. en Fischer, M. 1991. Transcriptional control of hepadnavirus gene expression. (*In* Mason, W.S. en Seeger, C. eds. Current topics in microbiology and immunology, vol. 168. Berlin: Springer-Verlag p. 21-39).
- Schoub, B.D. 1992. Estimations of the total size of the HIV and hepatitis B epidemics in South Africa. *South African medical journal*, 81:63-66.
- Schully, L.J. en Kang, C.Y. 1988. Production and secretion of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and Pre-S2 plus HBsAg using a baculovirus expression vector. (*In* Zuckerman ed. Viral hepatitis and liver disease. New York: Alan R. Liss Inc. p.365-371).
- Seeger, C., Summers, J. en Mason, W.S. 1991. Viral DNA synthesis. (*In* Mason, W.S. en Seeger, C. eds. Current topics in microbiology and immunology, vol.168. Berlin:Springer-Verlag. p. 41-60.)
- Smith, G.E., Summers, M.D. en Fraser.M.J. 1983. Production of human beta-interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Molecular and cellular biology*. 3:2156-2165.
- Somasundaram, C., Tournier, I., Feldmann, G., Bernuau, D. 1992. Increased efficiency of gene transfection in primary cultures of rat hepatocytes stimulated to proliferate: A comparative study using lipofection and calcium phosphate precipitate methods. *Cell biology international reports*, 16(7):653-662.
- Strydom, P.C.J. 1993. Uitdrukking van hepatitis B virus (subtype adw2) opevlaksantigene. Potchefstroom: PU vir CHO. (Verhandeling - M.Sc.).
- Summers, J. en Mason, W.S. 1982. Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell*, 29:403-415.

- Summers, J., Smolec, J.M. en Snyder, R. 1978. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proceedings of the national academy of sciences USA*, 75:4533-4537.
- Suzuki, H., Iino, S., Shiraki, K., Akahane, Y., Okamoto, H., Domoto, K. en Mishiro, S. 1994. Safety and efficacy of a recombinant yeast-derived pre-S2 + S - containing hepatitis B vaccine (TGP-943): phase 1,2 and 3 clinical testing.
- Suzuki, S., Lee, B., Luo, W., Tovell, D., Robins, M.J. en Tyrrel, L.J. 1988. Inhibition of duck hepatitis B virus replication by purine 2',3'-dideoxynucleosides. *Biochemical and biophysical research communications*, 156:1144-1151.
- Takehara, K., Ireland, D. en Bishop, D.H.L. 1988. Co-expression of the hepatitis B surface and core antigens using baculovirus multiple expression vectors. *Journal of general virology*, 69:2763-2778.
- Tiollais, P. en Buendia, M-A. 1991. Hepatitis B virus. *Scientific American*, 264(4):48-54.
- Tiollais, P., Hsu, T.Y., Möröy, T., Etiemble, J., Fourel, G., De Thé, H., Marcio, A., Dejean, A. en Buendia, M.A. 1990. Hepadnavirus as an insertional mutagen in hepatocellular carcinoma. (*In* Hollinger, F.B., Lemon, S.M. en Margolis, H.S. eds. *Viral hepatitis and liver disease*. Baltimore, Md.:Williams & Wilkins p541-564.)
- Tiollais, P., Pourcel, C. en Dejean, A. 1985. The hepatitis B virus. *Nature*, 317:489-495.
- Thomas, H.C. en Norvick, D.M. 1986. Chronic hepatitis B infection: treatment and prevention. (In Oriel, J.D. en Harris, J.R.W. eds. *Recent advances in sexually transmitted diseases*. Vol. 3. Edinburgh:Churchill Livingstone. p.157-174).
- Valenzuela, P., Medina, A., Rutter, W.J., Ammerer, G. en Hall, B.J. 1982. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature*, 298:347-350.
- Vyas, K.R., Rao, K.R. en Ibrahim, A.B. 1972. Australia antigen (hepatitis B antigen): a conformational antigen dependent on disulfide bonds. *Science*, 178:1300-1301.
- World Health Organization expert committee on viral hepatitis. 1977. *Advances in viral hepatitis*. World Health Organization. Geneva p.40.
- Wu, G.Y. en Wu, C.H. 1992. Specific inhibition of hepatitis B viral gene expression *in vitro* by targeted antisense oligonucleotides. *Journal of biological chemistry*, 267:12436-12439.
- Yamamoto, S., Nakatake, H., Kawamoto, S., Takimoto, M., Koshy, R. en Matsubara, K. 1993. Transactivation of cellular promoters by an integrated hepatitis B virus DNA. *Biochemical and biophysical research communications*, 192(1):111-118.

Yap, I., Guan, R. en Chan, S.H. 1992. Recombinant DNA hepatitis B vaccine containing pre-S components of the HBV coat protein - a preliminary study on immunogenicity. *Vaccine*, 10(7):439-442.

Yen, T.S.B, Wang, Y-F. en Seto, E. 1988. DNA transfection into suspension cell lines with a modified calcium phosphate precipitate method. *Biotechniques*, 6(5):413-414.

Zhou, M.X., Watabe, M en Watabe, K. 1994. The X-gene of human hepatitis B virus transactivates the c-jun and alpha-fetoprotein genes. *Archives of virology*, 134(3-4):369-379.

Afkortinglys

A	Adenien
aa	Aminosuur
AcNPV	<i>Autographa californica</i> kern polihedrose virus
amp	ampisillienweerstandbiedendheidsgeen
Au	Australiese
bp	basepaar(e)
C	sitosien
cccDNA	kovalentgeslote sirkelvormige DNA
cDNA	komplementêre DNA
CHO	eng. "Chinese hamster ovary"
CIP	kalfderm alkaliese fosfatase
cm	sentimeter
cm ²	vierkante sentimeter
ddH ₂ O	gedeïoniseerde water
DEAE	diëtielaminoetiel
DHBcAg	eend hepatitis B-virus kernantigeen
DHBsAg	eend hepatitis B-virus oppervlakantigeen
DHBV	eend hepatitis B-virus
DNA	deoksiribonukleïensuur
dNTP	deoksieribonukleosiedtrifosfaat
dsDNA	dubbelstring DNA
EDTA	etileendiamientetra-asynsuur
ENH	transkripsionele versterker, eng. "enhancer"
ELISA	ensiemgekoppelde immunotoets
EPI	uitgebreide program vir immunisering

G	guanien
HBcAg	hepatitis B-virus kernantigeen
HBeAg	hepatitis B-virus kernantigeen
HBS	Hepes-gebufferde soutoplossing
HBsAg	hepatitis B-virus oppervlakantigeen
HBV	hepatitis B-virus
HEPES	4-(2-hidroksie-etiel)-1-piperazienetaansulfoonsuur
kb	kilobase
kDa	kilodalton
L	liter
<i>lacZ</i>	galaktosidasegeen van <i>Escherichia coli</i>
LB	Luria-Bertani-voedingsop
λ -DNA	faag lambda DNA
M	mol per liter
mg	milligram
μ g	mikrogram
μ l	mikroliter
mM	millimol per liter
Mr	molekulêre massa
mRNA	boodskapper ribonukleïensuur
m/v	massa per volume
<i>neo</i>	<i>Escherichia coli</i> neomisienfosfotransferasegeen
ng	nanogram
Ni-NTA	nikel-nitrielsynsuur
nm	nanometer
PBS	fosfaatgebufferde fisiologiese soutoplossing

PHK	primêre heptosellulêre karsinoom
p.i.	post infeksie
PMSF	fenielmetielsulfonielfluoried
pol	polimerase ensiem
<i>polh</i>	polihedrien-geen
RNA	ribonukleïensuur
RNase	ribonuklease
SDS	natriumdodesielsulfaat
sf	serumvry
Sf	<i>Spodoptera frugiperda</i>
T	timien
Tris	tris-(hidroksiemetiel)-aminoetaan
UV	ultraviolet
v/v	volume per volume
WHO	eng."World Health Organization"
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indoliel- β -D-galaktopiranosied