

**KLONERING EN UITDRUKKING
VAN DIE
MENSGEEN VIR INTERLEUKIN-3 (IL-3)**

STEFANUS JOHANNES STEYN, B.Sc

**Verhandeling voorgelê ter gedeeltelike nakoming van die vereistes vir die graad
Magister Scientiae in Biochemie in die Fakulteit Natuurwetenskappe
van die Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys.**

Studieleier: Dr. P.J. Pretorius

POTCHEFSTROOM

Januarie 1995

***"Toe het God gekyk na alles
wat Hy gemaak het,
en dit was baie goed"***

Genesis 1:31a

Aan my Ouers, Oupa en Ouma....

INHOUDSOPGAWE

AFKORTINGSLYS	1
ABSTRACT	7
OPSOMMING	9
HOOFSTUK 1: INLEIDING	11
HOOFSTUK 2: LITERATUUROORSIG	13
2.1 INLEIDING	13
2.2 SITOKIENE	13
2.3 HEMATOPOÏETIESE GROEIFAKTORE	15
2.3.1 Hematopoïese en biologiese eienskappe	15
2.3.2 Eienskappe van die hematopoïetiese groeifaktore	15
2.3.3 Terapeutiese toepassings van die hematopoïetiese groeifaktore	19
2.4 INTERLEUKIN-3	19
2.4.1 Geenstruktuur en chromosoomposisie	19
2.4.2 Proteïenstruktuur van die IL-3 proteïen	25
2.4.3 Biologiese eienskappe van IL-3	27
2.4.4 Terapeutiese toepassings van IL-3	27
2.5 DOELSTELLINGS EN BENADERINGSWYSE	30
HOOFSTUK 3: DIE VERKRYGING VAN PEILERS VIR DIE KLONERING VAN DIE MENS IL-3 GEEN	33
3.1 INLEIDING	33
3.2 OLIGONUKLEOTIEDE	34

3.2.1 IL-3 Oligonukleotiede	37
3.2.1.1 Rekenaaranalise van die IL-3 oligo- nukleotiede	42
3.2.1.2 Sinteses en suiwing van die IL-3 oligonukleotiede	46
3.3 STANDAARDISERING VAN PCR-KONDISIES VIR DIE VERKRYGING VAN 'N IL-3 SPESIFIEKE PEILER	47
3.3.1 Inleiding	47
3.3.2 Optimalisering van die MgCl ₂ -konsentrasie	48
3.3.3 Optimalisering van die hibridiseringstemperatuur vir die IL-3 500bp PCR-produk se voorvoeders	51
3.3.4 Optimalisering van die T _m _{PCR} temperatuur vir die amplifisering van die 100bp-fragment in die IL-3 geen	54
3.3.5 Optimalisering van die T _m _{PCR} -temperatuur vir die amplifisering van die totale IL-3 geen	56
3.3.6 Klonering en restriksiekartering van die 500bp PCR-produk	57
3.3.7 Volgordebepaling van die 500bp PCR-produk	57
3.4 SAMEVATTING	60
HOOFSTUK 4: AFTASTING VAN 'N cDNA-BIBLIOTEEK MET 'N OLIGO- NUKLEOTIED PEILER VIR DIE VERKRYGING VAN DIE MENS IL-3 GEEN	61
4.1 INLEIDING	61
4.2 AANWENDING VAN OLIGONUKLEOTIEDE VIR DIE ISOLERING VAN DIE MENS IL-3 GEEN UIT 'N cDNA-BIBLIOTEEK	61
4.2.1 Identifisering van 'n cDNA-biblioteek waaruit IL-3 cDNA gekloneer kan word	61

4.2.2	Aanwending van oligonukleotiede as peilers vir biblioteekaftasting	62
4.2.3	Optimalisering van hibridiserings- en waskondisies om die IL-3 oligonukleotiede vir die aftasting van die Mens Limfoma cDNA-biblioteek te gebruik	63
4.2.3.1	Dot-blot analise as 'n geskikte tegniek om die hibridiserings- en waskondisies te optimaliseer	64
4.2.3.2	Optimalisering van die hibridiserings-temperatuur	68
4.2.3.3	Bepaling van die optimum wastemperatuur	70
4.2.3.4	Bepaling van die optimum wassoutkonsentrasie	70
4.2.3.5	Samevatting	72
4.2.4	Aftasting van die Mens Limfoma cDNA-biblioteek met oligonukleotiede	72
4.2.4.1	Karakterisering van potensieel positiewe plake	75
4.3	SAMEVATTING	77
HOOFSTUK 5: VERKRYGING VAN DIE MENS IL-3 GEEN DEUR MIDDEL VAN GENOMIESE-BIBLIOTEEK AFTASTING		79
5.1	INLEIDING	79
5.2	AFTASTING VAN 'N GENOMIESE-BIBLIOTEEK	79
5.2.1	Keuse van genomiese-biblioteek	79
5.2.2	Vorbereiding van die peiler	80
5.2.3	Hibridiserings- en waskondisies van die nitro-sellulosemembrane	80
5.2.4	Aftasting van die biblioteek	82
5.3	KARAKTERISERING VAN DIE GEÏDENTIFISEERDE KLONE	82
5.3.1	Bereiding van faag-DNA vir die karakterisering van die geïdentifiseerde klone	82

5.3.2 Dot-blot-analises van die klone	85
5.3.3 PCR-analise van die klone	85
5.3.4 Southern-oordraganalises van die klone	88
5.4 KLONERING EN KARTERING VAN DIE 5600bp	
<i>Sma</i> I-FRAGMENT	92
5.4.1 Klonering van die 5600bp <i>Sma</i> I-fragment	92
5.4.2 Restriksiekartering van pSJ5600	92
5.4.3 Southern-oordraganalises van pSJ5600	95
5.5 METODEDES OM DIE 5'-KANT VAN DIE IL-3 GEEN IN DIE	
KLONE TE IDENTIFISEER	102
5.5.1 Bepaling of die 5'-kant van die IL-3 geen in die	
1500bp <i>Sma</i> I-fragment voorkom	102
5.5.1.1 Verdeling van die klone in ekson-	
fragment	102
5.5.1.2 Analise van die 1500bp <i>Sma</i> I-fragment	
met 'n 5'-kant spesifieke peiler	104
5.5.2 Bepaling of die volledige Il-3 geen teenwoordig	
is in die geïsoleerde klone	107
5.6 SAMEVATTING	110
HOOFSTUK 6: KLONERING EN UITDRUKKING VAN DIE IL-3	
GEEN IN 'N EUKARIOTIESE UITDRUKKINGSSISTEEM	115
6.1 INLEIDING	115
6.2 KLONERING EN UITDRUKKING VAN DIE IL-3 GEEN IN 'N	
EUKARIOTIESE UITDRUKKINGSSITEEM	115
6.2.1 Identifisering van 'n geskikte eukariotiese	
sellyn	116
6.2.2 Identifisering van 'n geskikte soogdieruitdruk-	
kingsvektor	116
6.2.3 Konstruksie van pSJ100	118
6.2.4 Konstruksie van pSJIL-3(E)	118

6.2.5 Samevatting	120
6.3 UITDRUKKING VAN pSJIL-3(E) IN CHO-K1-SELLE	120
6.3.1 Inleiding	120
6.3.2 Transfeksie van die CHO-K1-selle	125
6.3.3 Seleksie van die getransfekteerde selle	128
6.3.4 Isolering van foki vir die produksie van die IL-3 proteïen	128
6.3.5 Indusering van die MMTV-LTR promotor	128
6.4 ANALISE VAN DIE GETRANSFEKTEERDE SELLE	130
6.4.1 Inleiding	130
6.4.2 Analise van die klone op grond van die uitdruk- king van die IL-3 geen	130
6.4.2.1 Evaluering van metodes om die getrans- fekteerde selle te sif	131
6.4.2.2 Samevatting	132
6.4.2.3 Uitvoering van die biologiese-aktiwi- teits bepaling op die getransfekteerde selle	133
6.4.3 Bepaling van die geenkopiegetal met behulp van slot-blot analyses	134
6.5 SAMEVATTING	138
HOOFSTUK 7: KLONERING EN UITDRUKKING VAN DIE MENSGEEN VIR IL-3 IN 'N PROKARIOTIESE UITDRUKKINGSSISTEEM	141
7.1 INLEIDING	141
7.2 KLONERING VAN DIE MENS IL-3 cDNA IN 'N PROKARIOTIESE UITDRUKKINGSSISTEEM	141
7.2.1 Inleiding	141
7.2.2 Identifisering van 'n prokariotiese uitdruk-	

kingsvektor	142
7.2.3 Klonering van die IL-3 cDNA in die prokariotiese uitdrukingsvektor pSE420	145
7.3 IDENTIFISERING VAN GESKIKTE <i>E. coli</i>-SELLYNE VIR DIE UITDRUKKING VAN pSJIL-3(P)	147
7.3.1 Inleiding	147
7.3.2 Genotipiese eienskappe van 'n ideale gasheer	147
7.3.3 Die genotipes van beskikbare <i>E. coli</i> -sellyne	151
7.4 UITDRUKKING VAN DIE MENS IL-3 cDNA IN 'N PROKARIOTIESE UITDRUKKINGSSISTEEM	153
7.4.1 Inleiding	153
7.4.2 Voorbereiding van die <i>E. coli</i> -sellyne	153
7.4.3 Grootskaalse kweking van die plasmiedbevattende <i>E. coli</i> -sellyne	154
7.5 WESTERN OORDRAGANALISE	154
7.5.1 Inleiding	155
7.5.2 Eksperimentele metode	155
7.5.3 Resultate van die Western oordraganalise	157
7.6 HPLC-ANALISE VAN DIE GETRANSFEKTEERDE SELLYNE	157
7.6.1 Inleiding	157
7.6.2 Bereiding van die subcellulêre fraksies	160
7.6.3 Lisering van die gekweekte selle	160
7.6.4 Oplossing van die sediment	161
7.6.5 Ammoniumsulfaatpresipitering	161
7.6.6 HPLC-analise van die onderskeie fraksies	162
7.7 SAMEVATTING	167
HOOFSTUK 8: BESPREKING	169
8.1 INLEIDING	169

8.2 HEMATOPOÏETIESE GROEIFAKTORE	169
8.3 DIE VERKRYGING VAN PEILERS VIR DIE KLONERING VAN DIE MENS IL-3 GEEN	170
8.4 AFTASTING VAN 'N cDNA-BIBLIOTEEK MET 'N OLIGONUKLEOTIED VIR DIE VERKRYGING VAN DIE MENS IL-3 GEEN	172
8.5 VERKRYGING VAN DIE MENS IL-3 GEEN DEUR MIDDEL VAN GENOMIESE-BIBLIOTEEK AFTASTING	176
8.6 KLONERING EN UITDRUKKING VAN DIE MENS IL-3 GEEN IN 'N EUKARIOTIESE UITDRUKKINGSSISTEEM	179
8.7 KLONERING EN UITDRUKKING VAN DIE MENS GEEN VIR IL-3 IN 'N PROKARIOTIESE UITDRUKKINGSSISTEEM	181
8.8 SLOTSOM	183
LITERATUURVERWYSINGS	185
BEDANKINGS	197

AFKORTINGSLYS

A	Adenien
ADCC	antigeen-afhanklike sitotoksiteit
Amp ^R	ampisillienweerstandbiedenheid
ATCC	American Type Culture Collection
AZT	3'-asido-3'-deoksitimidien
BFU	vormingseenheid (Eng: burst forming unit)
BFU-E	eritrosietvormingseenheid
bp	basepaar
BSA	beesserumalbumien
C	Sitosien
°C	grade Celsius
CaCl ₂	kalsiumchloried
cDNA	polideoksiribonukleotied gesintetiseer onder leiding van RNA-afhanklike DNA-polimerase
CFU	kolonie-vormingseenheid
CFU-BM	kolonie-vormingseenheid vir basofiele en mastselle
CFU-E	kolonie-vormingseenheid vir eritrosiete
CFU-Eo	kolonie-vormingseenheid vir eosinofiele
CFU-GM	kolonie-vormingseenheid vir granuloseite en monosiete
CFU-Meg	kolonie-vormingseenheid vir megakariosiete
CHO	Chinese hamster ovarium
Ci	curie
CLE1	behoue limfokien element 1 (Eng: conserved lymphokine element 1)
CLE2	behoue limfokien element 2 (Eng: conserved lymphokine element 2)
cm	sentimeter

cm ²	vierkante sentimeter
CO ₂	koolstofdiksied
ConA	konkanavalien A
CSF	kolonie-stimuleringsfaktor
dATP	deoksiadenosientrifosfaat
dCTP	deoksisitidientrifosfaat
dGTP	deoksiguanientrifosfaat
dTTP	deoksitimidientrifosfaat
ddH ₂ O	gedeïoniseerde hoogsgesuiwerde water
DNA	deoksiribonukleïensuur
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etileendiamientetra-asynsuur
ELISA	ensiemgekoppelde immuno-affiniteitstoets
EPO	eritroïetien
G	Guanien
g	gram
g/ml	gram per milliliter
g%	gram per 100 milliliter
xg	gravitasie eenheid
G418	genetisien
GC-inhoud	guanien-sitosien-inhoud
G-CSF	granulosietkolonie-stimuleringsfaktor
GM-CSF	granulosiet-makrofaag kolonie-stimuleringsfaktor
H ₂ O ₂	waterstofperoksied
HCl	waterstofchloried
HEPES	4-(2-hidroksiëtiel)-1-piperasien-etaansulfoonsuur
HGF	hematopoïetiese groeifaktor
HGF'e	hematopoïetiese groeifaktore

hGM-CSF	mens granulosiet-makrofaagkolonie-stimuleringsfaktor
HI	hitte geïnactiveer
hIL-3	mens interleukin-3 (Eng: human interleukin-3)
IFN	interferon
IL	interleukin
IL-1	interleukin-1
IL-2	interleukin-2
IL-3	interleukin-3
IL-5	interleukin-5
IL-6	interleukin-6
IPTG	isopropiel-β-D-tiogalaktopiranosied
kb	kilobasepaar
KCl	kaliumchloried
kD	kilodalton
KH ₂ PO ₄	kaliumdiwaterstofortofosfaat
l	liter
LTR	lang terminale herhalingsgebied (Eng: long terminal repeat)
M	molekulêre massa
mbar	millibar
M-CSF	makrofaag kolonie-stimuleringsfaktor
MDM	gemodifiseerde Dulbecco's medium
mg	milligram
mg/ml	milligram per milliliter
mg/ml/cm	milligram per milliliter per sentimeter
MgCl ₂	magnesiumchloried
MgSO ₄ ·7H ₂ O	magnesiumsulfaat

MHC	weefsel-vereenigbare antigeen (Eng: major histocompatibility complex)
ml	milliliter
mM	millimolêr
mm	millimeter
mmol	millimol
MMTV	muis borskankervirus
MMTV-LTR	muis borskankervirus lang terminale herhalingsgebied
mRNA	boodskapper ribonukleïensuur
m/v	massa per volume
NaCl	natriumchloried
NaOH	natriumhidroksied
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	dinatriumwaterstofortofosfaat
neo	neomisienfosfotransferase
ng	nanogram
ng/ml	nanogram per milliliter
(NH ₄) ₂ SO ₄	ammoniumsulfaat
nm	nanometer
OD	optiese digtheid
ODS	oktadekasiliel
ori	oorsprongpunt vir replisering in bakterieë
³² P	fosfaat met relatiewe atoommassa van 32
PAGE	poli-akriëlamiedgelëlektroforese
PBS	fosfaat gebufferde fisiologiese soutoplossing
PCR	polimerase-kettingreaksie
PEG	poliëtileenglikool
pg	pikogram
pI	isoëlektriese punt
PMA	forbolmono-asetaat

PMSF	fenielmetielsulfonielfluoried
pmol	pikomol
PVP	polivinielpirrolidoon
r	rekombinant
rhIL-3	rekombinante mens interleukin-3
RNA	ribonukleïensuur
RSV	Rous sarkomavirus
SCF	stamsel faktor
SDS	natriumdodesielsulfaat
SDS-PAGE	PAGE in die teenwoordigheid van SDS
SSC	natriumchloried-tri-natriumsitraat
SV	aapvirus
T	timien
<i>Taq</i>	<i>Termus aquaticus</i>
TBS	tris gebufferde soutoplossing
TFA	trifluoro-asynsuur
TM	handelsmerk
T _m	smelttemperatuur
T _m _{PCR}	smeltpunttemperatuur vir die uitvoering van PCR
TNF- α	kanker nekrosefaktor alfa (Eng: tumor necrosis factor alpha)
TPA	12- <i>O</i> -tetradekanoïelforbol-13 asetaat
tpm	tellings per minuut
tpm/ μ g	tellings per minuut per mikrogram
Tris	tris-(hidroksimetiel-aminometaan
TrisHCl	tris-(hidroksimetiel-aminometaan hidrochloried
TTBS	0.1% Tween 20 in TBS
U	eenheid
UV	ultraviolet

μCi	mikrocurie
μg	mikrogram
μl	mikroliter
$\mu\text{l}/\text{cm}^2$	mikroliter per vierkante sentimeter
μm	mikrometer
V	volts
VIGS	verworwe immuniteitsgebrek-sindroom
v/v	volume per volume

ABSTRACT

CLONING AND EXPRESSION OF THE HUMAN GENE FOR INTERLEUKIN-3 (IL-3)

The hematopoietic growth factor, IL-3, is responsible for the proliferation and differentiation of pluripotent stemcells to mature effector cells in the body. For the formation of mature effector cells, other hematopoietic factors also play a role. The key role of IL-3 during hematopoiesis render this factor great therapeutic potential especially when IL-3 is used in combination with other hematopoietic factors. IL-3 is especially successful in the treatment of chemo- and radio-therapy induced secondary hematopoietic failure. The genes for GM-CSF, G-CSF and IL-5 have already been successful cloned and expressed in our laboratory. As IL-3 has great therapeutic potential and because of the dependance of the above mentioned factors on IL-3 for greater therapeutic success we decided to clone and expressed the human gene for IL-3

Initially we attempt to isolate the IL-3 gene from cDNA and genomic libraries. For this IL-3 specific oligonucleotides were designed and synthesized to be used as probes for the screening of libraries as well as primers during PCR for the amplification of parts of the IL-3 gene. The amplification products can also be used as probes for the screening of libraries. The oligonucleotides were unsuccessful as probes for the isolation of IL-3 cDNA from a cDNA library. The use of oligonucleotides as primers for PCR however was successful and two PCR-products were obtained. The longest PCR-product (500bp) was then used to screen a genomic library. All the isolated potential positive clones each time contained only part of the IL-3 fragment. By means of a synthetic IL-3 cDNA probe it was confirmed that all the isolated clones only contained the third, fourth and fifth exon of the IL-3 gene.

The synthetic IL-3 cDNA was expressed in an eukaryotic and a prokaryotic expression system. The IL-3 cDNA was successfully cloned in an eukaryotic expression vector and IL-3

specific biological activity was shown by a recombinant clone. The IL-3 cDNA was also successfully cloned in an prokaryotic expression vector. Two transformed *E.coli* cell lines produced unique proteins which correspond with the human IL-3 protein. By means of an IL-3 protein standard and HPLC-analysis it was found that the unique proteins were indeed the human IL-3 protein. Thus the human gene for IL-3 was successfully cloned and expressed in two expression systems.

Part of this work was presented at the following national conferences:

1. S. Greeff, S.J. Steyn, P.W. Terblanche, and W.J. de Wet. "Comparative sequence analysis of the genes encoding six key hematopoietic growth factors." Tenth Annual Congress of the S.A. Biochemical Society (1991), University of Natal.
2. S.J. Steyn, S. Greeff, F.H. van der Westhuizen, J.S. Hendriks, and W.J. de Wet. "Clinical status of six hematopoietic growth factors." Eleventh Congress of the S.A. Biochemical Society (1992), Sun City.
3. S. Greeff, S.J. Steyn, P.W. Terblanche, and W.J. de Wet. "Comparative sequence analysis of the genes encoding six key hematopoietic growth factors." First South African Biotechnology Conference (1993), Grahamstown.
4. S.J. Steyn, S. Greeff, F.H. van der Westhuizen, J.S. Hendriks, and W.J. de Wet. "Clinical status of six hematopoietic growth factors." First South African Biotechnology Conference (1993), Grahamstown.

OPSOMMING

DIE KLONERING EN UITDRUKKING VAN DIE MENSGEEN VIR INTERLEUKIN 3 (IL-3)

IL-3 is 'n hematopoïetiese groeifaktor wat die proliferasie en differensiasie van pluripotente stamselle tot volwasse effektorselle in die liggaam tot gevolg het. Vir die uiteindelijke vorming van volwasse effektorselle in die liggaam speel ander hematopoïetiese faktore ook 'n rol. Die sleutel rol wat IL-3 tydens hematopoïese speel, verleen aan hierdie faktor groot terapeutiese potensiaal, veral as ander hematopoïetiese faktore saam met IL-3 aan pasiënte toegedien word. IL-3 is onder andere suksesvol in die behandeling van chemo- en radio-terapie geïnduseerde sekondêre hematopoïetiese disfunksies. Die gene vir GM-CSF, G-CSF en IL-5 is reeds suksesvol in ons laboratorium gekloneer en uitgedruk. Op grond van die terapeutiese potensiaal van IL-3 en die afhanklikheid van GM-CSF, G-CSF en IL-5 van IL-3 om terapeuties meer suksesvol te wees, is besluit om die mens geen vir IL-3 te kloneer en uit te druk.

Daar is aanvanklik gepoog om die IL-3 geen uit 'n cDNA- en genomiese-biblioteek te isoleer. Vir die doel is IL-3 spesifieke oligonukleotiede ontwerp en gesintetiseer om te gebruik as peilers vir die aftasting van biblioteke en ook om te gebruik as voorvoerders tydens PCR om dele van die IL-3 geen te amplifiseer. Die amplifiseringsprodukte kan dan ook as peilers vir die aftasting van biblioteke gebruik word. Die oligonukleotiede was nie suksesvol as peilers vir die isolering van 'n IL-3 cDNA uit 'n cDNA-biblioteek nie. Die aanwending van die oligonukleotiede as voorvoerders vir die uitvoering van PCR was suksesvol en twee PCR-produkte is verkry. Die langste PCR-produk, naamlik 500bp, is vervolgens aangewend om 'n genomiese biblioteek af te tas. Al die geïsoleerde potensieel positiewe klone het telkens net gedeeltelike IL-3-fragmente bevat. Met behulp van 'n sintetiese IL-3 cDNA peiler is bevestig dat al die geïsoleerde klone net die derde, vierde en vyfde eksone van die IL-3 geen bevat het.

Die sintetiese IL-3 cDNA is suksesvol in 'n eukariotiese uitdrukkingsektor gekloneer en IL-3 spesifieke biologiese-aktiwiteit is deur 'n kloon vertoon. Die IL-3 cDNA is ook suksesvol in 'n prokariotiese uitdrukkingsektor gekloneer. Twee getransformeerde *E.coli*-sellyne het unieke proteïene geproduseer wat in terme van grootte ooreengestem het met die mens IL-3 proteïen. Met behulp van 'n IL-3 proteïenstandaard en HPLC-analises is bevind dat die unieke proteïene wel die mens IL-3 proteïen is. Hierdeur is bewys dat die mens geen vir IL-3 suksesvol gekloneer en in meerdere uitdrukkingssisteme uitgedruk is.

Dele van hierdie studie is by die volgende nasionale kongresse aangebied:

1. S. Greeff, S.J. Steyn, P.W. Terblanche, en W.J. de Wet. "Comparative sequence analysis of the genes encoding six key hematopoietic growth factors." Tiende Kongres van die Suid-Afrikaanse Biochemiese Vereniging: Universiteit van Natal (1991).
2. S.J. Steyn, S. Greeff, F.H. van der Westhuizen, J.S. Hendriks, en W.J. de Wet. "Clinical status of six hematopoietic growth factors." Elfde Kongres van die Suid-Afrikaanse Biochemiese Vereniging: Sun City (1992).
3. S. Greeff, S.J. Steyn, P.W. Terblanche, en W.J. de Wet. "Comparative sequence analysis of the genes encoding six key hematopoietic growth factors." Eerste Suid-Afrikaanse Biotegnologiese Konferensie: Grahamstad (1993).
4. S.J. Steyn, S. Greeff, F.H. van der Westhuizen, J.S. Hendriks, en W.J. de Wet. "Clinical status of six hematopoietic growth factors." Eerste Suid-Afrikaanse Biotegnologiese Konferensie: Grahamstad (1993).

HOOFSTUK 1

INLEIDING

Hematopoïetiese groeifaktore is sitokiene wat die produksie van bloedselle in die liggaam vanaf pluripotente stamselle beheer. Die produksie van bloedselle in die liggaam vind volgens 'n kaskadereaksie plaas en benodig opeenvolgens sekere hematopoïetiese groeifaktore om 'n bepaalde effektorstel te laat ontwikkel. Die betrokkenheid van die hematopoïetiese groeifaktore by baie fisiologiese funksies in die liggaam het tot gevolg dat die faktore by 'n groot aantal siektetoestande in die liggaam betrokke is. Deur middel van die rekombinante DNA tegnologie is die gene van die bekende hematopoïetiese groeifaktore gekloneer en het die faktore in groot en suiwer hoeveelhede beskikbaar gekom vir toepassings in kliniese toetse.

IL-3 is 'n hematopoïetiese groeifaktor wat van die meer primitiewe pluripotente stamselle stimuleer tot proliferasie en differensiasie. IL-3 vestig dus 'n poel voorgangerselle waarvandaan verskeie effektorstelle kan ontwikkel onder die regie van ander, meer lynbeperkte hematopoïetiese groeifaktore. Die sleutelrol wat IL-3 tydens hematopoïese speel het tot gevolg dat die faktor oor 'n geweldige terapeutiese potensiaal beskik. IL-3 het reeds aangetoon om baie suksesvol te wees tydens die behandeling van chemo- en radio-terapie geïnduseerde sekondêre hematopoïetiese disfunksie. Dit is egter bevind dat die terapeutiese aanwending van IL-3 en GM-CSF in kombinasie meer suksesvol is as wat die betrokke faktore alleen is.

Die doel van hierdie studie is dan om die mens geën vir IL-3 te kloneer en uit te druk vir die terapeutiese aanwending van die faktor, alleen en in kombinasie met ander hematopoïetiese groeifaktore soos GM-CSF, G-CSF en IL-5 wat reeds in ons laboratorium gekloneer en uitgedruk is.

In Hoofstuk 2 van hierdie studie word 'n literatuuroorsig oor die hematopoïetiese groeifaktore

en meer spesifiek van IL-3 gegee. In al die opeenvolgende Hoofstukke word daar 'n oorsig van die literatuur wat op die betrokke Hoofstuk van toepassing is gegee. In Hoofstuk 3 word die verkryging van peilers vir die klonering van die mens geen vir IL-3 beskryf terwyl in Hoofstukke 4 en 5 die aftasting van 'n cDNA- en 'n genomiese-biblioteek onderskeidelik met die verkrygte peilers beskryf word. Hoofstukke 6 en 7 handel onderskeidelik oor die uitdrukking van 'n mens IL-3 cDNA in 'n eukariotiese en 'n prokariotiese uitdrukkingssisteem.

Die resultate van hierdie studie word in samehang met die literatuur in Hoofstuk 8 bespreek.

HOOFSTUK 2

LITERATUUROORSIG

2.1 INLEIDING

Hematopoïese is die geregleerde produksie van bloedselle in die liggaam vanaf pluripotente stamselle wat in die beenmurg voorkom (Yee, 1989). Die produksie van hierdie selle word geregleer deur regulatoriese proteïene bekend as die sitokiene (Clemens, 1991). Onder die regie van die sitokiene word rooibloedselle, neutrofiele, basofiele, eosinofiele, monosiete, bloedplaatjies en limfosiete vanaf die pluripotente stamselle geproduseer (Clark en Kamen, 1987). Die sitokiene speel dus fundamentele rolle in die beheer van baie fisiologiese funksies in die liggaam. Daarom is dit dan ook nie vreemd dat sitokiene by 'n groot aantal siektetoestande betrokke is nie. Die implikasie hiervan is die geweldige terapeutiese potensiaal om via die sitokiene sekere siektetoestande te behandel of te voorkom deur die groei en aktiwiteit van hemapoïetiese selle te beheer (Clemens, 1991). Interleukin-3 (IL-3) is 'n sitokien wat 'n baie belangrike rol tydens hematopoïese speel deurdat dit van die meer primitiewe stamselle stimuleer tot proliferasie en differensiasie (Yang *et al.*, 1986). Die terapeutiese potensiaal van IL-3 is dus ooglopend. In hierdie Hoofstuk word 'n oorsig van die terapeutiese waarde van sitokiene en spesifiek van die hematopoïetiese groeifaktore gegee, waarna IL-3 in meer besonderhede bespreek word. Die Hoofstuk sluit af met die doelstelling en benaderingswyse van hierdie studie.

2.2 SITOKIENE

Soos in Afdeling 2.1 genoem, word hematopoïese deur die sitokiene geregleer. Sitokiene word rofweg in ses katagorië ingedeel naamlik interferons, sitotoksiese faktore, interleukiene, hematopoïetiese kolonie-stimuleringsfaktore, - inflammatoriese sitokiene en

transformeringsgroeifaktore (Aggarwal en Pocsik, 1992; Yee, 1989). Hierdie heterogene groep proteïene het 'n aantal gemeenskaplike eienskappe. Hulle is almal lae molekulêre gewig proteïene (< 80kD) en is soms geglikosileerd. Sitokiene is betrokke by die immunologie en inflammasie van die liggaam waar hulle die omgewing en tydperk van die respons reguleer. Die sitokiene word lokaal op 'n kortstondige wyse geproduseer waar hulle dan in 'n para- of outokriene manier optree. Voorts is die sitokiene baie potent en is funksioneel in pikomolêre konsentrasies. Sitokiene bind ook aan hoë affiniteit seloppervlakreseptore wat spesifiek is vir elke sitokien of sitokiengroep (Balkwill en Burke, 1989).

Die biologiese rol van sitokiene in immunomodulering, hematopoïese, inflammasie, wondherstel, angiogenese, in die neuroendokriene sisteem, in bakteriese- en parasietinfeksies en in kanker word breedvoerig in die literatuur beskryf (Aggarwal en Pocsik, 1992; Clemens, 1991; Arai *et al.*, 1990; Balkwill en Burke, 1989).

Die terapeutiese rol van sitokiene is reeds drie dekades terug geïdentifiseer met die ontdekking dat interferon as 'n anti-virale middel optree (Aggarwal en Pocsik, 1992). Danksy rekombinante DNA-tegnologie is sitokiene in genoegsame hoeveelhede suiwer geproduseer wat dit moontlik gemaak het om van die sitokiene aan kliniese toetse te onderwerp (Sieff, 1990). Ongelukkig gaan die kliniese toediening van sitokiene ook gepaard met nuwe effekte. Die voorkoms van die nuwe effekte kan toegeskryf word aan die veelvuldige effekte wat sitokiene *in vivo* het (Clemens, 1991). Alhoewel van die nuwe effekte ernstig is, word dit in die algemeen in 'n minder ernstige lig beskou en kan die nuwe effekte behandel word (Aggarwal en Pocsik, 1992).

In skerp kontras met die normale farmaseutiese bedryf waar slegs 1 uit 50 000 formulerings terapieë van waarde is, is waargeneem dat soveel as 20% van die sitokiene wat al bestudeer is, terapieë suksesvol is in die behandeling van verskeie siektetoestande (Aggarwal en Pocsik, 1992). Met die uitsondering van IFN en IL-2 is van hierdie goedgekeurde sitokiene almal hematopoïetiese groeifaktore (HGF'e). Op grond van hierdie faktore se terapeutiese sukses, het hulle dan ook op die voorgrond getree in biotegnologiese navorsing (Zurawski, 1991). Hierdie terapieë belangrike HGF'e is IL-3, GM-CSF, M-CSF, G-CSF en EPO. IL-5 (Van der Westhuizen, 1993) en SCF (Zsebo *et al.*, 1990) het

terapeutiese potensiaal maar word nie in hierdie studie bespreek omdat die twee faktore nog geen terapeutiese toepassings het nie. Die biologiese eienskappe en terapeutiese toepassings van die genoemde HGF'e word nou verder beskryf met die klem op IL-3.

2.3 HEMATOPOÏETIESE GROEIFAKTORE

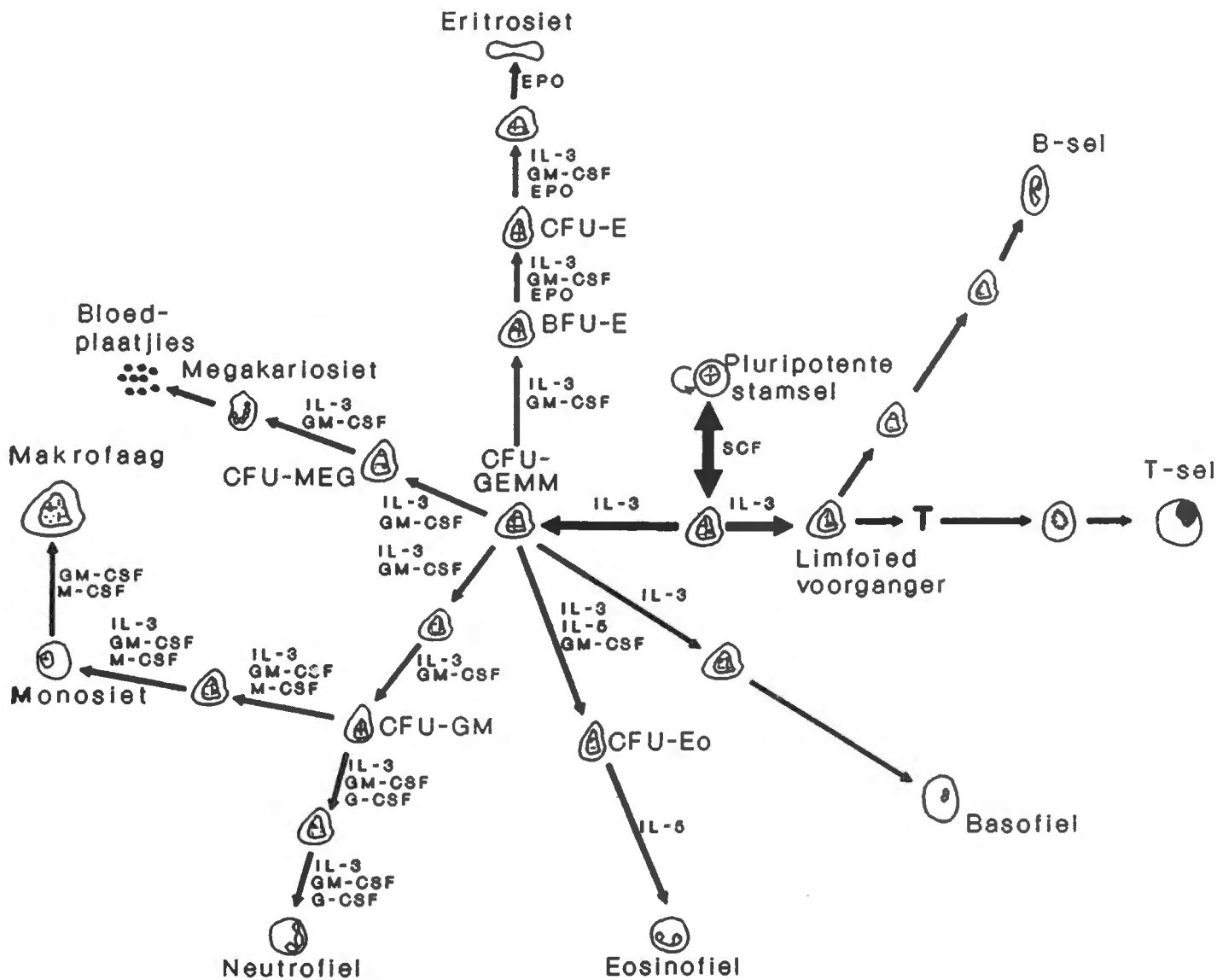
2.3.1 Hematopoïese en biologiese eienskappe

Soos in Afdeling 2.1 genoem is die geregleerde produksie van bloedselle een van die mees komplekse voorbeelde van multi-lyn differensiëring (Clark en Kamen, 1987). Onder die regie van die HGF'e vind hematopoïese plaas. Vanaf pluripotente stamselle in die beenmurg word rooibloedselle, neutrofiële, basofiele, eosinofiele, monosiete, bloedplaatjies en limfosiete geproduseer (Figuur 2.1) (Cowling en Dexter, 1992; Clemens, 1991; Clark en Kamen, 1987).

Die proses van hematopoïese word hoofsaaklik deur twee klasse HGF'e beheer. Klas 1 faktore is IL-3 en GM-CSF (Sieff, 1987; Yee, 1989). Hulle werk in op pluripotente stamselle en onvolwasse voorgangerselle, is nie linspesifiek nie en word regdeur differensiasie benodig. Hierdie twee faktore is ook belangrik vir die selfhernuwing en proliferasie van hierdie selle en dra ook by tot hulle differensiasie (Yee, 1989; Sieff, 1987). Klas 2 HGF'e bestaan uit faktore soos G-CSF, M-CSF en EPO (Yee, 1989; Sieff, 1987). Hierdie faktore beïnvloed die proliferasie en differensiasie van meer volwasse voorgangerselle en word tydens 'n later stadium van selontwikkeling as klas 1 faktore benodig (Yee, 1989; Sieff, 1987). Bykomend tot die primêre effekte het albei die HGF'e klasse die vermoë om direk of indirek die proliferasie van selle in ander hematopoïetiese lyne te stimuleer (Yee, 1989).

2.3.2 Eienskappe van die hematopoïetiese groeifaktore

Die HGF'e is glikoproteïene wat deur 'n aantal weefseltipes in die liggaam geproduseer word (Yee, 1989). In Tabel 2.1 word 'n opsomming van die oorsprong van die onderskeie HGF'e



FIGUUR 2.1
'N SKEMATIESE VOORSTELLING VAN HEMATOPOIESE

- CFU-GEMM - Kolonie-vormingseenheid vir granulosite, eritrosiete, monosiete en megakariosiete.
- BFU-E - Eritrosietvormingseenheid.
- CFU-E - Kolonie-vormingseenheid vir eritrosiete.
- CFU-Meg - Kolonie-vormingseenheid vir megakariosiete.
- CFU-BM - Kolonie-vormingseenheid vir basofiele en mastselle.
- CFU-Eo - Kolonie-vormingseenheid vir eosinofiele.
- CFU-GM - Kolonie-vormingseenheid vir granulosite en monosiete.

(Saamgestel uit die artikels van Cowling en Dexter, 1992; Clemens, 1991; Clark en Kamen, 1987.)

gegee. Die genetiese strukture en die chromosoomposisies van die HGF's word in Tabel 2.2 saamgevat. Dit is interessant om daarop te let dat die geen vir IL-3 en GM-CSF binne 9kbp van mekaar op dieselfde band in die langarm van chromosoom 5 voorkom (Yang en Clark, 1989; Clark en Kamen, 1987). Dit is ook die omgewing waarin die gene vir M-CSF en verskeie ander groeifaktore en groeifaktorreseptore voorkom (Clark en Kamen, 1987). Die betekenis van die verskynsel is nie duidelik nie maar kan moontlik te doen hê met die regulering van die betrokke gene (Clark en Kamen, 1987).

Die proteïeneienskappe van die HGF'e word in Tabel 2.3 opgesom. Al die HGF'e beskik oor 'n seinpeptied wat tot die uitskeiding van die volwasse proteïene deur die weefsels van oorsprong lei (Aggarwal en Pocsik, 1992). Al die proteïene beskik ook oor glikosileringsvolgordes. Die suikers beïnvloed die stabilisering van die proteïenkonformasie en die *in vivo* weefselverspreiding (Cowling en Dexter, 1992; Clemens, 1991) asook proteolitiese afbreking (Cowling en Dexter, 1992). Dit is egter aangetoon dat glikosilering nie bepalend is vir die biologiese aktiwiteit van die proteïene nie (Cowling en Dexter, 1992; Morstyn *et al.*, 1989).

Die biologiese eienskappe van die HGF'e *in vivo* sentreer op hematopoïese (Tabel 2.4). IL-3 verhoog die tempo van hematopoïese in die algemeen terwyl GM-CSF meer betrokke is by mielopoïese (Aggarwal en Pocsik, 1992). M-CSF het verhoogde mielopoïese tot gevolg en tree ook op as 'n anti-kanker middel en is betrokke by osteoklas produksie (Aggarwal en Pocsik, 1992). G-CSF se *in vivo* effek het neutrofilia en verhoogde mielopoïese tot gevolg (Aggarwal en Pocsik, 1992). EPO is soos die naam aandui, betrokke by verhoogde eritropoïese (Lin *et al.*, 1985). Die onderskeie rolle van die HGF'e tydens hematopoïese is ook deur hul *in vitro* eienskappe bevestig. 'n Baie belangrike verskynsel wat waargeneem is, is die sinergistiese optrede van die HGF'e. Dit is noodsaaklik dat die terapeutiese aanwending van die HGF'e hierdie sinergistiese optredes in ag moet neem. Volgens die gegewens in Tabel 2.4 kan duidelik gesien word dat die teenwoordigheid van een faktor, die produksie van ander faktore tot gevolg het.

TABEL 2.1
OORSPRONG VAN DIE HEMATOPOÏETIESE GROEIFAKTORE

HGF	BRON
IL-3	T-limfosiete Natuurlike moordselle
GM-CSF	T-limfosiete Endoteliale fibroblaste Makrofage
M-CSF	Endoteelselle Mononukluêre fagosiete Fibroblaste Plasenta selle
G-CSF	Mononukluêre fagosiete Fibroblaste
EPO	Niere (volwasse persoon) Lewer (fetus)

(Uit : Sieff, 1990; Yee, 1989; Lin *et al.*, 1985).

TABEL 2.2
DIE GENETIESE STRUKTURE EN DIE CHROMOSOOMPOSISIES VAN DIE HEMATOPOÏETIESE GROEIFAKTORE

HGF	CHROMOSOOM POSISIE	GEEN GROOTTE (kbp)	AANTAL EKSONS	mRNA (kbp)
IL-3	5q23-31	≈ 3.2	5	1
GM-CSF	5q23-31	2.5	4	0.7
M-CSF	5q33.1	≈ 21	10	4.2 - 1.6
G-CSF	17q21-22	2.5	5	1.6
EPO	7q11-22	2.1	5	1.6

(Uit: Aggarwal en Pocsik, 1992; Sieff, 1990; Foon, 1989)

2.3.3 Terapeutiese toepassings van die hematopoïetiese groeifaktore

Die terapeutiese toepassings van die HGF'e is hoofsaaklik gesetel in drie algemene areas (Clark en Kamen, 1987), naamlik herstel van hematopoïetiese disfunksie deur seltellings te verhoog van lae na normale waardes, die verhoging van die aktiwiteit van die gasheerverdedigingsisteme teen infeksies en moontlik teen kwaadaardige siektetoestande en die stimulering van die hiperproduksie van funksioneel-gerigte effektorselle tydens mielo-onderdrukking as gevolg van radio- en chemoterapie (Clemens, 1991; Clark en Kamen, 1987). Hierdie terapeutiese toepassings word in Tabel 2.5 saamgevat. Soos vroeër genoem, gaan die terapeutiese toediening van sitokiene gepaard met nuwe effekte soos opgesom in Tabel 2.5. Die nuwe effekte kan egter suksesvol behandel word (Yee, 1989). Dit is in *in vivo* en in pre-kliniese studies aangetoon dat IL-3 en GM-CSF in kombinasie meer effektief is as wat die enkele komponente alleen is (Hoelzer *et al.*, 1991; Oster *et al.*, 1991; Sieff, 1990; Morstyn *et al.*, 1989). Op grond hiervan word die stelling gemaak dat die toekomstige toepassing van die HGF'e gesetel is in die gebruik van kombinasies van die HGF'e (Moore, 1991).

Omdat die titel van hierdie studie die klonering en uitdrukking van die mensgeen vir IL-3 is, word in die volgende Afdelings die eienskappe van IL-3 in meer besonderhede beskryf.

2.4 INTERLEUKIN-3

2.4.1 Geenstruktuur en chromosoomposisie

Die mens IL-3 geen strek oor 3 200bp en is ingedeel in vyf klein eksone en vier introne (Yang en Clark, 1989). Die eerste ekson kodeer vir 54 aminosure, die tweede vir 14 aminosure, die derde vir 30 aminosure, die vierde vir 14 aminosure en die vyfde ekson vir 40 aminosure (Yang, *et al.*, 1986). Die eerste en vierde introne is onderskeidelik 98bp en 104bp groot (Yang *et al.*, 1986) terwyl die tweede intron ongeveer 1.3kbp groot is en die derde intron ongeveer 90bp groot is (Yang en Clark, 1989).

Die 5'-nie tranleerbare gebied van die geen strek oor 350bp (Yang en Clark, 1989) en bevat

TABEL 2.3
DIE PROTEÏENEIENSKAPPE VAN DIE HEMATOPOÏETIESE GROEIFAKTORE

HGF	MOLEKULêRE MASSA (kDa) ^a	AANTAL AMINOSURE	LENGTE VAN SEINPEPTIED ^b	pI (pH)
IL-3	15-17	133	19	4.7-7.2
GM-CSF	18-32	127	25	3.4-4.5
M-CSF	45-90	> 150	32	3.0-5.0
G-CSF	19.6	174/177	30	5.5-6.1
EPO	34-36	166	27	4.0-5.0

^a Volwasse post-tranlasonale geprosesseerde proteïen.

^b Aantal aminosure.

^c Verwys na suikerkettings wat aan asparagienresidue gekoppel is soos wat voorspel is vir die aminosuurvolgorde Asn-X-Thr/Ser. N of O verwys na koppelpunte in die suikerkettings.

^d Dit dui op die aantal sisteïenaminosure wat in die proteïen voorkom vir die daarstelling van 'n sisteïenbrug. Twee sisteïenresidue is nodig vir die vorming van een sisteïenbrug.

(Uit: Aggarwal en Pocsik, 1992; Clemens, 1991; Arai *et al.*, 1990; Sieff, 1990; Foon, 1989; Sieff, 1987)

GLIKOSILERINGS-PUNTE ^c	SISTEIEEN RESIDUE ^d
2N	2
2N	4
2-4N OF O-GEKOPPEL	9
10	4
3N, 10	4

TABEL 2.4

DIE *IN VITRO* EN *IN VIVO* EIENSKAPPE VAN DIE HEMATOPOÏETIESE GROEIFAKTORE

HGF	<i>IN VITRO</i> EFFEK
IL-3	Groei, differensiasie van pluripotente stamselle, mastselvoorgangerselle, neutrofiele ens. Inhibisie van klas II MHC antigeenuitdrukking geïnduseer deur IFN- γ in mastselle. Vrystelling van mediators in basofiele. Fagositose in makrofage, induksie van funksies in eosinofiele.
GM-CSF	Proliferasie van granulosisiet-makrofaag, eosinofiel, eritroïed (+EPO), megakariosiet en T-limfoïed (+IL-2) voorgangerselle. Aktivering van granulosisiete en makrofage. Verhoog fagositose. Chemotaksis van neutrofiele en monosiete.
M-CSF	Proliferasie, differensiasie van primitiewe hematopoïetiese selle tot makrofaagvoorganger makrofage (sinergisties met IL-1, IL-3, IL-6 en IL-3, GM-CSF respektiewelik). Verhoog leukemiese blastsel differensiasie tot monosiete en makrofage. Proliferasie van monosiete, makrofage alleen of sinergisties saam met GM-CSF, TNF- α . Induseer sintese van IL-1, G-CSF, IFN- γ en TNF in monosiete en makrofage.
G-CSF	Proliferasie, differensiasie van mieloïed voorgangers tot in die neutrofiellyn. Proliferasie van vroeë voorgangerselle in samewerking met IL-3. Proliferasie, differensiasie van sommige mieloïed leukemiese sellyne. Induksie van superoksied produksie, fagositose, vashegting en ADCC in neutrofiele. Induksie van migrasie en proliferasie van endoteelselle.
EPO	Proliferasie, differensiasie van eritroïedvoorgangerselle tot volwasse rooibloedselle. Proliferasie van megakariosiete.

(Uit: Aggerwal en Pocsik, 1992; Clemens 1991; Arai *et al.*, 1990; Yang en Clark, 1989; Sieff, 1987).

<i>IN VIVO</i> EFFEK
Verhoog Hematopoïese
Mielopoïese
Verhoog Mielopoïese Anti-kanker Oteoklas produksie
Neutrofilie Verhoog Mielopoïese Anti-mikrobies en anti- fungus aktiwiteit
Verhoog Eritropoïese

TABEL 2.5
TERAPEUTIESE AANWENDING VAN DIE HEMATOPOÏETIESE GROEIFAKTORE

HGF	TERAPEUTIESE AANWENDING	NEWE EFFEKTE
IL-3	Gevorderde neoplasmas. Sekondêre hematopoïetiese disfunksie	Koors. Koue koors. Naarhied. Vomering. Hoofpyn. Beenpyne. Lokale eriteem. Letargie en depressie.
GM-CSF	Outoloë beenmurgoorplantings vir nie-Hodgkin's limfomas. Hodgkin's se limfoma. Hodgkin's se siekte. Akute limfositiese leukemia. Allogeniese beenmurgoorplantings vir leukemia. Mielodisplastiese sindrome/aplastiese anemia. Kanker-chemoterapie geassosieerde mielo- onderdrukking. Vigs, en anti-vigs behandeling geassosieerde mielo- onderdrukking	Koors. Koue koors. Naarheid. Anoreksia. Fibrositis. Beenpyne. Lokale eriteem. Inflammasie by plek van inspuiting. Malaise. Astenie.
M-CSF	Soliede gewasse. Borskanker. Fungus infeksies. Akute mielogeniese leukemia.	
G-CSF	Nie-miëloïede kwaadaardigheid geassosieer met chemoterapie geïnduseerde mielo- onderdrukking. Mielodisplastiese sindrome. Ernstige kroniese neutropenia. Akute miëloïed leukemiese beenmurgoorplantings.	Beenpyne. Anemia. Koors.
EPO	Anemie geassosieer met kroniese renale disfunksie. Chemoterapie. Vigs. AZT-behandeling. Rheumatoïede artritis. Outoloë bloedskenking voor operasies. Kompensering van chirurgiese bloedverlies	Hipertensie. Verhoogde bloedstolling.

(Uit: Aggarwal en Pocsik, 1992; Cowling en Dexter, 1992; Clemens, 1991; Oster *et al.*, 1991; Sieff, 1990; Yee, 1989).

net soos die GM-CSF geen verskeie karakteristieke volgordes soos CLE1, CLE2 en 'n GC-ryke gebied tussen posisies -127 en -49 (Arai *et al.*, 1990). 'n TATA homologie kom voor asook 'n promotor terwyl daar nie 'n versterkervolgorde (enhancer) voorkom nie (Arai *et al.*, 1990).

Die 3'-nie transleerbare gebied strek oor 380 nukleotiede en bevat 'n herhalende ATTTA element (Yang en Clark, 1989). Hierdie element beïnvloed die stabiliteit van die mRNA (Shaw en Kamen, 1986) en die verwydering van hierdie element uit die mRNA van IL-6 het die mRNA drie-voudig gestabiliseer (Tonouchi *et al.*, 1989).

Uitdrukking van die IL-3 geen is beperk tot slegs T-limfosiete en geaktiveerde natuurlike moordselle (Yang en Clark, 1989) en lewer 'n IL-3 mRNA van ongeveer 1kb (Aggarwal en Pocsik, 1992; Yang *et al.*, 1986). Die cDNA-volgorde van IL-3 word in Figuur 2.2 gegee.

Die IL-3 geen is gelokaliseer in die langarm van chromosoom 5, band q23-31 (Yang en Clark, 1989; Le Beau *et al.*, 1987).

2.4.2 Proteïenstruktuur van die IL-3 proteïen

Die IL-3 proteïen is teen verskillende grade geglikosileer en dit verklaar die heterogene spektrum van molekulêre massas van die proteïen, naamlik 14-30kD (Oster, *et al.*, 1991). Die proteïen het twee N-gekoppelde suikerkettings (Cowling en Dexter, 1992) wat aan asparagien gekoppel is volgens die konsensus volgorde Asn-X-Thr/Ser (Aggarwal en Pocsik, 1992; Parekh *et al.*, 1989). Aktiewe konformasie van die proteïen word verseker deur 'n sisteïenbrug wat tussen Cys-35 en Cys-103 daargestel word (Cowling en Dexter, 1992). Die pI-waarde van die proteïen is 4.7-7.2 (Aggarwal en Pocsik, 1992). Interleukin-3 word gesintetiseer as 'n propeptied van 152 aminosure (Yang *et al.*, 1986) waarna die seinpeptied (Perlman en Halvorson, 1983) van 19 aminosure afgesplyt word (Yang *et al.*, 1986). Die volwasse IL-3 proteïen bestaan uit 133 aminosure met alanien as die aminoterminale aminosuur (Yang *et al.*, 1986).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
CAGAGCCCCACGAAGGACCAGAACAAGACAGAGTGCCCTCCTGCCCGATCCAAAC ATG AGC CGC CTG CCC GTC CTG CTC CTG CTC CAA
      MET Ser Arg Leu Pro Val Leu Leu Leu Leu Gln
                                     10
      90      100     110     120     130     140     150     160
CTC CTG GTC CGC CCC GGA CTC CAA GCT CCC ATG ACC CAG ACA ACG CCC TTG AAG ACA AGC TGG GTT AAC TGC TCT
Leu Leu Val Arg Pro Gly Leu Gln ALA Pro Met Thr Gln Thr Thr Pro Leu Lys Thr Ser Trp Val Asn Cys Ser
                                     20
                                     (1) 30

      170     180     190     200     210     21122 220     230
AAC ATG ATC GAT GAA ATT ATA ACA CAC TTA AAG CAG CCA CCT TTG CCT TTG CTG|GAC TTC AAC AAC CTC AAT GGG
Asn Met Ile Asp Glu Ile Ile Thr His Leu Lys Gln Pro Pro Leu Pro Leu Leu|Asp Phe Asn Asn Leu Asn Gly
      (20) 40                                     (30) 50                                     1222 (40) 60

      240     250     2133     260     270     280     290     300
GAA GAC CAA GAC ATT CTG ATG|GAA AAT AAC CTT CGA AGG CCA AAC CTG GAG GCA TTC AAC AGG GCT GTC AAG AGT
Glu Asp Gln Asp Ile Leu Met|Glu Asn Asn Leu Arg Arg Pro Asn Leu Glu Ala Phe Asn Arg Ala Val Lys Ser
                                     2333(50)70                                     (60) 80

      310     320     330     3144     350     360     370
TTA CAG AAC GCA TCA GCA ATT GAG AGC ATT CTT AAA|AAT CTC CTG CCA TGT CTG CCC CTG GCC ACG GCC GCA CCC
Leu Gln Asn Ala Ser Ala Ile Glu Ser Ile Leu Lys|Asn Leu Leu Pro Cys Leu Pro Leu Ala Thr Ala Ala Pro
      (70) 90                                     3144 100                                     (90)110
                                     (80)

      4155     390     400     410     420     430     440     450
ACG CGA CAT CCA ATC CAT ATC AAG GAC GGT GAC TGG AAT GAA TTC CGG AGG AAA CTG ACG TTC TAT CTG AAA ACC
Thr Arg His Pro Ile His Ile Lys Asp Gly Asp Trp Asp Glu Phe Arg Arg Lys Leu Thr Phe Tyr Leu Lys Thr
      4155                                     (100)120                                     (110)130

      460     470     480     490     500     510     520     530
CTT GAG AAT GCG CAG GCT CAA CAG ACG ACT TTG AGC CTC GCG ATC TTT TAG TCCAACGTCCAGCTCGTTCTCTGGGCCTTCT
Leu Glu Asn Ala Gln Ala Gln Gln Thr Thr Leu Ser Leu Ala Ile Phe ***
      (120)140                                     (130)150

      540     550     560     570     580     590     600     610     620     630
CACCACAGAGCCTCGGGACATCAAAAAACAGCAGAACTTCTGAAACCTCTGGGTCATCTCTCACACATCCAGGACCAGAAGCATTTTCACCTTTTCCTGC
      640     650     660     670     680     690     700     710     720     730
GGCATCAGATGAATTGTTAATTATCTAATTTCTGAAATGTGCAGCTCCCAATTTGGCCTTGTGCGGTTGTGTTCTCATTTTATCCCATTTGAGACTATTT
      740     750     760     770     780     790     800     810     820     830
ATTATGATGATGTATGTAATTTATTTATTTATTTGCTGGAGTGTGAAGTGTATTTATTTATTTAGCAGAGGACCATGTCTCTGCTTCTGCAAAAACTCAG
      840     850     860     870     900     910     920     930
AGTGGGGTGGGGACCATGTTTCATTTTGTACCTCGAGTTTTAAACTGGTTCCTAGGGATGTTGAGAAATAAATACTAGACTCTGAAC

```

FIGUUR 2.2
cDNA-VOLGORDE VAN IL-3

Die N-terminale aminosuur van die 152-aminosuur propeptied, naamlik metionien, sowel as die N-terminale aminosuur van die 133-aminosuur volwasse proteïen, naamlik alanien, is **donkergedruk**. Die seinpeptiedgedeelte is onderstreep. N-glikosileringsgebiede is met dubbellyne onderstreep terwyl die onstabiliteitsvolgordes (ATTTA) **donker** gedruk is. Die sisteïene wat die sisteïenbrug vorm, naamlik Cys-35 en Cys 103, is ook **donker** gedruk. Eksongrense word aangedui met die nommer van die voorafgaande ekson en die volgende ekson. Nukleotiedvolgorde is aan die bo-kant genommer. Die propeptied is aan die onderkant in *kursiewe* nommers genommer terwyl die volwasse proteïen ook aan die onderkant genommer is met die nommers wat in hakies () is.

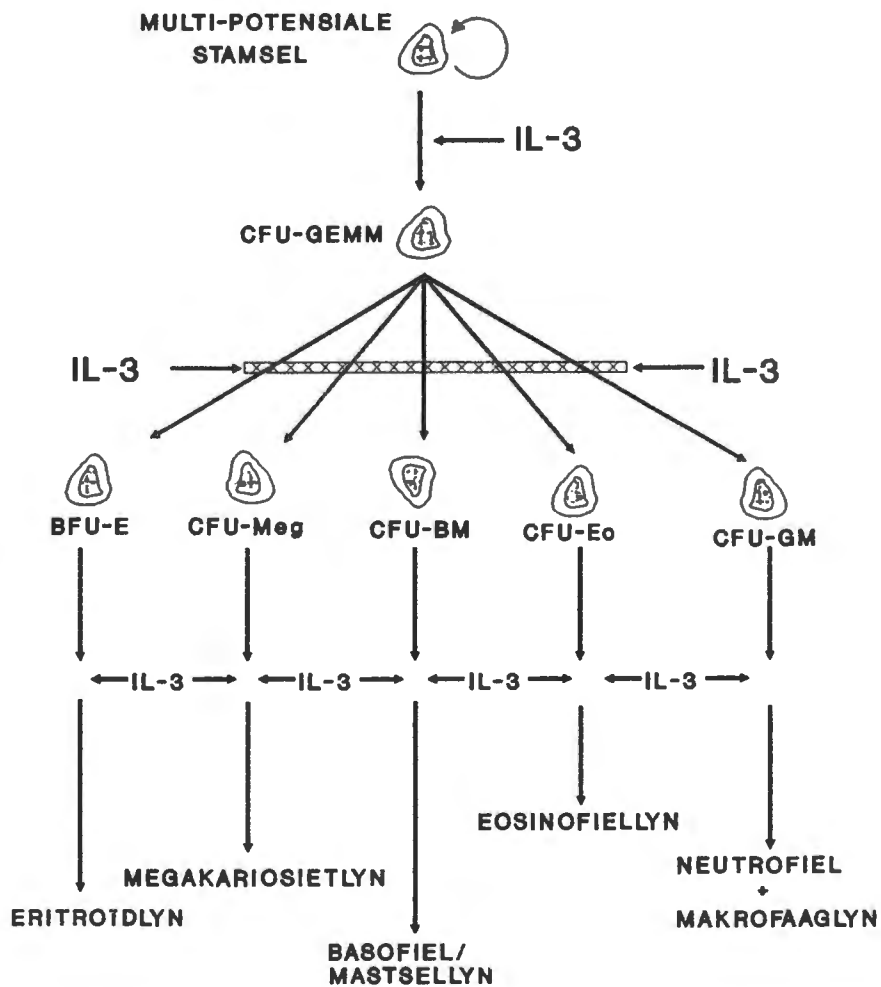
(Uit: Otsuka *et al.*, 1988; Yang *et al.*, 1986)

2.4.3 Biologiese eienskappe van IL-3

IL-3 stimuleer die groei en differensiasie van pluripotente hematopoïetiese stamselle wat lei tot die produksie van al die verskillende bloedselle naamlik makrofage, granulose, megakariosiete, eritrosiete, eosinofiele en mastselle (Figuur 2.3) (Clemens, 1991; Arai *et al.*, 1990; Yang en Clark, 1989; Yang *et al.*, 1986). Baie vroeg tydens hematopoïese het die proteïene die differensiasie van multi-potensiale stamselle in CFU-GEMM (kolonie-vormings-eenheid vir granulose, eritrosiete, monosiete en megakariosiete) tot gevolg wat die voorgangers is vir die eritroïed- en mieloïedlyne (Clemens, 1991; Yang en Clark, 1989). IL-3 bevorder ook die proliferasie van laterstadium enkel-lyn voorgangerselle (Figuur 2.3) (Clemens, 1991). Die proteïene werk sinergisties saam met die lynbeperkte HGF'e soos G-CSF, M-CSF, EPO en IL-5 deur stimulering van proliferasie en differensiasie van voorgangerselle (Clemens, 1991). IL-3 versterk ook mieloïed-eindselfunksies soos fagositose, antiliggaam-afhanklike-sellulêretoksiteit, eosinofiel metabolisme en monosietitoksiteit (Ganser *et al.*, 1990a).

2.4.4 Terapeutiese toepassings van IL-3

IL-3 is baie suksesvol in die behandeling van sekondêre hematopoïetiese disfunksies wat veroorsaak word deur chemo- en radioterapie, AZT-behandeling van HIV-pasiënte en beenmurgoorplantings (Aggarwal en Pocsik, 1992). Die grootse oorsaak van dood in hierdie pasiënte as gevolg van die sekondêre hematopoïetiese disfunksie, is infeksies en inwendige bloeding (Falk *et al.*, 1991). Die behandeling van hierdie pasiënte is beperk tot rooibloedsel- en bloedplaatjie-oortappings asook antibiotika (Falk *et al.*, 1991). Met die toetreding van GM-CSF en G-CSF tot die terapeutiese veld, is daarin geslaag om die aantal leukosiete in pasiënte met sekondêre hematopoïetiese disfunksie te verhoog (Falk *et al.*, 1991). Hierdie twee faktore stimuleer egter nie megakariosiet proliferasie en rypwording nie (Falk *et al.*, 1991). Hoelzer *et al.*, (1991) het in fase I/II kliniese toetse met rhIL-3 en pasiënte met sekondêre hematopoïetiese disfunksies as gevolg van chemo- en radio-terapie, waargeneem dat IL-3 'n sesvoudige toename in die aantal sirkulerende bloedplaatjies tot gevolg gehad het in 63% van die rhIL-3 behandelde pasiënte. Dit het tot gevolg gehad dat bloedplaatjie-oortappings in



FIGUUR 2.3
AKTIWITIETE VAN IL-3 TYDENS HEMATOPOÏESE

- CFU-GEMM - Kolonie-vormingseenheid vir granulosite, eritrosiete, monosiete en megakariosiete.
- BFU-E - Eritrosietvormingseenheid.
- CFU-Meg - Kolonie-vormingseenheid vir megakariosiete.
- CFU-BM - Kolonie-vormingseenheid vir basofiele en mastselle.
- CFU-Eo - Kolonie-vormingseenheid vir eosinofiele.
- CFU-GM - Kolonie-vormingseenheid vir granulosite en monosiete.

(Uit: Clemens, 1991)

66% van die pasiënte nie meer nodig was nie. Daar is ook waargeneem dat die leukosietelling 3.7-voudig toeneem het. Dit is in ooreenstemming met die resultate van Falk *et al.*, (1991) wat met identiese kliniese toetse waargeneem het dat rhIL-3 die aantal sirkulerende bloedplaatjies tot so 'n mate verhoog het dat bloedplaatjie-oortappings in 66% van die behandelde pasiënte vir meer as 10 maande nie nodig was nie. Daar is ook waargeneem dat die leukosietellings dramaties gestyg het. Dieselfde resultate is verkry deur Oster *et al.*, 1991; Ganser *et al.*, 1990a en Ganser *et al.*, 1990b. Dieselfde outeurs het egter waargeneem dat die styging in die rooibloedseltellings nie genoegsaam is om rooibloedseloortappings te staak nie.

IL-3 is egter minder suksesvol in die behandeling van primêre hematopoïetiese disfunksies (Ganser *et al.*, 1990a). Primêre hematopoïetiese disfunksies is siektetoestande soos aplastiese anemie en mielo-displastiesesindrome. Die patogenese van hierdie kondisies is baie uitlopend en behels onder andere totale of afwykende proliferasie en differensiasie van hematopoïetiese voorgangerselle, immuun-gemedieerde onderdrukking van voorgangerselle en mikro-omgewingdisfunksies (Ganser *et al.*, 1990c). Die algemeenste oorsaak van dood in hierdie pasiënte is infeksies en bloeding (Ganser *et al.*, 1990c). Moontlike redes vir die matige effek wat IL-3 in die geval van bogenoemde siektetoestande het, is dat daar 'n algemene tekort van stamselle in hierdie pasiënte is as gevolg van hulle siektetoestand asook onvoldoende produksie van sinergistiese hematopoïetiese groeifaktore (Falk *et al.*, 1991; Ganser *et al.*, 1990c). Kliniese toetse met GM-CSF en G-CSF het soortgelyke gematige respons gelever, waarskynlik om dieselfde redes (Falk *et al.*, 1991).

Ander terapeutiese toepassings van IL-3 word in die literatuur beskryf (Herrmann en Vellenga, 1990; Kannourakis en Johnson, 1990; Kobayashi *et al.*, 1990; Millar *et al.*, 1990; Schuitemaker *et al.*, 1990; Steward *et al.*, 1990).

IL-3 is dus 'n baie potente stimuleerder van trombopoïese, leukopoïese en eritropoïese in die mens (Ganser *et al.*, 1990b; Hoelzer *et al.*, 1991). Die nuwe effekte geassosieerd met die toediening van IL-3 aan pasiënte is egter gematig en kan met ander farmaseutiese middels behandel word (Hoelzer *et al.*, 1991; Oster *et al.*, 1991; Ganser *et al.*, 1990b) 'n Aspek wat egter baie duidelik na vore tree is die aanwending van IL-3 in kombinasie met ander HGF'e

soos GM-CSF (Hoelzer *et al.*, 1991; Oster *et al.*, 1991; Falk *et al.*, 1990; Ganser *et al.*, 1990a; Ganser *et al.*, 1990c) (Afdeling 2.3.2). Indien IL-3 en EPO byvoorbeeld saam toegedien word aan pasiënte met sekondêre hematopoïetiese disfunksie, kan eritropoïese geweldig bevorder word (Ganser *et al.*, 1990a). So ook kan die algemene stimulerings van hematopoïese bevorder word deur byvoorbeeld IL-3 aan pasiënte toe te dien om die voorgangerselle te stimuleer tot multi-lyn voorgangerselle en dan faktore soos GM-CSF, G-CSF, M-CSF en EPO later by te voeg om die ontwikkeling van gerigte effektorselle te induseer.

2.5 DOELSTELLING EN BENADERINGSWYSE

Die klonering van die gene van die HGF'e en die produksie van die betrokke proteïene in groot hoeveelhede met behulp van die rekombinante DNA tegnologie, het 'n omwenteling in die eksperimentele en kliniese hematologie tot gevolg gehad omdat genoegsame hoeveelhede van hierdie faktore beskikbaar gekom het om kliniese toetse te kan uitvoer (Sieff, 1991). Uit die suksesse wat reeds met die HGF'e behaal is, is dit duidelik dat die vraag na hierdie faktore geweldig gaan toeneem. Danksy biotegnologie is die gene van hierdie faktore gekloneer en die proteïene op groot skaal geproduseer. Opleiding in biotegnologie met die klem op die produksie van terapeuties belangrike mensproteïene, is dus essensieël vir die versekering van die lewering van hierdie faktore vir terapeutiese toepassings. Hierdie studie maak dan ook deel uit van 'n Biotegnologie program aan die Potchefstroomse Universiteit. Hematopoïetiese groeifaktore soos GM-CSF, G-CSF (Greeff, 1993) en IL-5 (Van der Westhuizen, 1993) is reeds gekloneer en suksesvol uitgedruk. Met die terapeutiese potensiaal van IL-3 en die klem wat gelê word op die gekombineerde aanwending van HGF'e, is dit dus voor die handliggend dat IL-3 ook gekloneer moet word vir die produksie van rhIL-3 en die lewering van 'n volledige spektrum HGF'e aan die plaaslike mark.

Die doelstelling van hierdie studie is dus eerstens om die mensgene vir IL-3 te kloner en uit te druk en tweedens om opleiding in Biotegnologie te bekom.

Die benaderingswyse wat gevolg is, was om oligonukleotiedpeilers en voorvoeders te

ontwerp waarmee biblioteke afgetas kan word vir die isolering van die IL-3 geen. Die oligonukleotiede is ook as voorvoeders vir PCR aangewend om peilers vir die aftasting van biblioteke te verkry. Ter wille van opleiding is 'n IL-3 geen in 'n eukariotiese en 'n prokariotiese uitdrukkingssisteem uitgedruk waarna die teenwoordigheid van die IL-3 proteïen met 'n aantal tegnieke aangetoon is.

HOOFSTUK 3

DIE VERKRYGING VAN PEILERS VIR DIE KLONERING VAN DIE MENS IL-3 GEEN

3.1 INLEIDING

Vir die klonering en uitdrukking van die mens IL-3 geen, word die genomiese- of cDNA vorm van die geen benodig. Navorsers kon egter vir 'n lang tyd nie daarin slaag om die teenwoordigheid van die mens IL-3 geen of 'n proteïen wat soortgelyk is aan die rot IL-3 aan toon nie (Cohen *et al.*, 1986). Die waarneming dat mens GM-CSF oor multi-potente aktiwiteit beskik (Sieff *et al.*, 1985) het aanleiding gegee tot spekulasie dat die mens IL-3 geen verlore gegaan het tydens evolusie en dat IL-3 se funksies in die mens deur GM-CSF oorgeneem is (Emerson *et al.*, 1985).

Yang *et al.*, (1986) was die eerste om 'n cDNA-kloon wat kodeer vir 'n nuwe primate kolonie-stimuleringsfaktor vanuit 'n cDNA biblioteek van 'n Gibbon T-sellyn te isoleer. Die aminosuurvolgorde van hierdie nuwe proteïen het beduidende ooreenstemming vertoon met die aminosuurvolgorde van die rot IL-3. Hierdie cDNA is toe as 'n peiler aangewend om 'n soortgelyke proteïen uit 'n mens genomiese biblioteek te isoleer. Klone wat so verkry is, is onderwerp aan aminosuur- en nukleotiedvolgordevergelykings met Gibbon en rot IL-3 volgordes. Op grond van die sterk ooreenkomste wat waargeneem is ten opsigte van die aminosuur- en nukleotiedvolgordes en ekson/intron rangskikking, is die mens IL-3 geen geïdentifiseer.

Dorssers *et al.*, (1987) het die 3'-nie-transleerbaregebied van muis IL-3 as peiler gebruik vir die aftasting van 'n ConA- en TPA-gestimuleerde mens limfosiet cDNA biblioteek. Hierdeur is aangetoon dat die mens IL-3 geen wel uitgedruk word en dat hierdie geen vir 'n biologies-aktiewe proteïen kodeer wat oor dieselfde biologiese-aktiwiteite as muis IL-3 beskik. Otsuka

et al., (1988) het met behulp van oligonukleotiede die mens IL-3 cDNA uit geaktiveerde T-selle geïsoleer. Hierdeur het hulle aangetoon dat die mens IL-3 mRNA, net soos die muis IL-3 mRNA, in T-selle uitgedruk word en vir 'n biologies-aktiewe proteïen kodeer wat multi-potensiële stamselle stimuleer.

Die identiteit van die mens IL-3 geen is deur bogenoemde outeur finaal bevestig. Met die cDNA-volgorde van mens IL-3 geen bekend, kon alternatiewe metodes aangewend word om IL-3 cDNA vir kloneringsdoeleindes te verkry. Die ontwikkeling van oligonukleotiedsintesetegniese het gevorder tot by die punt waar 'n geen gesintetiseer kan word. Phillips *et al.*, (1989) het 'n sintetiese mens IL-3 geen ontwerp en gesintetiseer. Hierdie geen is gebaseer op die IL-3 cDNA-volgorde van Yang *et al.*, (1986). Die sintetiese geen het vir 'n biologies-aktiewe proteïen gekodeer.

Die teenwoordigheid van die mens IL-3 geen is aangetoon en die nukleotiedvolgorde van mens IL-3 cDNA deur verskeie navorsers bepaal (Otsuka *et al.*, 1988; Dorssers *et al.*, 1987; Yang *et al.*, 1986). Vir die uitvoering van hierdie projek kon dus enige van die genoemde metodes aangewend word om die mens IL-3 geen te verkry. Selfs die metode wat deur Philips *et al.*, (1989) gevolg is, kon gevolg word om 'n IL-3 geen te verkry. Vir hierdie studie is egter besluit om die mens IL-3 geen met behulp van spesifieke peilers uit 'n cDNA of genomiese biblioteek te isoleer. Hierdie besluit is geneem grootliks op grond van die opleidingspotensiaal van hierdie benaderingswyse. In hierdie hoofstuk word die verkryging van peilers vir die isolering van 'n mens IL-3 geen bespreek met spesiale verwysing na:

1. Die ontwerp en sintese van oligonukleotiede wat as peilers en multi-funksionele DNA-fragmente kan dien.
2. Standarisering van PCR-kondisies vir die verkryging van IL-3 spesifieke peilers.

3.2 OLIGONUKLEOTIEDE

Ongeveer drie dekades gelede was organiese chemici die enigste persone wat belangstelling

getoon het in die sintetiese oligodeoksiribonukleotiede (oligonukleotiede). Geen biologiese toepassings het destyds vir die oligonukleotiede bestaan nie (Itakura *et al.*, 1984). Vandag is daar byna geen veld in die biologie waar oligonukleotiede nie gebruik word of die potensiaal het om gebruik te kan word nie (Caruthers, 1985). Ge-outomatiseerde apparaat en die kommersiële beskikbaarheid van sintesereagense het die beskikbaarheid en aanwending van oligonukleotiede 'n alledaagse verskynsel gemaak (Caruthers, 1985). Die hoof aanwending van oligonukleotiede is gesetel in die vermoë van oligonukleotiede om stabiele Watson-Crick basepare met komplementêre DNA of RNA te vorm (Itakura *et al.*, 1984). Die oligonukleotiede kan dus spesifiek hibridiseer aan komplementêre DNA of RNA (Conner *et al.*, 1983; Suggs *et al.*, 1981). Dit maak van die oligonukleotiede ideale peilers vir die aftasting van biblioteke (Caruthers, 1985). Die sintese van oligonukleotiede is 'n baie duur proses en om die rede is dit noodsaaklik om die oligonukleotiede so te ontwerp dat hulle multi-funksioneel is. Die oligonukleotiede wat benodig was vir hierdie projek, is so ontwerp dat hulle aangewend kon word vir :

- Peilers vir die aftasting van genomiese of cDNA biblioteke.
- Voorvoeders tydens PCR.
- Voorvoeders tydens voorvoerderverlengingsanalises.
- Volgordebepaling van die geen of cDNA.

Wanneer oligonukleotiede as peilers gebruik word vir die aftasting van cDNA-biblioteke, moet die oligonukleotiedpeilers se teikengebiede komplementêr wees aan die proteïen se koderende gebied. Sulke peilers sal gevolglik ook geskik wees vir die aftasting van genomiese biblioteke.

Die vermoë van oligonukleotiede om as voorvoeders vir PCR gebruik te word, is afhanklik van verskeie faktore (Kwok *et al.*, 1990). Die mees bepalende faktor vir sukses is egter in die nukleotiedsamestelling van die oligonukleotied gesetel. Voorvoerderlengtes van 18 tot 28 nukleotiede (Innis en Gelfand, 1990), 20 tot 30 nukleotiede (Coen, 1991) en 18 tot 22 nukleotiede (Lowe *et al.*, 1990) word in die literatuur voorgestel. Verder is dit belangrik dat die sin en anti-sin voorvoeders 'n geamplifiseerde gebied van tussen 100bp tot 600bp sal spesifiseer (Lowe *et al.*, 1990). *Taq*-polimerase beskik egter oor die vermoë om 'n gebied

van tot 2kb effektief te amplifiseer (Saiki, *et al.*, 1988).

Die GC-inhoud van die voorvoerder is bepalend vir die stewige en selektiewe hibridisering aan die templaar. Hoofsaaklik twee GC-inhoud spesifikasies kom in die literatuur voor, naamlik tussen 50% en 60% (Innis en Gelfand, 1990) of tussen 45% en 55% (Lowe *et al.*, 1990). Die GC-inhoud van 'n voorvoerder beïnvloed die T_m -waarde (hibridiseringstemperatuur) van die voorvoerder direk, volgens die algemene formule : $T_m = (nA + nT)2^\circ C + (nG + nC)4^\circ C$, waar $n \geq 0$ (Innis en Gelfand, 1990). Hiervolgens is dit duidelik dat G en C 'n baie groter invloed het op die T_m -waarde as A en T. 'n Lae GC-inhoud gee aanleiding tot 'n lae hibridiseringstemperatuur wat die diskriminasie vermoë van die voorvoerder negatief kan beïnvloed. 'n Hoër GC-inhoud verseker 'n hoër hibridiseringstemperatuur wat die selektiwiteit van die voorvoerder bevorder (Innis en Gelfand, 1990).

Daar moet gewaak word teen voorvoeders wat oor gebiede met poli-purien of poli-pirimidien volgordes beskik ter wille van 'n hoë GC-inhoud. Hierdie volgordes is besonder geneig om sekondêre strukture binne die voorvoerder te vorm wat die aanwending van die voorvoerder feitlik onmoontlik maak (Coen, 1991). Deur die 3'-kant van die voorvoerder redelik GC-ryk te maak, word verseker dat die 3'-kant van die voorvoerder stewig en ongehinderd aan die templaar kan bind vir die inisiëring van die sintese van die komplementêre string deur *Taq*-polimerase. *Taq*-polimerase verleng die komplementêre DNA-string vanaf die 3'-kant van die voorvoerder (Lowe *et al.*, 1990). Daar moet ook gewaak word teen komplementariteit tussen voorvoerderpare, veral aan die 3'-termini van die voorvoeders want dit sal die vorming van voorvoerderdimere bevorder wat op sy beurt die opbrengs van die verlangde produk verlaag (Coen, 1991; Innis en Gelfand, 1990).

Indien die volgorde van die voorvoerder doelbewus verander moet word, om byvoorbeeld 'n bepaalde restriksiepunt te skep (Scharf *et al.*, 1986) is dit belangrik om sulke nukleotiedveranderinge nader aan die 5'-kant van die voorvoerder aan te bring. Die rede hiervoor is om te verseker dat die 3'-kant van die voorvoerder onveranderd bly om stewig aan die templaar te kan bind sodat inisiasie van kettingverlenging optimaal kan plaasvind (Lowe *et al.*, 1990). Indien moontlik, moet 'n paar G of C nukleotiede aan weerskante van

die veranderde nukleotiede voorkom om as 'n klamp te dien vir die hegting van die voorvoerder (Scharf, 1990).

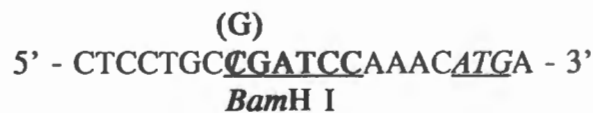
Die oligonukleotiede moet ook as voorvoeders tydens voorvoederverlengingsanalise gebruik kan word. Vir hierdie doel moet die oligonukleotiede se teikengebiede komplementêr wees aan die proteïenkoderende gebied in die betrokke RNA (Gruissem *et al.*, 1986). Sodra die volgorde van 'n geen of cDNA bepaal moet word, kan dit van groot hulp wees indien die voorvoeders wat aangewend word die inisiasie en terminasie kodons van die betrokke geen sal insluit. Op die manier kan die korrekte leesraam maklik opgespoor word en die korrektheid van die rekombinante geen of cDNA bepaal word.

3.2.1 IL-3 Oligonukleotiede

Die cDNA-volgorde van die mens IL-3 geen wat deur Otsuka *et al.*, (1988) bepaal is, is gebruik om nukleotiedvolgordes te identifiseer wat as multi-funksionele oligonukleotiede kan funksioneer. Die cDNA-volgorde bestaan uit meer 5'-nie-transleerbare nukleotiede waaruit oligonukleotiedvolgordes geïdentifiseer kan word. Die ander gepubliseerde IL-3 cDNA-volgordes strek nie so ver stroomop nie (Dorssers *et al.*, 1987; Yang *et al.*, 1986). Geen inligting oor die nukleotiedvolgorde van die introns van die IL-3 geen is bekend nie en slegs die grootte van die eerste intron, naamlik 96bp, en die grootte van die vierde intron, naamlik 104bp, is bekend (Yang *et al.*, 1986). Die grootte van die tweede intron is bereken as 1270bp en die grootte van die derde intron is bereken as 100bp volgens die skaal van die langafstand restriksiekaart van die IL-3 geen (Yang en Clark, 1989). Die inbou van unieke restriksiepunte in die oligonukleotiede vir klonerings doeleindes is slegs gebaseer op rekenaarbemiddelde restriksiepuntanalises van die beskikbare cDNA-volgordes. Vir die rekenaaranalises is Beckman se MicroGenie[®] programmatuur, weergawe 5, gebruik. Die voorkoms van die restriksiepunte in die introns kon gevolglik nie in ag geneem word nie. Die kloneringsvektore pSP64 en pSP65 (Melton *et al.*, 1984) beskik oor 'n funksionele multi-klonerings gebied. Omdat hierdie vektore ook reeds in die laboratorium beproef is, is besluit om die vektore aan te wend vir die klonering van die PCR-produkte. Die verskeidenheid restriksiepunte van die multi-klonerings gebiede van pSP64 en pSP65 en die volgordes van die spesifieke

oligonukleotiede, is bepalend by die keuse van die restriksiepunte wat in die oligonukleotiede ingebou is.

Die riglyne wat in Afdeling 3.2 genoem is, is in ag geneem met die vasstelling van die onderskeie oligonukleotiedvolgordes. Die posisie van oligonukleotied IL-3 1A is eerste vasgestel en sodanig dat die inisiasiekodon ingesluit is en ook dat dit komplementêr is aan die anti-sin volgorde (Figuur 3.1). Hierdie posisie maak dit moontlik om die oligonukleotied aan te wend as voorvoerder tydens PCR en voorvoerderverlengingsanalises asook vir leesraambepaling tydens volgordebepaling. Die verandering van sitosien na guanien in die agtste posisie, was nodig om 'n *Bam* HI restriksiepunt in die volgorde van oligonukleotied IL-3 1A te skep. Hierdie restriksiepunt kan gebruik word vir klonering in pSP64 of pSP65. Oligonukleotied IL-3 1A is 21 nukleotiede lank en het 'n GC-inhoud van 52% en 'n T_m-waarde van 64 °C (Tabel 3.1). Die volgorde van oligonukleotied IL-3 1A is soos volg:



ATG - Inisiasie kodon.

'n Oligonukleotied wat die terminasiekodon insluit, is gekies sodat dit komplementêr is aan die sin volgorde en is genoem oligonukleotied IL-3 5B (Figuur 3.1). Hierdie oligonukleotied beskik oor dieselfde moontlikhede as oligonukleotied IL-3 1A. Die verandering van guanien na sitosien in posisie 7 was nodig om 'n *Sac* I restriksiepunt te skep. Oligonukleotied IL-3 5B is 21 nukleotiede lank en het 'n GC-inhoud van 52% en 'n T_m-waarde van 64 °C (Tabel 3.1). Die volgorde van oligonukleotied IL-3 5B is soos volg:

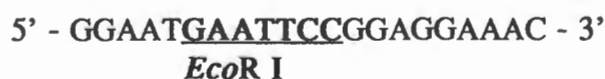


CTA - Komplementêr aan 5'-TAG -3' Terminasie kodon

Oligonukleotiede IL-3 1A en IL-3 5B kan gebruik word as 'n voorvoerderpaar vir PCR wat 'n produk van ongeveer 2000bp kan lewer wat strek vanaf die inisiasiekodon tot by die terminasiekodon van die IL-3 geen (Figuur 3.2).

Aangesien al die groottes van die onderskeie introns in die IL-3 geen nie presies bekend is nie, kan dit moontlik wees dat die werklike intronlengtes te lank kan wees vir PCR-vermeerdering van die totale geen vanaf genomiese DNA as templaar, wanneer oligonukleotied IL-3 1A en IL-3 5B as voorvoeders gebruik word (Afdeling 3.2). Om hierdie rede is dit nodig om 'n sin en anti-sin oligonukleotied wat in dieselfde ekson geleë is te kies sodat 'n PCR-fragment verkry word wat nie afhanklik is van die intronlengtes nie. 'n Redelike groot ekson word egter vir hierdie doel benodig. Ekson 5 is die grootste ekson van IL-3 en oligonukleotied IL-3 5B was reeds in 'n ideale 3'-posisie om op te tree as die sin voorvoerder vir PCR.

Oligonukleotied IL-3 5A is gevolglik ontwerp as die anti-sin oligonukleotied in die 5'-gedeelte van ekson 5, met die oog op PCR vermeerdering van ekson 5 (Figuur 3.1 en 3.2). 'n *Eco RI* restriksiepunt kom in die begin van die ekson voor en die posisie van oligonukleotied IL-3 5A is dus sodanig gekies om hierdie *Eco RI* restriksiepunt in te sluit (Figuur 3.1). Oligonukleotied IL-3 5A is 21 nukleotiede lank en het 'n GC-inhoud van 48% en 'n T_m-waarde van 62 °C (Tabel 3.1). Die volgorde van oligonukleotied IL-3 5A is soos volg:



--OLIGONUKLEOTIED IL-3 1A-->

10 20 30 40 (G) 50 60 70 80
CAGAGCCCCAGGAAGGACCAGAACAAGACAGAGTGCCTCCTGCATCCAAACATGAGCCGCCTGCCCGTCTGCTCCTG
GTCTCGGGGTGCTTCTCGTGTCTGTCTCAGCGGAGCAGGCTAGGTTGTACTCGGCGGACGGGCAGGACGAGGAC
90 100 110 120 130 140 150 160
CTCCAACCTCGTCCGCCCGGACTCCAAGCTCCCATGACCCAGACAACGCCCTTGAAGACAAGCTGGGTTAACTGCTC
GAGGTTGAGGACCAGGCGGGCCTGAGGTTGAGGGTACTGGGTTCTTGCGGGAACCTTCTGTTCCGACCCAATTGACGAG

170 180 190 200 210 220 230 240
TAACATGATCGATGAAATTATAACACACTTAAAGCAGCCACCTTTGCCTTTGCTG GACTTCAACAACCTCAATGGGGAAG
ATTGTACTAGTACTTTAATATTGTGTGAATTCGTCCGTGGAACGGAAACGAC CTGAAGTTGTTGGAGTTACCCCTTC

250 270 280 290 300 310 320
ACCAAGACATTTCTGATG GAAAAAACCTTCGAAGGCCAAACCTGGAGGCATTCAACAGGGCTGTCAAGAGTTTACAGAAC
TGGTTCTGTAAGACTAC CTTTTAFTGGAAGCTTCCGGTTTGGACCTCCGTAAGTTGTCCCGACAGTTCTCAAATGCTCTG

330 340 360 370 380 400
GCATCAGCAATTGAGAGCATTCTTAAA AATCTCCTGCCATGTCTGCCCCGGCCAGGGCCGACCCACG CGACATCCAAT
CGTAGTCGTTAACTCTCGTAAGAAATTT TTAGAGGACGGTACAGACGGGGACCGGTGCCGGCTGGGTGC GCTGTAGGTTA

--OLIGONUKLEOTIED IL-3 5A-->

410 420 430 440 450 460 470 480
CCATATCAAGGACGGTGAATGAAATTCGGAGGAAACTGACGTTCTATCTGAAAACCTTGAAGATGCGCAGGCTC
GGTATAGTTTCTGCCACTGACCTTACTTAAGGCCTCCTTTGACTGCAAGATAGACTTTTGGAACTCTTACCGCTCCGAG

490 500 510 520 530 540 550 560
AACAGACGACTTTGAGCCTCGCGATCTTTTACTCCAAAGTCCAGCTCGTTCTCTGGGCCTTCTACCCACAGAGCCTCGGG
TTGTCTGCTGAACTCGGAGCGCTAGAAAATCAGGTTGCAGGTCGAGCAAGAGACCCGGAAGTGGTGTCTCGGAGCCC

(C)

<--OLIGONUKLEOTIED IL-3 5B--

570 580 590 600 610 620 630 640
ACATCAAAAACAGCAGAACTTCTGAAACCTCTGGGTCATCTCTCACACATTCCAGGACCAGAAGCATTTCACCTTTTCCT
TGTAGTTTTTGTGCTTGAAGACTTTGGAGACCCAGTAGAGAGTGTGTAAGGTCCTGGTCTTCTGTAAGTGGAAAAGGA

650 660 670 680 690 700 710 720
GCGGCATCAGATGAATTGTTAATTACTAATTTCTGAAATGTGCAGCTCCCATTTGGCCTTGTGCGGTTGTGTTCTCATT
CGCCGTAGTCTACTTAAACAATTAATAGATTAAGACTTTTACCGTCCGAGGTAACCGGAACACGCCAACACAAGAGTAA

730 740 750 760 770 780 790 800
TTTATCCCATTTGAGACTATTTATTTATGTATGTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTA
AAATAGGGTAACTCTGATAAATAAATACATACATAAATAAATAAATAAATAAATACGGACCTCACACTTGACATAAATAAAT

810 820 830 840 850 860 870 880
GCAGAGGAGCCATGCTGCTGCTTCTGCAAAAACTCAGAGTGGGTGGGAGCATGTTCAATTTGTACCTCGAGTTTAA
CGTCTCCTCGGTACAGGACGACGAAGACGTTTTTTGAGTCTCAACCCACCCCTCGTACAAGTAAACATGGAGCTCAAAAT

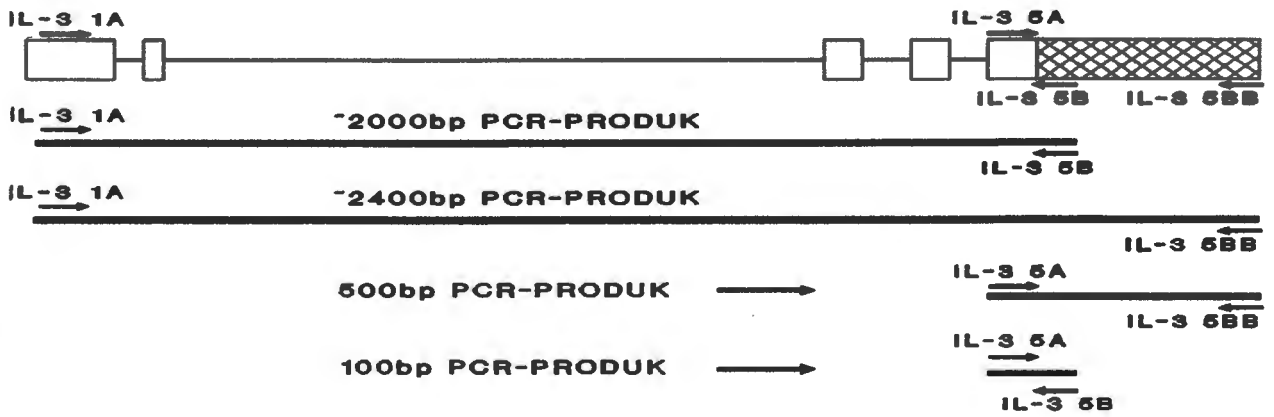
890 900 910 920
AACTGGTTCCTAGGGATGTGTGAGAATAAACTAGACTCTGAAC
TTGACCAAGGATCCCTACACTCTTATTTGATCTGAGACTTG

(A)

<--OLIGONUKLEOTIED IL-3 5BB--

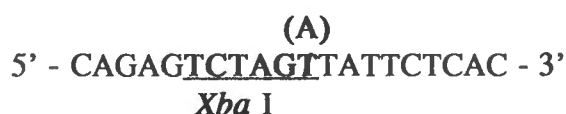
FIGUUR 3.1
POSISIES VAN DIE ONDERSKEIE OLIGONUKLEOTIEDE IN DIE cDNA-
VOLGORDE VAN IL-3

Die nukleotiede in hakies vervang die doodgetrekte nukleotied in die onderskeie oligonukleotiede. Pylpunte dui die rigting van die betrokke oligonukleotiede aan. Die eksongrense word deur die vertikale lyne aangedui. Die inisiësie en terminasië kodons is donker gedruk en onderstreep.



FIGUUR 3.2
SKEMATIESE VOORSTELLING VAN DIE POSISIES VAN DIE ONDERSKEIE IL-3
OLIGONUKLEOTIEDE IN DIE IL-3 GEEN EN DIE POTENSIELE PCR-PRODUKTE.

Om die grootte van ekson vyf optimaal te kon benut, is dit nodig om nog 'n oligonukleotiedvolgorde in die ekson te identifiseer, naamlik oligonukleotied IL-3 5BB. Die posisie van oligonukleotied IL-3 5BB is gekies om so ver as moontlik afstroom van die terminasie kodon te wees en is komplementêr aan die anti-sin string (Figuur 3.1). Die posisie van oligonukleotied IL-3 5BB maak dit dus moontlik om saam met die sin oligonukleotiede, IL-3 1A en IL-3 5A, as voorvoerders vir PCR op te tree (Figuur 3.2). Timien in posisie 11 is vervang met adenien, om 'n *Xba* I restriksiepunt te skep. Oligonukleotied IL-3 5BB is 20 nukleotiede lank en het 'n GC-inhoud van 40% en 'n T_m-waarde van 56 °C (Tabel 3.1). Die volgorde van oligonukleotied IL-3 5BB is soos volg:



3.2.1.1 Rekenaaranalise van die IL-3 oligonukleotiede

Die riglyne wat in Afdeling 3.2 gestel is vir die identifisering van oligonukleotiedvolgordes, kan nie die funksionaliteit van die oligonukleotiede as 'n enkelstring sintetiese DNA onder reaksiekondisies verseker nie. Onder reaksiekondisies kan van die oligonukleotiede moontlik op hulself terugvou en haarnaaldboë of voorvoerderdimere vorm (Coen, 1991; Lowe *et al.*, 1990). Die oligonukleotiede sal dan nie aan die hibridiseringsreaksies kan deelneem nie, soos byvoorbeeld PCR of biblioteekafasting. In die teenwoordigheid van genomiese DNA of mRNA, kan die oligonukleotiede moontlik nie meer in staat wees om aan hulle onderskeie spesifieke teikengebiede te hibridiseer nie. Nie-spesifieke hibridisering aan ander DNA- of mRNA-volgordes kan plaasvind wat tot gevolg sal hê dat nie-spesifieke produkte of selfs geen produkte gesintetiseer sal word nie (Mullis en Faloona, 1987). 'n Rekenaaranalise is uitgevoer met die geïdentifiseerde oligonukleotiedvolgordes om 'n aanduiding van die funksionaliteit van die oligonukleotiede te verkry. Vir die rekenaaranalises is Beckman se MicroGenie[®]

TABEL 3.1
SAMEVATTING VAN DIE EIENSKAPPE VAN DIE IL-3 OLIGONUKLEOTIEDE

Oligonu= kleotied	Volgorde en snitpunte	G/C INHOUD	Tm- WAARDE
IL-3 1A	KOMPLEMENTêR AAN ANTI-SIN (G) 5' - CTCCTGCTGATCCAAACATGA - 3' <i>Bam</i> HI <i>ATG</i> - Inisiasie kodon.	52%	64 °C
IL-3 5A	KOMPLEMENTêR AAN ANTI-SIN 5' - GGAATGAATTCCGGAGGAAAC - 3' <i>Eco</i> RI	48%	62 °C
IL-3 5B	KOMPLEMENTêR AAN SIN (C) 5' - CGAGCTCGACGTTGGACTAAA - 3' <i>Sac</i> I <i>CTA</i> - Komplementêr aan 5'-TAG - 3' Terminasie kodon	52%	64 °C
IL-3 5BB	KOMPLEMENTêR AAN SIN (A) 5' - CAGAGTCTAGTTATTCTCAC - 3' <i>Xba</i> I	40%	56 °C

Die doodgetrekte nukleotied is deur die nukleotied in hakkies vervang in die volgorde van die oligonukleotied vir die inbouing van unieke restriksiepunte

programmatuur, weergawe 5, gebruik. Die 62^{ste} vrystelling van GenBank^R (1990), is as databank gebruik.

Om te bepaal of die oligonukleotiede op hulle self kan terugvou, dit is of hulle sekondêre strukture kan vorm, is die "Compare within a sequence" funksie van die "Compare" afdeling van die rekenaarprogram gebruik. Hierdie rekenaarprogram word ook internasionaal versprei en is daarom in Engels. Metode 10 van die afdeling is aangewend omdat die funksie omgekeerde herhalings in 'n volgorde soek, wat 'n aanduiding kan gee van die moontlikheid van selfterugvouing van 'n oligonukleotied. Die parameterstellings van die rekenaarprogram wat die strengheid van die analyses bepaal, is so streng as moontlik gekies. Geen omgekeerde herhalings in die oligonukleotiede is deur die rekenaaranalise gevind nie. Daar kom dus nie volgordes in die oligonukleotiede voor wat die vorming van sekondêre strukture begunstig nie.

Om te bepaal of daar enige homologie tussen die onderskeie voorvoerderpare bestaan, is weer eens die "Compare" afdeling van die program gebruik. Die keer is die "Homology-" en die "Matrix Comparison" funksies van die afdeling aangewend. Die twee funksies soek homoloë gebiede in twee volgordes, maar maak van verskillende metodes gebruik. Ter wille van volledigheid is beide die funksies aangewend. Hierdie analise het geen homoloë gebiede in die voorvoerderpare geïdentifiseer nie. Elke oligonukleotied beskik dus oor 'n unieke volgorde met die gevolg dat daar nie kompetisie tussen die oligonukleotiede vir dieselfde teikenvolgorde behoort te wees nie.

Geen uitspraak kon egter gemaak word oor die komplementariteit tussen die voorvoerderpare nie. Komplementariteit tussen voorvoerderpare kan aanleiding gee tot die vorming van voorvoerderdimere, wat die voorvoeders ongeskik kan maak vir hibridiseringsreaksies. Die feit dat die volgorde van elke oligonukleotied uniek is, sluit nie die moontlikheid uit dat hulle dalk komplementêr aan mekaar kan wees nie. MicroGenie^R beskik nie oor 'n funksie wat die komplementariteit tussen twee volgordes kan bepaal nie. Deur van 'n indirekte metode gebruik te maak, kan hierdie probleem oorbrug word. Indien die spesifisiteit van binding van die oligonukleotiede onder baie streng kondisies bepaal word, kan daar ook 'n aanduiding gekry word oor die komplementariteit tussen die voorvoerderpare. Komplementêre

oligonukleotiede sal homolog wees aan die sens en anti-sens volgordes van dieselfde teikengebied en kan dan gevolglik ook aan mekaar bind. As elke oligonukleotied net homolog is aan sy unieke teikengebied tussen al die nukleotiedvolgordes vervat in Genbank^R, is die moontlikheid groot dat daar nie komplementariteit tussen die voorvoerderpare bestaan nie. Die "Search a DataBank" funksie van die "Databank" afdeling van MicroGenie^R is gebruik om die spesifisiteit van die oligonukleotiede te bepaal. Die analise is so uitgevoer dat enige homologie van 24% of meer tussen 'n oligonukleotied en 'n DNA-volgorde geregistreer is. Dit is onwaarskynlik dat 'n oligonukleotied met slegs 24% homologie aan 'n ander DNA-volgorde as peiler of voorvoerder onder reaksiekondisies sal kan optree. Indien daar dus 24% of meer homologie tussen 'n oligonukleotied en enige DNA-volgorde bestaan, is dit aanvaar dat die oligonukleotied spesifiek is vir meer as een DNA-volgorde en nie geskik is vir spesifieke hibridiseringsreaksies nie. Die nukleotiedvolgordes in die "Primate" databank is as teikenvolgordes aangewend. Ten spyte van die lae homologie vereiste van 24%, het die IL-3 oligonukleotiede slegs hul eie teikengebiede in IL-3 volgordes geïdentifiseer (Tabel 3.2).

TABEL 3.2
DNA-VOLGORDES IN DIE "PRIMATE" DATABANK (GENBANK^R) WAT DEUR
DIE IL-3 OLIGONUKEOTIEDE GEÏDENTIFISEER IS.

VOLGORDE GEÏDENTIFISEER	OLIGONUKEOTIED
Gibbon IL-3 mRNA (Yang <i>et al.</i> , 1986)	IL-3 5A IL-3 5B
Mens IL-3 mRNA (Yang <i>et al.</i> , 1986)	IL-3 5A IL-3 5B
Mens IL-3 mRNA (Otsuka <i>et al.</i> , 1988)	IL-3 1A IL-3 5A IL-3 5B IL-3 5BB
Mens multi-CSF* mRNA (Dorssers <i>et al.</i> , 1987)	IL-3 1A IL-3 5A IL-3 5B IL-3 5BB

* Ander naam vir IL-3 (Aggarwal en Pocsik, 1992).

Die identifisering van die Gibbon IL-3 geen deur die oligonukleotiede IL-3 5A en 5B, het geen invloed op die funksionaliteit van die twee oligonukleotiede omdat mens genomiese DNA en genetiese biblioteke gebruik is vir die verkryging van die mens geen vir IL-3. Al die IL-3 oligonukleotiede het slegs IL-3 volgordes tussen al die volgordes in GenBank^R uitgeken. Die oligonukleotiede het ook slegs hulle eie teikengebiede in die onderskeie IL-3 geenvolgordes geïdentifiseer. Ten spyte van die lae homologie vereiste van 24% wat gestel is, is geen ander gene geïdentifiseer nie. Nie een van die oligonukleotiede het ook 'n ander oligonukleotied se teikengebied, hetsy die sens of anti-sens volgorde, geïdentifiseer nie. Die oligonukleotiede is dus baie spesifiek vir hulle eie teikengebiede want hulle ken slegs hul eie teikengebiede baie akkuraat uit tussen al die ander volgordes wat in Genbank^R vervat is. Die oligonukleotiede is ook nie komplementêr aan mekaar nie.

3.2.1.2 Sintese en suiwing van die IL-3 oligonukleotiede

Die voorafgaande rekenaaranalises het getoon dat die nukleotiedvolgordes wat as oligonukleotiede beplan was, suksesvol behoort te wees in die uitvoering van al die genoemde reaksies waarvoor hulle geselekteer is. Gevolglik is die oligonukleotiede chemies gesintetiseer volgens die fosforamidietmetode (Caruthers *et al.*, 1987) met 'n Beckman SYS200A oligonukleotiedsintetiseerder. Beckmanreagense is deurgaans gebruik. Die post-sintese behandeling en suiwing van die oligonukleotiede is uitgevoer volgens 'n beskrywing in die Beckman Technical Bulletin no. 017 (1988) met geringe veranderinge. Na die sintese is die oligonukleotiedbevattende glasmatrikse tesame met die teflonfilters na 'n 1.5ml skroefdop Eppendorfbuis oorgedra. Die Eppendorfbuis is met 'n 33% Ammoniak-oplossing gevul. Na deeglike menging van die Eppendorfbuis se inhoud, is dit vir 20 minute by kamertemperatuur gelaat waarna dit vir 17 uur by 55 °C geïnkubeer is. Die oligonukleotiede word tydens hierdie behandeling van die glasmatrikse gesplyt en die beskermende bensoïel- en isobutirielgroepe van die primêre aminogroepe op die oligonukleotiedmonomere verwyder (Brown en Brown, 1991). Tydens die 17 uur inkubasie tydperk is die inhoud van die buise gereeld gemeng. Na inkubasie is die buise verkoel, die teflonfilters is verwyder en die glasmatrikse is deur ligte sentrifugering versamel. Die oligonukleotiedbevattende supernatant is afgetrek en na 'n nuwe Eppendorfbuis oorgedra waarna die ammoniak deur middel van vriesdroging uit die buise

verwyder is. Die gedroogde monsters is in 100 μ l van 'n 1M Ammoniumasetaatoplossing (pH 6.8) gesuspendeer waarna die mengsel vir 5 min by 90 $^{\circ}$ C verhit is om volledige oplossing te verseker. Na ligte sentrifugering is die supernant na 'n nuwe Eppendorfbuis oorgedra en die oligonukleotiede is versamel deur etanol presipitering oornag by -20 $^{\circ}$ C. Die presipitaat is twee maal met 70% etanol gewas, gedroog en in 500 μ l ddH₂O vir 30min by 37 $^{\circ}$ C gesuspendeer. Die konsentrasie van die oligonukleotiede is met behulp van UV-spektrofotometrie by 'n golflengte van 260nm bepaal. 'n Uitwissingskoëffisiënt van 25.5 mg/ml/cm. is in die berekenings gebruik. Die oligonukleotiedoplossings is hierna by -20 $^{\circ}$ C bewaar.

Ontsoute oligonukleotiede kan net so aangewend word vir biblioteekafstastingsreaksies, hibridiseringsreaksies en volgordebepalings (Caruthers, 1989). Vir ander toepassings, soos byvoorbeeld kloneringsreaksies en biofisiese reaksies, is dit nodig om die oligonukleotiede te suiwer deur middel van gelelektroforese of hoëdrukvlloeistofchromatografie (HPLC) (Caruthers, 1989). Gelelektroforese skei die oligonukleotiede op grond van grootte (Sambrook *et al.*, 1989) en 'n bepaling of oligonukleotiede van die regte lengte gesintetiseer is, kan gedoen word. Die IL-3 oligonukleotiede is gevolglik deur middel van akrielamiedgelelektroforese op 'n 20% akrielamiedgel gesuiwer (Sambrook *et al.*, 1989). Deur gelykertyd groottestandaarde te elektroforeer, is vasgestel dat al vier die IL-3 oligonukleotiede se lengtes korrek is (resultaat nie getoon nie). Na suiwing is die oligonukleotiede se konsentrasies bepaal soos voorheen beskryf en is hulle by -20 $^{\circ}$ C bewaar.

3.3 STANDAARDISERING VAN PCR-KONDISIES VIR DIE VERKRYGING VAN 'N IL-3 SPESIFIEKE PEILER

3.3.1 Inleiding

Om optimale sintese van die korrekte PCR-produkte te verseker, is dit nodig om die optimale MgCl₂-konsentrasie van die amplifiseringsbuffer vir elke voorvoerderpaar vas te stel. Dit is nodig omdat die MgCl₂-konsentrasie die mees kritiese veranderlike tydens PCR is (Coen, 1991). Die volgende aspekte kan almal deur die MgCl₂-konsentrasie beïnvloed word:

voorvoerderhibridisering, dissosiasietemperature van die templaar en die PCR-produk, vorming van voorvoerderdimere, ensiemaktiwiteit en akkuraatheid (Innis en Gelfand, 1990). Te same met die $MgCl_2$ -konsentrasie, speel die hibridiseringstemperatuur van die voorvoeders ook 'n baie belangrike rol. Die hibridiseringstemperatuur bepaal hoe spesifiek die voorvoeders aan 'n DNA-volgorde sal hibridiseer (Innis en Gelfand, 1990). Dit is dus ook noodsaaklik om die optimale hibridiseringstemperatuur van die voorvoeders vas te stel, veral omdat van die voorvoeders oor veranderde volgordes beskik. In hierdie Afdeling word die standaardisering van die $MgCl_2$ -konsentrasie en die standaardisering van die onderskeie hibridiseringstemperature vir die voorvoerderpare bespreek vir die amplifisering van die 500bp PCR-produk.

3.3.2 Optimalisering van die $MgCl_2$ -konsentrasie

Indien een komponent van 'n reaksie gestandaardiseer moet word, moet die ander reaksiekomponente so gekies word dat dit geen beperkende invloed op die reaksie sal uitoefen nie. Die onbekende groottes van die introns van die IL-3 geen kan veroorsaak dat geen PCR-produk of baie lae opbrengs verkry kan word, onafhanklik van die $MgCl_2$ konsentrasie. PCR met voorvoeders IL-3 1A en IL-3 5B, en IL-3 1A en IL-3 5BB is dus nie geskik vir die standaardisering van die $MgCl_2$ -konsentrasie nie (Figuur 3.2). Die amplifisering van die 500bp gebied in ekson vyf tussen die voorvoeders IL-3 5A en IL-3 5BB is 'n beter keuse. Dit is so omdat die 500bp PCR-produk die 100bp PCR-produk tussen voorvoeders IL-3 5A en IL-3 5B bevat en boonop strek die geamplifiseerde gebied nie oor introns nie. 'n Ideale hibridiseringstemperatuur vir voorvoeders tydens PCR is $5^\circ C$ laer as die T_m -waarde ($T_{m_{PCR}}$) (Innis en Gelfand, 1990). Volgens Coen (1991) en Innis en Gelfand (1990) is $55^\circ C$ 'n baie toepaslike en algemene hibridiseringstemperatuur vir voorvoeders tydens PCR. Die gemiddeld van die 500bp PCR-produk se twee voorvoeders se $T_{m_{PCR}}$ -waardes is $54^\circ C$ wat baie nader is aan $55^\circ C$ as die 100bp PCR-produk se voorvoeders wat $57^\circ C$ is (Tabel 3.3). Dit maak van die sintese van die 500bp PCR-produk 'n goeie kandidaat vir die standaardisering van die $MgCl_2$ -konsentrasie.

Die gemiddelde $T_{m_{PCR}}$ -waarde vir die voorvoeders IL-3 5A en IL-3 5BB is $54^\circ C$, $3^\circ C$ hoër

TABEL 3.3

OPSOMMING VAN DIE 100BP PCR-PRODUK EN DIE 500BP PCR-PRODUK SE T_m -WAARDES

VOORVOERDER PAAR	PCR-PRODUK	T_m	$T_{m_{PCR}}$ ($T_m - 5^\circ C$)	GEMIDDELD $T_{m_{PCR}}$
IL-3 5A IL-3 5B	100bp	62°C 64°C	57°C 59°C	58°C 54°C
IL-3 5A IL-3 5BB	500bp	62°C 56°C	57°C 51°C	

Die T_m -waardes is volgens die formule, beskryf deur Innis en Gelfand, (1990), uitgewerk. Die $T_{m_{PCR}}$ -waarde is verkry deur $5^\circ C$ van die T_m -waarde af te trek (Innis en Gelfand, 1989). Die gemiddelde $T_{m_{PCR}}$ -waardes is bepaal vir die twee voorvoeders wat saam aangewend sal word vir die betrokke PCR-reaksies.

as die $T_{m_{PCR}}$ -waarde vir oligonukleotied IL-3 5BB. Oligonukleotied IL-3 5BB bevat een nukleotiedverandering vir die inbouing van 'n *Xba* I restriksiepunt terwyl oligonukleotied IL-3 5A geen verandering het nie. Om te voorkom dat die hibridiseringskondisies moontlik teen oligonukleotied IL-3 5BB sal diskrimineer, is besluit om die $T_{m_{PCR}}$ -waarde vir die twee oligonukleotiede vas te stel op $52^\circ C$. Amplifiseringsbuffers is berei met die volgende $MgCl_2$ -konsentrasies:

0.0mM; 1.0mM; 2.0mM; 3.0mM; 4.0mM; 5.0mM; 6.0mM; 6.5mM;
7.0mM; & 7.5mM

Die amplifiseringsbuffer het, tesame met die onderskeie $MgCl_2$ -konsentrasies, bestaan uit 67mM TrisHCl (pH8.3), 16.6mM $(NH_4)_2SO_4$, 10mM β -merkpto-etanol en steriele ddH₂O. Die PCR-reaksiemengsel is in 'n eppendorfbuis op ys saamgestel en het uit amplifiseringsbuffer, 0.1mg/ml BSA fraksie V, 500ng mens genomiese DNA, 20pmol van elk van oligonukleotiede IL-3 5A en IL-3 5BB, 200 μ M van elk dTTP, dCTP, dGTP en dATP en 1U *Taq* DNA-polimerase (Promega) bestaan. Steriele ddH₂O is bygevoeg tot 'n finale volume van 50 μ l. Verdamping van die reaksiekomponente tydens die hoë denaturerings

temperature is voorkom deur in elke Eppendorfbuis 50 μ l aptekersparaffien (Merck # 7161) te voeg.

Die eppendorfbuise is na 'n geoutomatiseerde Techne PHC-2 PCR-apparaat oorgedra wat geprogrammeer is soos in Tabel 3.4 beskryf is. Denaturering van die dubbelstring DNA-templaas word by 94 $^{\circ}$ C bewerkstellig. By 52 $^{\circ}$ C vind hibridisering van die voorvoeders aan die templaas plaas. *Taq*-polimerase (Promega) is optimaal aktief by 72 $^{\circ}$ C waar kettingverlenging plaasvind. Program 50 se denatureringstyd is langer om te verseker dat volledige denaturering plaasvind vir optimale hibridisering van die voorvoeders. Program 52 se kettingverlengingstyd is langer as die ander om te verseker dat alle gedeeltelik voltooië PCR-produkte voltooi word.

TABEL 3.4
PROGRAMMERING VAN PCR-APPARAAT VIR DIE BEPALING VAN DIE OPTIMUM MgCl₂-KONSENTRASIE

PROGRAM	94 $^{\circ}$ C (4)	52 $^{\circ}$ C (4)	72 $^{\circ}$ C (4)	SIKLUSSE
50	5.10 min	1.10 min	1.10 min	1
51	1.10 min	1.10 min	1.10 min	30
52	1.10 min	1.10 min	10.00 min	1

Die volgorde van die verloop van die reaksie is soos voorgestel in die Tabel. Die waarde tussen hakies dui die tempo aan waarteen die verlangde temperatuur bereik moet word. Tempo 4 is die vinnigste tempo waarteen die apparaat die verlangde temperatuur kan bereik en dit het vir elke temperatuursverandering gegeld.

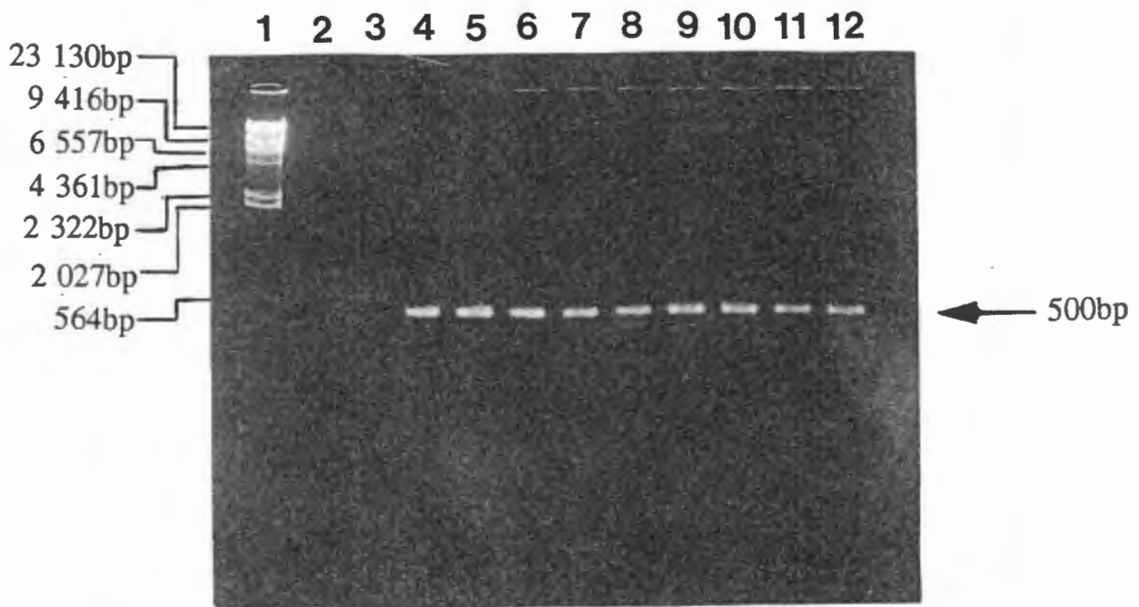
Na voltooiing van die PCR is 10 μ l van elke reaksiemengsel, verteenwoordigend van die onderskeie MgCl₂-konsentrasiereaksies, onttrek en met 2 μ l 50% gliserol gemeng. Die mengsels is elektroforeties op 'n 1.5% etidiumbromiedbevattende agarosegel teen 60V geskei. Die proses is volgehou totdat daar genoegsaam tussen die bande van die groottestandaard, Lambda *Hind* III DNA, onderskei kon word. Na elektroforese is die gel aan UV-lig by

260nm blootgestel en gefotografeer (Tipe 667 Polaroid™ film is gebruik).

In die resultaat (Figuur 3.3) kan gesien word dat 'n enkele PCR-produk gevorm is. Aan die hand van die groottestandaard is bepaal dat die grootte van die produk 500bp is wat ooreenstem met die verwagte lengte. Geen amplifisering het plaasgevind by 0.0mM MgCl₂ en by 1.0mM MgCl₂ nie. Vanaf 2.0mM MgCl₂ tot by 7.5mM MgCl₂ het slegs die 500bp produk voorgekom met 'n geringe afname in opbrengs na mate die MgCl₂-konsentrasie gestyg het. Die produk in die geval van die 3.0mM MgCl₂-konsentrasie se band in die agarose gel vertoon breër as die ander bande wat daarop dui dat daar meer produk per 10μl teenwoordig as in die ander PCR-reaksiemengsels. Daarom is 3.0mM MgCl₂ optimaal vir die amplifisering van die 500bp fragment met die voorvoeders IL-3 5A en IL-3 5BB.

3.3.3 Optimalisering van die hibridiseringstemperatuur vir die IL-3 500bp PCR-produk se voorvoeders

Die MgCl₂-konsentrasie vir die amplifisering van die 500bp gebied in ekson vyf van die IL-3 geen met voorvoeders IL-3 5A en IL-3 5BB, is eksperimenteel vasgestel op 3.0mM MgCl₂ (Afdeling 3.3.2). Soos in Afdeling 3.3.1 gemotiveer, speel die temperatuur waarby hibridisasie van die voorvoeders plaasvind 'n baie belangrike rol in die bindingspesifisiteit van die voorvoeders. Die amplifisering van die 500bp fragment is suksesvol by 52°C (Afdeling 3.3.2). By 52°C kan die spesifisiteit van voorvoerder IL-3 5A moontlik afgeneem het omdat die temperatuur 5°C laer is as die T_{m,PCR} temperatuur vir hierdie voorvoerder. Dit kan 'n verlaging in die opbrengs van die produk tot gevolg hê. As gevolg van die nukleotiedverandering in voorvoerder IL-3 5BB, kan die spesifisiteit van die voorvoerder moontlik ook nie optimaal wees by 52°C nie. Dit mag ook 'n verlaging in die opbrengs van die produk tot gevolg hê. 'n Hoër hibridiseringstemperatuur kan moontlik die spesifisiteit van die voorvoerder verhoog deurdat minder mispassings by 'n hoër hibridiseringstemperatuur toegelaat sal word. 'n Ideale hibridiseringstemperatuur sal een wees wat albei bogenoemde argumente kan bevredig. Dit kan bewerkstellig word deur die PCR apparaat so te programmeer om vanaf die denatureringstemperatuur van 94°C, teen tempo 4 na 57°C te daal vir die hibridisering van voorvoerder IL-3 5A. Hierdie temperatuur word vir een minuut



FIGUUR 3.3

OPTIMALISERING VAN DIE MgCl₂-KONSENTRASIE VIR DIE PCR-REAKSIE MET DIE VOORVOEDERS IL-3 5A EN IL-3 5BB

10µl van elke reaksiemengsel, verteenwoordigend van die onderskeie MgCl₂-konsentrasiereaksies, is onttrek en met 2µl 50% gliserol gemeng. Die mengsels is elektroforeties op 'n 1.5% etidiumbromiedbevattende agarosegel teen 60V geskei. Die proses is volgehou totdat daar genoegsaam tussen die bande van die groottestandaard, Lambda *Hind* III DNA, onderskei kon word. Die volgorde op die gel is as volg:

- Baan - 1. Standaard: Lambda *Hind* III
- Baan - 2. 0.0mM MgCl₂
- Baan - 3. 1.0mM MgCl₂
- Baan - 4. 2.0mM MgCl₂
- Baan - 5. 3.0mM MgCl₂
- Baan - 6. 4.0mM MgCl₂
- Baan - 7. 5.0mM MgCl₂
- Baan - 8. 5.5mM MgCl₂
- Baan - 9. 6.0mM MgCl₂
- Baan - 10. 6.5mM MgCl₂
- Baan - 11. 7.0mM MgCl₂
- Baan - 12. 7.5mM MgCl₂

gehandhaaf en daal dan teen tempo 2 stadig tot 53 °C. So kan die geleentheid gebied word vir voorvoerder IL-3 5A om, indien 57 °C te hoog is, by 'n laer temperatuur selektief aan die templaar te hibridiseer. Tydens die verlaging van die hibridiseringstemperatuur, word daar ook geleentheid gebied vir voorvoerder IL-3 5BB om by 'n bepaalde temperatuur selektief aan die templaar te hibridiseer. Die laer temperatuur van 53 °C moet dan ook vir een minuut gehandhaaf word. Kettingverlenging word hierna geïnisieer deur die temperatuur teen tempo 4 na 72 °C te verhoog.

As gevolg van die nukleotiedverandering wat in die voorvoerder IL-3 5BB teenwoordig is, kan die laagste hibridiseringstemperatuur van 53 °C moontlik te hoog wees vir selektiewe hibridisering van die voorvoerder. Dieselfde argument kan geld vir voorvoerder IL-3 5A. Om dus die hibridiseringstemperatuur van die twee voorvoerders te bepaal, moet die effek van temperature tot so laag as 53 °C ook ondersoek word. Aan die anderkant kan hierdie temperatuur te laag wees vir die selektiewe hibridisering van die voorvoerders aan die templaar. Daarom moet die effek van hoër temperature ook ondersoek word. Die volgende temperatuurreeks is gevolglik getoets vir optimale PCR van die 500bp fragment:

51 °C - 47 °C	60 °C - 56 °C
54 °C - 50 °C	63 °C - 59 °C
57 °C - 53 °C	

Die reaksiemengsels is saamgestel soos wat dit in Afdeling 3.3.2 beskryf is. Die amplifiseringsbuffer het 3.0mM MgCl₂ bevat. 'n Voorbeeld van hoe die PCR-apparaat geprogrammeer is om die invloed van die hibridiseringstemperatuur te ondersoek, word in Tabel 3.5 gegee.

TABEL 3.5

PROGRAMMERING VAN PCR-APPARAAT VIR DIE BEPALING VAN DIE OPTIMUM $T_{m_{PCR}}$ -TEMPERATUUR VIR DIE AMPLIFISERING VAN DIE 500BP FRAGMENT.

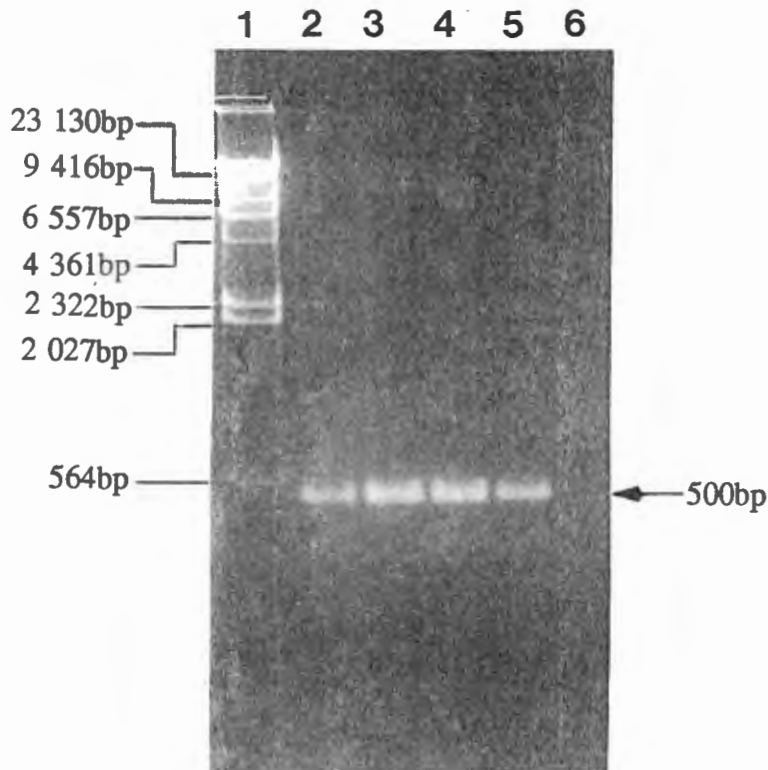
PROGRAM	94 °C(4)	51 °C(4)	47 °C(2)	72 °C(4)	SIKLUSSE
50	5.10min	1.10min	1.10min	1.10min	1
51	1.10min	1.10min	1.10min	1.10min	30
52	1.10min	1.10min	1.00min	10.00min	1

Die waarde tussen die hakies dui die tempo aan waarteen die bestrokke temperatuur bereik moet word.

Na afloop van die reaksie, is 10 μ l uit elke Eppendorfbuis onttrek en aan gelelektroforese onderwerp soos wat dit in Afdeling 3.3.2 beskryf is. 'n PCR-produk van die verwagte lengte is verkry en geen ander DNA-bande kan waargeneem word nie (Figuur 3.4). By al die hibridiseringstemperature is dieselfde produk gevorm, behalwe in die geval van 63 °C tot 59 °C waar geen produk gevorm het nie. Uit hierdie resultaat is dit duidelik dat by 54 °C - 50 °C en by 57 °C - 53 °C die hoogste PCR opbrengs verkry is en te oordeel aan die mate van fluorosensie, is die optimum opbrengs by 57 °C - 53 °C. Gootskaalse PCR vermeerdering van die 500bp PCR-produk vir kloneringsdoeleindes, sal dus by 3mM MgCl₂ en by 'n hibridiseringstemperatuur van 57 °C tot 53 °C uitgevoer word.

3.3.4 Optimalisering van die $T_{m_{PCR}}$ temperatuur vir die amplifisering van die 100bp-fragment in die IL-3 geen

Die optimum $T_{m_{PCR}}$ -temperatuur vir die amplifisering van die 100bp gebied in ekson vyf van die IL-3 geen, met voorvoeders IL-3 5A en IL-3 5B, is eksperimenteel vasgestel op 54 °C - 50 °C, by 'n konsentrasie van 3.0mM MgCl₂. (resultaat nie getoon). Soos in Afdeling 3.3.1 beskryf, word die 100bp PCR-produk in die 500bp PCR-produk vervat. Om hierdie rede is daar nie verdere aandag aan hierdie PCR-produk gegee nie. Die resultaat het wel aangedui dat oligonukleotied IL-3 5B, ten spyte van 'n nukleotiedverandering, suksesvol is as 'n



FIGUUR 3.4
DIE BEPALING VAN DIE OPTIMUM $T_{m_{PCR}}$ -TEMPERATUUR VIR DIE AMPLIFISERING VAN DIE 500bp FRAGMENT

10 μ l van elke reaksiemengsel, verteenwoordigend van die onderskeie temperatuurreekse, is onttrek en met 2 μ l 50% gliserol gemeng. Die mengsels is elektroforeties op 'n 1.5% etidiumbromiedbevattende agarosegel teen 60V geskei. Die proses is volgehou totdat daar genoegsaam tussen die bande van die groottestandaard, Lambda *Hind* III DNA, onderskei kon word. Die volgorde op die gel is as volg:

- Baan - 1. Lambda *Hind* III standaard
- Baan - 2. 51 $^{\circ}$ C - 47 $^{\circ}$ C
- Baan - 3. 54 $^{\circ}$ C - 50 $^{\circ}$ C
- Baan - 4. 57 $^{\circ}$ C - 53 $^{\circ}$ C
- Baan - 5. 60 $^{\circ}$ C - 56 $^{\circ}$ C
- Baan - 6. 63 $^{\circ}$ C - 59 $^{\circ}$ C

voorvoerder by 3.0mM MgCl₂ en 'n T_{m_{PCR}}-temperatuurreeks van 54 °C tot 50 °C.

3.3.5 Optimalisering van die T_{m_{PCR}}-temperatuur vir die amplifisering van die totale IL-3 geen

Twee potensiele PCR-produkte kan in hierdie geval verwag word (Figuur 3.2). Oligonukleotied IL-3 1A is die anti-sens voorvoerder in die geval van albei die potensiele PCR-produkte. Die sens voorvoeders is IL-3 5B of IL-3 5BB. Dit is reeds aangetoon dat die twee voorvoeders suksesvol is as voorvoeders vir PCR by 3.0mM MgCl₂ en T_{m_{PCR}}-temperatuur van 54 °C - 50 °C en 57 °C - 53 °C onderskeidelik. Oligonukleotied IL-3 1A is dieselfde as oligonukleotied IL-3 5B ten opsigte van die GC-inhoud, T_m-waarde en tipe nukleotiedverandering wat aangebring is (Afdeling 3.2.1). PCR-reaksiemengsels is saamgestel soos wat dit in Afdeling 3.3.2 beskryf is met 3.0mM MgCl₂ en PCR is by die volgende temperature uitgevoer:

51 °C - 47 °C

54 °C - 50 °C

57 °C - 53 °C

60 °C - 56 °C

Hierdie PCR-reaksiemengsels is saamgestel met voorvoeders IL-3 1A - IL-3 5B en IL-3 1A - IL-3 5BB onderskeidelik. Die PCR-apparaat is geprogrammeer soos in Tabel 3.4 voorgestel.

Geen PCR-produkte is by enige van die twee PCR-reaksies of by enige T_{m_{PCR}}-temperatuur gevorm nie (resultaat nie getoon nie). Die T_{m_{PCR}}-temperatuur van IL-3 1A (59 °C) is ingesluit in die T_{m_{PCR}}-temperatuurkombinasie van 60 °C = 56 °C. Hibridisering sal eerder by 'n temperatuur wat laer is as die T_{m_{PCR}}-temperatuur plaasvind (Afdeling 3.3.3 en 3.3.4). Voorvoeders IL-3 5A, IL-3 5B en IL-3 5BB hibridiseer suksesvol vanaf 3.0mM MgCl₂ tot 7.5mM MgCl₂. Deur die MgCl₂-konsentrasie van die onsuksesvolle PCR-reaksies te verhoog, sal daarom nie 'n effek hê op die verloop van die onsuksesvolle PCR-reaksies nie.

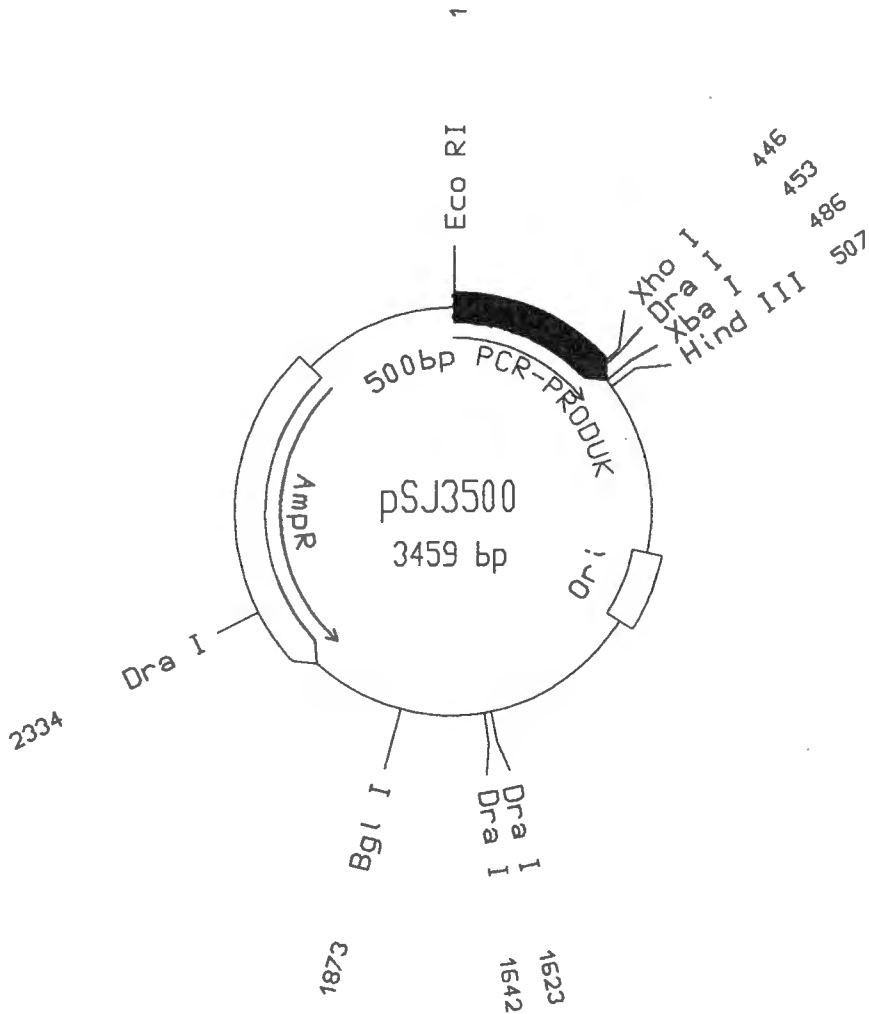
3.3.6 Klonering en restriksiekartering van die 500bp PCR-produk

Die 500bp PCR-produk is op grootskaal berei deur die PCR-reaksie uit te voer by 3.0mM MgCl₂ en 'n T_{m_{PCR}}-temperatuurkombinasie van 57 °C tot 53 °C. Die produk is deur middel van elektroeluering geïsoleer waarna die geïsoleerde fragment met *Eco* RI en *Xba* I behandel is en in 'n soortgelyk behandelde pSP65-vektor gekloneer is (Vergeer, 1988). Die resulterende vektor, pSJ3500, is op grootskaal berei soos deur Vergeer (1988) beskryf en is onderwerp aan restriksiekartering (Figuur 3.5). pSJ3500 is met *Eco* RI behandel en die fragment van 3500bp wat verkry is, dui daarop dat 'n fragment van 500bp in pSP65 ingevoeg het. Behandeling van die plasmied met *Eco* RI en *Xba* I, het twee fragmente gelever met groottes van 500bp en 3000bp onderskeidelik. Die 500bp fragment wat in pSP65 gekloneer is, kan dus met dieselfde ensieme uitgesny word as waarmee dit gekloneer is. 'n Unieke *Xho* I restriksiepunt is in die 500bp gebied van ekson vyf teenwoordig. Behandeling van pSJ3500 met *Xho* I, het 'n enkele band van 3500bp gelever wat dui op die teenwoordigheid van die *Xho* I restriksiepunt. Restriksiepunte vir *Dra* I kom in beide pSP65 en die 500bp fragment voor en behandeling van pSJ3500 met *Dra* I het fragmente met groottes van 1578bp, 1170bp, en 692bp gelever. Die resultaat bevestig verder dat die 500bp PCR-produk teenwoordig is in pSJ3500. Die 500bp fragment is dus suksesvol deur middel van PCR verkry en in pSP65 gekloneer.

3.3.7 Volgordebepaling van die 500bp PCR-produk

Die 500bp PCR-produk is met *Eco* RI en *Xba* I uit pSJ3500 gesny waarna dit in 'n *Eco* RI- en *Xba* I-behandelde M13mp19-vektor gekloneer is (Vergeer, 1988). Die volgorde van die 5'-kant van die fragment is vervolgens bepaal met behulp van die Sequenase Version 2.0™ (United States Biochemical Corporation) pakket. Die volgordebepaling is presies soos die handleiding van die pakket dit spesifiseer uitgevoer. Uit die resultaat van die volgordebepaling (Figuur 3.6) is bevestig dat die 500bp fragment wat in pSP65 gekloneer is, wel die 500bp fragment van die vyfde ekson van die IL-3 geen is.

A



B

ENSIEM	TEORETIESE FRAGMENTGROOTTE kb	WAARGENOME FRAGMENTGROOTTE kb
<i>Eco RI</i>	3.5	3.5
<i>Eco RI</i> <i>Xba I</i>	3.0 0.5	3.0 0.5
<i>Xho I</i>	3.5	3.5
<i>Dra I</i>	1.6, 1.1, 0.7, 0.02	1.6, 1.1, 0.7

FIGUUR 3.5
RESTRIKSIEKARTERING VAN DIE PLASMIED pSJ3500

- A. Restriksiekaartvoorstelling van pSJ3500
- B. Tabel van teoretiese en waargenome fragmentgroottes.

--OLIGONUKLEOTIED IL-3 5A--

10	20	30	40	50	60		
<u>CCATATCAAGGACGGTACTGGAATGAATCCGGAGGAACTGACGTTCTATCTGAAAACCCCTTGAGAAATGGCAGGCTC</u>							
<u>GGTATAGTTCCTGCCACTGACCTTACTTAAAGGCCTCCTTTGACTGCAAGATAGACTTTTGGGAACCTTACGCGTCCGAG</u>							
70	80	90	100	110	120	130	140
<u>AACAGACGACTTTGAGCCTCGCGATCTTTTAGTCCAACTCCAGCTCGTTCTCTGGGCCTTCTCACCACAGAGCCTCGGG</u>							
<u>TTGTCTGCTGAAAACCTCGGAGCGCTAGAAAATCAGGTTGCAGTTCGAGCAAGAGACCCGGAAGAGTGGTGTCTCGGAGCCC</u>							

(C)

<--OLIGONUKLEOTIED IL-3 5B--

150	160	170	180	190	200	210	220
<u>ACATCAAAAAACAGCAGAACCTCTGAAAACCTCTGGGTATCTCTCACACATTCAGGACCAGAAGCATTTCACCTTTTCCT</u>							
<u>TGTAGTTTTGTCGCTTGAAGACTTTGGAGACCCAGTAGAGAGTGTGTAAGGTCCTGGTCTTCGTAAGTGGAAAAGGA</u>							
230	240	250	260	270	280	290	300
<u>GCGGCATCAGATGAATTGTTAATTATCTAATTTCTGAAATGTCAGCTCCCATTTGGCCTTGTGCGGTTGTGTTCTCATT</u>							
<u>CGCCGTAGTCTACTTAAACAATTAATAGATTAAGACTTTACACGTCGAGGGTAAACCGGAACAACGCCAACACAAGAGTAA</u>							
310	320	330	340	350	360	370	380
<u>TTTATCCCATGAGACTATTTATTTATGTATGTATGTAATTTATTTATTTATTTGCTGGAGTGTGAACTGTATTTATTTTA</u>							
<u>AAATAGGGTAACTCTGATAAAATAAATACATACATAAAATAAATAAATAACGGACCTCACACTTGACATAAATAAAT</u>							
390	400	410	420	430	440	450	460
<u>GCAGAGGCCATGTCCTGCTGCTTCTGCAAAAACTCAGAGTGGGTGGGAGCATGTTCAATTGTAACCTCGAGTTTTTA</u>							
<u>CGTCTCCTCGGTACAGGACGACGAAGACGTTTTTTGAGTCTCACCCCACCCCTCGTACAAGTAAACATGGAGCTCAAAAT</u>							
470	480	490	500				
<u>AACTGGTTCCTAGGGATGTTGAGAAATAAACTAGACTCTGAAC</u>							
<u>TTGACCAAGGATCCCTACACACTCTTATTTGATCTGAGACTTG</u>							

(A)

<--OLIGONUKLEOTIED IL-3 5BB--

FIGUUR 3.6
NUKLEOTIEDVOLGORDE VAN DIE 500BP *Eco* RI - *Xba* I FRAGMENT VAN pSJ3500

Die posisies van die voorvoeders wat die PCR-produk tot gevolg het, word aangedui. Dubbelyne dui die gedeelte aan waarvan die volgorde bevestig is.

3.4 SAMEVATTING

Multi-funksionele nukleotiedvolgordes is gekies en rekenaaranalises het getoon dat hulle 'n baie hoë spesifisiteit vir hul onderskeie teikengebiede het. Deur middel van akrielamiedelektroforese is aangetoon dat oligonukleotiede van die regte lengte gesintetiseer is. Hiervolgens is die oligonukleotiede dus geskik vir die doel waarvoor hulle beplan is soos wat in Afdeling 3.2 beskryf is.

Die 500bp gebied in ekson vyf van die IL-3 geen is suksesvol deur middel van PCR geamplifiseer. Hierdie fragment is ook suksesvol in pSP65 gekloneer waarna die identiteit van die fragment as die 500bp-fragment van die vyfde ekson van die IL-3 geen bevestig is deur middel van volgordebepaling. Langer peilers kon egter nie deur middel van PCR verkry word nie. Die 500bp PCR-produk behoort bruikbaar te wees as peiler vir die aftasting van biblioteke vir die verkryging van die mens IL-3 geen.

In Hoofstuk 4 word die aanwendig van die oligonukleotiede as peilers vir die aftasting van 'n cDNA-biblioteek bespreek terwyl Hoofstuk 5 handel oor die aanwending van die 500bp PCR-produk as peiler vir die aftasting van 'n genomiese biblioteek om die IL-3 geen te isoleer.

HOOFSTUK 4

AFTASTING VAN 'N cDNA-BIBLIOTEEK MET 'N OLIGONUKLEOTIED PEILER VIR DIE VERKRYGING VAN DIE MENS IL-3 GEEN

4.1 INLEIDING

Peilers in die vorm van die IL-3 spesifieke 500bp PCR-fragment en IL-3 spesifieke oligonukleotiede is berei (Hoofstuk 3). Hierdie peilers is vervolgens aangewend om die mens IL-3 geen op te spoor deur middel van biblioteek-aftasting. Die aftasting van 'n cDNA-biblioteek met 'n oligonukleotied as peiler word in hierdie hoofstuk bespreek aan die hand van die volgende vraag:

Kan die gesintetiseerde IL-3 oligonukleotiede aangewend word om die cDNA van die IL-3 geen uit 'n cDNA-biblioteek te isoleer ?

4.2 AANWENDING VAN OLIGONUKLEOTIEDE VIR DIE ISOLERING VAN DIE MENS IL-3 GEEN UIT 'N cDNA-BIBLIOTEEK

4.2.1 Identifisering van 'n cDNA-biblioteek waaruit IL-3 cDNA gekloneer kan word

cDNA word berei vanaf mRNA wat op 'n spesifieke tydstip teenwoordig is in die selle waarvan die cDNA berei moet word. Nie al die gene in die genoom van die betrokke selle is op daardie tydstip verteenwoordig in die vorm van mRNA nie. Yang *et al.*, (1986) het aangetoon dat die mens IL-3 geen uitgedruk word in geaktiveerde perifere bloedlimfositete deurdat hulle die teenwoordigheid van 'n 1kb IL-3 mRNA aangetoon het. Hulle het ook bepaal dat die voorkoms van die mens IL-3 mRNA in-perifere bloedlimfositete tussen 0.01 %

en 0.001% van die totale mRNA uitmaak. Otsuka *et al.*, (1988) het aangetoon dat IL-3 mRNA in geaktiveerde T-selle uitgedruk word. Hulle het ook daarin geslaag om IL-3 cDNA vanuit T-sel cDNA-biblioteke te isoleer. Maar Otsuka *et al.*, (1988) het ook waargeneem dat die frekwensie waarteen IL-3 cDNA in T-sel cDNA-biblioteke voorkom baie laag is. Uit 3 verskille geaktiveerde T-sel cDNA-biblioteke waarvan daar by elk 60 000 klone afgetas is, het hulle 2, 1 en geen IL-3 cDNA klone geïdentifiseer. In teenstelling hiermee is die voorkoms van GM-CSF cDNA klone uit 60 000 klone in dieselfde biblioteke onderskeidelik 720, 240 en 120. 'n Potensieel geskikte cDNA-biblioteek vir die isolering van IL-3 cDNA moet dus vanaf geaktiveerde T-selle berei wees. Indien daar slegs een uit 60 000 klone is wat IL-3 cDNA verteenwoordig, moet die mRNA isoleringsmetode ook van so 'n aard wees om te verseker dat die IL-3 cDNA-fragment ook in die cDNA-biblioteek teenwoordig sal wees.

CLONTECH beskik oor 'n Mens Limfoma 5'-verlengde cDNA-biblioteek (Kat No. HL1068b) wat vanaf PMA gestimuleerde T-selle berei is. Die T-selle is afkomstig van die HuT 78 sellyn (ATCC No. TIB161). Die biblioteek is van mRNA berei wat volledig deur metielmercuriehidroksied gedenatureer is. cDNA-sintese is in twee afsonderlike reaksies uitgevoer, naamlik met Oligo(dT)- en ewekansige voorvoeders. Dit verseker dat die meeste van die geïsoleerde mRNA wel as templaatsal dien vir cDNA-bereiding. Na die twee onderskeie cDNA-reaksies is die produkte gekombineer. Voor klonering is lae molekulêre gewig cDNA (kleiner as 500bp) verwyder en cDNA groottes vanaf 500bp tot 5 000bp is geselekteer en in lambda gt11 vektorarms gekloneer. Volgens CLONTEC het die metode, genaamd 5'-verlenging, tot gevolg dat die biblioteke in die algemeen oor langer cDNA-invoegsels beskik as die tradisioneel bereide cDNA-biblioteke. Die cDNA-invoegselgroottes van die cDNA-biblioteek varieer tussen 1.0kb en 4.0Kb met 'n gemiddeld van 1.6kb. Mens IL-3 mRNA is volgens Yang *et al.*, (1986) 1.0kb in grootte.

4.2.2 Anwending van oligonukleotiede as peilers vir biblioteekafasting

Die oligonukleotiede is so ontwerp om ook as peilers gebruik te kan word vir die aftasting van cDNA-biblioteke (Afdeling 3.2). Oligonukleotiede is al suksesvol aangewend as peilers vir die opsporing en klonering van cDNA-volgordes (Otsuka *et al.*, 1988; Conner *et al.*,

1983; Suggs *et al.*, 1981). Berent *et al.*, (1985) het die gebruik van oligonukleotiede en lang DNA-fragmente as peilers met mekaar vergelyk en hulle het bevind dat 5'-radio-aktiefgemaakte oligonukleotiedpeilers 30 tot 100 maal minder sensitief is as lang DNA-peilers wat deur middel van vervangingsmerking radio-aktief gemerk is. Die oligonukleotiedpeilers was egter nog steeds doeltreffend vir kolonie- en plaakaftasting. Berent *et al.*, (1985) het ook waargeneem dat 'n oligonukleotied waarin 'n een basepaar-mispassing teenwoordig is, 10 tot 30 maal minder sensitief is as die volledige oligonukleotied. Die sein was egter nog steeds sterker as die agtergrondseine.

4.2.3 Optimalisering van hibridiserings- en waskondisies om die IL-3 oligonukleotiede vir die aftasting van die Mens Limfoma cDNA-biblioteek te gebruik

Omdat CLONTEC se Mens Limfoma 5'-Strekkings cDNA-biblioteek aangekoop is vir die isolering van IL-3 cDNA (Afdeling 4.2.1), is besluit om die hibridiserings- en waskondisies wat CLONTEC voorstel vir die peiling van nitrosellulosemembrane met oligonukleotiede as peilers, uit te voer. Volgens CLONTEC moet die pre- en hibridiseringsmengsels uit 6xSSC, 2xDenhartsoplossing, 0.25% SDS en 0.1mg/ml gedenatureerde salmsperm DNA bestaan. 1xSSC bestaan uit 0.15M NaCl en 0.015M natruimsitraat. Die pH van 6.8 is met behulp van 0.2M sitroensuur ingestel. Prehibridisering moet by 'n temperatuur wat 20°C laer is as die T_m-waarde uitgevoer word terwyl hibridisering vir 8 ure of oornag by die prehibridiseringstemperatuur uitgevoer moet word. Na hibridisering is die membrane 3 keer met 2xSSC-0.05% SDS vir 20 minute by kamertemperatuur gewas en vir die finale was is die membrane 1 keer met 2xSSC-0.05% SDS vir 3-10 minute by 'n temperatuur van T_m-10°C gewas. Omdat van die oligonukleotiedvoorvoeders oor veranderde nukleotiedvolgordes beskik (Afdeling 3.2.1), moet die onderskeie hibridiserings- en waskondisies eers geoptimaliseer word. Die omvang van hibridisering tussen perfekte en mispassingsduplekse is baie afhanklik van die temperatuur waarby hibridisering en die wasstappe uitgevoer word (Berent *et al.*, 1985). Optimalisering van die kondisies kan die effek wat moontlike mispassings tussen die oligonukleotiede en cDNA-teikenvolgordes het, verminder en die spesifisiteit van die oligonukleotiede optimaliseer. So word die moontlikheid vergroot om

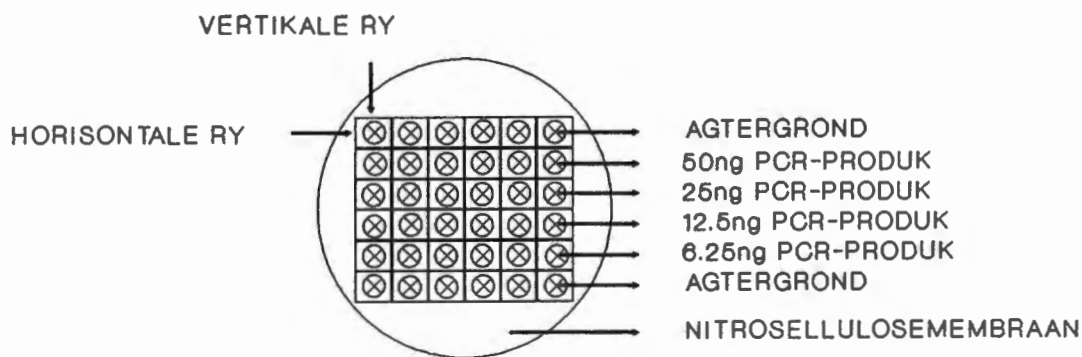
positiewe IL-3 cDNA-klone te identifiseer.

In hierdie Afdeling word die optimalisering van die hibridiserings- en waskondisies bespreek met besondere verwysing na:

1. Dot-blot analise as 'n geskikte tegniek om die hibridiserings- en waskondisies te optimaliseer.
2. Optimalisering van die hibridiseringstemperatuur.
3. Bepaling van die optimum wastemperatuur.
4. Bepaling van die optimum wassoutkonsentrasie.

4.2.3.1 Dot-blot analise as 'n geskikte tegniek om die hibridiserings- en waskondisies te optimaliseer.

Benton en Davis (1977) het waargeneem dat 'n enkele plaak van 'n lambda gt11-rekombinantefaag genoeg faag-DNA bevat om deur middel van hibridisering met 'n spesifieke peiler opgespoor te kan word. Die ideale metode om die hibridiserings- en waskondisies te optimaliseer sal dus een wees wat so na as moontlik aan die werklike biblioteek omstandighede is. Dot-blots voldoen aan hierdie vereiste. DNA word in afnemende konsentrasies op 'n nitrosellulosemembraan aangebring waarna die membraan aan hibridisering onderwerp word. Indien die teiken-DNA van die peiler op die membraan teenwoordig is, sal hibridisering van die peiler aan die teiken DNA plaasvind. Op grond van verskeie hibridiserings- en waskondisies, sal die kondisies bepaal kan word waar die genoemde hibridisering optimaal plaasvind. Die 500bp PCR-fragment van die IL-3 geen (Afdeling 3.3) is as die teiken DNA gebruik wat op die nitrosellulosemembrane aangebring is. Millipore nitrosellulosemembrane (HATF 08250; 0.45 μ m) is in 36 1cm² blokkies ingedeel (Figuur 4.1). Op die boonste ry en die onderste ry blokkies is telkens 2 μ l Robertsbuffer gedot om as agtergrondkontrole te dien. Op die tweede horisontale ry is 50ng van die 500bp PCR-fragment gedot waarna op die derde ry 25ng, op die vierde ry 12.5ng en op die vyfde ry 0.625ng 500bp PCR-fragment gedot is (Figuur 4.1). Om verder te verseker dat die optimaliseringsmetode so na as moontlik aan werklike-biblioteekafkastingskondisies is, is die



FIGUUR 4.1
VOORSTELLING VAN DIE VERDELING VAN 'N
NITROSELLULOSEMEMBRAAN VIR DIE UITVOERING VAN DOT-BLOT-
ANALISES.

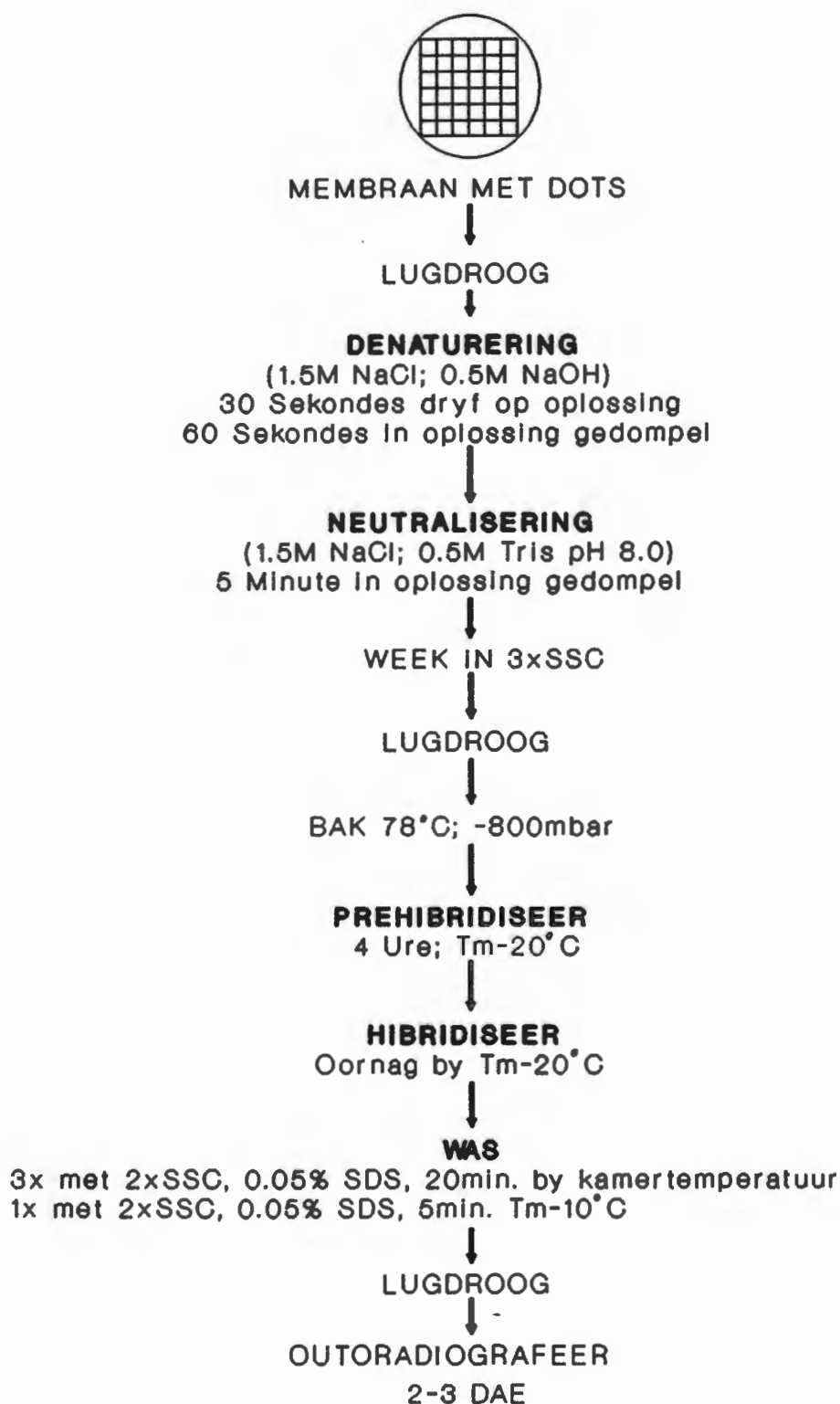
Die nitrocellulosemembrane is in 36 1 cm² blokkies ingedeel. Op die eerste en laaste horisontale rye is 2µl Robertsbuffer gedot om as agtergrondskontrolle te dien. Op die tweede tot vyfde horisontale rye is die 500bp PCR-fragment gedot met die konsentrasie wat van bo na onder afneem. Die membrane is in vertikale rye gesny en elke vertikale rye is aan verskillende hibridiserings- of waskondisies onderwerp.

membraan vervolgens aan dieselfde prosedure onderwerp wat CLONTEC voorstel vir die voorbereiding van biblioteekmembrane (Figuur 4.2). Nadat die PCR-produk op die membraan aangewend is, is die membraan gelaat om te lugdroog. Na lugdroging is die membraan met denatureringsoplossing (1.5M NaCl; 0.5M NaOH) behandel. Die metode behels dat die membraan vir 30 sekondes op die denatureringsoplossing moet dryf waarna dit vir 60 sekondes in die oplossing gedompel moet word. Die membraan is hierna met neutraliseringsoplossing (1.5M NaCl; 0.5M Tris, -pH 8.0) behandel deur dit vir vyf minute in die oplossing te dompel. Hierna is die membraan in 'n 3xSSC oplossing geweek en daarna weereens gelaat om te lugdroog. Na lugdroging is die membraan onder vakuüm (-800mbar) by 'n temperatuur van 78°C vir 2 ure gebak.

Die membraan is vervolgens in vertikale stroke gesny en elkeen van die rye is aan

verskillende kondisies onderwerp vir die optimalisering van die hibridiserings- en waskondisies. Voor prehibridisering is die membrane in 6xSSC benat. Die prehibridiseringsmengsel is saamgestel volgens die aanwysings van CLONTEC (Afdeling 4.2.3) en is by die benatte membrane teen 25 μ l prehibridiseringsmengsel per vierkante sentimeter nitrosellulosemembraan gevoeg. Die membrane is vervolgens tesame met die prehibridiseringsmengsel in 'n Seal-a-mealTM-plastieksakkie verseël waarna hibridisering vir 4 uur uitgevoer is.

Oligonukleotied IL-3 5A is as peiler gekies. Die oligonukleotied se teikengebied kom in die 500bp PCR-fragment voor (Figuur 3.1 en 3.2) en dit is reeds vasgestel dat hierdie oligonukleotied ten spyte van 'n nukleotiedverandering, spesifiek aan sy teikengebied bind (Afdeling 3.3.3). 100ng van oligonukleotied IL-3 5A is met 50 μ Ci [γ -³²P]ATP (Amersham No. PB 10168) aan die 5'-termini deur middel van 1U van die ensiem T4-Poli-nukleotiedkinase (Amersham No. T2020Y) radio-aktief gemerk. Die merkingsreaksie is in kinasebuffer (50mM Tris, pH 7.6; 10mM MgCl₂; 5mM Ditiotreitol; 0.1mM Spermidien HCl & 0.1mM EDTA, pH 8.0) vir een uur by 37^oC uitgevoer. Na afloop van die reaksie is die volume van die reaksiemengsel tot 100 μ l met ddH₂O aangevul en met 1M Ammoniumasetaat en 0.04mg/ml gehomogeniseerde salmsperm DNA gesupplementeer. Etanolpresipitering is vervolgens uitgevoer om die oningeboude [γ -³²P]ATP nukleotiede te verwyder deur 800 μ l vrieskoue 100% etanol by die reaksiemengsel te voeg en oornag by -20^oC te laat. Die volgende dag is die oligonukleotiede 2 maal met vrieskoue 70% etanol gewas, gedroog en in 50 μ l TE-buffer (pH 7.6) (10 mMTris, pH 7.6; 1mM EDTA, pH 8.0) gesuspender. Die spesifieke aktiwiteit van die radio-aktiefgemerkte oligonukleotied is deur middel van vloeistofsintillasietelling in 'n Packard Tri-carb^R 460C sisteem bepaal. Die spesifieke aktiwiteit van die peiler het altyd tussen 1x10⁸ en 3x10⁸ tpm/ μ g oligonukleotied gewissel. Die radio-aktiefgemerkte peiler is na prehibridisering by die prehibridiseringsmengsel gevoeg tot 'n eindkonsentrasie van 15ng peiler per milliliter prehibridiseringsmengsel. Hierna is hibridisering oornag uitgevoer. Na hibridisering is die vloeistof uitgegooi en die membrane is soos deur CLONTEC voorgestel gewas (Afdeling 4.2.3). Membrane is na die wasproses gelugdroog en vir 2 tot 3 dae by -70^oC op Cronex-4 X-straalfilm geoutoradiografeer.



FIGUUR 4.2

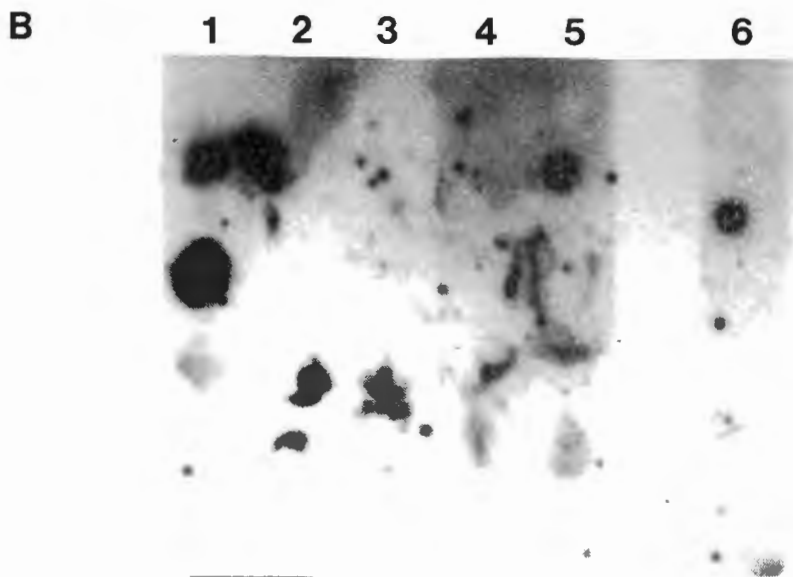
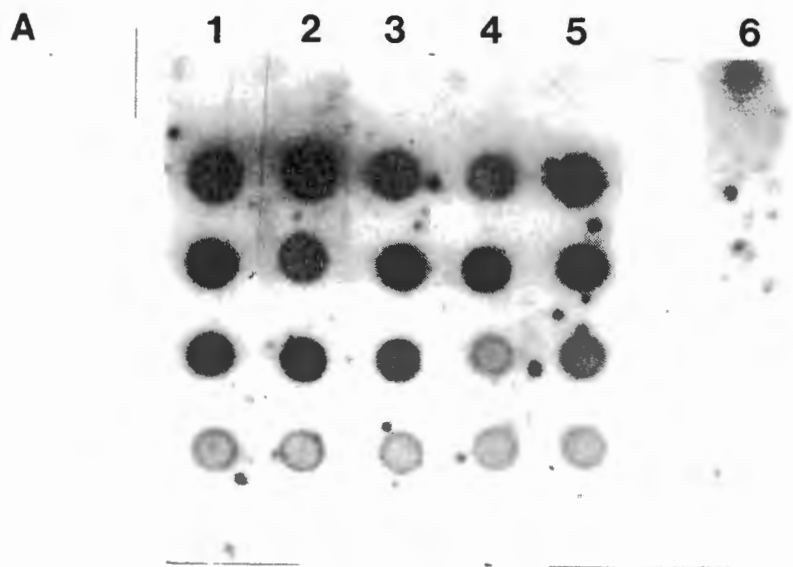
OPSOMMING VAN DIE METODE WAARAAN DIE NITROSELLULOSEMEMBRANE ONDERWERP IS VIR DIE UITVOERING VAN DIE DOT-BLOT-ANALISES SOOS DEUR CLONTECH VOORGESTEL.

4.2.3.2

Optimalisering van die hibridiseringstemperatuur

Tydens Southern-oordragte word die nitrosellulosemembrane vooraf in 6xSSC benat (Vergeer, 1988). Om te bepaal of die nitrosellulosemembrane vir die aftasting van die cDNA-biblioteek ook vooraf benat moet word of nie, is 'n membraan vooraf vir 'n uur in 6xSSC benat. Die 500bp PCR-fragment is vervolgens op die nat, sowel as op 'n droë membraan aangebring. CLONTEC stel voor dat prehibridisering en hibridisering (Afdeling 4.2.3) by 'n temperatuur van $T_m - 20^\circ\text{C}$ uitgevoer moet word. Die T_m -waarde van oligonukleotied IL-3 5A is 62°C (Afdeling 3.2.1) en gevolglik is $T_m - 20^\circ\text{C}$ ongeveer 42°C . Vir die optimalisering van die hibridiseringstemperatuur is die volgende temperatuurreeks saamgestel: 37°C , 40°C , 43°C , 46°C en 49°C . Prehibridisering en hibridisering is by hierdie temperature uitgevoer soos beskryf in Afdeling 4.2.3.1. en die wasstappe is uitgevoer volgens CLONTEC se voorstel (Afdeling 4.2.3). Die finale wasstap is een keer met 2xSSC-0.05% SDS vir vyf minute by 46°C uitgevoer. Die temperatuur is 6°C laer as die voorgestelde finale wastemperatuur ($T_m - 10^\circ\text{C}$). Die laer temperatuur behoort te voorkom dat die finale wasstap 'n invloed sal hê op die temperatuurafhanklike hibridisering van die peiler aan die teiken DNA.

Die resultaat van die optimalisering van die hibridiseringstemperatuur word in Figuur 4.3 gegee. 'n Baie duidelike verskil in die mate van hibridisering en die agtergrond tussen die droë membraan se dots en die vooraf-benatte membraan se dots is duidelik sigbaar. Dit is duidelik dat deur die membrane vooraf met 6xSSC te benat, tot gevolg het dat die teiken-DNA nie suksesvol op die membraan aangebring kan word nie en van daar die nie-spesifieke hibridisering van die peiler. In die geval van die droë membraan het optimale hibridisering by 37°C en 40°C plaasgevind. By temperature laer as 40°C vind hibridisering nie-temperatuurafhanklik plaas nie terwyl hibridisering by temperature hoër as 40°C temperatuur afhanklik is. Die mate van hibridisering het afgeneem by temperature hoër as 40°C (Figuur 4.3A, Bane 3 - 4). Dit is daarom besluit dat 40°C die hibridiseringstemperatuur sal wees.



FIGUUR 4.3
DIE OPTIMALISERING VAN DIE HIBRIDISERINGSTEMPERATUUR

A. - Droë membraan

B. - Nat membraan

1. 37° C
2. 40° C
3. 43° C
4. 46° C
5. 49° C
6. Negatiewe kontrole: pSP65-DNA in dieselfde afnemende konsentrasies gedot as die 500bp PCR-produk.

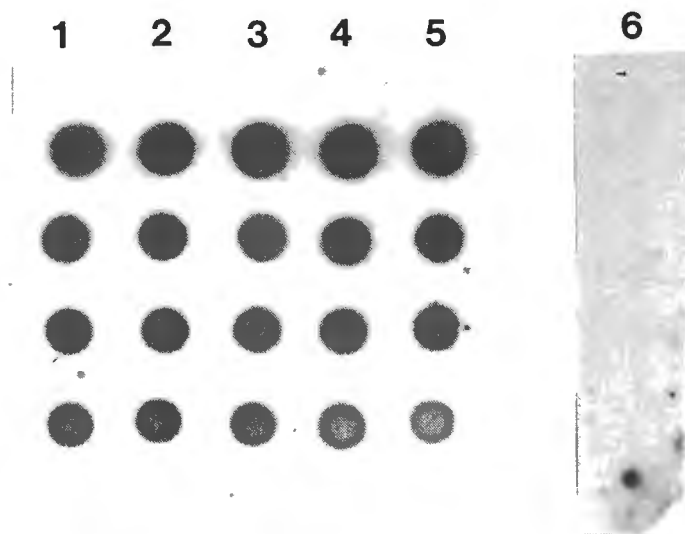
4.2.3.3. Bepaling van die optimum wastemperatuur.

Volgens CLONTEC moet die finale wasstap met 2xSSC-0.05% SDS vir 'n tydperk van 5 tot 10 minute by 'n temperatuur van $T_m - 10^\circ\text{C}$ uitgevoer word (Afdeling 4.2.3). $T_m - 10^\circ\text{C}$ vir oligonukleotied IL-3 5A is 52°C . Dot-blots is aangebring op droë nitrosellulosemembrane (Afdeling 4.2.3.1) en die membrane is gepre- en gehibridiseer by 40°C (Afdeling 4.2.3.2). Die finale wasstap is met 2xSSC-0.05% SDS vir vyf minute by die volgende temperature uitgevoer: 35°C ; 40°C ; 45°C ; 50°C en 55°C . Uit die resultaat (Figuur 4.4) kan geen wastemperatuurafhanklike variasie in die mate van hibridisering waargeneem word nie. Dit wil voorkom dat die wastemperature, met 55°C as die hoogste temperatuur, nog te laag is om 'n effek uit te oefen op die hibridiserings wat plaasgevind het. 'n Ander moontlike verklaring is dat die soutkonsentrasie van 2xSSC te hoog is en daarom die effek wat die hoër wastemperature mag hê, ophef. Hierdie probleem kan op twee maniere opgelos word, naamlik eerstens om die finale wastemperature te verhoog terwyl die soutkonsentrasie by 2xSSC gehou word of tweedens om tydens die finale wasstap die temperatuur konstant te hou en die soutkonsentrasie te verlaag. Laasgenoemde voorstel is meer ideaal omdat dit makliker is om die soutkonsentrasie te verlaag en omdat dit meer gerieflik is om die wasstappe by laer temperature uit te voer.

4.2.3.4. Bepaling van die optimum wassoutkonsentrasie

Omdat hibridisering by 40°C uitgevoer word (Afdeling 4.2.3.2) en indien die finale wastemperatuur ook by 40°C uitgevoer kan word, sal dit nie nodig wees om nog 'n ander waterbad wat by 'n ander temperatuur gestel is, voor te berei nie. Vir die bepaling van die optimum wassoutkonsentrasie is die finale wasstap by 40°C en 0.05% SDS uitgevoer in die teenwoordigheid van die volgende soutkonsentrasies: 4xSSC; 2xSSC; 1xSSC; 0.5xSSC en 0.1xSSC.

Om te bepaal of die wastemperatuur van 40°C wel 'n invloed het op die opheffing van hibridisering van die peiler ten spyte van die laer soutkonsentrasies, is die finale wasstap ook by kamertemperatuur by die genoemde soutkonsentrasies uitgevoer. Die



FIGUUR 4.4
RESULTAAT VAN DIE OPTIMALISERING VAN DIE WASTEMPERATUUR

1. 35° C
2. 40° C
3. 45° C
4. 50° C
5. 55° C
6. Negatiewe kontrole: pSP65-DNA in dieselfde afnemende konsentrasies gedot as die 500bp PCR-produk.

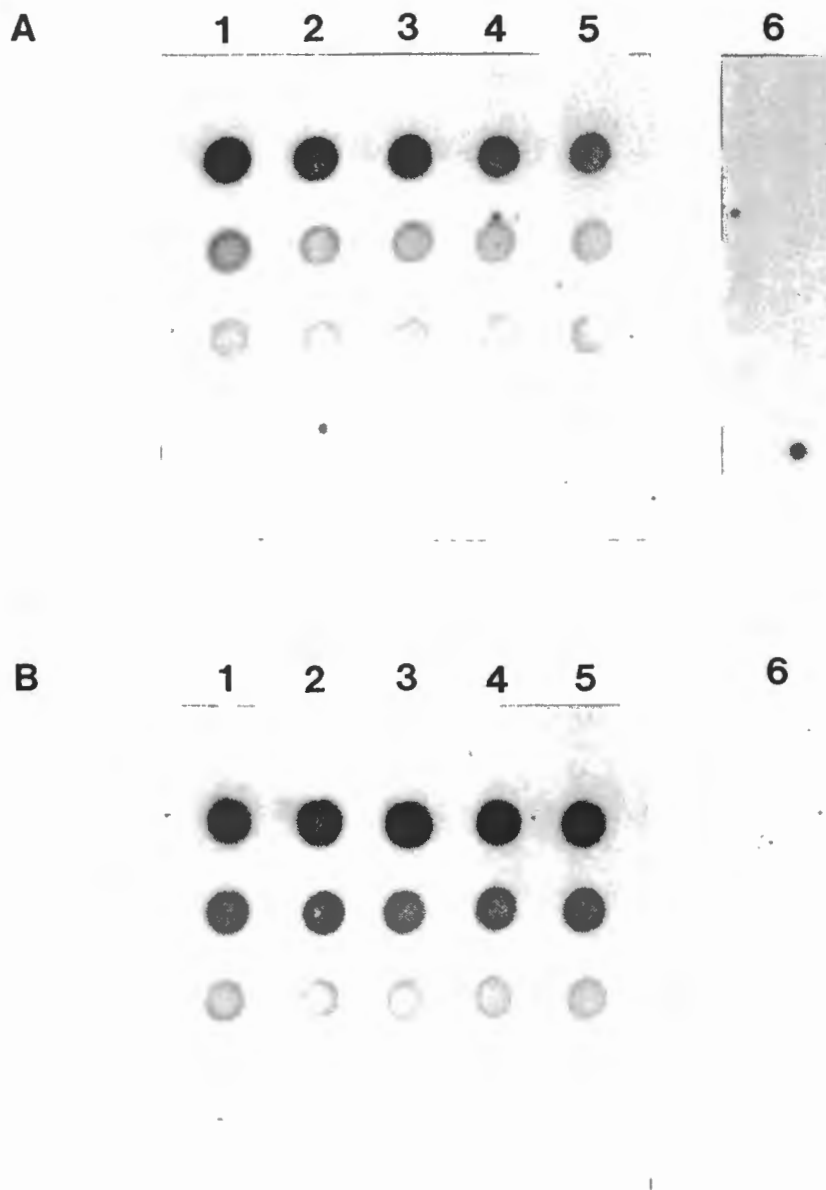
nitrocellulosemembrane is weereens voorberei soos in Afdeling 4.2.3.1 beskryf is. Uit die resultaat (Figuur 4.5) kan 'n verskil waargeneem word tussen die membrane wat tydens die finale was by 40°C gewas is en die wat by kamertemperatuur gewas is. By kamertemperatuur het daar nie 'n verskil in hibridisering voorgekom ten spyte van die laer wassoutkonsentrasie. By 'n wastemperatuur van 40°C het daar wel 'n afname in hibridisering voorgekom soos wat die wassoutkonsentrasie afgeneem het. Dit beteken dat wastemperatuur wel 'n invloed het op die opheffing van hibridisasie van die peiler. By 0.1xSSC en 40°C is die meeste hibridisering opgehef (Figuur 4.5). By die laagste konsentrasie van 0.625ng PCR-fragment is feitlik alle hibridisering opgehef by 'n wastemperatuur van 40°C en 'n soutkonsentrasie van 0.1xSSC. Alhoewel die konsentrasie van die rekombinante faag-DNA in 'n enkele plaak baie laag is kan diskriminasie teen hibridisering as gevolg van die lae teikenkonsentrasie voorkom word deur eerder die finale was by 40°C en 'n soutkonsentrasie van 0.5xSSC uit te voer.

4.2.3.5 Samevatting

Die kondisies vir die aftasting van 'n cDNA-biblioteek met oligonukleotiede is geoptimaliseer deur die metode wat CLONTEC voorgestel het, as basis te neem. Droë nitrocellulosemembrane moet gebruik word en prehibridisering moet by 40°C vir 4 uur en hibridisering oornag by 40°C uitgevoer word. Die membrane moet vervolgens 3 keer by kamertemperatuur gewas word waarna die finale was by 40°C en 'n soutkonsentrasie van 0.5xSSC uitgevoer word.

4.2.4 Aftasting van die Mens Limfoma cDNA-biblioteek met oligonukleotiede

Die Mens Limfoma cDNA-biblioteek is volgens die vervaardiger se voorskrifte voorberei en is volgens die geoptimaliseerde kondisies afgetas (Afdeling 4.2.4). Uit die 100 000 plake wat tydens die eerste rondte afgetas is, is 24 potensieel positiewe plake geïdentifiseer. Hierdie plake is op grond van 'n ronde diffuse kolletjie op die X-staalfilm gekies wat kenmerkend nie 'n skerp swart kolletjie in die middel het nie (Figuur 4.6). Indien die oligonukleotied nie-spesifiek hibridiseer, vind die radio-aktiewe uitstraling radiaal vanaf die middelpunt op die



FIGUUR 4.5
RESULTAAT VAN DIE BEPALING VAN DIE OPTIMUM WAS-
SOUTKONSENTRASIE.

- A. 40°C
 B. Kamertemperatuur
1. 4xSSC
 2. 2xSSC
 3. 1xSSC
 4. 0.5xSSC
 5. 0.1xSSC
 6. Negatiewe kontrole: pSP65-DNA in dieselfde afnemende konsentrasies gedot as die 500bp PCR-produk.



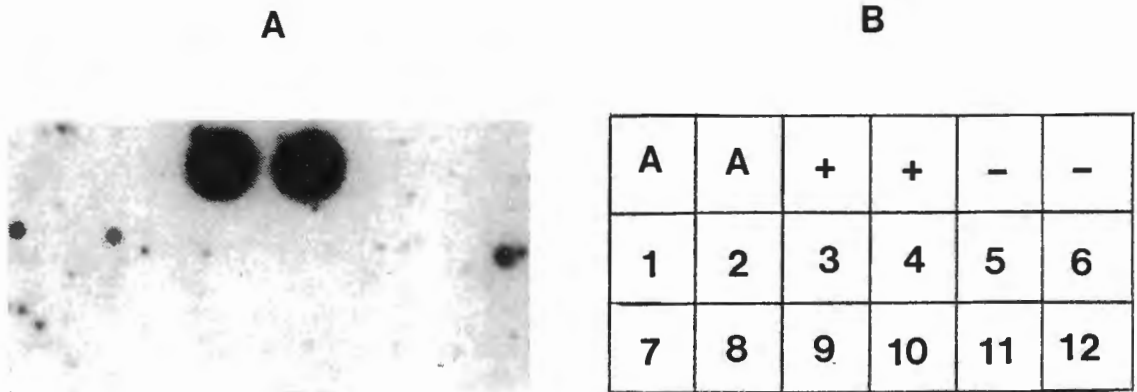
FIGUUR 4.6
X-STRAAL VAN NITROSELLULOSEMEMBRAAN MET POTENSIEEL POSITIEWE
HIBRIDISERINGSKOLLE.

X-staalfilm plaas. Dit het 'n donker swart kolletjie tot gevolg met 'n ligte rand. Fage versprei radiaal vanaf die eerste geïnfekteerde gasheersel op 'n gasheerselmat. In 'n plaak is al die fage, dit wil sê al die rekombinante cDNA, homogeen oor die plaak versprei en indien die radio-aktiewe oligonukleotied dus aan van die rekombinante cDNA hibridiseer, sal die radio-aktiewe uitstraling meer homogeen wees. Slegs diffuse ligte swart kolletjies wat op die X-straalfilm voorkom en wat ooreenkom met 'n duidelik gevormde plaak op die gasheerselmat, is as potensieel positief beskou en geïsoleer. Die 24 potensieel positiewe plake van die eerste rondte van aftasting is aan 'n tweede rondte onderwerp en 12 potensieel positiewe plake is

geïsoleer. Hierdie plake is aan 'n derde rondte van selektering onderwerp waarna weereens 12 potensieël positiewe plake geïdentifiseer en geïsoleer is. Die plake is geïsoleer deur die plakk met behulp van steriele tandestokkies uit die agar te skep en oornag by 4 °C in 200µl SM-buffer (100mM NaCl; 10mM MgSO₄·7H₂O; 50mM Tris, pH 7.5; 0.01% m/v Gelatien) te laat sodat die faagpartikels uit die agar kan diffundeer.

4.2.4.1 Karakterisering van potensieel positiewe plake

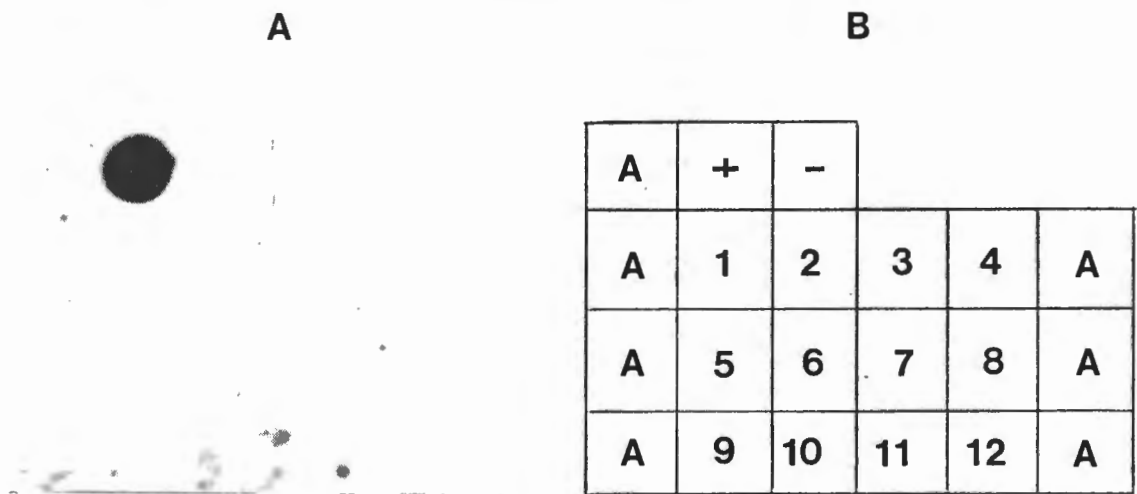
Om te verseker dat die geïdentifiseerde plake na die derde rondte wel positief is, is die geïsoleerde fage aan dot-blot analyses onderwerp. 2µl van elke faagsuspensie is by 3µl SM-buffer gevoeg waarna die mengsel vir 10 minute by 80 °C verhit is om te verseker dat die faagpartikels van mekaar geskei is. Die totale 5µl is vervolgens onverdund gedot. Omdat die fage in SM-buffer gesuspendeer is, is SM-buffer as agtergrond kontrole gedot terwyl die 500bp IL-3 PCR-fragment as positiewe kontrole gedot is. Die negatiewe kontrole het bestaan uit wilde tipe λgt11 fage waarin geen rekombinante DNA teenwoordig is nie. Die membrane waarop die faagsuspensies aangebring is, is aan dieselfde kondisies as die biblioteekmembrane onderwerp (Afdeling 4.2.4). Teen die verwagting in het geen hibridisering aan die onderskeie plake voorgekom nie (Figuur 4.7). Geen hibridisering het in die geval van die negatiewe kontroles plaasgevind nie terwyl duidelike hibridisering in die geval van die positiewe kontrole waargeneem kan word. Geen rekombinante cDNA wat die teikenvolgorde van die peiler bevat het was onder hierdie klone teenwoordig nie. Die afleiding is gemaak dat die geïdentifiseerde plake, afkomstig van die derde ronde van aftasting, nie positief is nie. Die twaalf potensieel positiewe plake wat na die tweede ronde van aftasting geïdentifiseer is, is vervolgens ook aan dieselfde dot-blot analise onderwerp as die plake van die derde rondte om te bepaal of hierdie plake positief is. Geen hibridisering het aan die plake plaasgevind nie, terwyl die positiewe kontrole baie duidelike hibridisering vertoon (Figuur 4.8). Die plake van die tweede rondte is dus ook nie positief nie.



FIGUUR 4.7

RESULTAAT VAN DOT-BLOTS OM DIE POTENSIEEL POSITIEWE KLONE TE TOETS.

Die X-straalresultaat van die klone word in paneel (A) vertoon terwyl die verklaring van die uitleg van die X-straalresultaat in paneel (B) gegee word. Die verklaring van die onderskeie afkortings is as volg: A: 2 μ l SM-buffer as agtergrondkontrolle; +: 50ng 500bp PCR-fragment as positiewe kontrolle; -: negatiewe kontrolle naamlik λ gt11 wilde tipe fage; 1 - 12: Die onderskeie geïsoleerde plake.



FIGUUR 4.8

X-STRAALRESULTAAT VAN DOT-BLOTS OM DIE POTENSIEEL POSITIEWE KLONE VAN DIE TWEDE RONDTE TE TOETS.

Die X-straalresultaat van die klone word in paneel (A) vertoon terwyl die verklaring van die uitleg van die X-straalresultaat in paneel (B) gegee word. Die verklaring van die onderskeie afkortings is as volg: A: 2 μ l SM-buffer as agtergrondkontrolle; +: 50ng 500bp PCR-fragment as positiewe kontrolle; -: negatiewe kontrolle naamlik λ gt11 wilde tipe fage; 1 - 12: Die onderskeie geïsoleerde plake.

Ten spyte van die optimalisering van hibridiserings- en waskondisies om die cDNA-biblioteek af te tas, is geen IL-3 cDNA klone geïsoleer tydens die aftasting van die Mens Limfoma cDNA-biblioteek nie. Oligonukleotied IL-3 5A kon dus nie suksesvol gebruik word om die cDNA van die IL-3 geen uit 'n cDNA-biblioteek te isoleer nie.

Om die IL-3 cDNA in 'n cDNA-biblioteek op te spoor, kan die aftastingsprosedure herhaal word deur meer as een tipe geaktiveerde T-sel cDNA-biblioteek af te tas met die langer 500bp PCR-produk as peiler. Sukses kan verder verseker word deur ten minste 1 000 000 plake van elke biblioteek af te tas. Maar omdat die voorkoms van die IL-3 cDNA so laag is in cDNA-biblioteke, is besluit om eerder die IL-3 geen uit 'n genomiese-biblioteek te isoleer met die 500bp PCR-fragment as peiler. Die kans is groter dat IL-3 geen teenwoordig sal wees in die genomiese-biblioteek. Die aftasting van 'n mens genomiese-biblioteek word in Hoofstuk 5 beskryf.

HOOFSTUK 5

VERKRYGING VAN DIE MENS IL-3 GEEN DEUR MIDDEL VAN GENOMIESE-BIBLIOTEEK AFTASTING

5.1 INLEIDING

In die voorafgaande Hoofstuk is die aftasting van 'n cDNA-biblioteek met 'n oligonukleotied as peiler bespreek. In hierdie Hoofstuk word die aftasting van 'n genomiese-biblioteek met die 500bp PCR-fragment bespreek aan die hand van die volgende vraag:

Kan die volledige mens IL-3 geen uit 'n genomiese-biblioteek geïsoleer word met die 500bp PCR-fragment as peiler ?

5.2 AFTASTING VAN 'n GENOMIESE-BIBLIOTEEK

5.2.1 Keuse van genomiese-biblioteek

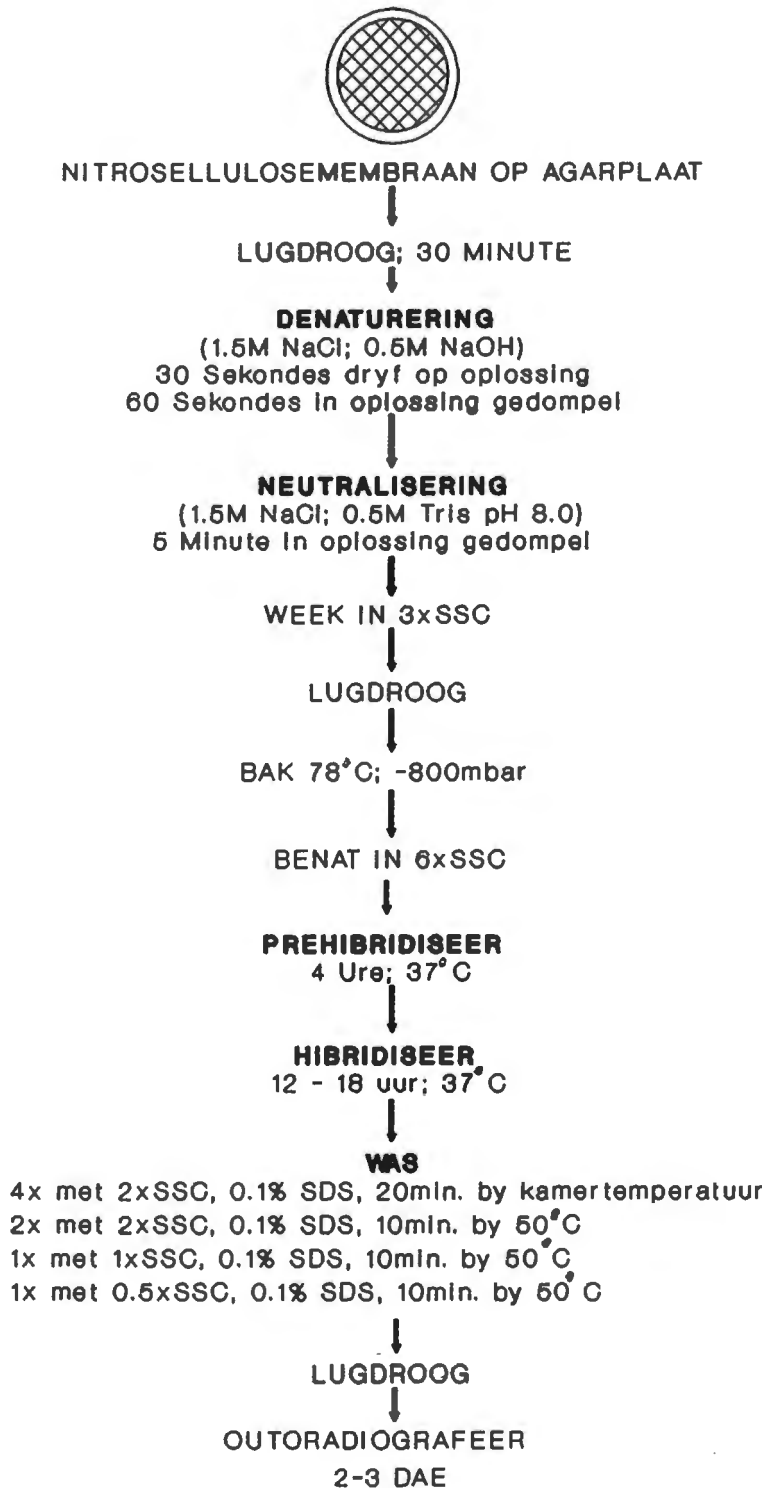
Alle genomiese materiaal is vervat in 'n genomiese-biblioteek. Enige mens genomiese-biblioteek kan dus aangewend word vir die verkryging van die mens IL-3 geen. Mens leukosiet genomiese DNA-biblioteek is in ons laboratorium beskikbaar (CLONTECH No. HL1006d) en is vervolgens aangewend. Volgens CLONTECH is die biblioteek gekonstrueer deur mens leukosiet genomiese DNA gedeeltelik te behandel met die restriksie ensiem *Mbo* I. Die resulterende DNA-fragmente is geskei op 'n sukrosegadiënt en fragment groottes tussen 8kb en 22kb is geïsoleer. Die fragmente is in die *Bam* HI posisie in die kloneringsvektor EMBL-3 gekloneer. Die restriksie-fragmente van *Bam* HI en *Mbo* I pas op mekaar. Die gemiddelde DNA-invoegselgrootte in die mens leukosiet genomiese-biblioteek is 16kb.

5.2.2 Voorbereiding van die peiler

Die 500bp PCR-fragmentbevattende vektor, pSJ3500 (Afdeling 3.3.6), is op groot skaal volgens die metode beskryf deur Vergeer (1988) gekweek. Die 500bp-fragment is uit pSJ3500 met die restriksie ensieme *Eco* RI en *Xba* I gesny (Afdeling 3.3.6), waarna die 500bp-fragment van die res van die resulterende DNA-fragmente deur middel van 'n 1% agarosegel geskei is. Die 500bp-fragment is uit die agarosegel herwin met behulp van GENE CLEAN II™ (BIO101 No. 3106). Na suiwering is die konsentrasie van die fragment met behulp van 'n konsentrasiegel bepaal. Ongeveer 50ng van die fragment is telkens met 20 μ Ci α (³²P)dCTP (> 3 000 Ci/mmol - Amersham) radioaktief gemerk deur van die Random Prime Labeling Kit™ (Amersham) gebruik te maak. Die vrye α (³²P)dCTP nukleotiede is van die radio-aktiewe peiler verwyder deur middel van kolomuitsluitingschromatografie op 'n Sephadex G-50-kolom van 260mm x 10mm. Die kolobuffer is uit 10mM Tris (pH 7.5), 100mM NaCl, 1mM EDTA en 0.1g% (m/v) SDS saamgestel. Die spesifieke aktiwiteit van die peiler is deur vloeistof-sintillasiemeting in 'n Packard Tri-carb^R 460C sisteem bepaal. Die spesifieke aktiwiteit van die peiler het altyd tussen 1x10⁸ en 3x10⁸ tpm/ μ g peiler gewissel. Voordat die radio-aktiewe peilers gebruik is, is dit gedeneureer deur dit vir 5 minute in 'n kokende waterbad te inkubeer waarna dit dadelik op ys geplaas is.

5.2.3 Hibridiserings- en waskondisies van die nitrosellulosemembrane

Die hibridiserings- en waskondisies, soos beskryf vir Southern-oordraganalises deur Vergeer (1988), is met geringe veranderinge toegepas. Die nitrosellulosemembrane is vir 30 minute op die agarplate met die plake geplaas om die oordraging van die plaakmateriaal te bewerkstellig. Hierna is die nitrosellulosemembrane gelaat om te lugdroog. Dieselfde denaturerings- en neutraliseringskondisies as wat gevolg is tydens cDNA-biblioteek aftasting, is vervolgens toegepas. In Figuur 5.1 word die metode uiteengesit. Prehibridisering is in Hybaid™-bottels in 'n Hybaid™-hibridiseringssoond vir 4 ure by 37°C uitgevoer. Die membrane is in 6xSSC benat waarna dit na die Hybaid™-bottels oorgedra is. Prehibridiseringsmengsel is by die membrane teen 25 μ l/cm² nitrosellulosemembraan gevoeg. Die mengsel bestaan uit 5xSSC; 50% formamied; 0.1g% (m/v) SDS; 200 μ g/ml gesoniseerde



FIGUUR 5.1
OPSOMMING VAN DIE METODE WAARMEE DIE PLAAKBEVATTENDE
NITROSELLULOSEMEMBRANE VOORBEREÏ IS VIR PRE- EN HIBRIDISERING

salm sperm DNA; 10g% (m/v) dekstraansulfaat en 0.4g% (m/v) van onderskeidelik Ficoll, BSA en PVP. Na prehibridisering van 4 ure is die gedenateerde radio-aktiewe peiler teen 'n konsentrasie van 15ng/ml hibridiseringsvloeistof bygevoeg. Hibridisering is vervolgens vir 12 tot 18 uur by 37° C uitgevoer. Hierna is die membrane soos volg gewas:

- 4 keer met 2xSSC-0.1g% (m/v) SDS vir 20 minute by kamertemperatuur.
- 2 keer met 2xSSC-0.1g% (m/v) SDS vir 10 minute by 50° C.
- 1 keer met 1xSSC-0.1g% (m/v) SDS vir 10 minute by 50° C en
- 1 keer met 0.5xSSC-0.1g% (m/v) SDS vir 10 minute by 50° C.

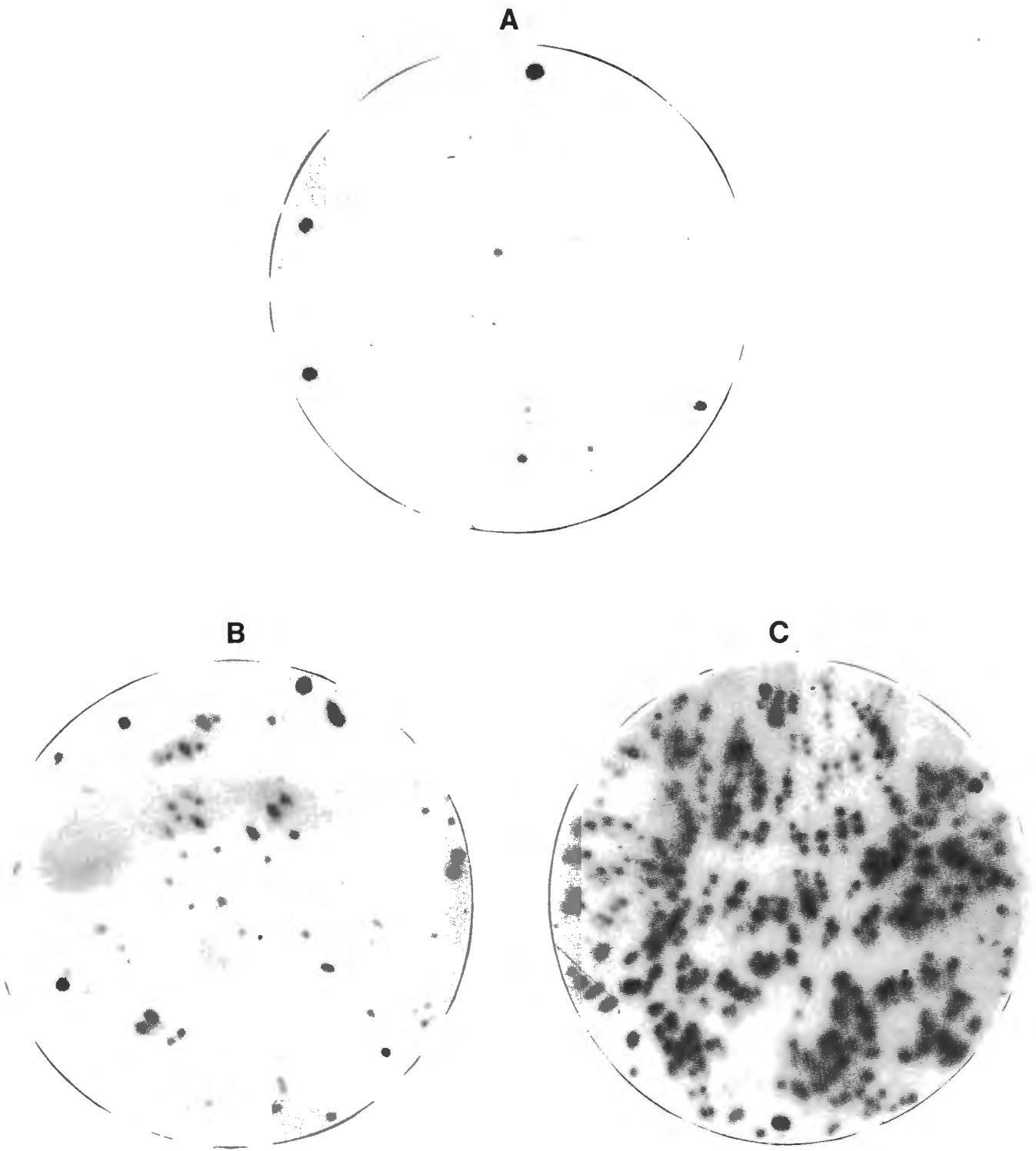
Membrane is na die wasproses gelugdroog en vir 2 tot 3 dae by -70° C op Cronex-4 X-straalfilm geoutoradiografeer.

5.2.4 Aftasting van die biblioteek

E.coli NM539 is gebruik as gasheer vir die vermeerdering van die EMBL-3 fage. Die biblioteek is volgens die vervaardiger se voorskrifte voorberei en vir die eerste rondte van aftasting is 440 000 plake afgetas met Millipore nitrosellulosemembrane (HATF 08250; 0.45µm). Na die eerste rondte is 27 potensieel positiewe klone geïdentifiseer waarna 19 potensieel positiewe klone na die tweede rondte geïdentifiseer is. Na die derde rondte is 6 klone geïdentifiseer op grond van sterk hibridiseringspatrone. 'n Duidelike toename in die aantal potensieel positiewe plake kan waargeneem word vanaf die eerste rondte tot die derde rondte van aftasting (Figuur 5.2). Al die klone op die X-straalfilm van die derde rondte stem ooreen met plake op die agarplate.

5.3 KARAKTERISERING VAN DIE GEÏDENTIFISEERDE KLONE

5.3.1 Bereiding van faag-DNA vir die karakterisering van die geïdentifiseerde klone



FIGUUR 5.2

AANDUIDING VAN DIE TOENAME IN DIE AANTAL POSITIEWE KLONE VANAF DIE EERSTE RONDTE TOT BY DIE DERDE RONDTE VAN AFTASTING

- A. X-Straalfilm van die eerste rondte
- B. X-Straalfilm van die tweede rondte
- C. X-Straalfilm van die derde rondte van aftasting

Die geïdentifiseerde klone is uit die agar verwyder deur die plaak met 'n pasteurpipet uit die agar te skep. Die stukkie agar is in 200 μ l steriele SM-buffer (100mM NaCl, 10mM MgSO₄·7H₂O, 50mM Tris (pH 7.5), en 0.01g% (m/v) gelatien) geplaas en vir 12 ure by 4 °C gelaat. Die bereiding van faag-DNA is uitgevoer volgens die metode beskryf deur Sambrook *et al.*, (1989) met geringe veranderinge. *E. coli* NM 539 is in 10ml NZCYM (N-Z-Amien-A 10g% (m/v), NaCl 5g% (m/v), Gisekstrak 5g% (m/v), Kaasaminosure 1g% (m/v), en MgSO₄·7H₂O 2g% (m/v)) gekweek tot 'n OD₆₅₀ waarde van 1. 'n OD₆₅₀ van 1 is gelykstaande aan 'n seldigtheid van 10¹⁰ selle/ml. 10¹⁰ selle is met 30 μ l van die faagbevattende SM-buffer geïnfekteer deur dit vir 30 minute by 37 °C te inkubeer. Die mengsel is na afloop van die inkubasie by 40ml verhitte NZCYM-meduim gevoeg. Met baie goeie belugting is die 40ml NZCYM geïnkubeer by 37 °C totdat die gasheerselle geliseer het. Dit het gewoonlik tussen 4 en 8 uur geneem. Indien daar nog geen lise plaasgevind het na 8 uur nie, is nog faag bevattende SM-buffer bygevoeg.

Na lise is die selreste met behulp van sentrifugering verwyder. Die faagpartikel-bevattende supernatant is na 100ml kegelflesse oorgedra. *DNase I* en *RNase* is vars berei en by die supernatante in die kegelflesse gevoeg tot 'n finale konsentrasie van 1 μ g/ml waarna dit by 37 °C vir 30 minute geïnkubeer is. Hierna is 6g% (m/v) NaCl by die flesse gevoeg en geroer totdat dit opgelos is waarna 50g% (m/v) PEG-6000 bygevoeg is. Die kegelflesse is liggies op 'n skudblad geskud totdat al die PEG opgelos het waarna die kegelflesse oornag by 4 °C gelaat is. Die volgende dag is die kegelflesse effens geroer om die inhoud te meng. Die faag-PEG komplekse wat gevorm het is deur sentrifugering versamel. Nadat die supernatant afgegooi is, is die presipitaat opgelos deur 400 μ l SM-buffer by die presipitaat te voeg. Die opgeloste presipitaat is met 'n wye punt pipet na 'n 1.5ml polipropileenbuis oorgedra. 'n 1:1 Chloroform ekstraksie is uitgevoer om die faag-PEG komplekse te laat opbreek en uit die mengsel te verwyder. Die faagpartikels versamel in die waterfase terwyl die PEG in die interfase voorkom na die ekstraksie. Deur middel van toevoeging van EDTA tot 'n finale konsentrasie van 20mM, SDS tot 'n finale konsentrasie van 1g% (m/v) en vars bereide *Protelase K* tot 'n finale konsentrasie van 0.25mg/ml, is die faagpartikels verteer en gedenatureer deur dit vir 1 uur by 56 °C te inkubeer. Die vrygestelde faag-DNA is gesuiwer deur dit agtereenvolgens met gelyke volumes fenol, fenol:chloroform (1:1) en chloroform:isoamielalkohol (24:1) te ekstraer. Na *étanol* presipitering is die faag-DNA een

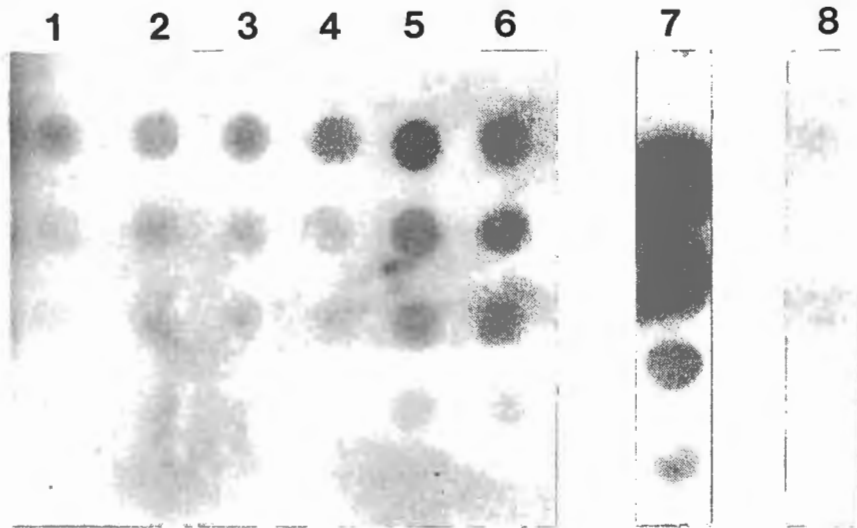
maal met vrieskoue 70% etanol gewas, gedroog en in 50 μ l - 100 μ l water gesuspendeer. Die konsentrasie van die DNA is spektrofotometries by 'n golflengte van 260nm met 'n uitwissingskoeffisiënt van 20 mg⁻¹.ml.cm⁻¹ bepaal. Die faag-DNA is by -20° C bewaar.

5.3.2 Dot-blot-analise van die klone

Die doel van die dot-blot-analises van die klone is om te bepaal hoeveel van die geïdentifiseerde klone beskik werklik oor DNA-volgordes waaraan die 500bp IL-3 spesifieke peiler kan hibridiseer. Die dot-blots is op dieselfde wyse uitgevoer soos wat dit in Afdeling 4.2.3.1 bespreek is en in Figuur 4.1 voorgestel word. In hierdie geval is verdunnings van die 6 klone in afnemende konsentrasies gedot terwyl SM-buffer as agtergrondkontrolle gedot is. Die 500bp peiler is radio-aktief gemerk soos beskryf in Afdeling 5.2.2. In Figuur 5.3 word die resultaat gegee. Daar het geen hibridisering aan die agtergrondkontroles asook aan die negatiewe kontroles voorgekom nie teenoor die positiewe kontrole wat baie duidelike hibridisering vertoon. Die 500bp peiler het aan al 6 die klone se DNA gehibridiseer. Die 6 geïdentifiseerde klone beskik dus almal oor IL-3 spesifieke volgordes.

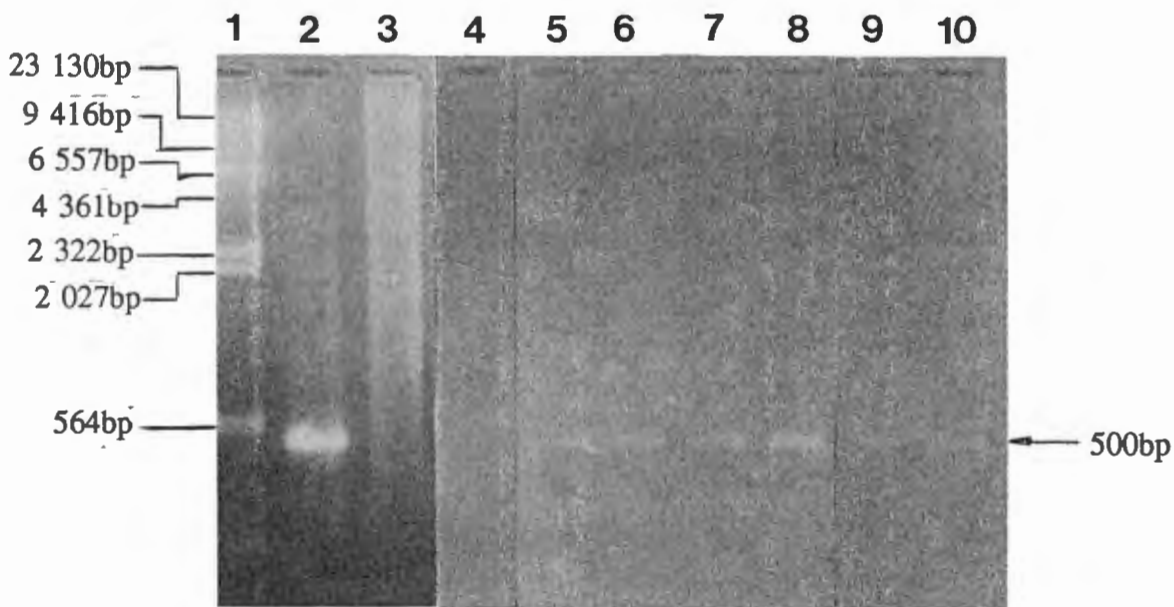
5.3.3 PCR-analise van die klone

Die resultaat van Afdeling 5.3.2 kan aangevul word deur te bepaal of die hibridisering wat voorgekom het, spesifieke hibridisering van die 500bp peiler is. Dit kan bepaal word deur die faag-DNA as templaats aan te wend tydens PCR met voorvoeders IL-3 5A en IL-3 5BB (Figuur 3.2). 'n 500bp PCR-fragment kan by al 6 die klone waargeneem word (Figuur 5.4). Die voorvoeders ken baie spesifiek hulle teikenvolgordes in die bereide faag-DNA uit. Die afleiding is gemaak dat die vyfde ekson van die IL-3 geen voorkom in die genomiese invoegsels van al 6 die klone.



FIGUUR 5.3
RESULTAAT VAN DIE DOT-BLOT-ANALISES WAT UITGEVOER IS OP DIE SES
POTENSIEEL POSITIEWE KLONE

- Baan 1 : Kloon 1
- Baan 2 : Kloon 2
- Baan 3 : Kloon 3
- Baan 4 : Kloon 4
- Baan 5 : Kloon 5
- Baan 6 : Kloon 6
- Baan 7 : Positiewe kontrole - pSJ3500
- Baan 8 : Negatiewe kontrole - EMBL-3-DNA



FIGUUR 5.4

RESULTAAT VAN DIE PCR-ANALISE VAN DIE KLONE

Die PCR-reaksiemengsels is op 'n 1% etidiumbromiedbevattende agarosegel geskei. Die elektroforese is volgehou totdat daar genoegsaam tussen die fragmente van die grootte standaard DNA onderskei is.

- Baan 1 : Lambda *Hind* III standaard
- Baan 2 : Positiewe kontrole - genomiese DNA
- Baan 3 : Negatiewe kontrole - EMBL-3 DNA
- Baan 4 : Oop
- Baan 5 : Kloons 1
- Baan 6 : Kloons 2
- Baan 7 : Kloons 3
- Baan 8 : Kloons 4
- Baan 9 : Kloons 5
- Baan 10: Kloons 6

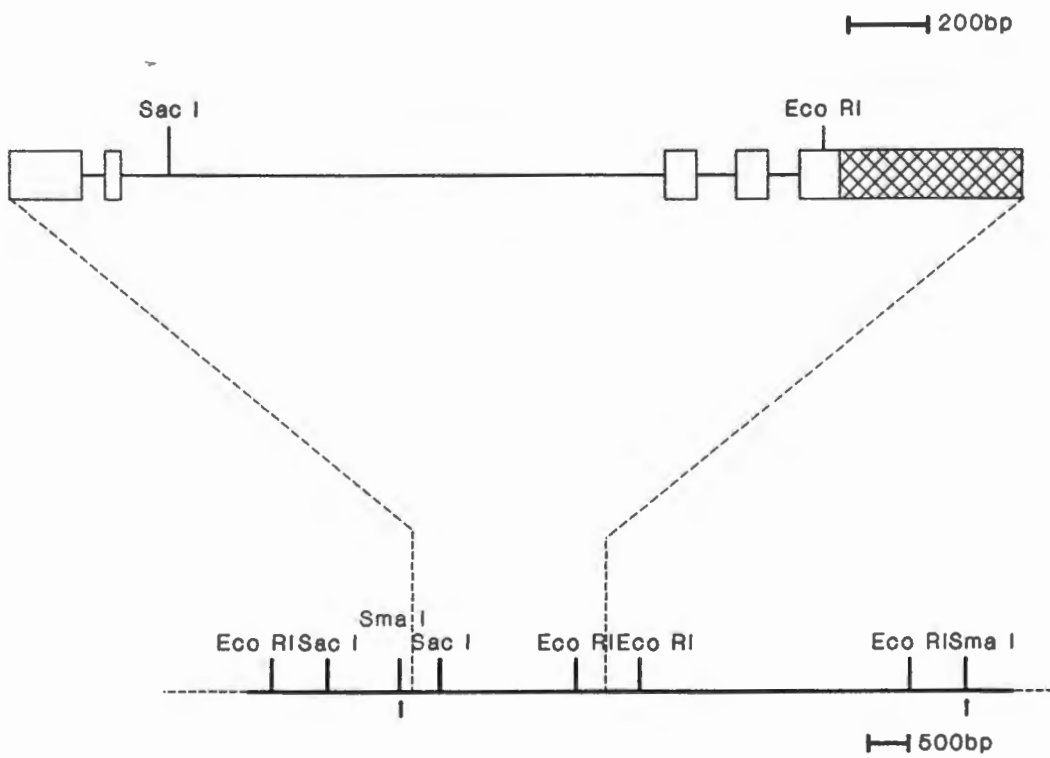
5.3.4 Southern-oordraganalises van die klone

Yang en Clark (1989) het met behulp van langafstand restriksiekartering 'n gedeeltelike restriksiekaart van die genomiese IL-3 geen opgestel (Figuur 5.5). Alhoewel baie min restriksiepunte aangetoon is, kan wel waargeneem word dat die IL-3 geen deur 2 *Sma* I-restriksiepunte wat 7100bp uitmekaar is, begrens word. Volgens die restriksiekaart kom daar geen *Sma* I-restriksiepunte in die introns van die IL-3 geen voor nie. Indien die 6 klone dus met *Sma* I behandel word, is die veronderstelling dat na 'n Southern-oordraganalise met die 500bp-peiler, by van die klone hibridisering aan 'n fragment van 7100bp waar te neem. Figuur 5.6 toon die *Sma* I-behandeling van die klone aan.

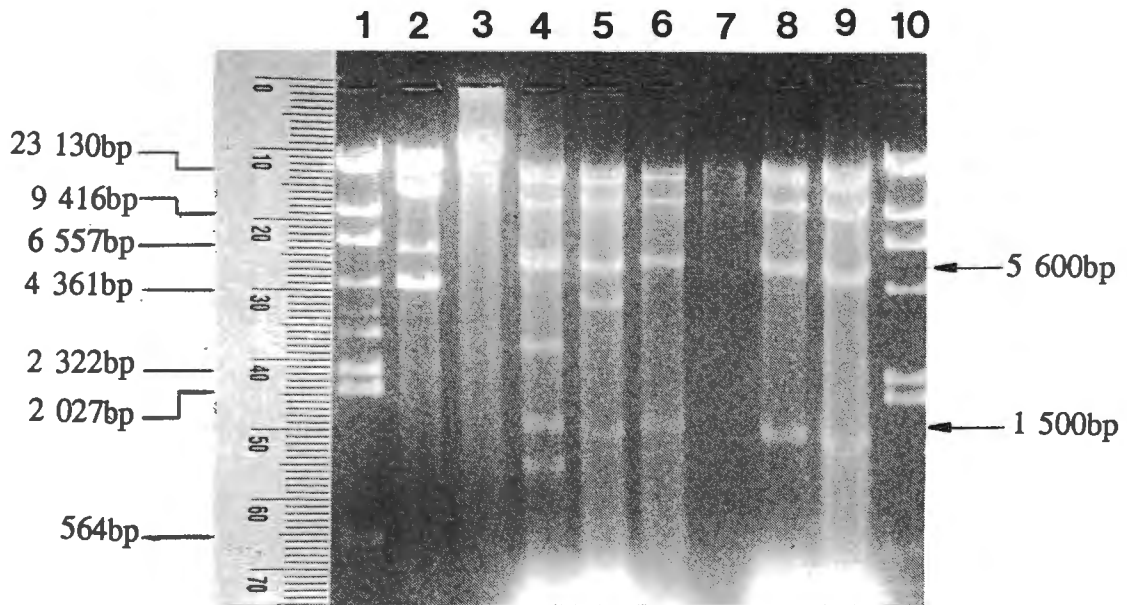
Restriksiebehandeling van die klone met *Sma* I vertoon baie duidelik 3 verskillende patrone. Kloon 1 en kloon 2 vertoon unieke restriksiepatrone terwyl klone 3, 5 en 6 dieselfde restriksiepatroon vertoon. Geen fragment van 7100bp kan waargeneem word nie. Behandeling van EMBL-3 faag-DNA met *Sma* I lewer 'n fragment van 5600bp. Die fragment kan by al die klone waargeneem word.

Southern-oordraganalise met die 500bp-peiler (Figuur 5.7) toon dat die peiler aan die 5600bp-fragmente van die klone hibridiseer, maar nie aan die EMBL-3 afgeleide 5600bp-fragment nie. Die positiewe kontrole vertoon ook 'n enkel hibridisering van ongeveer 7000bp. Die teikengebied van die peiler is dus vervat in die 5600bp *Sma* I-fragment van die klone. Dit stem nie ooreen met die verwagting van ongeveer 7000bp wat wel by die positiewe kontrole verkry is nie. Die afleidings wat hieruit gemaak kan word is as volg:

1. Die mikro-omgewing waarin die faag-DNA voorkom tydens elektroforese verskil van die omgewing waarin die genomiese-DNA voorkom as gevolg van verskillende bereidingsmetodes. Genomiese-DNA is 'n baie suiwerder preparaat as faag-DNA. Die verskil in mikro-omgewing kan dalk verantwoordelik wees vir die verskil in die grootte wat waargeneem is.
2. Die IL-3 geen is moontlik volledig vervat in die 5600bp *Sma* I-fragment.

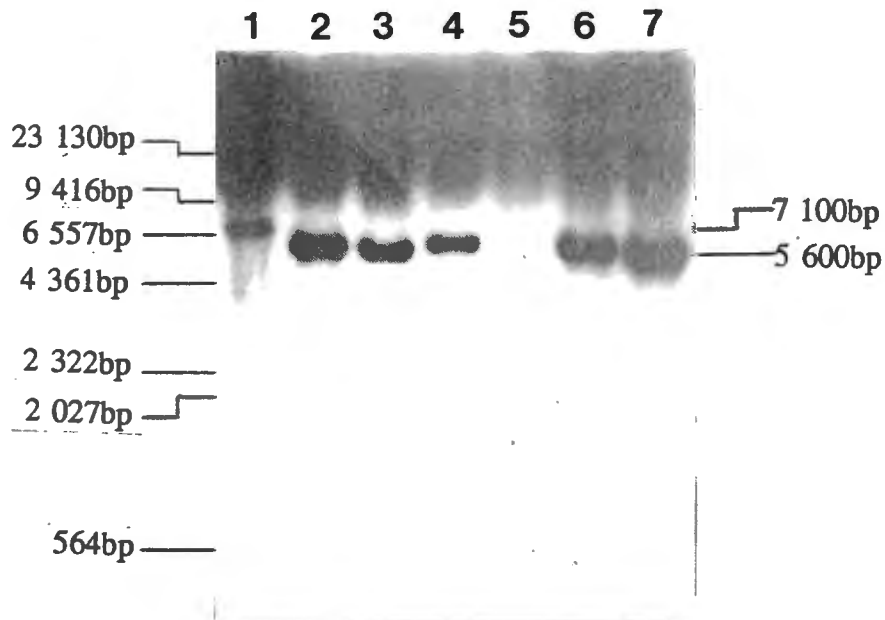


FIGUUR 5.5
LANGAFSTAND RESTRIKSIEKARTERING VAN DIE IL-3 GEEN (Yang en Clark 1989)



FIGUUR 5.6
RESTRIKSIEKARTERING VAN DIE KLONE MET *Sma* I
 Na behandeling is die fragmente op 'n 1% etidiumbromiedbevattende agarosegel geskei.

- Baan 1 : Lambda *Hind* III standaard
- Baan 2 : EMBL-3 DNA behandel met *Sma* I
- Baan 3 : Genomiese DNA behandel met *Sma* I
- Baan 4 : Kloon 1
- Baan 5 : Kloon 2
- Baan 6 : Kloon 3
- Baan 7 : Kloon 4 (Faag-DNA het gedegradear)
- Baan 8 : Kloon 5
- Baan 9 : Kloon 6
- Baan 10: Lambda *Hind* III standaard



FIGUUR 5.7
SOUTHERN-OORDRAGANALISE VAN DIE *Sma* I-BEHANDELDE KLONE

- Baan 1 : Genomiese DNA behandel met *Sma* I
- Baan 2 : Kloons 1
- Baan 3 : Kloons 2
- Baan 4 : Kloons 3
- Baan 5 : Kloons 4 (Faag-DNA het gedegradeer)
- Baan 6 : Kloons 5
- Baan 7 : Kloons 6

Albei die afleidings kan getoets word indien die 5600bp-fragment van 'n kloon in 'n vektor gekloneer word vir verdere restriksie- en Southern-oordraganalises. Die effek wat die mikro-omgewing moontlik op die migrasiesnelheid van die fragmente kon gehad het, sal dan opgehef wees. Met restriksiekartering en Southern-oordraganalises kan bepaal word of die IL-3 geen wel volledig in die *Sma* I-fragment voorkom.

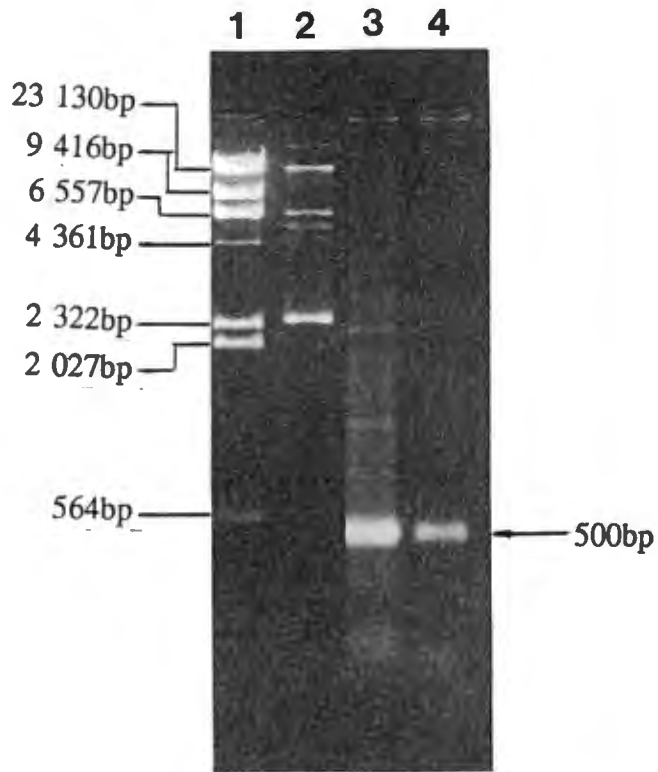
5.4 KLONERING EN KARTERING VAN DIE 5600bp *Sma* I-FRAGMENT

5.4.1 Klonering van die 5600bp *Sma* I-fragment

Die 5600bp *Sma* I-fragment kom by al die geïsoleerde klone voor. Enige een kan dus gekloneer word met die oog op verdere karakterisering. Die 5600bp *Sma* I-fragment van kloon 5, is na behandeling met *Sma* I, geïsoleer met behulp van gelelektroforese waarna dit uit die agarosegel herwin is met behulp van GENE CLEAN II™ (BIO101 No. 3106). Die vektor pSP65 (Afdeling 3.2.1) is ook met *Sma* I behandel en gedefosforileer (Vergeer, 1988). Deur ligering van die twee fragmente (Vergeer, 1988) is die resulterende vektor pSJ5600 gekonstrueer. Die teenwoordigheid van die 5600bp-fragment in die vektor is aangetoon deur die vektor pSJ5600 as templaats aan te wend tydens PCR met voorvoeders IL-3 5A en IL-3 5BB. In Figuur 5.8 kan duidelik gesien word dat die verwagte 500bp PCR-produk gesintetiseer is. Die 5600bp *Sma* I-fragment van kloon 5 is dus in vektor pSP65 gekloneer.

5.4.2 Restriksiekartering van pSJ5600

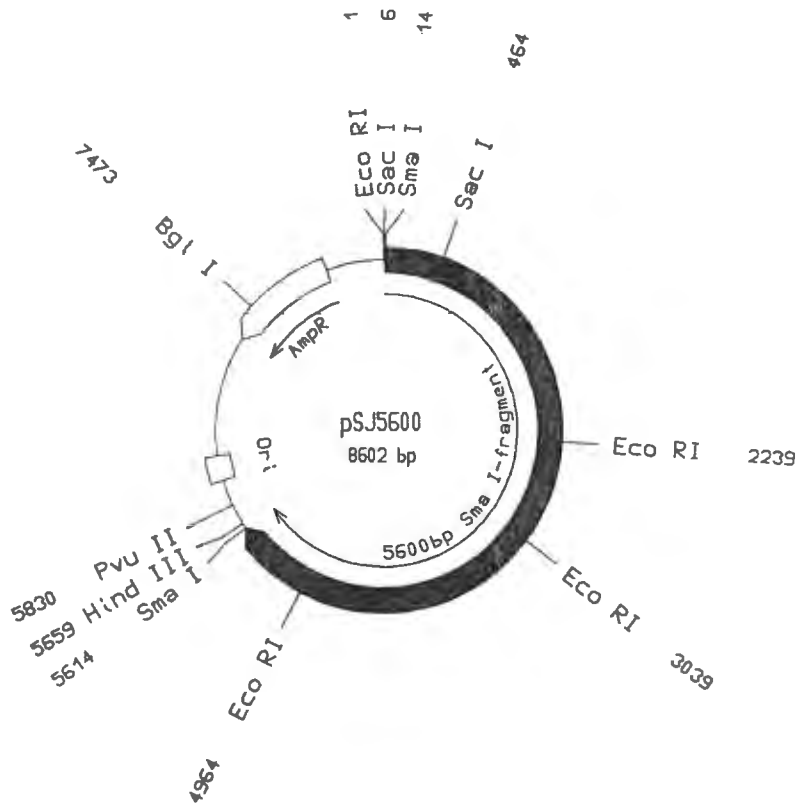
Ligering van fragmente met stomptermine kan aanleiding gee tot 4 moontlike oriëntasies waarin die fragment in 'n identiese voorbereide vektor kan invoeg waarvan 2 oriëntasies 'n effek op die posisies van die restriksiepunte sal hê. Figuur 5.9 toon die twee moontlike oriëntasies aan waarin die 5600bp *Sma* I-fragment (Yang en Clark, 1989) in pSP65 kan invoeg wat die posisies van die restriksiepunte sal beïnvloed. Uit die voorstelling kan gesien word dat die snitpunt vir die restriksie ensiem *Sac* I ideal geleë is om die oriëntasie van die fragment aan te dui.



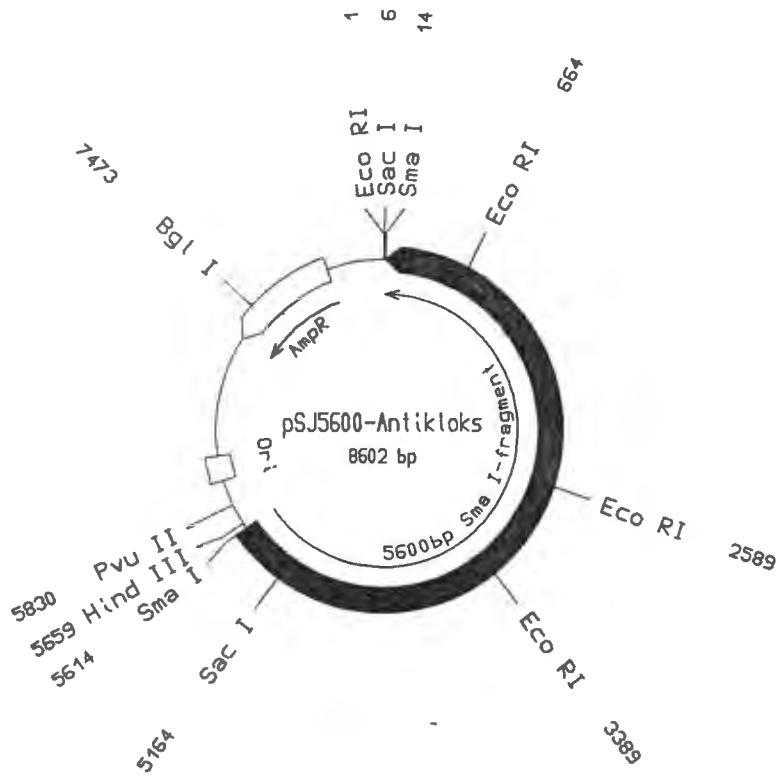
FIGUUR 5.8
PCR-RESULTAAT MET DIE PLASMIED pSJ5600 AS TEMPLAAT
 Die skeiding is op 'n 1% etidiumbromiedbevattende agarosegel uitgevoer.

- Baan 1 : Lambda *Hind* III standaard
- Baan 2 : Negatiewe kontrole - pSP65 as templaar
- Baan 3 : Positiewe kontrole - genomiese DNA as templaar
- Baan 4 : pSJ5600

A



B



FIGUUR 5.9
DIE TWEE ORIËNTASIES WAARIN DIE 5600bp *Sma* I-FRAGMENT IN pSP65 KON INGEVOEG HET

- A. Voorstelling van die kloksgewyse oriëntasie
- B. Voorstelling van die anti-kloksgewyse oriëntasie

Fragmentgroottes van 8425bp en 375bp sal dui op 'n kloksgewyse oriëntasie terwyl fragmentgroottes van 5435bp en 3365bp op die anti-kloksgewyse oriëntasie sal dui. Die *Eco* RI-restriksiepunt kan ook aangewend word om die oriëntasie van die fragment te bepaal.

Die pSJ5600-vektor is gevolglik met die restriksie ensieme soos aangedui behandel (Figuur 5.10). *Sma* I-behandeling van pSJ5600 (Figuur 5.10B, Baan 4), lewer 'n fragment van 5600bp. Die afleiding wat dus gemaak is rondom die mikro-omgewings waarin die fragmente hulle bevind ter verklaring van die verskil in grootte van die *Sma* I-fragment (Afdeling 5.4.1), is dus nie korrek nie. *Sma* I-behandeling van die klone lei tot 'n 5600bp-fragment waarin die uitkenningsvolgordes van die 500bp-peiler voorkom. Die res van die restriksiefragmente stem nie ooreen met die teoretiese fragmentgroottes nie. *Sac* I lewer 3 fragmente teenoor die verwagte 2 fragmente (Figuur 5.10B, Baan 2). Die resultaat kan nie aangewend word om die oriëntasie van die invoegsel te bepaal nie. Behandeling met *Eco* RI lewer weer 1 fragment minder as wat teoreties verwag is (Figuur 5.10B, Baan 3). Die voorkoms van 'n 4800bp *Eco* RI-fragment dui daarop dat die 5600bp *Sma* I-fragment moontlik in die anti-kloksgewyse oriëntasie in die vektor gevoeg het. Die som van die twee teoretiese *Eco* RI-fragmente van 2798bp en 652bp is 3400bp. Hierdie grootte is presies gelyk aan die waargenome fragment van 3400bp. Dit kan op die afwesigheid van hierdie betrokke restriksiepunt dui.

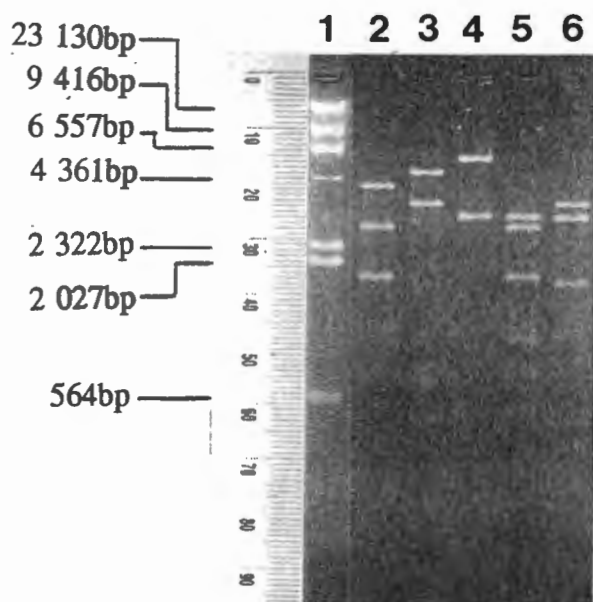
5.4.3 Southern-oordraganalise van pSJ5600

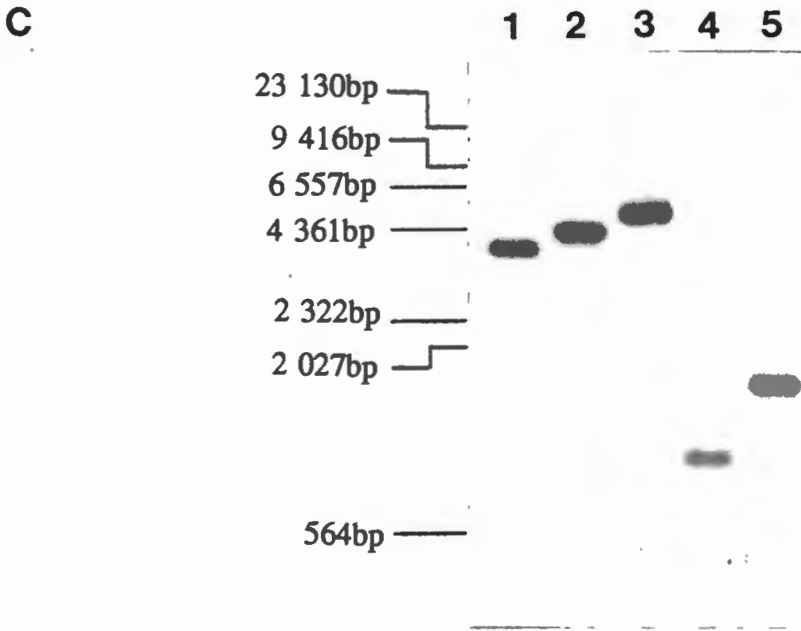
'n Southern-oordraganalise van die restriksiekarterings soos beskryf in Afdeling 5.4.2, is met die 500bp-peiler uitgevoer (Figuur 5.10). Die verwagte hibridiserings het nie voorgekom nie behalwe dat hibridisering aan die 5600bp *Sma* I-fragment voorgekom het (Figuur 5.10C, Baan 3). Die 5600bp *Sma* I-fragment beskik dus oor die uitkennings volgordes van die IL-3 spesifieke 500bp peiler. Met die inligting van die restriksiekartering en die Southern-oordraganalise, is 'n geenkaart van die 5600bp *Sma* I-fragment saamgestel (Figuur 5.11). Omdat die 500bp-peiler wel hibridiseer aan die 5600bp *Sma* I-fragment en die fragment wel 'n 500bp-produk lewer na PCR, is bewys dat die vyfde ekson van die IL-3 geen vervat is in die fragment. Die restriksiekaart van die 5600bp *Sma* I-fragment stel voor dat daar 'n

A

Restriksie ensiem	Teoretiese fragmentgroottes (bp)		Waargenome fragmentgroottes (bp)
	Kloksgewys	Anti-kloksgewys	
<i>Sac</i> I	8425 375	5435 3365	4000 2800 1800
<i>Eco</i> RI	3515 2798 1835 652	4805 2798 652 545	4800 3400 440
<i>Sma</i> I	5600 3000	5600 3000	5600 3000
<i>Sma</i> I - <i>Sac</i> I	5430 2995 370 5	5430 2995 370 5	3000 2800 1800 1000
<i>Sma</i> I - <i>Eco</i> RI	2985 2798 1820 652 530 15	2985 2798 1820 652 530 15	3400 3000 1700 440

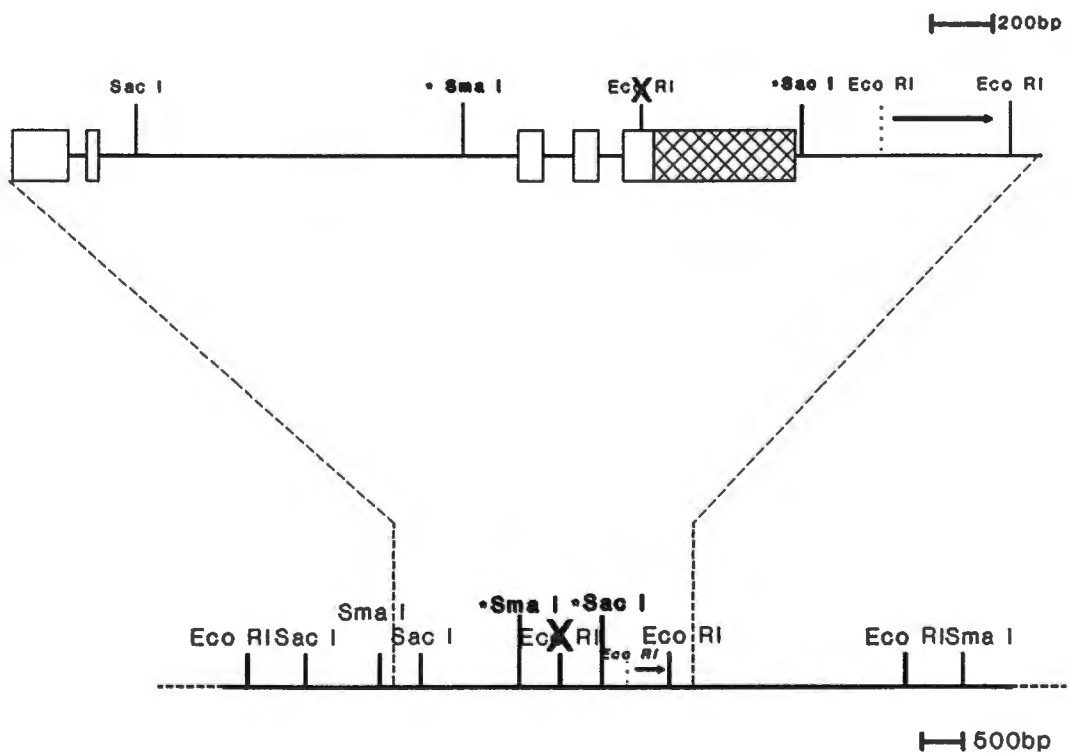
B





FIGUUR 5.10
RESTRIKSIEKARTERING EN SOUTHERN-OORDRAGANALISE VAN pSJ5600

- A. Tabel van die teoretiese restriksie- en Southern-oordraganaliseresultate en waargenome resultate. Die donker en kursief gedrukte groottes is die teoretiese en waargenome hibridiseringsfragmente.
- B. Resultaat van pSJ5600 restriksiebehandeling
- Baan 1 : Lambda *Hind* III standaard
 - Baan 2 : *Sac* I
 - Baan 3 : *Eco* RI
 - Baan 4 : *Sma* I
 - Baan 5 : *Sma* I - *Sac* I
 - Baan 6 : *Sma* I - *Eco* RI -
- C. Southern-oordraganaliseresultaat van pSJ5600
- Baan 1 : *Sac* I
 - Baan 2 : *Eco* RI
 - Baan 3 : *Sma* I
 - Baan 4 : *Sma* I - *Sac* I
 - Baan 5 : *Sma* I - *Eco* RI



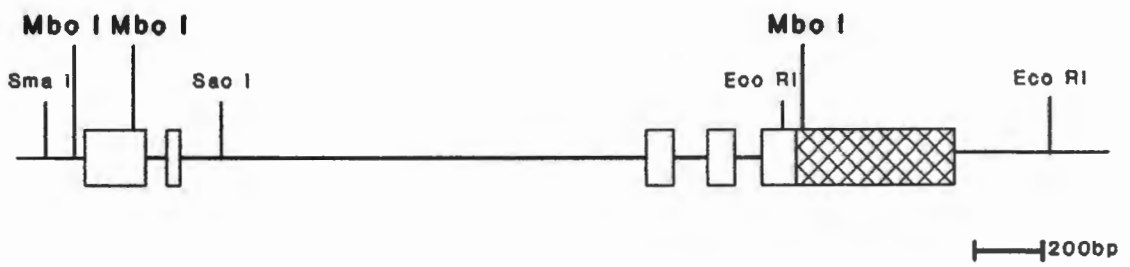
FIGUUR 5.11

GEENKAART VAN DIE 5600bp *Sma* I-FRAGMENT

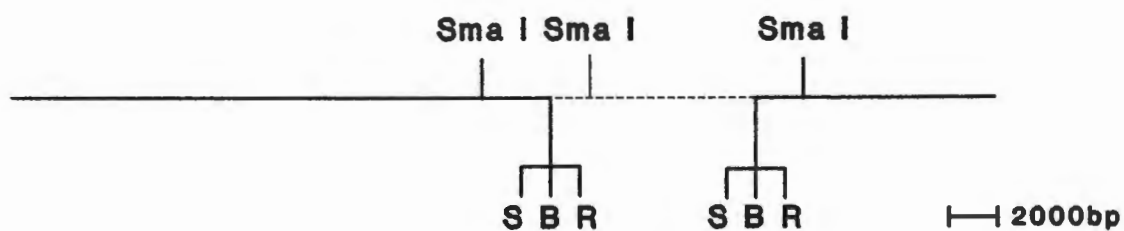
Die asteriske (*) dui die nuwe restriksiepunte aan wat ook donker gedruk is, terwyl die kruis (X) op die afwesigheid van die restriksiepunt dui. 'n Pyl (->) dui die verskuiwing van 'n restriksiepunt aan.

Sma I-restriksiepunt in die tweede intron van die IL-3 geen voorkom, dat daar 'n ekstra *Sac* I-restriksiepunt net na die vyfde ekson van die IL-3 geen voorkom, dat die *Eco* RI-restriksiepunt afwesig is in die vyfde ekson en dat die *Eco* RI-restriksiepunt net afstroom van die vyfde ekson van die IL-3 geen 420bp verder afstroom voorkom. Uit die resultate wil dit voorkom dat die tweede afleiding van Afdeling 5.3.4 nie korrek is nie en dat die IL-3 geen nie volledig vervat is in die 5600bp *Sma* I-fragment nie. Slegs die vyfde en moontlik die vierde en derde eksone is teenwoordig.

Om die afwesigheid van die *Eco* RI-restriksiepunt in die vyfde ekson van die IL-3 geen te probeer verklaar, is daar na 'n *Mbo* I-restriksiekaart van die eksone van die IL-3 geen gekyk (Figuur 5.12). Volgordes van die introne van die IL-3 geen is nie bekend nie. Die genomiese-biblioteek waaruit die klone geïdentifiseer is, is gekonstrueer na 'n gedeeltelike behandeling van genomiese DNA met *Mbo* I (Afdeling 5.2.1). 'n *Mbo* I-restriksiepunt wat net afstroom van die *Eco* RI-restriksiepunt voorkom, kan waargeneem word. Indien *Mbo* I wel by hierdie punt verteer het tydens die konstruksie van die biblioteek, sou die 500bp-peiler nog steeds aan die res van die fragment geïbridiseer het. Die 5600bp-fragment sou egter nie suksesvol as templaar vir PCR gewees het nie, want die uitkeningsgebied van voorvoerder IL-3 5A (Figuur 3.1) sou nie voorgekom het nie. Die 5600bp-fragment is wel suksesvol as templaar tydens PCR aangewend (Figuur 5.8). Die betrokke *Mbo* I-restriksiepunt is dus nie aangewend tydens die konstruksie van die genomiese biblioteek nie. Indien een van die ander 2 *Mbo* I-restriksiepunte betrokke was tydens die konstruksie van die genomiese-biblioteek, is die 5'-kant *Sma* I-restriksiepunt verwyder. Die volgende *Sma* I-restriksiepunt wat moontlik betrokke kan wees in die lewering van 'n *Sma* I-fragment kom in die linkerarm van faag EMBL-3-DNA voor (Figuur 5.13). Die punt is 2600bp opstroom van die kloneringspunt van die genomiese DNA in EMBL-3. Dit sou tot gevolg het dat die *Sma* I-fragment van die klone waaraan die 500bp peiler geïbridiseer het, ongeveer 8200bp groot gewees het. Dieselfde argument geld vir enige *Mbo* I-restriksiepunte wat moontlik in die introne van die IL-3 geen kon voorgekom het. Dieselfde argument is ook geldig indien die genomiese-invoegsel in EMBL-3 in die anti-kloksgewyse oriëntasie ingevoeg het. In die regterarm van faag EMBL-3-DNA kom daar ook 'n *Sma* I-restriksiepunt voor wat ongeveer 2000bp afstroom van die kloneringspunt geleë is. Die manier waarop die genomiese-biblioteek dus gekonstrueer is, kan nie die onvolledige IL-3 geen in die 5600bp *Sma* I-fragment verklaar nie.



FIGUUR 5.12
***Mbo* I-RESTRIKSIEKAART VAN DIE IL-3 GEEN**



FIGUUR 5.13

EMBL-3 *Sma* I-RESTRIKSIEKAART

Die restriksiekaart stel EMBL-3 voor sonder 'n genomiese invoegsel. Die gedeelte van EMBL-3 wat tydens klonering verwyder word, is met 'n stippellyn aangedui. Die multi-kloneringsgebied in EMBL-3 bestaan uit snitpunte vir die ondergenoemde ensieme:

- S - *Sal* I
- B - *Bam* HI
- R - *Eco* RI

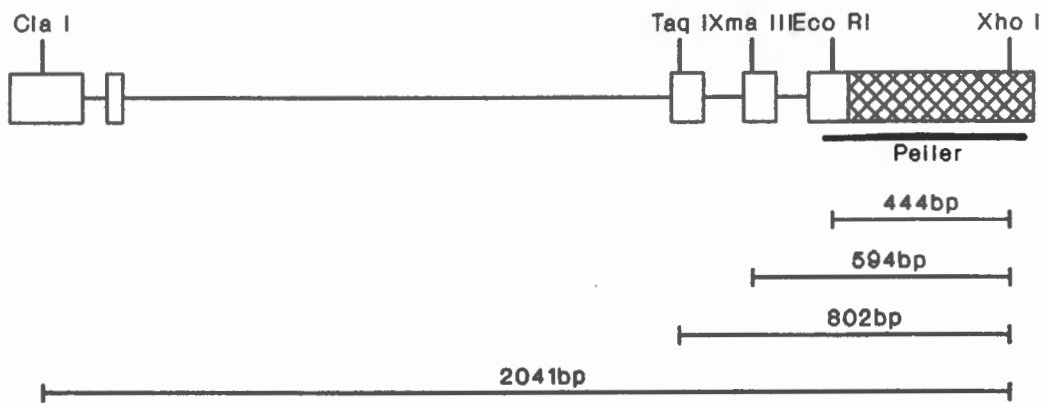
5.5 METODES OM DIE 5'-KANT VAN DIE IL-3 GEEN IN DIE KLONE TE IDENTIFISEER

5.5.1 Bepaling of die 5'-kant van die IL-3 geen in die 1500bp *Sma* I-fragment voorkom

In die voorafgaande Afdeling is die afleidings wat in Afdeling 5.3.4 gemaak is, naamlik dat die waargenome 5600bp *Sma* I-fragment kleiner as 7100bp vertoon as gevolg van die mikro-omgewing waarin die fragmente voorgekom het tydens elektroforese en dat die totale IL-3 geen moontlik vervat is in die 5600bp *Sma* I, verkeerdbewys. In die vorige Afdeling is dit ook aangetoon dat daar moontlik 'n ekstra *Sma* I-restriksiepunt in die tweede intron van die IL-3 geen voorkom wat nie deur Yang en Clark (1989) aangetoon is of geïdentifiseer is nie. Indien daar dus 'n *Sma* I-restriksiepunt voorkom in die 7100bp *Sma* I-fragment (Yang en Clark 1989) behoort die "nuwe" *Sma* I-restriksiepunt die 7100bp-fragment te verdeel in 'n *Sma* I-fragment van 5600bp (soos reeds verkry) en 'n *Sma* I-fragment van 1500bp. As daar weer na Figuur 5.6 gekyk word, kan by elkeen van die klone 'n *Sma* I-fragment van ongeveer 1500bp waargeneem word. Die afleiding wat hieruit gemaak kan word is dat die fragmente moontlik die res van die 7100bp *Sma* I-fragment kan uitmaak, soos deur Yang en Clark (1989) aangetoon is en oor die 5'-kant van die IL-3 geen beskik. Die 500bp-peiler is egter nie instaat om met 'n *Sma* I-restriksiekartering aan te dui of die 5'-kant van die IL-3 geen voorkom in die 1500bp-fragment nie. In die volgende Afdeling word beskryf hoe die genoemde probleem voorkom is.

5.5.1.1 Verdeling van die klone in eksonfragmente

Om die probleem wat in die vorige Afdeling uitgelig is aan te spreek, is die klone met restriksie ensiem-kombinasies behandel sodat daar telkens vanaf die 3'-kant van die geen, terugwerkend al meer eksone van die geen in restriksiefragmente vervat is. Dit het tot gevolg dat die vyfde ekson altyd deel uitmaak van die groter wordende fragmente sodat die 500bp-peiler aangewend kan word vir hibridisering. Die betrokke restriksie ensieme is op grond van hulle lae voorkoms in faag lambda-DNA gekies. In Figuur 5.14 word hierdie beginsel



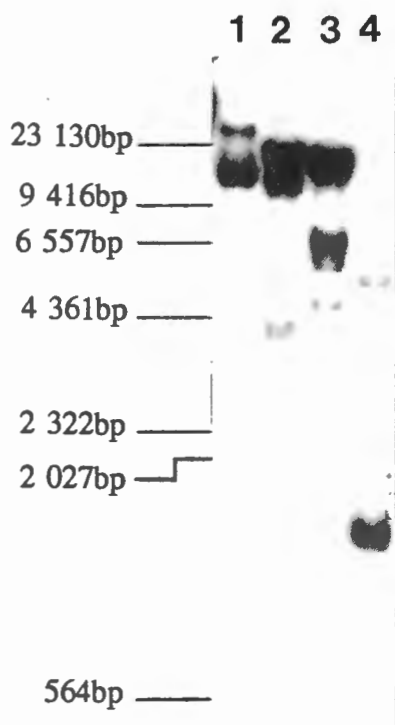
FIGUUR 5.14
VOORSTELLING VAN DIE KARTERING VAN DIE IL-3 GEEN SODAT DIE
VYFDE EKSON ALTYD DEEL VAN DIE RESTRIKSIEFRAGMENTE IS

skematies voorgetel. Indien die klone met die restriksie ensieme *Xho* I en *Eco* RI behandel word, word verwag dat 'n fragment van 444bp aan die 500bp-peiler sal hibridiseer tydens 'n Southern-oordraganalise. Indien die klone met *Xho* I en *Xma* III behandel word en die 500bp-peiler aan 'n fragment van 594bp hibridiseer, is dit seker dat die vierde ekson van die IL-3 geen teenwoordig is. Dieselfde beginsel geld indien hibridisering aan die 802bp *Xho* I - *Taq* I-fragment plaasvind wat op die teenwoordigheid van die derde ekson sal dui. Hibridisering van die peiler aan die 2041bp *Xho* I - *Cla* I-fragment sal beteken dat die volledige IL-3 geen teenwoordig is.

Hierdie eksperiment is uitgevoer soos beskryf, maar na vele pogings wat insluit metodes om die faag-DNA suiwerder te kry, die radio-aktiewe peiler skoner te kry, hoër ensiemkonsentrasies te gebruik tydens die ensiembehandelings van die klone, ander hibridiserings- en waskondisies, kon daar nooit geslaag word om volledige vertering van die klone te bewerkstellig nie. Figuur 5.15 toon 'n tipiese Southern-oordraganalise van 'n kloon. Die verkrygte patroon het nie altyd tot dieselfde mate voorgekom nie. Die resultate wat verkry is, is onverklaarbaar en kan nie aangewend word om te bepaal of die totale IL-3 geen in een van die klone teenwoordig is nie.

5.5.1.2 Analise van die 1500bp *Sma* I-fragment met 'n 5'-kant spesifieke peiler

Om te bepaal of die 1500bp *Sma* I-fragment die 5'-kant van die IL-3 geen bevat en of een van die genomiese invoegsels van 'n kloon oor die volledige IL-3 geen beskik, moet peilers verkry word wat spesifiek is vir die 5'-kant, die middelste gedeelte en die 3'-kant van die IL-3 geen. Die aanwending van oligonukleotied IL-3 1A as peiler om te bepaal of die 5'-kant van die geen teenwoordig is, is nie oorweeg omdat die oligonukleotied as voorvoerder tydens PCR nie 'n produk tot gevolg gehad het nie. Dit is dus nie seker of die oligonukleotied as peiler aangewend kan word nie. 'n Peiler wat aan al die gestelde kriteria voldoen, is "British Bio-technology's" "Designer gene" reeks wat ook 'n sintetiese geen van mens IL-3 insluit (katalogusnommer BBG14). Die volgorde van die sintetiese geen is gebaseer op die volgorde wat deur Yang *et al.*, (1986) gepubliseer is en kodeer vir die volwasse IL-3 proteïen van 133 aminosure met 'n massa van 14.6kD. Die volgorde van die sintetiese geen is verander om



FIGUUR 5.15
VOORBEELD VAN HOE DIE SOUTHERN-OORDRAGANALISE VAN DIE KLONE
DAARNA UITGESIEN HET

- Baan 1 : *Cla* I - *Xho* I
- Baan 2 : *Taq* I - *Xho* I
- Baan 3 : *Xma* III - *Xho* I
- Baan 4 : *Eco* RI - *Xho* I

A

			10	20	30	40	50	
IL-3	Natuurlik	1	APMTQTTSLK	TSWVNCSNMI	DEIITHLKQP	PLPLDFNNL	NGEDQDILME	5
IL-3	Sinteties	1	*****P**	*****	*****	*****	*****	
			60	70	80	90	100	
IL-3	Natuurlik	51	NNLRRPNLEA	FNRAVKSLQN	ASAIESILKN	LLPCLPLATA	APTRHPIHIK	10
IL-3	sinteties	51	*****	*****	*****	*****	*****	10
			110	120	130	140	150	
IL-3	Natuurlik	101	DGDWNEFRRK	LTFYLKTLEN	AQAQQTLSL	AIF.....	15
IL-3	Sinteties	101	*****	*****	*****	***.....	15

B

IL-3	NatuurlikCAAGCTCCCATGACCCAGACAACGCCCTTGAAGACAAGCTGGGTAACTGC
IL-3	SintetiesATG*****TAGT*****
IL-3	Natuurlik	TCTAACATGATCGATCAAATTATAACACACTTAAAGCAGCCACCTTTGCCTTTGCTGGAC
IL-3	Sinteties	*****
IL-3	Natuurlik	TTCAACAACCTCAATGGGGAAGACCAAGACATTCTGATGGAAAATAACCTTCGAAGGCCA
IL-3	Sinteties	*****
IL-3	Natuurlik	AACCTGGAGGCATTCAACAGGGCTGTCAAGAGTTTACAGAATGCATCAGCAATTGAGAGC
IL-3	Sinteties	*****
IL-3	Natuurlik	ATTCTTAAAAATCTCCTGCCATGTCTGCCCTGGCCACGGCCGCACCCACGCGACATCCA
IL-3	Sinteties	*****
IL-3	Natuurlik	ATCCATATCAAGGACGGTGACTGGAATGAATTCCGGAGGAACTGACGTTCTATCTGAAA
IL-3	Sinteties	*****
IL-3	Natuurlik	ACCCTTGAGAATGCGCAGGCTCAACAGACGACTTTGTCGCTAGCGATCTTTTAGTCC....
IL-3	Sinteties	*****TAA....

* Dui ooreenkomste aan

FIGUUR 5.16
VERGELYKING TUSSEN DIE GEPUBLISEERDE IL-3 GEEN VOLGORDE VAN
YANG EN CLARK (1989) EN DIE VOLGORDE VAN DIE SINTETIESE IL-3 GEEN

A. Aminosuurvolgorde
 B. Nukleotiedvolgorde

nuttige restriksiepunte in te bou, maar verskil nie baie van die oorspronklike volgorde wat deur Yang *et al.*, (1986) gepubliseer is nie (Figuur 5.16). Die sintetiese geen beskik oor 'n ATG-kodon wat kodeer vir 'n N-terminale metionien in die proteïen. Die sintetiese IL-3 geen is tussen die *Hind III*- en *Eco RI*-restriksiepunte van die pUC18 vektor gekloneer (Figuur 5.17).

Hierdie geen is verkry en die 327bp *Hind III* - *Eco RI*-fragment is voorberei as 5'-peiler vir die IL-3 geen om te bepaal of die 1500bp *Sma I*-fragment van die klone oor IL-3-volgordes beskik wat nie deur die 500bp-peiler opgespoor is nie. Die *Hind III* - *Eco RI*-fragment van pBBG14 bevat nie die vyfde ekson van die IL-3 geen nie. Die Southern-oordraganalise is uitgevoer soos in Afdeling 5.3.4. beskryf is. Die peiler het nie aan die 1500bp *Sma I*-fragmente geïbridiseer nie. Daar het wel hibridisering aan die 5600bp *Sma I*-fragmente voorgekom. Die afleiding wat in Afdeling 5.4.4 gemaak is wat beweer dat die 5'-kant van die IL-3 moontlik vervat is in die waargenome 1500bp *Sma I*-fragmente is dus nie korrek nie. Die hibridisering van die peiler, wat nie oor die volgorde van die vyfde ekson van die IL-3 geen beskik nie, aan die 5600bp *Sma I*-fragment, kan dui op die teenwoordigheid van die vierde en derde eksons soos reeds beweer is (Afdeling 5.4.3) en dat die res van die IL-3 geen nie teenwoordig is in die ses geïsoleerde klone nie. Die afleiding word in die volgende Afdeling getoets.

5.5.2 Bepaling of die volledige IL-3 geen teenwoordig is in die geïsoleerde klone

Die 5600bp *Sma I*-fragment bevat definitief die vyfde ekson van die IL-3 geen en ook die vierde en derde eksons (Figuur 5.11) of dele daarvan (Afdeling 5.5.1.2). Die 5'-kant peiler van die IL-3 geen het nie geïbridiseer aan die verwagte 1500bp-fragmente nie. Daar het ook geen ander hibridiserings voorgekom wat moontlik op die teenwoordigheid van die 5'-kant van die IL-3 geen kan dui nie. Om te bevestig dat die IL-3 geen nie volledig in die ses geïsoleerde klone vervat is nie, is peilers uit die sintetiese IL-3 geen berei wat 'n 5'-kant peiler, 'n peiler spesifiek vir die middelste gedeelte van die IL-3 geen en 'n 3'-kant peiler spesifiek vir die IL-3 geen insluit. Die 5'-kant peiler is die 71bp *Hind III* - *Taq I*-fragment

```

10      20      30      40      50      60
aagcttaccATGGCTCCCATGACCCAGACAAGCTTTGAAGACAAGCTGGGTTAACTGC
Hind III Nco I                               Hpa I
ttcgaatggTACCGAGGGTACTGGGTCTGTTGATCAAACCTTCTGTTTCGACCCAATTGACG

70      80      90      100     110     120
TCTAACATGATCGATCAAATTATAACACACTTAAAGCAGCCACCTTTGCCTTTGCTGGAC
Taq I
AGATTGTACTAGCTACTTTAATATTGTGTGAATTTTCGTCGGTGGAACGGAAACGACCTG

130     140     150     160     170     180
TTCAACAACCTCAATGGGGAAGACCAAGACATTCTGATGGAAAATAACCTTCGAAGGCCA
Taq I
AAGTTGTTGGAGTTACCCCTTCTGGTTCTGTAAGACTACCTTTTATTGGAAGCTTCCGGT

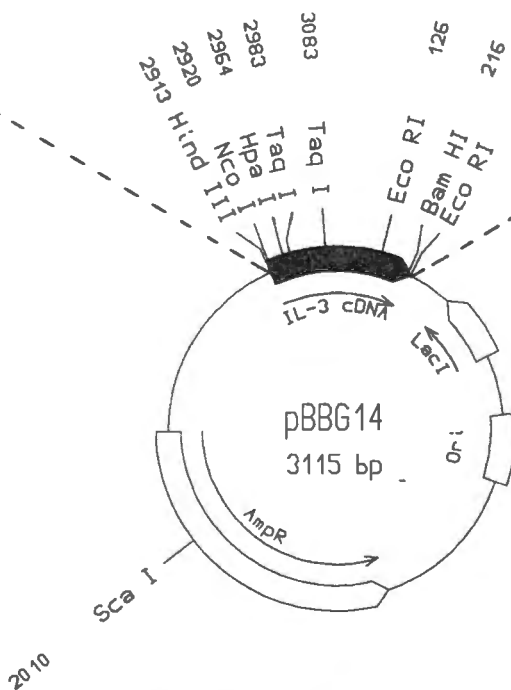
190     200     210     220     230     240
AACCTGGAGGCATTC AACAGGGCTGTCAAGAGTTTACAGAATGCATCAGCAATTGAGAGC
TTGGACCTCCGTAAGTTGTCCCGACAGTTCTCAAATGTCTTACGTAGTCGTTAACTCTCG

250     260     270     280     290     300
ATTCTTAAAAATCTCCTGCCATGTCTGCCCCTGGCCACGGCCGCACCCACGCGACATCCA
TAAGAATTTTTAGAGGACGGTACAGACGGGGACCGGTGCCGGCGTGGGTGCGCTGTAGGT

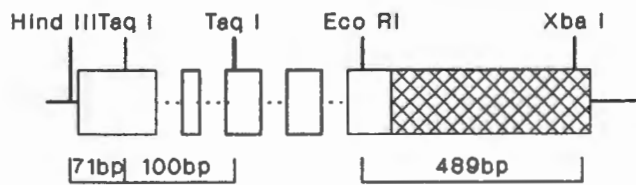
310     320     330     340     350     360
ATCCATATCAAGGACGGTGACTGGAATGAATTCGGAGGAACTGACGTTCTATCTGAAA
Eco RI
TAGGTATAGTTCTGCCACTGACCTTACTTAAGGCCTCCTTTGACTGCAAGATAGACTTT

370     380     390     400     410     420     42
ACCCTTGAGAATGCGCAGGCTCAACAGACGACTTTGTGCTAGCGATCTTTTAGTAaggatccgaatt
Bam HI Eco RI
TGGGAActCTTACGCGTCCGAGTTGTCTGCTGAAACAGCGATCGCTAGAAAATCATTcctagggttaa

```



FIGUUR 5.17
PLASMIEDKAART VAN DIE SINTETIESE IL-3 GEEN IN pUC18



FIGUUR 5.18
VOORSTELLING VAN DIE VERKRYGING VAN 'N 5'-KANT SPESIFIEKE, DIE
MIDDELSTE GEDEELTE SPESIFIEKE EN 'N 3'-KANT SPESIFIEKE PEILER
VANUIT DIE SINTETIESE IL-3 GEEN

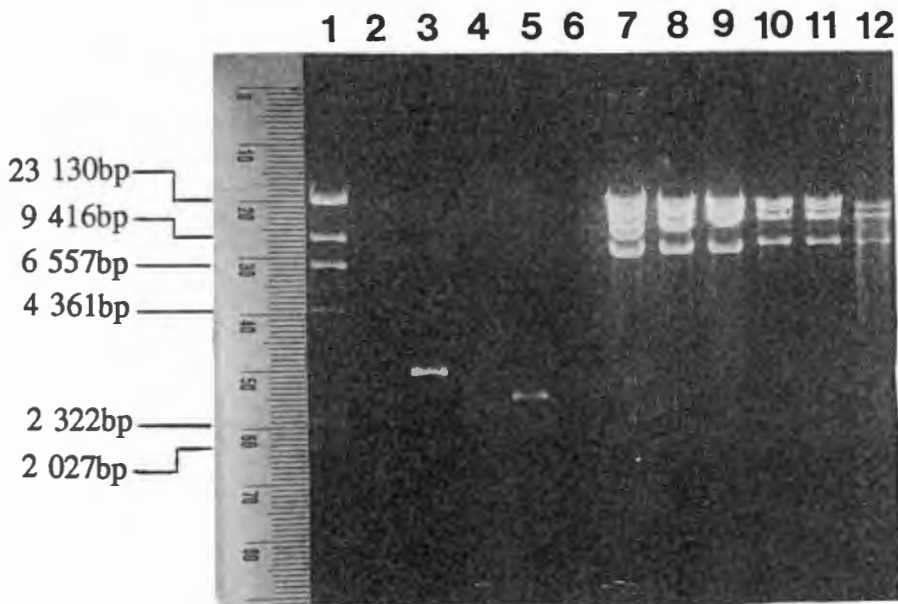
van die sintetiese IL-3 geen (Figuur 5.18), terwyl die peiler spesifiek vir die middelste gedeelte van die IL-3 geen die 100bp *Taq* I-fragment is. Die 3'-kant peiler is die 489bp *Eco* RI - *Xba* I-fragment van pSJ3500. Die 489bp-peiler is met behulp van GENE CLEAN II™ (BIO101 No. 3106) uit 'n agarosegel geïsoleer terwyl die 71bp en die 100bp-fragmente met behulp van akrielamiedgelelektroforese (Sambrook *et al.*, 1989) geïsoleer is. Die 489bp-fragment is radio-aktief gemerk met die Random Prime Labeling Kit™ (Amersham) soos in Afdeling 5.2.2 beskryf is. Die kleiner fragmente is radio-aktief gemerk met die Klenowensiem soos beskryf deur Sambrook *et al.*, (1989).

Om te voorkom dat vertering van die genomiese invoegsels in die klone kan lei tot halvering van die IL-3 geen, is die klone behandel met die restriksie ensiem *Sal* I. Die ensiem kom aan weerskante van die kloneringsgebied van die EMBL-3 vektor voor (Figuur 5.13) en sny die genomiese invoegsel uit EMBL-3 (Figuur 5.19).

Southern-oordraganalises van die *Sal* I-behandelde klone word in Figuur 5.20 gegee. Die 3'-kant peiler het aan die 9kb *Sal* I-fragment gehibridiseer. Die middelste peiler en die 5'-kant het nie aan die *Sal* I-fragmente gehibridiseer nie.

5.6 SAMEVATTING

In hierdie Hoofstuk is die verkryging van die mens IL-3 geen deur middel van genomiese-biblioteekafasting beskryf. Verskeie metodes is aangewend om die klone te karakteriseer. Hieruit is bevind dat al ses die geïsoleerde klone net uit die derde, vierde en vyfde eksone van die IL-3 geen bestaan. Die logiese stap hierna sal wees om nog klone af te tas met die sintetiese IL-3 cDNA as peiler om wel 'n vollengte IL-3 geen te isoleer. Tyd is egter 'n beperkende faktorkomponent en daarom is besluit om eerder die sintetiese IL-3 cDNA in 'n eukariotiese en prokariotiese uitdrukkingssisteem uit te druk as om bekende tegnieke te herhaal. Die uitdrukking van die IL-3 cDNA in 'n eukariotiese- en prokariotiese uitdrukkingssisteem word in Hoofstukke 6 en 7 onderskeidelik beskryf.

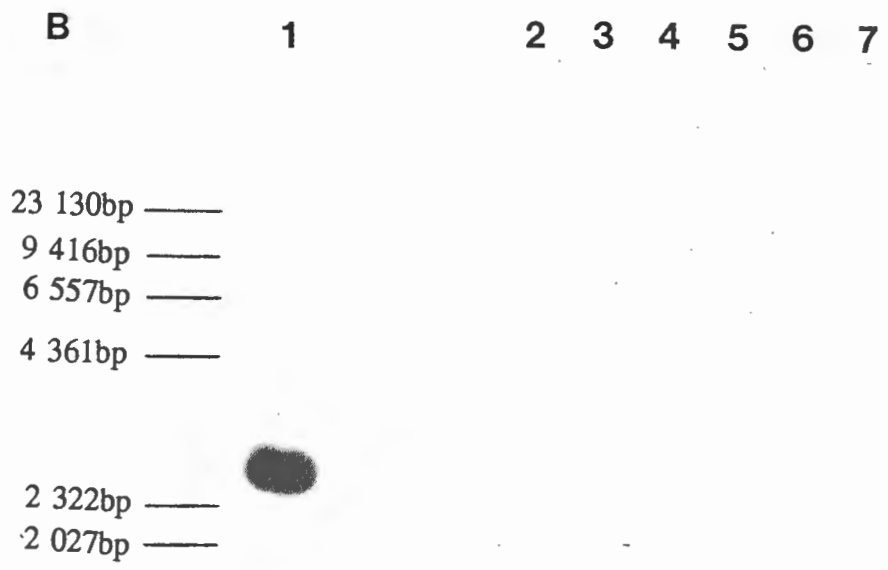
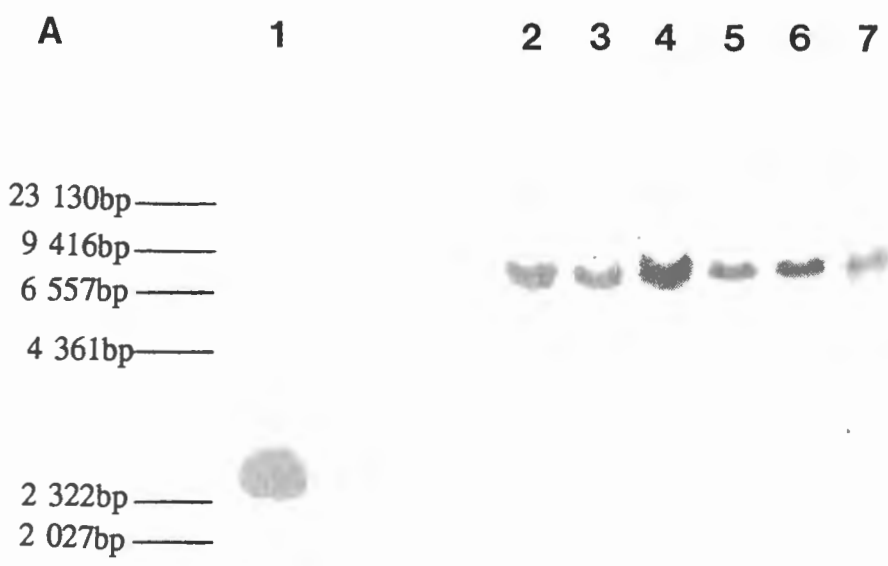


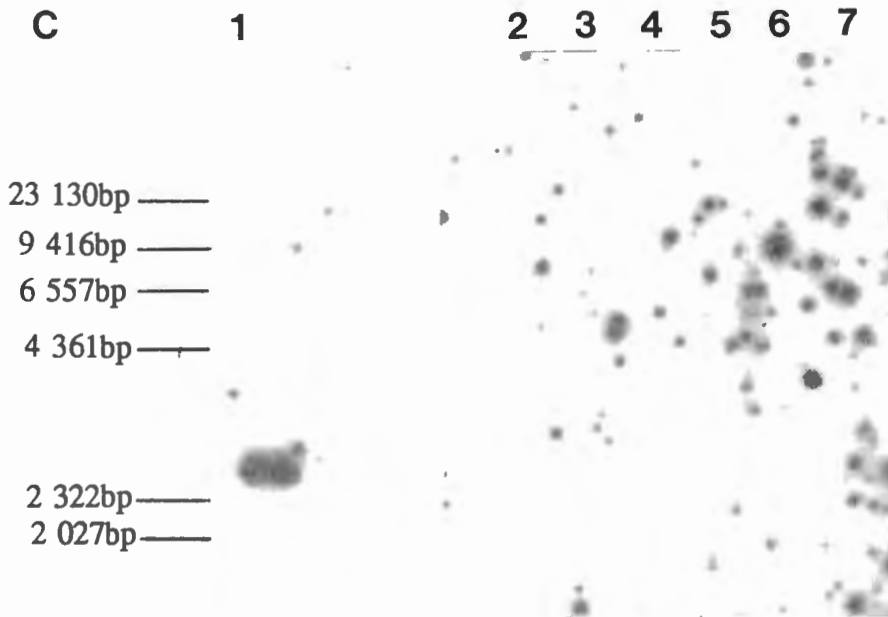
FIGUUR 5.19

RESULTAAT VAN DIE *Sal* I-BEHANDELING VAN DIE KLONE

Die fragmente is op 'n 1% etidiumbromiedbevattende agarosegel geskei.

- Baan 1 : Lambda *Hind* III standaard
- Baan 2 : Oop
- Baan 3 : Positiewe kontrole - *Hind* III behandelde pBBG14
- Baan 4 : Oop
- Baan 5 : Negatiewe kontrole - *Hind* III behandelde pUC18
- Baan 6 : Oop
- Baan 7 : Kloon 1
- Baan 8 : Kloon 2
- Baan 9 : Kloon 3
- Baan 10: Kloon 4
- Baan 11: Kloon 5
- Baan 12: Kloon 6





FIGUUR 5.20
SOUTHERN-OORDRAGANALISE VAN DIE *Sal* I-BEHANDELDE KLONE

- A. 489bp *Eco* RI - *Xba* I-peiler (3'-kant van die IL-3 geen)
- B. 100bp *Taq* I-peiler (middelste gedeelte van die IL-3 geen)
- C. 71bp *Hind* III - *Taq* I-peiler (5'-kant van die IL-3 geen)

- Baan 1 : Positiewe kontrole - *Hind* III behandelde pBBG14
- Baan 2 : Kloons 1
- Baan 3 : Kloons 2
- Baan 4 : Kloons 3
- Baan 5 : Kloons 4
- Baan 6 : Kloons 5
- Baan 7 : Kloons 6

HOOFSTUK 6

KLONERING EN UITDRUKKING VAN DIE IL-3 GEEN IN 'N EUKARIOTIESE UITDRUKKINGSSISTEEM

6.1 INLEIDING

Die sintetiese IL-3 cDNA (Afdeling 5.4.5) bevat die nukleotiedvolgorde wat kodeer vir die volwasse IL-3 proteïen, maar die gedeelte wat vir die seinpeptied kodeer is nie teenwoordig nie. Indien die cDNA dus in 'n eukariotiese uitdrukkingssisteem uitgedruk sou word, is die moontlikheid groot dat die IL-3 proteïen nie in die voedingsmedium uitgeskei sal word nie, maar wel in die selle sal agterbly. Om enige proteïenanalises uit te voer, moet die selle oopgebreek word om die proteïene vry te stel. Baie van die oopbreekmetodes is destruktief wat die biologies-aktiewe struktuur van proteïene vernietig of wat die omgewing waarin die proteïen voorkom ongunstig maak vir die uitvoering van biologiese toetse. In hierdie hoofstuk word die klonering en uitdrukking van die mens IL-3 cDNA in 'n eukariotiese uitdrukkingssisteem beskryf aan die hand van die volgende vraag:

Kan 'n biologies-aktiewe rhIL-3 proteïen deur 'n eukariotiese uitdrukkingssisteem gesintetiseer word ?

Om te bepaal of die sintetiese cDNA wel kodeer vir 'n biologies-aktiewe rhIL-3 proteïen, is besluit om die cDNA in 'n eukariotiese uitdrukkingssisteem uit te druk en die selle deur middel van vries-en-ontvries siklusse oop te breek en dan te toets vir hIL-3 spesifieke aktiwiteit.

6.2 KLONERING EN UITDRUKKING VAN DIE IL-3 GEEN IN 'N EUKARIOTIESE UITDRUKKINGSSISTEEM

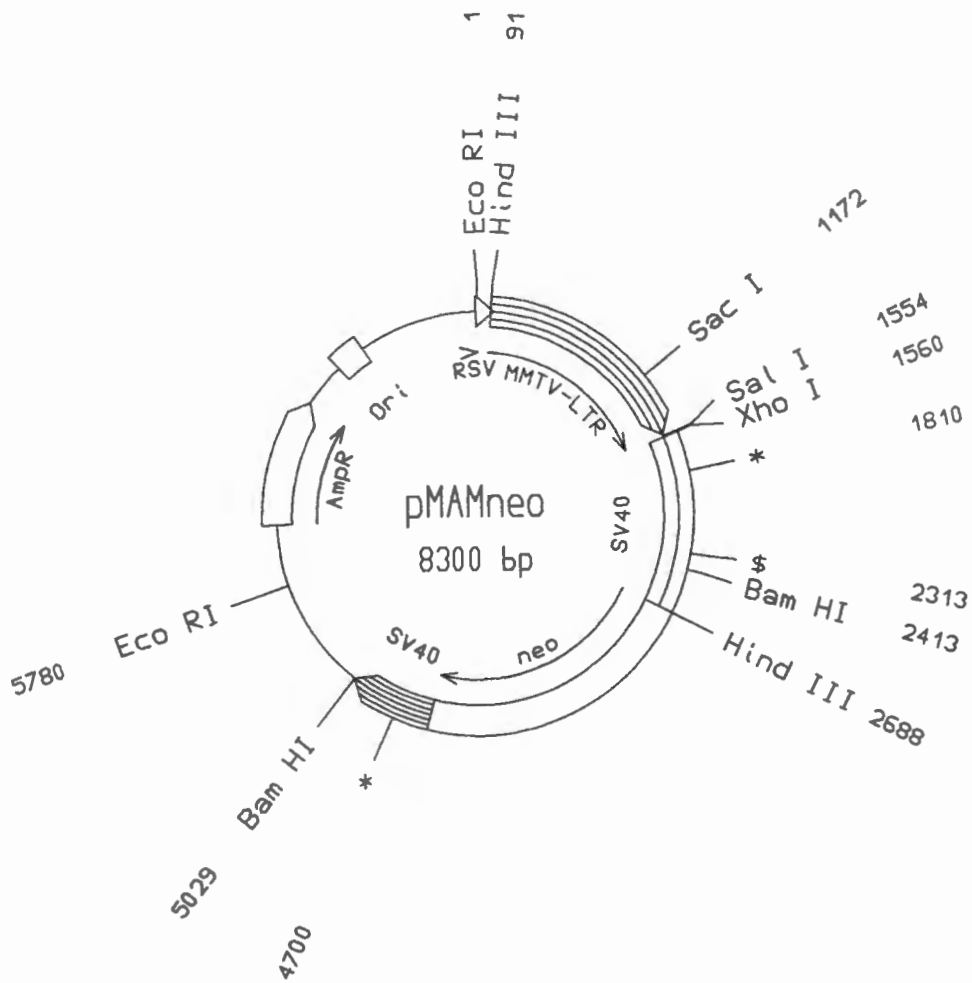
6.2.1 Identifisering van 'n geskikte eukariotiese sellyn

Om te verseker dat 'n biologies-aktiewe proteïen geproduseer word in 'n uitdrukkingssisteem, moet die omstandighede tydens sintese van die rekombinante-proteïen so na as moontlik wees aan die omstandighede tydens die natuurlike sintese van die proteïen. Biologiese-aktiwiteit van 'n proteïen word baie keer beïnvloed deur die post-translacionele modifikasies wat 'n proteïen ondergaan. Soogdierselle beskik uiteraard oor 'n omgewing wat dieselfde is as waarin die IL-3 proteïen normaalweg gesintetiseer word. Modifikasies soos glikosilering, disulfiedbrugvorming en proteïenvouing vind ook in hierdie sisteme plaas (Kaufman, 1987).

CHO-selle (Chinese hamster ovary cells) beskik oor baie goeie eienskappe wat die soogdiersellyn 'n geskikte kandidaat maak vir die produksie van 'n biologies-aktiewe IL-3 proteïen. Hierdie selle word al vir 'n geruime tyd vir genetiese analises in weefselkulture gebruik (Scahill *et al.*, 1983; Kao *et al.*, 1969). CHO-selle is aanvanklik uit vroulike hamsters geïsoleer (Puck *et al.*, 1958) en 'n sub-sellyn, naamlik CHO-K1 (ATCC CCL61), het die algemeen gebruikte sellyn geword. Die eienskappe van CHO-selle wat van hulle ideale uitdrukkingssisteme maak waarmee rekombinante proteïene gesintetiseer kan word, is dat hulle baie maklik groei en 'n verdubbelingstyd van net 12 uur het, hulle kloneringseffektiwiteit is so hoog as 80% en hulle kan maklik deur 'n aantal metodes getransfekteer word (Gottesman, 1987). Hierdie sellyn het egter ook nadele soos dat dit nie in suspensie gekweek kan word nie (Gottesman, 1987), maar dit is nie van toepassing op hierdie studie nie.

6.2.2 Identifisering van 'n geskikte soogdieruitdrukkingsektor

Verskeie eukariotiese uitdrukkingsektore is kommersieël beskikbaar. Vir die produksie van biologies-aktiewe mens IL-3 proteïen is besluit om die pMAM*neo* eukariotiese uitdrukkingsektor van Clontech te gebruik (katalogus nommer 6104-1) (Figuur 6.1). pMAM*neo* is 'n soogdier uitdrukkingsektor wat ontwikkel is vir hoë vlak uitdrukking van eukariotiese gene. Die vektor beskik verder oor die RSV-LTR versterker (enhancer) wat gekoppel is aan die deksametasoon-induseerbare MMTV-LTR promotor. Hierdie konstruksie



FIGUUR 6.1
SKEMATIESE VOORSTELLING VAN DIE VEKTOR pMAMneo
 Die belangrikste gene en restriksiepunte word in die voorstelling aangedui.

- * SV40 vroë splytings gebied en poli-adenilering
- \$ SV40 ori en vroë promotor

het gekontroleerde maar hoë uitdrukking van gekloneerde volgordes tot gevolg. Die SV40 splytings- en poli-adenileringspunte laat RNA-prosessering in soogdierselle toe. Die *E.coli neo*-geen, wat deur die SV40 vroë promotor gereguleer word, laat die seleksie toe van transformante wat in G418 antibiotika-bevattende medium groei. 'n pBR322-oorsprong van replisering en die teenwoordigheid van 'n ampisillienweerstandbiedeheidsgeen laat vermeerdering van die vektor in *E.coli* toe (Lee *et al.*, 1981). Die vektor bevat ook drie unieke restriksiepunte vir die klonering van DNA-fragmente, naamlik *Nhe I*, *Sal I* en *Xho I*.

6.2.3 Konstruksie van pSJ100

Die IL-3 cDNA kom tussen 'n *Hind III* en *Bam HI* fragment van 417bp in vektor pBBG14 voor (Figuur 6.2). Die restriksiepunte is nie komplementêr aan die drie unieke klonerings-restriksiepunte in pMAM*neo* nie. Om klonerings-restriksiepunte te skep, is die tussenvektor, pSJ100, soos volg gekonstrueer: pBBG14 is met die restriksie ensieme *Hind III* en *Sca I* behandel. Dit het twee fragmente van 0.9kb en 2.2kb onderskeidelik gelewer. Met behulp van gelelektroforese en GENE CLEAN II™ (BIO101 No. 3106) is die 2.2kbp fragment geïsoleer.

pSP65 is op sy beurt met *Hind III* en *Sca I* verteer. Fragmente van onderskeidelik 1.7kb en 1.3kb is verkry waarna die 1.3kb fragment met behulp van gelelektroforese en GENE CLEAN II™ (BIO101 No. 3106) geïsoleer is. Ekwimolêre hoeveelhede van die geïsoleerde 2.2kb pBBG14-fragment is met die geïsoleerde 1.3kb pSP65-fragment geligeeer. Die resulterende vektor pSJ100 beskik oor die IL-3 cDNA met 'n *Sal I* restriksiepoint wat afstroom van die 5'-kant van die geen voorkom. Die konstruksiestrategie van pSJ100 word in Figuur 6.3 uiteengesit.

6.2.4 Konstruksie van pSJIL-3(E)

Die *Sal I* restriksiepoint wat deur die konstruksie van pSJ100 aan die 5'-kant van die IL-3 cDNA bygevoeg is, kan saam met die *Sal I* restriksiepoint in pMAM*neo* aangewend word om

die 5'-kant van die IL-3 cDNA in pMAMneo te kloneer. Invoeging van die 3'-kant van die IL-3 cDNA in pMAMneo is as volg bewerkstellig: pSJ100 is met *Bam* HI behandel wat twee fragmente lewer van onderskeidelik 451bp en 3 024bp. Die IL-3 cDNA bevattende fragment van 451bp is met gelelektroforese en GENE CLEAN II™ (BIO101 No. 3106) geïsoleer, waarna die *Bam* HI termini stomp gemaak is deur die Klenowreaksie. Hierdie fragment is vervolgens met *Sal* I behandel en die resulterende fragment van 439bp bevat die IL-3 cDNA-fragment met 'n *Sal* I restriksiepunt aan die 5'-kant en 'n stomp terminus aan die 3'-kant van die fragment. pMAMneo is met *Xho* I behandel waarna die *Xho* I termini ook deur die Klenowreaksie stomp gemaak is. Die pMAMneo-fragment is daarna met *Sal* I behandel. Die resulterende pMAMneo-fragment beskik dus nou oor 'n *Sal* I restriksiepunt en 'n stomp terminus, identies aan die fragment wat die IL-3 cDNA bevat. Ekwimolêre hoeveelhede van die twee fragmente is aan mekaar geligter en die eukariotiese uitdrukkingsektor pSJIL-3(E) is gekonstrueer. Die konstruksiestrategie van pSJIL-3(E) word in Figuur 6.4 voorgestel.

Om te bevestig dat pSJIL-3(E) korrek gesintetiseer is, is die vektor met 5 restriksie ensieme gekarteer. Tabel 6.1 bevat die teoretiese restriksiefragmentgroottes en die eksperimenteel waargenome fragmentgroottes, terwyl die resultaat van die karakterisering in Figuur 6.5 gegee word. Hierdie karakterisering bevestig dat pSJIL-3(E) korrek gesintetiseer is.

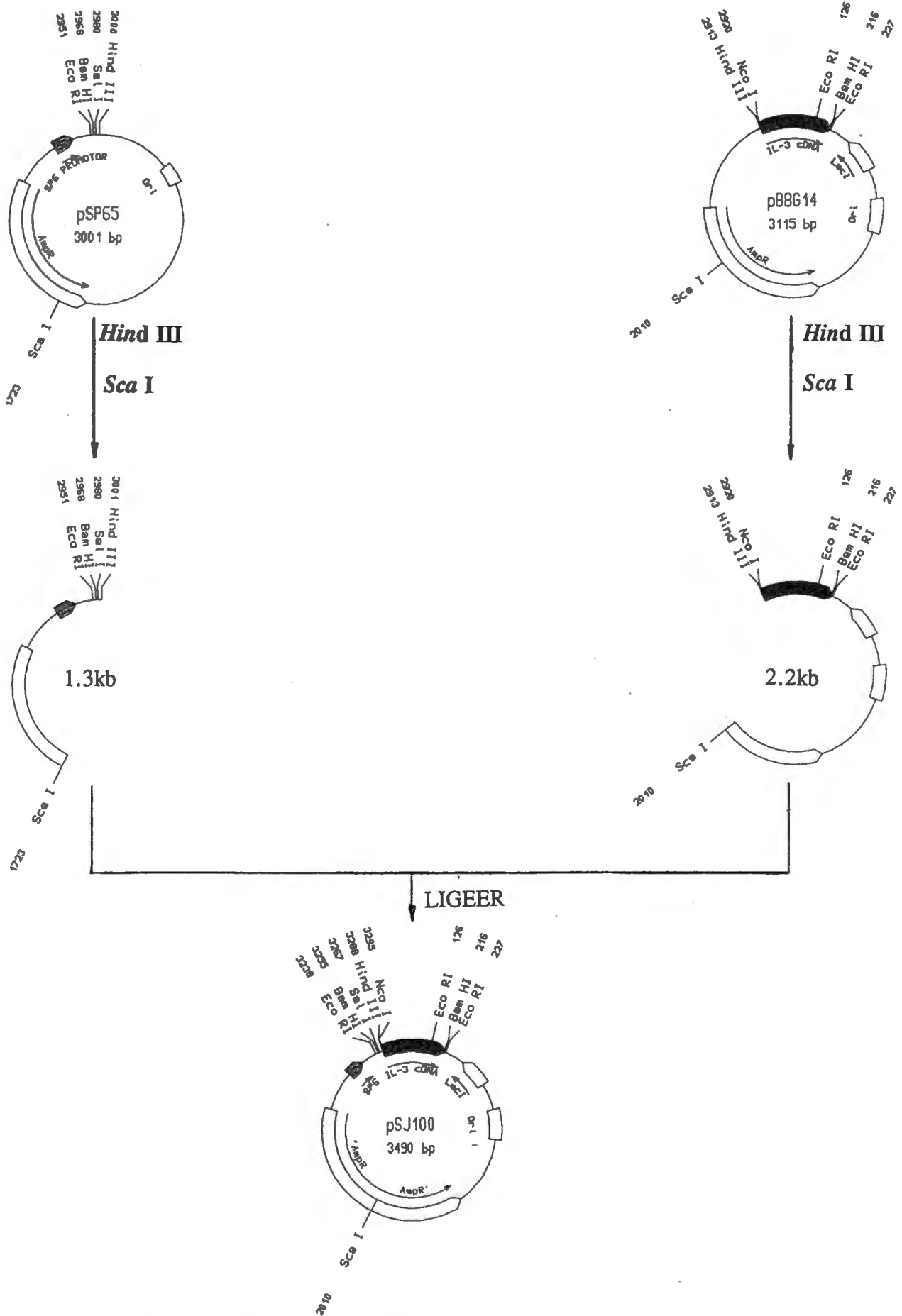
6.2.5 Samevatting

Uit die resultate van die restriksiekartering van pSJIL-3(E) is die afleiding gemaak dat die uitdrukkingsektor korrek gekonstrueer is. Die vektor kan nou gebruik word om CHO-K1-selle te tranfekteer vir die produksie van biologies-aktiewe mens IL-3 proteïene.

6.3 UITDRUKKING VAN pSJIL-3(E) IN CHO-K1-SELLE

6.3.1 Inleiding

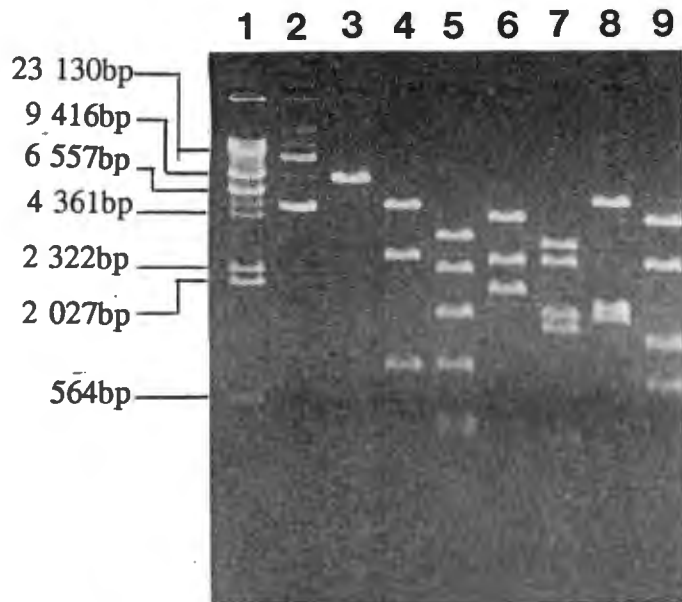
CHO-K1-selle is as die soogdierselle vir die produksie van die IL-3 proteïene gekies. CHO



FIGUUR 6.3
VOORSTELLING VAN DIE KONSTRUKSIE VAN pSJ100

TABEL 6.1
TEORETIESE RESTRIKSIEFRAGMENTGROOTTES VAN DIE
RESTRIKSIEKARTERING EN DIE WAARGENOME FRAGMENTGROOTTES VAN
pSJIL-3(E)

Restriksie ensiem	Teoretiese fragmentgroottes (kb)	Waargenome fragmentgroottes (kb)
<i>Sal</i> I	8.9	8.8
<i>Bam</i> HI	5.3 2.7 0.9	5.1 2.6 0.8
<i>Bam</i> HI - <i>Hind</i> III	3.3 2.3 1.5 0.9 0.4 0.3	3.4 2.2 1.4 0.8 0.4 0.3
<i>Eco</i> RI	4.4 2.5 2.0	4.3 2.5 1.8
<i>Eco</i> RI - <i>Hind</i> III	3.1 2.5 1.6 1.3 0.3 0.09	3.0 2.5 1.4 1.2 0.3
<i>Hind</i> III	5.7 1.6 1.6	5.5 1.6 1.5
<i>Sac</i> I - <i>Eco</i> RI	4.4 2.5 1.3 0.7	4.3 2.4 1.2 0.6



FIGUUR 6.5

RESULTAAT VAN DIE RESTRIKSIEKARTERING VAN pSJIL-3(E)

Na die ensiembehandeling is die fragmente op 'n 1% etidiumbromiedbevattende agarosegel geëlektroforeer.

Baan 1 : Lambda *Hind* III grootte standaard

Baan 2 : Onbehandelde pSJIL-3(E)

Baan 3 : *Sal* I

Baan 4 : *Bam* HI

Baan 5 : *Bam* HI - *Hind* III

Baan 6 : *Eco* RI

Baan 7 : *Eco* RI - *Hind* III

Baan 8 : *Hind* III

Baan 9 : *Sac* I - *Eco* RI

-K1-selle groei optimaal by 37 °C in 'n gehumidifiseerde inkubator en verkies 'n pH van 7.4 - 7.8. Die atmosferiese CO₂-konsentrasie moet 5% wees. Transformering van CHO-K1-selle veroorsaak dat die selle oplik en gevolglik sterf sodra hulle aanmekaar raak. Die getransformeerde selle moet dus gereeld verdeel word en die ideaal is om die selle te verdeel sodra die selfles 80% volgroeï is. Figuur 6.6 toon 'n CHO-K1-selkultuur wat 80% volgroeï is.

CHO-K1-selle is prolien-ouksotrofies wat beteken dat hulle in 'n medium wat prolien bevat gekweek moet word (Gottesman, 1987). Die selle is gevolglik in Ham se F12 groeimedium (Ham, 1963) gekweek met 5% (v/v) fetale kalfserum in 25cm² polistireen-flesse (Nunc 163371). Die groeimedium, kalfserum en tripsienoplossing is van Highveld Biochemicals aangekoop.

6.3.2 Transfeksie van die CHO-K1-selle

Om plasmiede in soogdierselle te kry, kan verskeie transfeksiemetodes aangewend word. Om te verseker dat stabiele of permanente transfeksie van die selle plaasvind, dit wil sê stabiele integrasie van die plasmied in die chromosomale DNA van die CHO-K1-selle, is van die kalsiumfosfaatmetode gebruik gemaak (Chen en Okayana, 1987). Die opname van DNA deur die selle vind plaas deurdat 'n presipitaat wat uit kalsiumfosfaat en DNA bestaan, op 'n monolaagselkultuur vorm. Die presipitaat word gevorm deurdat 'n HEPES-gebufferde soutoplossing met DNA en kalsiumchloried gemeng word (Chen en Okayana, 1988). Opname van die DNA-bevattende presipitaat vind moontlik deur middel van fagositose plaas. Die hoeveelheid DNA-bevattende presipitaat wat deur die selle opgeneem word, word deur 'n gliserolskok verhoog.

Die kalsiumfosfaatmetode is in ons laboratorium gestandariseer en is net so toegepas (Vergeer, 1988). 24 uur voor transfeksie is 80% volgroeïde weefselkulture aan verdeling in 'n subkultuurverhouding van 1:1 onderwerp. Vir die verdeling is die selle drie keer met 1xPBS (137mM NaCl; 2.7mM KCl; 4.3mM Na₂HPO₄·7H₂O en 1.4mM KH₂PO₄) gewas om



FIGUUR 6.6
FOTO VAN 'N 80% VOLGROEIDE CHO-K1-SOOGDIERSELKULTUUR (100x
VERGROOT)
Die selle is *in situ* gefotografeer sonder kleuring.

die serumproteïene te verwyder. Hierna is die selle met 2ml 1.6mg/ml tripsienoplossing (verdun in 1mg/ml EDTA (pH 8.0)) gespoel. Die tripsienoplossing is dadelik na spoeling weer uitgegooi. Die selfesse is by 37°C geïnkubeer totdat die selle begin het om van die selfesoppervlak en van mekaar te dissosieer. Hierna is volledige medium (Ham se F12 groeimedium met 5% (v/v) fetale kalfserum) by die selle gevoeg. Die selfesse is hard geskud om volledige suspensie van die gedissosieerde selle te verseker. Vervolgens is die inhoud van die flesse in die verlangde subkultuurverhoudings verdeel en weer onder normale kondisies geïnkubeer.

Drie uur voor transfeksie is die medium van die selle vervang met vars medium terwyl die kalsiumfosfaat-DNA-presipiteringsmengsel saamgestel is. Die volgorde van samestelling is baie belangrik. Eerstens is 5µg van baie suiwer pSJIL-3(E)-DNA onder steriele kondisies verdun tot 0.5ml in HBS-medium (0.14M NaCl; 25mM HEPES en 0.75mM Na₂HPO₄ by pH 7.1). Hierby is 31µl van 'n 2M CaCl₂-oplossing stadig drupsgewys bygevoeg. Die pH van die HBS-medium is baie krities vir presipitaatvorming en moet presies 7.1 wees. Die mengsel is versigtig gemeng en daarna vir 30 minute by kamertemperatuur geïnkubeer. Na die inkubasie is die kalsiumfosfaat-DNA presipiteringsmengsel stadig op die selle gedrup terwyl die selfesse skuins gehou is. Die selle met die presipitaat is hierna vir 4 ure by 37°C geïnkubeer. Vervolgens is die medium gedekanteer en die selle met Ham se F12 medium gewas. Direk hierna is die selle aan 'n gliserolskok onderwerp deur 3ml skokmedium (15g% (m/v) gliserol in HBS) by die selle te voeg. Die selle is vir 3 minute aan die skokmedium blootgestel waarna dit verwyder is en die selle met Ham se F12 medium gespoel is. Volledige medium is hierna by die selle gevoeg en die selle is vir 48 uur by 37°C in die teenwoordigheid van 5% CO₂ geïnkubeer. Seleksie van die getransfekteerde selle het na 16 uur begin (Afdeling 6.3.3).

As kontroles tydens die transfeksie is pMAMneo as negatiewe kontrole vir uitdrukking gebruik. As negatiewe kontrole vir transfeksie is slegs 0.5ml HBS met die CaCl₂ gemeng.

6.3.3 Seleksie van die getransfekteerde selle

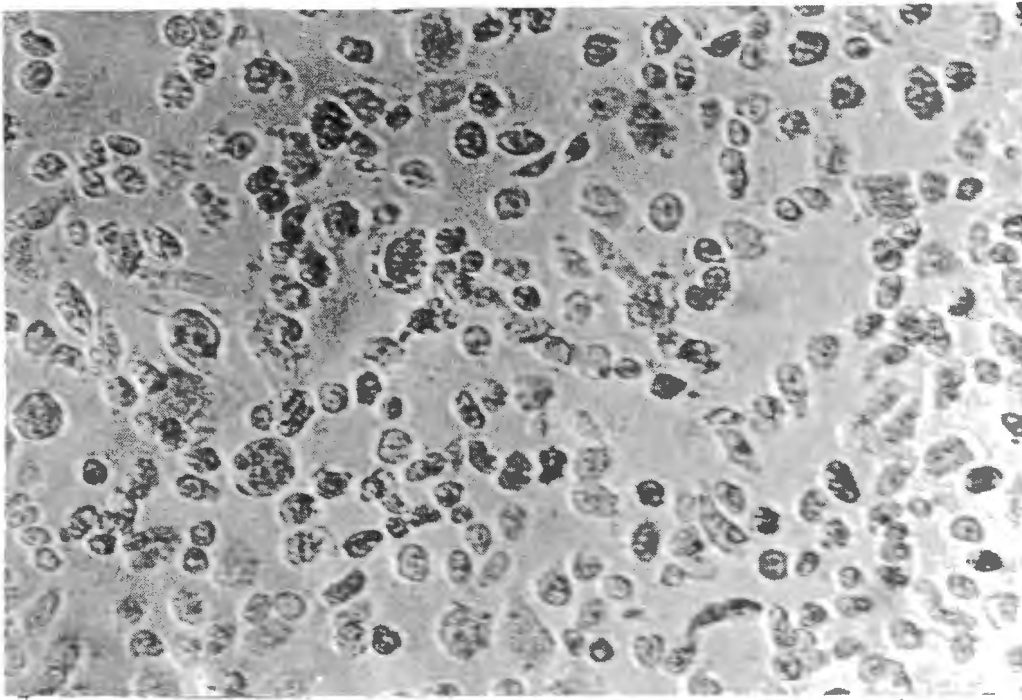
Seleksie van die getransfekteerde selle is uitgevoer op grond van neomisien weerstandbiedende van daardie selle waarin pSJIL-3(E)- of pMAM*neo* vektore teenwoordig is. Seleksie het 14 dae geduur en is uitgevoer deurdat die selle blootgestel is aan 100 - 800 $\mu\text{g/ml}$ genetisien (G418) in volledige medium. Die uitdrukking van die bakteriese neomisiengen (*neo*) detoksifiseer genetisien (Kingston, 1987). Genetisien is 'n aminoglukosied en stem struktureel ooreen met neomisien. Hierdie antibiotikum inhibeer proteïensintese in nie-getransfekteerde selle wat lei tot die afsterwe van die selle. Al die selle van die negatiewe kontroles van transfeksie het afgesterf (Figuur 6.7) terwyl die pSJIL-3(E) en pMAM*neo*-bevattende selle oorleef en vermeerder het en foki begin vorm het (Figuur 6.8).

6.3.4 Isolering van foki vir die produksie van die IL-3 proteïen

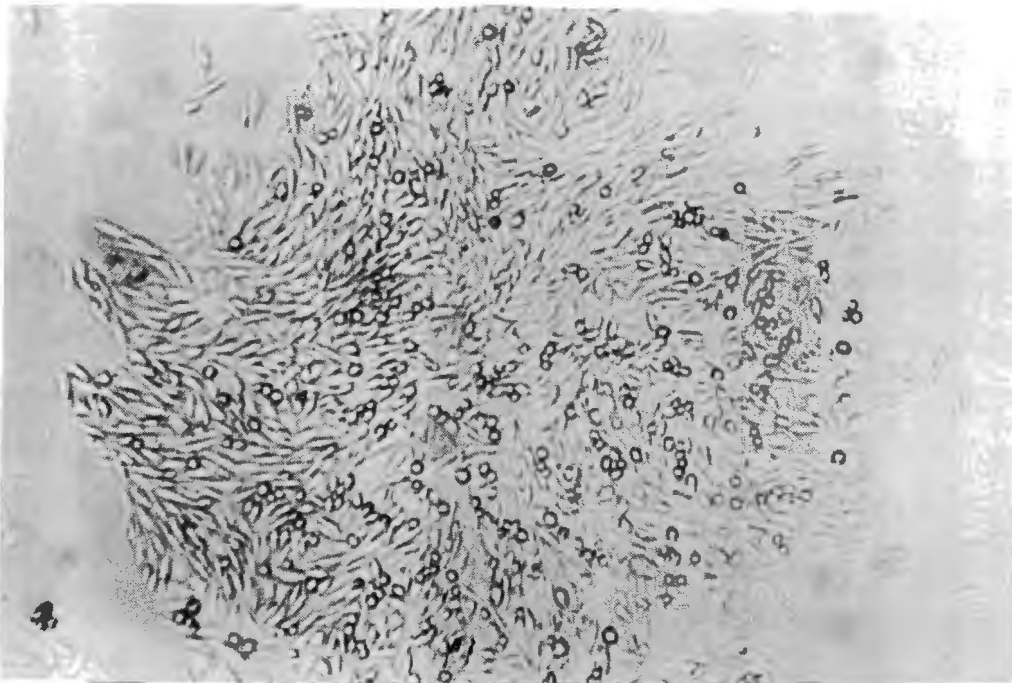
Twee foki verteenwoordigend van die pMAM*neo*-transfeksie en 10 foki van die pSJIL-3(E)-transfeksie is gekies vir verdere analises. Die foki is duidelik met 'n merkpen aangedui waarna die foki met 'n selskraper afgeskraap is. Die foki-bevattende selskraper is vervolgens vir 5 minute in 200 μl voorafverhitte (37 °C) dispase (4.8mg/ml in PBS sonder Ca^{2+} en Mg^{2+}) in 'n eppendorfbuis geplaas. Na 5 minute is die oorblywende selle van die selskraper geskud waarna 1ml 1xPBS, met Ca^{2+} en Mg^{2+} ione, bygevoeg is. Die mengsel is by 37 °C vir 3 minute geïnkubeer. Die selle is hierna met sentrifugering (200 - 400xg) versamel waarna die supernatant gedekanteer is. Die selpresipitaat is in 1ml volledige medium gesuspendeer waarna dit na 'n 25cm²-selfles oorgedra is. Die flesse is by 37 °C in die teenwoordigheid van 5% CO₂ geïnkubeer. Sodra die selflesse 80% volgroei is, is die selle verdeel in 'n subkultuurverhouding van 1:1.

6.3.5 Indusering van die MMTV-LTR promotor

Soos genoem in Afdeling 6.2.2 bevat pMAM*neo* of te wel pSJIL-3(E) die deksametasoon



FIGUUR 6.7
CHO-K1-SELLE NA 14 DAE SELEKSIE WAT NIE 'N NEOMISIEN-WEERSTANDBIEDENHEIDSGEEN BEVAT NIE (100x VERGROOT)
Die selle is *in situ* sonder kleuring gefotografeer.



FIGUUR 6.8
VOORBEELD VAN 'N FOKI WAT DEUR G418 WEERSTANDBIEDENDE-SELLE GEVORM WORD NA 14 DAE VAN SELEKSIE (40x VERGROOT)
Die selle is *in situ* sonder kleuring gefotografeer.

induseerbare MMTV-LTR promotor. Deksametasoon is 'n glukokortikoïedhormoon wat die MMTV-LTR promotor aktiveer en transkripsie van virale DNA stimuleer. Indien vreemde gene in die regte oriëntasie tot die MMTV-LTR promotor geplaas word, word hul transkripsie ook tienvoudig gestimuleer in die teenwoordigheid van deksametasoon (Lee *et al.*, 1981). Nadat die selle van elk van die tien klone en die kontroles in 'n subkultuurverhouding van 1:1 verdeel is, is 400 - 500ng/ml deksametasoon by die volledige groeimedium gevoeg. Die deksametasoonstimulering is volgehou totdat die selle die selflesse 100% volgroei het. Die selle is hierna verdeel in 'n subkultuurverhouding van 1:1 om een selfles beskikbaar te hê vir biologiese-toetse en een vir DNA-analises. As kontrole is ongetransfekteerde CHO-K1-selle op dieselfde wyse as die getransfekteerde selle gestimuleer en geanaliseer.

6.4 ANALISE VAN DIE GETRANSFEKTEERDE SELLE

6.4.1 Inleiding

Transfeksie van CHO-K1-selle met die uitdrukingsvektore het tot gevolg dat die uitdrukingsvektore in die genoom van die CHO-K1-selle integreer. Die integrasie vind ewekansig plaas en die volledige uitdrukingsvektor word nie altyd geïntegreer nie. Seleksie op grond van G418-weerstandbiedenheid is dus nie altyd 'n aanduiding van die teenwoordigheid van die volledige uitdrukingsvektor en veral die IL-3 geen nie. Die MMTV promotor kan moontlik as gevolg van die integrasie nie aktief of teenwoordig wees nie, wat kan lei tot baie lae uitdrukking van die IL-3 geen. Die IL-3 geen kan selfs so integreer dat dit onder die regie van 'n baie sterk natuurlike promotor staan wat hoë vlak uitdrukking van die IL-3 geen tot gevolg kan hê. Daarom is dit nodig om die tien klone te analiseer op grond van die uitdrukking van die IL-3 geen. Die teenwoordigheid asook die aantal IL-3 cDNA-gene in die genoom van getransfekteerde selle, kan dan met behulp van die geenkopiegetalbeplanning aangedui word.

6.4.2 Analise van die klone op grond van die uitdrukking van die IL-3 geen

6.4.2.1 Evaluering van metodes om die getransfekteerde selle te sif

Deur die eindproduk van transkripsie en translase te evalueer, kan bepaal word of die tersaaklike geen teenwoordig is, tot watter mate die geen tot uitdrukking kom en of die mRNA korrek geprosesseer word vir die sintese van 'n biologies-aktiewe rhIL-3 proteïen. Die teenwoordigheid van 'n proteïen kan op grond van sy strukturele of biologiese-eienskappe aangetoon word.

Die strukturele eienskappe van die IL-3 proteïen kan deur 'n ELISA-analise bepaal word. ELISA-analise-sisteme spesifiek vir die mens IL-3 proteïen, is kommersieel beskikbaar (Amersham RPN 2134; British Biotechnology BDK 8). Die sisteem is egter baie duur en bestaan uit slegs een 96-put ELISA-plaat. Een plaat sal nie voldoende wees vir die sifting en kwantifisering van die klone nie. 'n Alternatiewe metode kan wees om self 'n ELISA-sisteem saam te stel. Die mees sensitiewe ELISA-sisteem is die antigeenvasvanging-immunometriese bepaling (sandwich system) (Catty en Raykundalia, 1989). Die nodige primêre anti-liggame (Genzyme No. BL-3M) en sekondêre anti-liggame (Genzyme No. BL-3P) is kommersieël beskikbaar vir die samestelling van so 'n sisteem. 'n Groot verskeidenheid anti-liggaamkonjugate vir die amplifisering van die gevormde immunokomplekse is ook kommersieël beskikbaar (Sigma No. A9169). Om die sensitiwiteit en spesifiteit van die saamgestelde sisteem te optimaliseer, moet die sisteem gestandariseer word. Dit sal die koste in terme van anti-liggame baie hoog maak asook die tyd wat dit sal neem om die sisteem saam te stel. 'n ELISA-sisteem kan egter net 'n aanduiding gee of die betrokke proteïen teenwoordig is en nie of die proteïen ook biologies-aktief is nie. Daarom is daar eerder na metodes gekyk wat die teenwoordigheid van 'n biologies-aktiewe IL-3 proteïen sal aandui.

Die biologiese-eienskappe van die rhIL-3 proteïen kan bepaal word deur van 'n proliferasie-induksie-analise gebruik te maak. Die aantal selle in 'n proliferasie-analise kan deur twee metodes bepaal word: Die eerste is 'n direkte bepaling deur die selle te tel (Mosman, 1983). Die ander metode berus op 'n indirekte bepaling. Die aantal selle word bepaal deur die inbouing van 'n radio-aktiewe voorganger in die DNA, of deur die totale proteïene te kwantifiseer deur chromogeniese kleurstowwe, of deur die metaboliese aktiwiteit van sellulêre ensieme te bepaal (Tada *et al.*, 1986). Die direkte bepaling van die aantal selle is moontlik

die akkuraatste, maar nie die effektiestste metode nie, veral wanneer baie bepalinge gelyk gedoen moet word. 'n Nadeel van die indirekte metodes is die baie tussenstappe wat die tydsduur van die bepaling vergroot en die akkuraatheid van die bepalinge beïnvloed (Tada *et al.*, 1986). Die mees algemene indirekte bepaling van die proliferasie van selle is sekerlik die bepaling van die inbouing van [H^3]timidien in die DNA van prolifererende selle (Mosman, 1983). Die inbouing word bepaal deur gewone vloeistofsintillasietelling.

Mosman (1983) het 'n proliferasie-analise ontwikkel wat 'n kolorimetriese-analise is en berus op die vermoë van mitochondriale dehidrogenase ensieme van lewende selle om 'n tetrasoliumsout MTT (3-(4,5-dimetiltiasol-2-yl)-2,5-difenieltetrasoliumbromied) om te skakel na 'n formasaan produk. Die hoeveelheid formasaan wat gevorm het, kan spektrofotometries bepaal word (Mosman, 1983) en die hoeveelheid formasaan wat gevorm word, is direk eweredig aan die aantal aktief prolifererende selle teenwoordig tydens die analise (Denizot en Lang, 1986).

Om die biologiese-aktiwiteit van IL-3 aan te toon, is IL-3 afhanklike sellyne ontwikkel (Kitamura *et al.*, 1989; Avanzi *et al.*, 1988). Die M-O7E sellyn is deur Avanzi *et al.*, (1988) vanaf die perifere bloed van 'n pasiënt met akute megakariositiese leukemie ontwikkel en is afhanklik van hIL-3 en hGM-CSF vir proliferasie en oorlewing. Kitamura *et al.*, (1989) het 'n sellyn genaamd TF-1 ontwikkel vanaf 'n eritroleukemiese pasiënt. Die TF-1 selle vertoon die morfologiese eienskappe van onvolwasse eritroblaste en is afhanklik van hIL-3 of hGM-CSF of EPO vir proliferasie en oorlewing. Die sellyn word algemeen gebruik om die biologiese-aktiwiteite van kommersieel beskikbare rhIL-3 aan te toon (Boehringer Mannheim; British Biotechnology; Promega).

6.4.2.2 Samevatting

Die enigste metode wat die teenwoordigheid van biologies-aktiewe rekombinante IL-3 proteïene sal aandui, is 'n proliferasie-analise. Enige indirekte bepaling van die proliferasie van die toetselle sal gebruik kan word om die proliferasie aan te dui.

Prof. B. Mendelow van die Departement Hematologie van die Universiteit van die Witwatersrand beskik oor M-O7E selle om die proliferasie van die M-O7E selle aan te toon in die teenwoordigheid van IL-3 of GM-CSF. Prof Mendelow het goedgegunstiglik ingestem om die getransfekteerde selle te toets vir die teenwoordigheid van IL-3 spesifieke biologiese-aktiwiteit.

6.4.2.3 Uitvoering van die biologiese-aktiwiteits bepaling op die getransfekteerde selle

Een CHO-K1-selfles van elke kloon is gebruik om die biologiese aktiwiteit van te bepaal en is soos volg uitgevoer: Nadat die medium gedekanteer is, is die selle twee maal met 1xPBS gewas. Om baie deeglike dissosiasie van die CHO-K1-selle van mekaar en van die selflesoppervlak te verseker, is 3ml tripsien by die selle gevoeg. Die selflesse is vir 4 minute by 37°C geïnkubeer en nadat die selflesse baie hard geskud is, is die inhoud daarvan na 15ml polipropileenbuis oorgedra. Die selle is deur sentrifugering (200-400xg) gepresipiteer waarna die selle 4x met vreiskoue 1xPBS gewas is om volledige uitwassing van die tripsien te bewerkstellig. Na die laaste was is die selle in 800µl volledige medium gesuspendeer waarna dit na eppendorfbuis oorgedra en by -76°C gevries is. Na 'n uur is die eppendorfbuis by 37°C geplaas om te ontvries. Hierdie proses is drie maal herhaal. Die eppendorfbuis is na Prof. Mendelow gestuur waar die analyses uitgevoer is.

Die toetse is as volg uitgevoer: Die M-O7E selle groei in suspensie en is baie sensitief vir temperatuurveranderinge. Die selle is dus altyd so kort as moontlik buite die inkubators gehou. Die selle groei by 37°C in 5% CO₂ atmosfeer. Om oorlewing van die selle te verseker, moet hulle altyd in digthede van 3x10⁵ selle/ml gekweek word. Die selle is elke drie tot vier dae met Iscove se MDM medium, 20% (v/v) HI fetale kalfserum en 15% (v/v) Rat-1 medium gevoer. Rat-1 selle is IL-3 produserende selle wat die IL-3 proteïen in die voedingsmedium uitskei. Hierdie selle groei as monolaagkulture en word met Iscove se MDM medium en 10% (v/v) fetale kalfserum gevoer. Die Rat-1 medium is van 'n 95% volgroeide selmonolaag verwyder en is voor gebruik deur 'n 0.22µm filter gefiltreer.

Drie tot vier dae voordat die analise uitgevoer is, is die M-O7E selle gevoer en op die dag van die analise is die selle deur sentrifugering versamel en deeglik gewas om van enige Rat-1 medium ontslae te raak. Nadat die selle getel is, is hulle in toetsmedium (Iscove se MDM en 10% (v/v) HI fetale kalfserum) verdun tot 'n konsentrasie van 20 000 selle/200 μ l in 'n steriele mikroplaatput. 200 μ l van die oopgebreekte CHO-K1-selle is in drie-voud by die M-O7E-bevattende putte gevoeg. Die positiewe kontrole het bestaan uit 'n reeks van 5% (v/v)- en 15% (v/v) Rat-1 medium wat ook in drie-voud uitgevoer is. Die negatiewe kontroles is M-O7E selle in toetsmedium sonder enige van die groei-afhanklike faktore, medium van natiewe CHO-K1 selle en medium van pMAM neo getransfekteerde selle. Die mikroplaat met die selle is vir drie dae by 37 $^{\circ}$ C en 5% CO $_2$ geïnkubeer waarna [H^3]Timidien vir vier ure by die selle gevoeg is. Oningeboude [H^3]timidien is na die tyd uitgewas en die hoeveelheid ingeboude [H^3]timidien in die DNA van prolifererende selle is met behulp van vloeistofsintillasietelling bepaal. 'n Opsomming van die resultate word in Tabel 6.2 gegee.

Uit Tabel 6.2 is dit duidelik dat slegs kloon 5.6 'n waarde het wat betekenisvol hoër is as die negatiewe kontrole. Hierdie waarde is 6% van die 15% Rat-1 positiewe kontrole se waarde en 12% van die 5% Rat-1 positiewe kontrole se waarde. Hieruit is die afleiding gemaak dat kloon 5.6 oor IL-3 spesifieke biologiese-aktiwiteit beskik.

Die lae IL-3 spesifieke aktiwiteit van kloon 5.6 kan moontlik toegeskryf word aan die metode wat gevolg is om die selle oop te breek. Hierdie metode het dalk nie die meerderheid van die selle oopgebreek nie. Die oopbreek van selle lei ook tot die vrystelling van sellulêre proteolitiese ensieme wat moontlik van die IL-3 proteïene gedegradeer het. 'n Ander moontlikheid kan wees dat die IL-3 cDNA nie baie suksesvol in die betrokke uitdrukkingssisteem uitgedruk word nie of dat die transfeksie-doeltreffendheid te laag was sodat die kopiegetal van die getransfekteerde selle baie laag is. In die volgende Afdeling word die kopiegetal van die klone bepaal om 'n aanduiding van die transfeksie-doeltreffendheid te verkry.

6.4.3 Bepaling van die geenkopiegetal met behulp van slot-blot analyses

Die DNA is uit die CHO-K1-selle geïsoleer en die bepaling van die geenkopiegetal is met geringe wysigings uitgevoer volgens die metode beskryf deur Vergeer (1988). Die CHO-K1-DNA verdunningsreeks het uit $5\mu\text{g}$; $2.5\mu\text{g}$; $1.25\mu\text{g}$; $0.6\mu\text{g}$ en $0.3\mu\text{g}$ DNA bestaan. Die

TABEL 6.2
RESULTAAT VAN DIE AKTIWITEITSTOETS

KLOON	TELLINGS PER MINUUT n = 3
Negatiewe kontrole CHO-K1	427 ± 58
Negatiewe kontrole pMAMneo	308 ± 61
Negatiewe kontrole (0% Rat-1)	361 ± 42
Positiewe kontrole (5% Rat-1)	6 471 ± 503
Positiewe kontrole (15% Rat-1)	11 985 ± 528
Kloon 5.3	187 ± 72
Kloon 5.5	297 ± 23
Kloon 5.6	759 ± 61
Kloon 5.8	547 ± 185

Die agtergrondtelling van 155tpm is reeds van die tellings afgetrek. Nie al tien die klone se tellings word gegee nie omdat dit laer as die negatiewe kontroles se waardes is.

verdunnings is in duplikaat uitgevoer omdat daar van twee peilers gebruik gemaak is, naamlik die 417bp *Hind* III - *Bam* HI-IL-3 cDNA-fragment van pBBG14 en 'n 1200bp- β -aktienfragment. Die spesifieke aktiwiteit van die peilers is in ag geneem by die berekening van die geenkopiegetal, waarna hibridiseringskurwes vir elke peiler wat aan die DNA gehibridiseer het, saamgestel is. Figuur 6.9 gee 'n voorbeeld van 'n tipiese slot-blot resultaat terwyl 'n tipiese hibridiseringkromme in Figuur 6.10 gegee word.

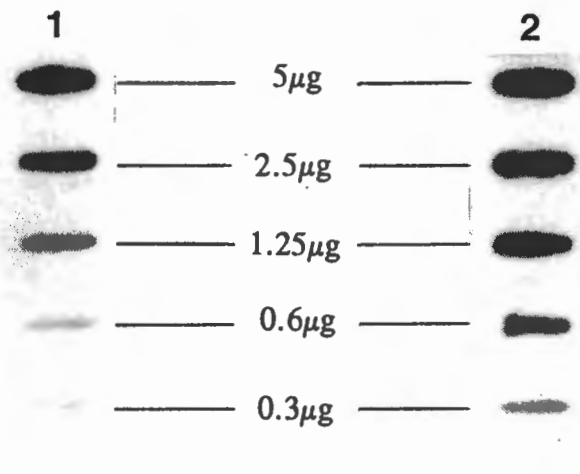
Om die geenkopiegetalle per diploïde genoom te bereken, is die verhouding van die twee kurwes se hellings tot mekaar bepaal. Twee kopieë van die β -aktiengeen is in soogdierselle

teenwoordig en daarvolgens is die kopiegetalle van die IL-3 cDNA in die getransfekteerde selle bepaal met die volgende formules:

$$\beta\text{-aktien} = \text{Helling} \times \frac{1000}{\text{lengte van peiler (bp)}}$$

$$\text{IL-3} = \text{Helling} \times \frac{1000}{\text{lengte van peiler (bp)}}$$

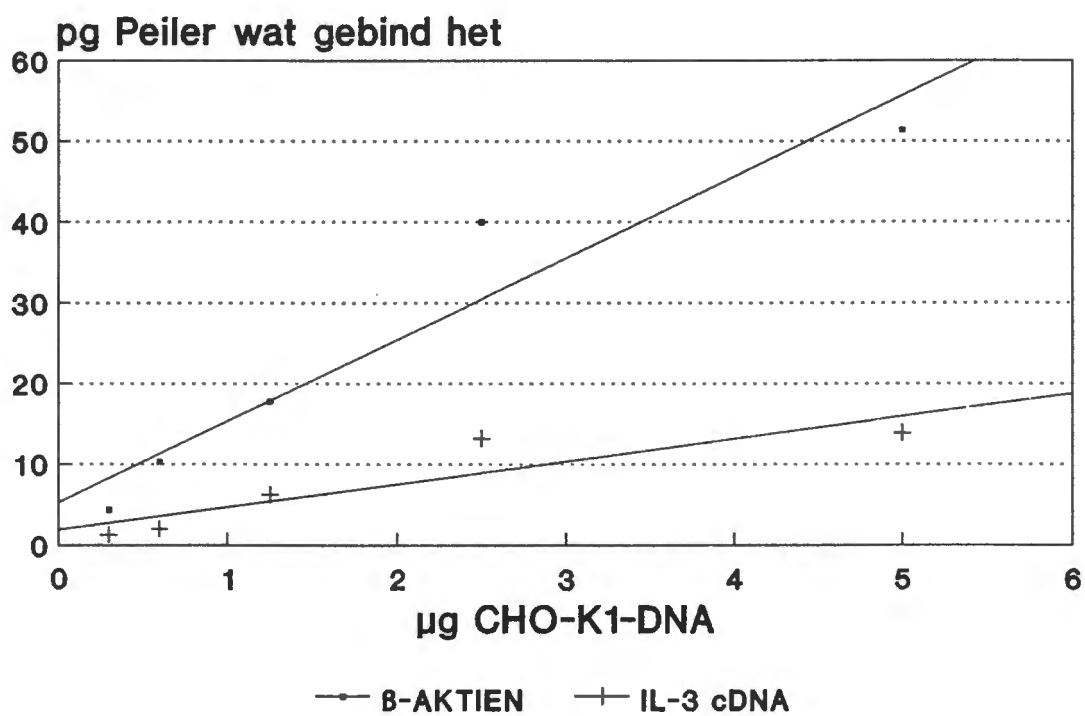
$$\text{Kopiegetal} = 2(\text{IL-3}/\beta\text{-aktien})$$



FIGUUR 6.9

VOORBEELD VAN 'N SLOT-BLOT RESULTAAT

1. 417bp *Hind* III - *Bam* HI - IL-3 cDNA peiler.
2. 1200bp β-aktien peiler.



FIGUUR 6.10

TIPIESE HIBRIDISERINGSKROMME VAN DIE IL-3-PEILER EN DIE β-AKTIEENPEILER AAN pSJIL-3(E)-GETRANSFEKTEERDE CHO-K1 DNA

Die hoeveelheid peiler wat gebind het, is met behulp van die volgende formule bereken:

$$\text{pg gebonde peiler} = \frac{(\text{tpm} - \text{agtergrond}) \times 10^6}{\text{spesifieke aktiwiteit van peiler}}$$

Die geenkopiesgetalle van die IL-3 klone wat biologiese-aktiwiteit vertoon het, is op dieselfde wyse bepaal en die resultaat word in Tabel 6.3 saamgevat.

CHO-K1-selle bevat ook hamster IL-3 geenvolgordes. Om te bepaal of die mens IL-3 cDNA-peiler dalk moontlik aan die Hamster IL-3 volgordes gehybridiseer het en nie aan die rhIL-3 cDNA-volgordes van pSJIL-3(E) tydens die geenkopiesgetal-bepaling, is CHO-K1-DNA met die β -aktien en met die IL-3 cDNA peiler afgetas. Die β -aktienpeiler het wel aan die CHO-K1-DNA gehybridiseer, terwyl die hIL-3 cDNA peiler gladnie aan die CHO-K1-DNA gehybridiseer het nie.

TABEL 6.3
SAMEVATTING VAN DIE GEENKOPIEGETALLE VAN DIE IL-3 KLONE WAT
BIOLOGIESE-AKTIWITEIT VERTOON HET

KLOON	GEENKOPIEGETAL	
	Berekende getal	Waarskynlike getal
Kloon 5.3	0.22	0
Kloon 5.5	0.14	0
Kloon 5.6	0.59	1
Kloon 5.8	0.32	0

6.5 SAMEVATTING

In hierdie Hoofstuk is die klonering van die sintetiese IL-3 cDNA in 'n eukariotiese uitdrukkingssisteem beskryf. Na transfeksie, seleksie en induksie van die promotor is die CHO-K1-selle deur middel van vries-en-ontvriessiklusse oopgebreek om die selinhoud vry te stel. Die inhoud van die oopgebreekte selle is aan biologiese-aktiwiteitstoetse onderwerp en dit is bevind dat kloon 5.6 IL-3 spesifieke biologiese-aktiwiteit vertoon het. Die vraag wat

in Afdeling 6.1 gevra is, naamlik of 'n biologies-aktiewe rhIL-3 proteïen deur 'n eukariotiese uitdrukkingssisteem gesintetiseer word, is dus positief beantwoord. Die geenkopiegetalle van die klone is ook bepaal en dit is waargeneem dat dieselfde kloon wat die hIL-3 spesifieke biologiese-aktiwiteit vertoon het, ook die grootste geenkopiegetal het.

Deur die prosesse van transfeksie, seleksie, induksie en analise herhaal word, is die kans groot dat 'n kloon met 'n baie hoë geenkopiegetal en biologiese-aktiwiteit verkry kan word. Die Doelstellings van hierdie studie is egter verwesenlik deurdat die mens IL-3 geen gekloneer is en hIL-3 spesifieke biologiese-aktiwiteit waargeneem is. Om die opleidingsdoelwit van die studie verder uit te bou, eerder as om bekende prosesse te herhaal, is die IL-3 cDNA ook in 'n prokariotiese uitdrukkingssisteem uitgedruk. Hierdie proses word in Hoofstuk 7 beskryf.

HOOFSTUK 7

KLONERING EN UITDRUKKING VAN DIE MENSGEEN VIR IL-3 IN 'N PROKARIOTIESE UITDRUKKINGSSISTEEM

7.1 INLEIDING

In die vorige Hoofstuk is die klonering en uitdrukking van die mensgeen vir IL-3 in 'n eukariotiese uitdrukkingssisteem beskryf. Met behulp van hierdie uitdrukkingssisteem is IL-3 spesifieke biologiese-aktiwiteit waargeneem en die teenwoordigheid, asook die geenkopiegetal van die IL-3 cDNA, is in die genoom van die gasheerselle (CHO-K1) aangetoon.

In hierdie Hoofstuk word die klonering en uitdrukking van die mensgeen vir IL-3 in 'n prokariotiese uitdrukkingssisteem beskryf. Eukariotiese uitdrukkingssisteme verleen hulle goed daartoe om biologies-aktiewe rekombinante proteïene te sintetiseer, terwyl prokariotiese sisteme nie noodwendig aan hierdie vereiste voldoen nie. Daarom is besluit om die teenwoordigheid van die rekombinante mens IL-3 proteïen wat deur 'n prokariotiese sisteem geproduseer word, eerder op grond van die proteïen se fisiese eienskappe met behulp van Western-oordraganalises en HPLC-tegnieke aan te dui.

7.2 KLONERING VAN DIE MENS IL-3 cDNA IN 'N PROKARIOTIESE UITDRUKKINGSSISTEEM

7.2.1 Inleiding

Net soos met die eukariotiese uitdrukkingsektore, is daar 'n groot aantal prokariotiese uitdrukkingsektore kommersiël beskikbaar, elkeen met 'n unieke reeks eienskappe. Die IL-3 cDNA is nie op grond van *E.coli* kodongebruik gesintetiseer nie (British Bio-technology

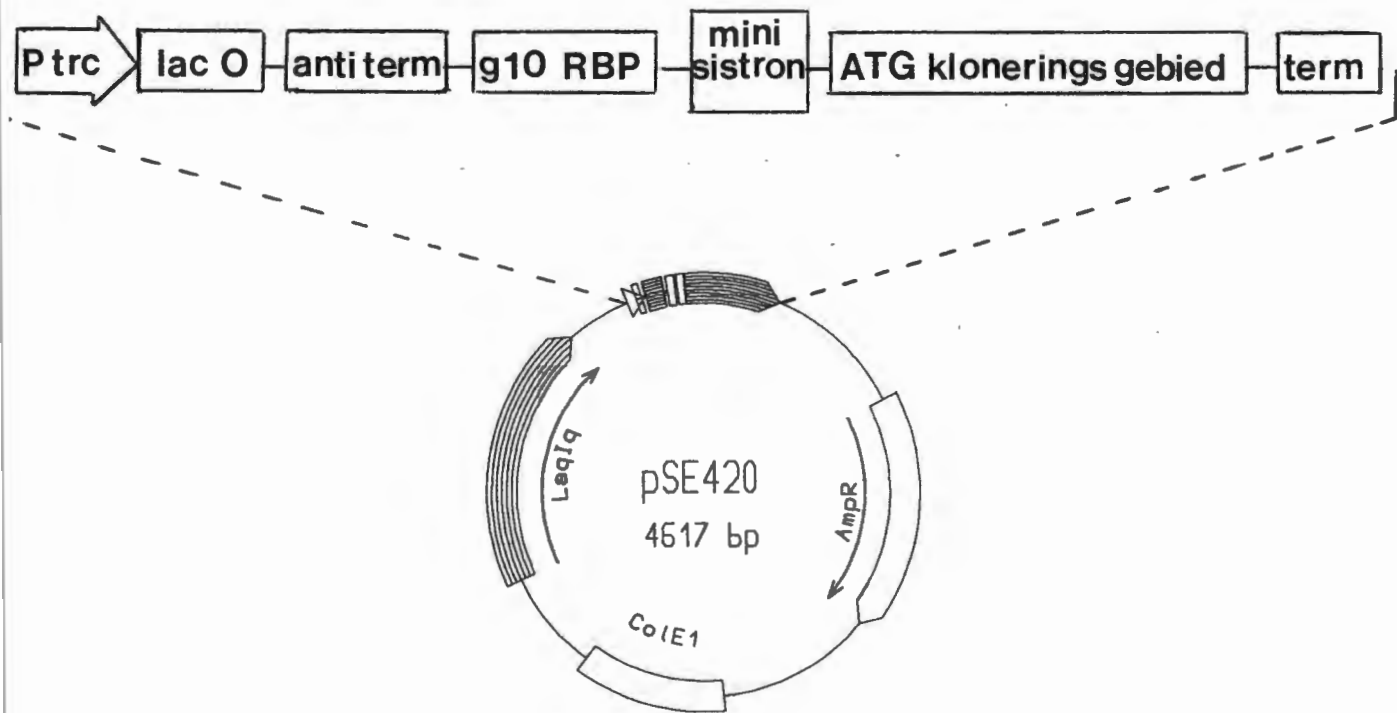
Product Catalogue 1993, Reagents and Assays for Cell & Molecular Biology Research). Daarom word 'n vektor benodig wat spesifiek ontwerp is vir die hoë vlak uitdrukking van eukariotiese gene. In hierdie Afdeling word die identifisering van 'n prokariotiese uitdrukkingsektor beskryf.

7.2.2 Identifisering van 'n prokariotiese uitdrukkingsektor

Die uitdrukkingsektor, pSE420 van Invitrogen (Katalogusnommer V420-20) (Figuur 7.1), is as die mees ideale vektor geïdentifiseer. Die vektor het geregleerde, maar hoë vlak transkripsie van gene tot gevolg asook verhoogde translase van eukariotiese gene. Die vektor is 4617bp groot en beskik oor 'n groot meerdoelige kloneringsgebied wat unieke restriksiesnitpunte vir 38 restriksie ensieme bevat (Tabel 7.1) (Brosius, 1992). 'n Uitstaande eienskap van hierdie vektor is die teenwoordigheid van 'n *Nco* I-kloneringpunt aan die begin van die meerdoelige kloneringsgebied. Hierdie *Nco* I-snitpunt voorsien nie net 'n ATG-kodon wat noodsaaklik is vir die inisiasie van translase nie maar is ook sodanig geleë, dit is op die regte afstand vanaf die regulatoriese elemente, sodat inisiasie optimaal kan plaasvind (Brosius, 1992). Hierdie posisie van die ATG-kodon verseker ook 'n oop leesraam regdeur die meerdoelige kloneringsgebied. 'n Sterk transkripsie terminasie volgorde van die *rnmB* ribosomale RNA-geen (Brosius *et al.*, 1981) kom aan die einde van die superkoppelstuk voor.

Baie sterk transkripsie inisiasie vir die uitdrukking van rekombinante gene word verseker deur die *trp-lac* fusiepromotor, *trc* (Brosius *et al.*, 1985; Amann *et al.*, 1983). Die promotor word geregleer deurdat 'n *LacO*-repressorbindingspunt net afstroom van die promotor voorkom. Volgehoue onderdrukking van die promotor word verseker deur die *LacI^r*-geen wat ook in pSE420 voorkom (Schaaper *et al.*, 1985). Die promotor word deur IPTG geïnduseer (Brosius, 1992).

Afstroom van die *LacO*-repressorbindingspunt kom 'n volgorde van die *rnmB* operon voor. Hierdie volgorde tree op as 'n anti-transkripsie terminasievorgorde wat te vroeë terminasie van transkripsie deur die gasheer RNA-polimerase voorkom (Li *et al.*, 1984). Hierdie *E. coli* *rnmB* ribosomale-RNA operon kan transkripsie deur hoogs gestruktureerde gebiede in die



FIGUUR 7.1
DIE PROKARIOTIESE UITDRUKKINGSVEKTOR pSE420

TABEL 7.1
RESTRIKSIE-ENSIEME WAT IN DIE MEERDOELIGE KLONERINGSGBIED
VAN pSE420 VOORKOM

ENSIEM	POSISIE*	ENSIEM	POSISIE*
<i>Nco</i> I	412	<i>Ngo</i> MI	613
<i>Dra</i> III	431	<i>Nae</i> I	615
<i>Bsm</i> I	441	<i>Sna</i> BI	621
<i>Bst</i> BI	443	<i>Bsp</i> EI	628
<i>Eco</i> RI	445	<i>Stu</i> I	644
<i>Bsp</i> MI	463	<i>Avr</i> II	645
<i>Sal</i> I	469	<i>Eag</i> I	661
<i>Aat</i> II	470	<i>Not</i> I	661
<i>Bsu</i> 36I	475	<i>Xma</i> III	661
<i>Xma</i> I	490	<i>Pst</i> I	672
<i>Sma</i> I	492	<i>Bsi</i> WI	691
<i>Eco</i> O109I	494	<i>Nru</i> I	699
<i>Bam</i> HI	506	<i>Sac</i> II	706
<i>Mun</i> I	511	<i>Xho</i> I	721
<i>Bgl</i> II	533	<i>Sac</i> I	722
<i>Bsa</i> BI	549	<i>Spe</i> I	731
<i>Eco</i> 47III	557	<i>Msc</i> I	738
<i>Nhe</i> I	575	<i>Pml</i> I	742
<i>Xba</i> I	587	<i>Sfi</i> I	744
<i>Acc</i> 65I	593	<i>Afl</i> II	756
<i>Age</i> I	596	<i>Hind</i> III	759
<i>Kpn</i> I	597		

* Die posisies van die ensieme is aangedui soos wāt dit voorkom in die gepubliseerde nukleotiedvolgorde van pSE420 soos deur Invitrogen verskaf.

rekombinante geen bemiddel (Brosius, 1992).

Inisiasie van translasië van eukariotiese gene in prokariote mag beduidend minder doeltreffend wees in vergelyking met die inisiasie van natuurlike prokariotiese gene (Olins *et al.*, 1988 & Amann en Brosius, 1985). Die rede hiervoor is dat in die geval van prokariotiese gene kom daar genetiese elemente in die koderende gedeelte van die geen voor wat in die mRNA benodig word om deur ribosome geïdentifiseer te word (Olins *et al.*, 1988). Om te kompenseer hiervoor, word die rekombinante geen in pSE420 uitgedruk as die tweede ooplesraam van 'n bisistroniese mRNA. Die eerste ooplesraam of mini-sistron (Schoner *et al.*, 1986) is afgelei van die bakteriofaag T7 geen-10-volgorde wat bewys is om effektief getransleer te word (Olins *et al.*, 1988). Net opstroom van die minisistron kom die bakteriofaag T7 geen-10 translasiëversterker (enhancer) (Olins *et al.*, 1988) voor, gevolg deur 'n ribosoombindingspunt (Brosius, 1992) wat deur AT-ryke gebiede aan weerskante begrens word (Brosius, 1992). In Figuur 7.2 word die rangskikking van die genetiese elemente in pSE420 aangetoon.

Die vektor pSE420 beskik ook oor die β -laktamase geen vir ampisilienweerstandbiedendeheid. Die produksie van 'n geen se produk is baie keer afhanklik van die aantal kopië van die betrokke geen in 'n uitdrukkingssisteem. Die aantal kopië van 'n geen word grootliks bepaal deur die mate van plasmiedreplisering tydens vermeerdering van die gasheerselle. pSE420 beskik oor die ColE1-sisteem wat plasmiedreplisering reguleer en 'n hoë plasmiedkopiëgetal regdeur opkweking van die gasheerselle verseker (Friebs en Reardon, 1993).

7.2.3 Klonering van die IL-3 cDNA in die prokariotiese uitdrukkingsektor pSE420

Die meerdoelige kloneringsgebied van pSE420 bied baie unieke restriksiepunte vir die klonering van rekombinante gene sonder die konstruksie van tussenvektore om restriksiepunte te verkry vir die klonering van die betrokke geen.

P_{trc}
LacO.

TTGACAATTAATTATCCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCA

rrnB anti-term

ACAGGAAACAGCGCCGCTGAGAAAAAGCGAAGCGGCACTGCTCTTTAACAATTTATCAGA

g10

CAATCTGTGTGGGCACTCGACCGGAATTGGGCATCGATTAACTTTATTATATAAAAATTAA

RBP MS RBP Nco I

AGAGGTATATATTAATGTATCGATTAAATAAGGAGGAATAAACCAATGGCTGGTGACCACG

 MetTyrArgLeuAsnLysGluGlu*** MetAlaGlyAspHisV

TCGTGGAATGC... Meerdoelige kloneringsgebied SL2

alValGluCys...

FIGUUR 7.2

RANGSKIKKING VAN DIE GENETIESE ELEMENTE IN pSE420

Elke tiende nukleotied is met 'n kol aangedui. Die -35 en -10 gebiede van die *trc*-promotor is onderstreep. Die *Lac*-operator (*LacO*), die *rrnB* anti-terminasie volgorde (*rrnB* anti-term) en die T7 geen 10 translasië versterker (g10), is **donker** gedruk. Die ribosoombindingspunte (RBP) wat die **ATG**-kodons van die mini-sistron (MS) en die superkoppelstuk voorafgaan, is dubbelonderstreep. Stop-kodons word met asteriske (*) aangedui. Die afgeleide aminosuurvolgorde van die mini-sistron en 'n gedeelte van die meerdoelige kloneringsgebied word ook gegee. Die *Nco* I-kloneringspunt is dubbelonderstreep.

Die inisiasiekodon van die IL-3 cDNA in pBBG14, bevat 'n *Nco* I- restriksiepunt terwyl daar'n *Bam* HI-restriksiepunt net afstroom van die twee terminasie-kodons in pBBG14 voorkom (Figuur 5.17). Die inisiasiekodon van die meerdoelige kloneringsgebied bevat ook 'n *Nco* I-restriksiepunt (Figuur 7.2) terwyl daar 'n *Bam* HI-restriksiepunt in die meerdoelige kloneringsgebied voorkom (Tabel 7.1). Die restriksie ensieme, *Nco* I en *Bam* HI kan dus aangewend word om die IL-3 cDNA direk in pSE420 te kloneer.

pBBG14 is vervolgens met *Nco* I en *Bam* HI behandel waarna die 410bp *Nco* I - *Bam* HI-fragment met behulp van GENECLAN II™ (BIO101 No. 3106) geïsoleer is. pSE420 is ook met *Nco* I en *Bam* HI behandel. Ekwimolêre hoeveelhede van die IL-3 cDNA-bevattende 410bp *Nco* I - *Bam* HI-fragment en die pSE420 *Nco* I - *Bam* HI-fragment is geligeer. Hierdeur is die IL-3 prokariotiese uitdrukkingsvektor pSJIL-3(P) gekonstrueer (Figuur 7.3).

Die korrektheid van pSJIL-3(P) is bevestig na restriksiekartering van hierdie vektor. Tabel 7.2 bevat die teoretiese- en waargenome fragmentgroottes teenoor die betrokke restriksie-ensieme, terwyl die foto-resultaat van die restriksiekartering in Figuur 7.4 gegee word.

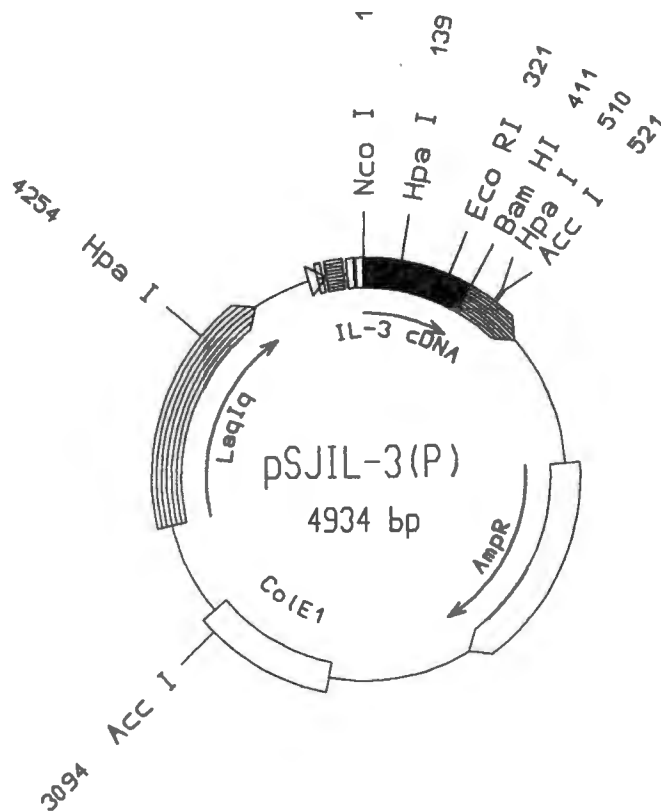
7.3 IDENTIFISERING VAN GESKIKTE *E.coli*-SELLYNE VIR DIE UITDRUKKING VAN pSJIL-3(P)

7.3.1 Inleiding

Die uitdrukkingsvektor pSJIL-3(P) beskik oor bykans al die genetiese elemente wat nodig is vir die produksie van 'n eukariotiese proteïen in 'n prokariotiese uitdrukkingsstelsel. Die eienskappe van die vektor kan gekomplimenteer word in die regte *E.coli*-gasheer. In hierdie Afdeling word die seleksie van geskikte *E.coli* gasheersellyne beskryf.

7.3.2 Genotipiese eienskappe van 'n ideale gasheer

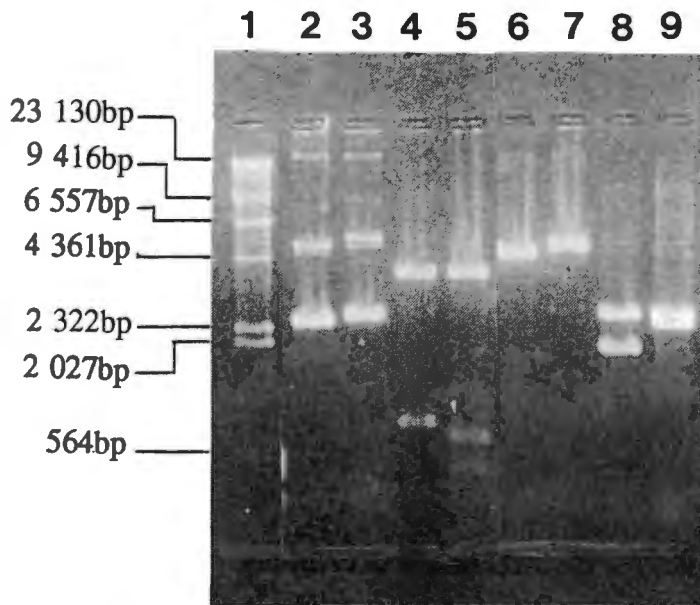
In Tabel 7.3 word die genotipiese vereiste van 'n ideale gasheer gegee teenoor die eienskap



FIGUUR 7.3
DIE PROKARIOTIESE IL-3 cDNA-UITDRUKKINGSVEKTOR pSJIL-3(P)

TABEL 7.2
TEORETIESE- EN WAARGENOME RESTRIKSIEFRAGMENTGROOTTES VAN
DIE RESTRIKSIEKARTERING VAN pSJIL-3(P)

RESTRIKSIE- ENSIEM	TEORETIESE FRAGMENTGROOTTES (kb)		WAARGENOME FRAGMENTGROOTTES (kb)	
	pSE420	pSJIL-3(P)	pSE420	pSJIL-3(P)
<i>Hpa</i> I	3.7 0.9	3.7 0.8 0.5	3.7 0.9	3.7 0.8 0.5
<i>Eco</i> RI	4.6	5.0	4.5	5.0
<i>Acc</i> I	2.6 1.9	2.6 2.5	2.6 1.9	2.6 1.9



FIGUUR 7.4

RESULTAAT VAN DIE RESTRIKSIEKARTERING VAN pSJIL-3(P)

Die restriksiefragmente is op 'n 1% etidiumbromiedbevattende agarosegel geskei totdat daar genoegsaam tussen die fragmente van die groottestandaard onderskei kon word.

- Baan 1 : Lambda *Hind* III groottestandaard
- Baan 2 : pSE420 onbehandel
- Baan 3 : pSJIL-3(P) onbehandel
- Baan 4 : pSE420 behandel met *Hpa* I
- Baan 5 : pSJIL-3(P) behandel met *Hpa* I
- Baan 6 : pSE420 behandel met *Eco* RI
- Baan 7 : pSJIL-3(P) behandel met *Eco* RI
- Baan 8 : pSE420 behandel met *Acc* I
- Baan 9 : pSJIL-3(P) behandel met *Acc* I

TABEL 7.3

OPSOMMING VAN DIE GENOTIPIESE EIENSKAPPE WAAROR DIE IDEALE *E. coli*-GASHEER MOET BESKIK OM DIE GENETIESE EIENSKAPPE VAN pSE420 TE KOMPLEMENTEER

EIENSKAP VAN pSE420	BENODIG IN GASHEER	FUNKSIE
ColE1	<i>recA</i> ⁻	Stabiele replisering
<i>LaqI</i> ^{rs}	<i>LaqI</i> ^{rs}	Sterk onderdrukking van promotor
<i>Amp</i> ^R	<i>Amp</i> ^{Sⁱ-}	Seleksie
<i>trc</i> -promotor	<i>lon</i> ⁻	Beskerming van rekombinante proteïene

Die eienskappe van die genotipes is verkry uit die New England Biolabs, 1992 katalogus en Sambrook *et al.*, 1989.

van die uitdrukingsvektor wat gekomplementeer moet word.

Die ColE1 eienskap van die vektor kan gekomplementeer word deur 'n *recA*-gasheer. Die genotipiese eienskap laat hoë-kopie stabiele replisering van plasmiede toe (Sambrook *et al.*, 1989). Omdat pSJIL-3(P) oor sy eie *Laq^R*-geen beskik, is dit nie 'n vereiste dat die gasheer hierdie genotipiese eienskap hoef te hê nie. Die gasheer moet ook ampicilliensensitief wees. Die sterk *trc*-promotor het hoë uitdrukking van gene tot gevolg. Die akkumulerende proteïene moet beskerm word teen sellulêre protease ensieme. Die genotipiese eienskap, *lon*, dui op die gasheer se onvermoë om die sitoplasmiese protease La te produseer (Sambrook *et al.*, 1989). Eliminering van een proteasesisteem impliseer egter nie totale afwesigheid van sellulêre protease aktiwiteit nie.

Die ideale gasheer moet dus as volg daarna uitsien:

1. Die gasheer moet beskik oor die *recA* en *lon* genotipe. Die voorkoms van die *laq^R* genotipe is opsioneel.
2. Die gasheerselle moet maklik transformeerbaar wees; en
3. die gasheerselle moet ampicillienweerstandbiedend wees.

7.3.3 Die genotipes van beskikbare *E.coli* sellyne

In die laboratorium is 'n aantal *E.coli* sellyne beskikbaar. Hierdie sellyne en van hulle genotipiese eienskappe word in Tabel 7.4 saamgevat.

Uit die Tabel is dit duidelik dat die ideale gasheer nie onder die beskikbare sellyne in ons laboratorium voorkom nie. Die *lon*-genotipe kom glad nie voor in enige van die selle nie. Soos reeds genoem, impliseer die *lon*-genotiep slegs die afwesigheid van die La proteasesisteem en nie van die totale protease aktiwiteit nie. Dit is daarom nie baie krities dat die *lon*-genotipe nie voorkom in die beskikbare sellyne nie. Uit die beskikbare sellyne is die volgende *E.coli* gashere geselekteer. TOP 10, DH1, JM101, JM109, LE 392, en MC 1061.

TABEL 7.4
OPSOMMING VAN DIE GENOTIPIESE EIENSKAPPE VAN DIE BESKIKBARE
***E. coli*-SELLYNE**

SELLYN	<i>RecA</i> ⁻	<i>LaqI</i> ^r	<i>lon</i> ⁻
TOP 10	*		
DH1	*		
DH5	*		
HB101	*		
JM101		*	
JM105		*	
JM109	*	*	
INV _α F'	*		
NM522		*	
LE 392			
C 600			
MC1061			

Die eienskappe van die genotipes is verkry uit die **New England Biolabs**, 1992 katalogus en Sambrook *et al.*, 1989. Die asteriske (*) beteken dat die betrokke sellyn oor die relevante genotipiese eienskap beskik.

TOP 10 is ingesluit omdat hierdie gasheer deur Invitrogen as die ideale gasheer vir uitdrukking in pSE420 aanbeveel word. TOP 10 is 'n rekombinasie-negatiewe sellyn en word aanbeveel vir die stabiele replisering van hoë kopiegetal plasmiede (Invitrogen).

DH1 is ook 'n *recA*⁻-sellyn (New England Biolabs, 1992 Katalogus) wat algemeen gebruik word vir die grootskaalse bereiding van plasmiede. Engelke *et al.*, (1990) het die DH1-sellyn gebruik vir die suksesvolle klonering en uitdrukking van *Taq* DNA-polimerase.

JM101 beskik oor die *LaqI*^R-genotipe wat pSJIL-3(P) moontlik kan bystaan met die onderdrukking van die *trc*-promotor om uitdrukking van die IL-3 cDNA op die regte tyd te verseker. JM109 beskik oor die *recA*⁻- en die *LaqI*^R-genotipes wat reeds bespreek is. Die sellyne LE 392 en MC 1061 beskik oor geen van die verlangde genotipes nie, maar is tog geselekteer om te bepaal of die sellyne wat oor van die verlangde genotipes beskik, wel 'n rol speel in die suksesvolle produksie van die IL-3 proteïen.

7.4 UITDRUKKING VAN DIE MENS IL-3 cDNA IN 'N PROKARIOTIESE UITDRUKKINGSSISTEEM

7.4.1 Inleiding

In die voorafgaande Afdelings is die konstruksie van pSJIL-3(P) en die selektering van gasheersellyne vir die produksie van die IL-3 proteïen beskryf. In hierdie Afdeling word die metodes wat gevolg is vir die produksie van die IL-3 proteïen beskryf met verwysing na die kweek van die pSJIL-3(P) bevattende selle, Westelike-oordraganalise van die selproteïene, oopbreek van die selle en fraksionering van hul inhoud en die HPLC-analise van die onderskeie selfraksies.

7.4.2 Voorbereiding van die *E.coli* sellyne

Die onderskeie *E.coli* gasheersellyne is volgens die standaardmetodes, soos deur Vergeer

(1988) beskryf, kompetent gemaak en getransformeer met onderskeidelik pSE420 en pSJIL-3(P). Met behulp van die vinnige isolering van plasmied-DNA uit individuele getransformeerde kolonies (Vergeer, 1988) is vir elk van die sellyne klone geïdentifiseer wat oor die korrekte pSJIL-3(P) en pSE420 vektore beskik het.

7.4.3 Groot skaalse kweking van die plasmiedbevattende *E. coli* sellyne

Luriasop (pH 7.5) (10g% (m/v) Bacto-triptoon; 5g% (m/v) Bacto-gisekstrak; 5g% (m/v) NaCl en 1g% (m/v) Glukose) wat met 1mg% (m/v) ampisillien vermeng is, is vooraf verhit tot by 37°C. Die Luriasop is in 80ml hoeveelde in 12 flesse verdeel, een vir elke gasheer wat met pSE420 en pSJIL-3(P) onderskeidelik getransformeer is. Die Luriasop is vervolgens met 'n 1/10-volume van 'n oornagkultuur van die betrokke gasheerselle geïnkubeer en is op 'n skudblad vir goeie belugting by 37°C geïnkubeer. Sodra 'n absorbansie waarde van 0.5 by 600nm bereik is ($OD_{600} 0.5 \approx 2 \times 10^8$ selle/ml), is 1ml sop uit elke fles onttrek en in 'n eppendorfbuis geplaas. Terwyl die selle in die eppendorfbuis gesedimenteer is (10 000xg), is IPTG tot 'n finale konsentrasie van 1mM by die restant van die selle gevoeg om die *trc*-promotor te induseer. Inkubasie is by 37°C met goeie belugting vir 16 uur voortgesit. Die gesedimenteerde selle in die eppendorfbuise is vervolgens met 50µl 1xSDS-laaibuffer (50mM TrisCl (pH 6.8); 100mM Ditiotreitol; 2g% (m/v) elektroforesegraad SDS; 0.1g% (m/v) Bromofenolblou en 10% (v/v) gliserol) gesuspendeer waarna dit vir 5 minute gekook is. Die inhoud van die eppendorfbuise is met ligte sentrifugering versamel en op ys bewaar. Hierdie is die pre-induksie selekstrak.

Na 16 uur inkubasie is die absorbansiewaardes by 600nm van die flesse bepaal. Vervolgens is 2×10^8 selle uit elke fles onttrek en in eppendorfbuise geplaas waarna die volume tot 1ml in die eppendorfbuise opgevol is. Die selle is net soos hierbo genoem met 1xSDS-laaibuffer oopgebreek en op ys bewaar. Hierdie is die na-induksie selekstrak.

7.5. WESTERN-OORDRAGANALISE

7.5.1 Inleiding

In die vorige Afdeling is van elke sellyn 2×10^8 selle in SDS opgelos waarna dit in die teenwoordigheid van DTT gekook is om die sellulêre proteïene te denatureer en te reduseer. In hierdie Afdeling word die elektroforetiese skeiding van die sellulêre proteïene beskryf asook die oordraging van die onderskeie proteïenbande na nitrosellulosemembrane. Die immunologiese identifisering van IL-3 spesifieke proteïene word ook beskryf.

7.5.2 Eksperimentele metode

Twee 15% Trisglisien SDS-poli-akriëlamiedgelle is voorberei soos beskryf deur Sambrook *et al.*, (1989). Die inhoud van die eppendorfbuise wat op ys bewaar is, (dit is die pre- en na-induksie selekstrakte) is in die putte van die gelle gelaai. Groottestandaarde (**Rainbowmarkers**, Amersham) is ook in van die gelle se putte gelaai. Elektroforese is teen 70V uitgevoer totdat die bromofenolblouband tot aan die onderkant van die gel gemigreer het. Nadat elektroforese voltooi is, is die proteïene na nitrosellulosemembrane oorgedra volgens die metode beskryf deur Gallagher *et al.*, (1992). Die oordragproses is met behulp van 'n **Biorad Transphor™**-apparaat oornag teen 14V by 4°C uitgevoer.

Die immunologiese identifisering van die IL-3 proteïen op die nitrosellulosemembraan is bewerkstellig volgens die metodes beskryf deur Sambrook *et al.*, (1989) en Gallagher *et al.*, (1992), met geringe wysigings. Na die oordrag van die proteïene na die nitrosellulosemembrane, is die membrane by kamertemperatuur in TBS (100mM TrisCl (pH 7.5); 0.9g% (m/v) NaCl) geweek. Die membrane is vervolgens in **Seal-a-Meal™**-sakkies geplaas. Die sakkies is verseël nadat blokkeringsbuffer in die vorm van TTBS (0.1% (v/v) Tween 20 in TBS) by die membrane gevoeg is teen 'n konsentrasie van 0.1ml/cm² nitrosellulosemembraan. Die verseëelde sakkies is oornag by kamertemperatuur op 'n roterende blad geplaas om baie goeie en konstante verspreiding van die TTBS oor die nitrosellulosemembrane te verseker.

Hierna is die sakkies oopgeknip en die TTBS is uit die sakkies verwyder. Poliklonale-haas-

anti-mens IL-3 antiliggaam (Genzyme Katalogusnommer BL-3P) is as die antiliggaam gebruik om die IL-3 proteïen sigbaar te maak. Volgens die vervaardigers is die eindpunttiter van die anti-liggaam $6\mu\text{g/ml}$ vir die opsporing van 25ng mens IL-3 proteïen. Na aanleiding van die grootte van die oppervlak van die nitrosellulosemembrane, word 5ml TTBS per membraan benodig teen 'n konsentrasie van 0.1ml/cm^2 nitrosellulosemembraan. Om die rede is $30\mu\text{g}$ van die antiliggaam met 5ml TTBS gemeng. Hierdie mengsel is by die membrane in die sakkies gevoeg waarna die sakkies weer verseël is. Die sakkies is vir 1.5 uur by kamertemperatuur op 'n roterende blad geroteer. Hierna is die sakkies oopgeknip en die nitrosellulosemembrane is in bakke met 'n oormaat TTBS geplaas. Die membrane is vervolgens 3x met TTBS gewas vir 10 minute op 'n keer. Hierna is die membrane weer in Seal-a-Meal™-sakkies geplaas. Proteïen-A-Peroksidase (Sigma nommer P8651) is met 5ml TTBS gemeng in 'n verhouding van 1:1500. Hierdie verhouding is eksperimenteel bepaal. Die Proteïen A-bevattende TTBS is by die membrane gevoeg en die sakkies is verseël waarna die sakkies vir 1.5 uur by kamertemperatuur op 'n roterende blad geroteer is. Hierna is die sakkies oopgeknip en die membrane is weer eens 3x in 'n oormaat TTBS gewas vir 10 minute op 'n keer.

In die tussentyd is die reagense vir die peperwortel peroksidase-reaksie voorberei (Sambrook *et al.*, 1989). As substraat vir die peroksidasesisteem is 6mg diaminobensidien tetrahydrochloried in 9ml van 'n 0.01M TrisCl-oplossing (pH 7.6) opgelos. Die sensitiwiteit van die reaksie is verhoog deur 0.3g% (m/v) CoCl_2 by die substraatmengsel te voeg. Die substraatmengsel is telkens vars berei. Om enige onopgeloste stof en onsuiverhede uit die substraatmengsel te verwyder, is dit deur 'n Whatman nommer 1 papier gefiltreer. Net voordat die mengsel by die membrane gevoeg is, is $30\mu\text{l}$ van 'n 30% (v/v) H_2O_2 -oplossing daarby gevoeg. Die gewasde membrane is na 'n vlak bak oorgedra waarna die substraatmengsel teen 0.1ml/cm^2 membraan bygevoeg is. Sodra bande waargeneem is, is die membrane dadelik na 'n ander bak met 'n oormaat dubbelgedistilleerde water oorgedra. Nadat al die substraatmengsel van die membrane afgewas is, is die membrane weer in Seal-a-Meal™-sakkies geplaas. Na die byvoeging van TTBS is die membrane verseël en by 4°C bewaar.

7.5.3 Resultate van die Western-oordraganalise

In Figuur 7.5 word 'n tipiese resultaat van 'n Westelike-oordraganalise gegee. Baie hoë agtergrond is deurgans verkry. Ten spyte van 'n verlenging van die blokkeringstyd, blootstelling van die antiliggaammengsel aan 'n *E. coli*-lisaat en verlenging van die wasstappe, kon die agtergrond van die Westelike-oordrag nie verminder word nie. Bane 1 tot 4 bevat die proteïene van die *E. coli* TOP 10-sellyn. Wanneer bane 2 en 4, dit is TOP 10-selle wat met pSJIL-3(P) getransformeer is, met bane 1 en 3 vergelyk word, word 'n proteïen waargeneem wat volgens die groottestandaard (baan 9), dieselfde grootte, naamlik 14.6kD, as die mens IL-3 proteïen het. Die proteïen kan nie voor by die negatiewe kontroles nie (bane 1 en 3). Die voorkoms van hierdie proteïen by baan 2, dit is voorinduksie, kan moontlik dui op die sterkte van die *trc*-promotor om nog steeds aktiwiteit te vertoon in die teenwoordigheid van 'n onderdrukker. Hierdie proteïen se intensiteit verhoog na induksie (baan 4). Dit beteken dat die proteïen 'n produk is van die *trc*-promotor of te wel pSJIL-3(P) is.

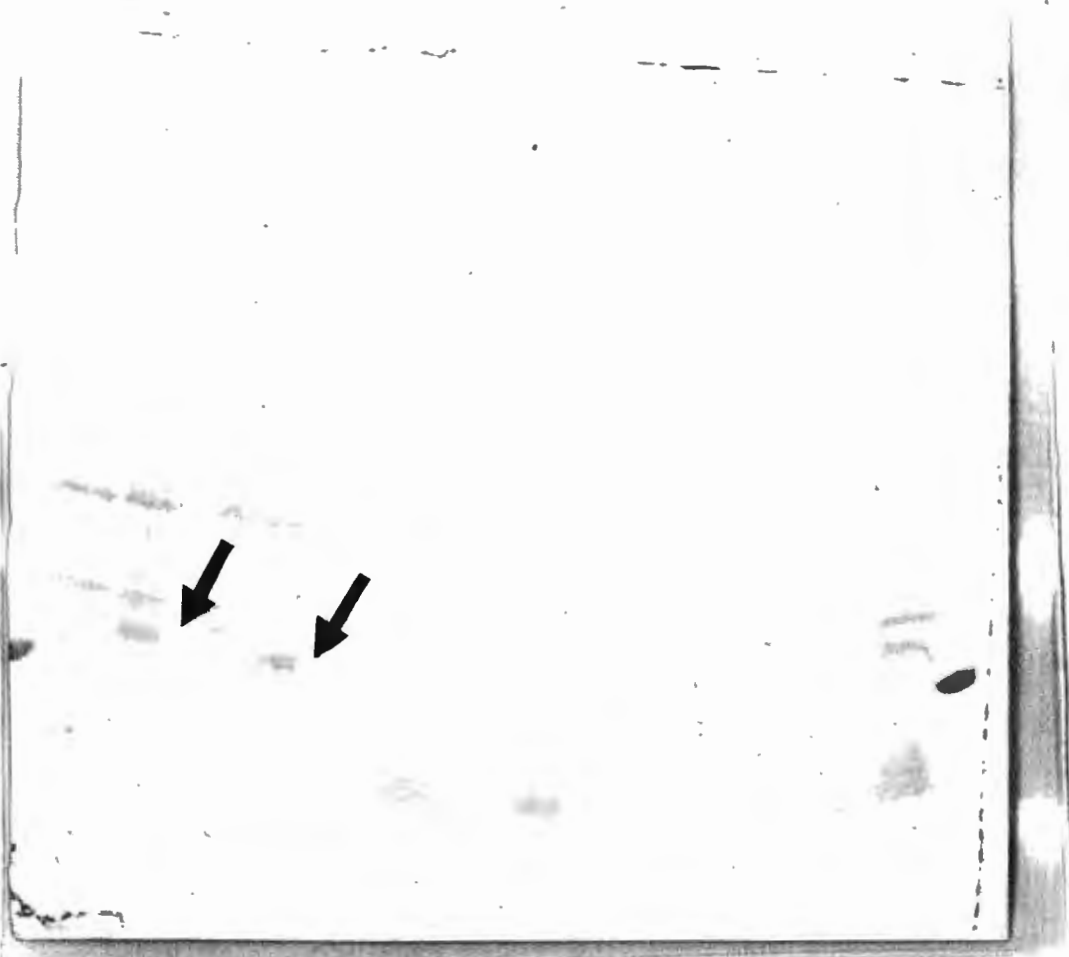
In Figuur 7.5(B), baan 5 tot 8, word die geskeide proteïene van die getransformeerde sellyn JM101 gegee. Hier kan 'n duidelike voorbeeld van geïnduseerde uitdrukking van 'n geen waargeneem word. Weer eens word 'n proteïen waargeneem van dieselfde grootte as die mens IL-3 proteïen. Hierdie band word nie by die negatiewe kontroles (bane 5 en 7) asook nie by die pre-induksie baan (baan 6) opgemerk nie. Die proteïen is dus ook 'n produk van die *trc*-promotor wat na induksie van die promotor gesintetiseer word en is dus afkomstig van die uitdrukkingsektor pSJIL-3(P). Daar word nie soortgelyke proteïenbande van 14.6kD by die ander sellyne waargeneem nie.

7.6 HPLC-ANALISE VAN DIE GETRANSFEKTEERDE SELLYNE

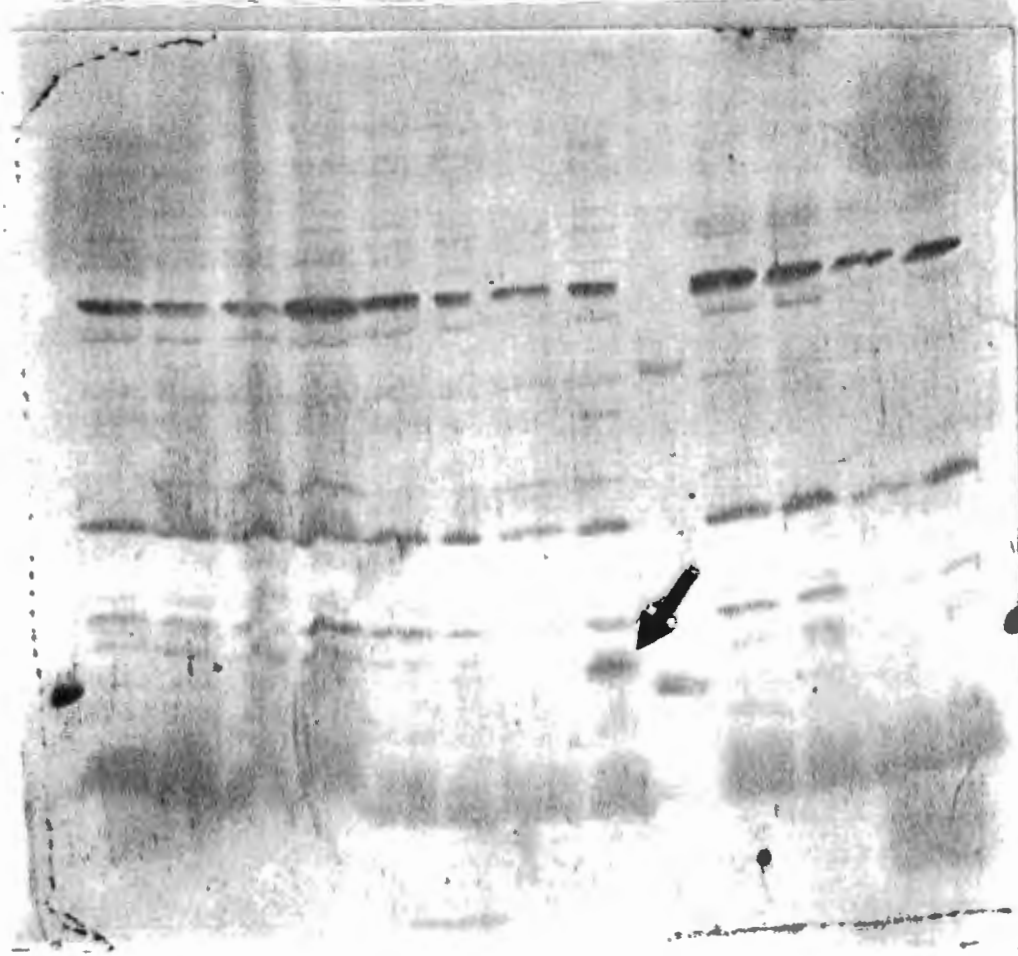
7.6.1 Inleiding

Volgens die resultate van die Westelike-oordraganalises kan die afleiding gemaak word dat in die TOP 10- en JM101-selle wat met pSJIL-3(P) getransformeer is, 'n proteïen na induksie met IPTG, vervaardig word wat ten opsigte van grootte ooreenstem met die mens IL-3

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



FIGUUR 7.5
RESULTATE VAN DIE WESTELIKE OORDRAGANALISE

- A.
- Baan 1 : TOP 10 selle - pSE420 - voor induksie
 - Baan 2 : TOP 10 selle - pSJIL-3(P) - voor induksie
 - Baan 3 : TOP 10 selle - pSE420 - 16 uur na induksie
 - Baan 4 : TOP 10 selle - pSJIL-3(P) - 16 uur na induksie
 - Baan 5 : DH1 selle - pSE420 - voor induksie
 - Baan 6 : DH1 selle - pSJIL-3(P) - voor induksie
 - Baan 7 : DH1 selle - pSE420 - 16 uur na induksie
 - Baan 8 : DH1 selle - pSJIL-3(P) - 16 uur na induksie
 - Baan 9 : **Rainbowmarkers (Amersham)**
 - Baan 10 : LE 392 selle - pSE420 - voor induksie
 - Baan 11 : LE 392 selle - pSJIL-3(P) - voor induksie
 - Baan 12 : LE 392 selle - pSE420 - 16 uur na induksie
 - Baan 13 : LE 392 selle - pSJIL-3(P) - 16 uur na induksie
- B.
- Baan 1 : MC1061 selle - pSE420 - voor induksie
 - Baan 2 : MC1061 selle - pSJIL-3(P) - voor induksie
 - Baan 3 : MC1061 selle - pSE420 - 16 uur na induksie
 - Baan 4 : MC1061 selle - pSJIL-3(P) - 16 uur na induksie
 - Baan 5 : JM 101 selle - pSE420 - voor induksie
 - Baan 6 : JM 101 selle - pSJIL-3(P) - voor induksie
 - Baan 7 : JM 101 selle - pSE420 - 16 uur na induksie
 - Baan 8 : JM 101 selle - pSJIL-3(P) - 16 uur na induksie
 - Baan 9 : **Rainbowmarkers (Amersham)**
 - Baan 10 : JM 109 selle - pSE420 - voor induksie
 - Baan 11 : JM 109 selle - pSJIL-3(P) - voor induksie
 - Baan 12 : JM 109 selle - pSE420 - 16 uur na induksie
 - Baan 13 : JM 109 selle - pSJIL-3(P) - 16 uur na induksie

proteïen. Volgens Invitrogen is TOP 10-selle die ideale gasheer vir uitdrukking in die pSE420vektor. Om hierdie redes is besluit op die TOP 10-selle weer op grootskaal te kweek vir die identifisering van die mens IL-3 proteïen met behulp van HPLC.

Rekombinante proteïene wat in *E. coli* uitgedruk word, kom baie keer in 'n onopgelosde vorm in die selle voor (Asenjo en Patrick, 1990). Die onopgelosde vorm word insluitingsliggame (inclusion bodies) genoem. Die vorming van insluitingsliggame is egter nie noodwendig 'n nadeel nie, want die insluitingsliggame kan gesien word as 'n verrykte bron van die rekombinante proteïen (Brewer en Sassenfeld, 1990). Sodra getransformeerde selle dus na kweking geliseer en aan sentrifugering onderwerp word, kan die rekombinante proteïen teen 'n suiwerheid van ongeveer 50% in die sediment verkry word (Marston en Hartley, 1990). In hierdie Afdeling word daar beskryf hoedat die gekweekte selle se inhoud in 'n sitoplasmiese- en in 'n insluitingsliggaamfraksie verdeel is om te bepaal of die rekombinante IL-3 proteïen in die vorm van insluitingsliggame voorkom of nie.

7.6.2 Bereiding van die subsellulêre fraksies

Die rekombinante TOP 10-selle is in 250ml Luriasop gekweek by 37°C totdat 'n absorbansiewaarde van 0.5 by 600nm verkry is. IPTG is tot 'n finale konsentrasie van 1mM bygevoeg vir die induksie van die *trc*-promotor. Die kulture is vervolgens vir 16 uur by 37°C met goeie belugting geïnkubeer.

7.6.3 Lisering van die gekweekte selle

Die lisering van die gekweekte selle is met klein veranderinge uitgevoer volgens die metode beskryf deur Engelke *et al.*, (1990). Nadat die selle vir 16 uur geïnkubeer is, is hulle vir 30 minute op ys afgekoel. Die selle is toe deur sentrifugering (3 000xg) by 4°C vir 15 minute versamel en drie maal met 25ml Buffer A (50mM TrisCl (pH 7.25); 50mM Dekstrose en 1mM EDTA) gewas. Na die laaste sentrifugering van die selle is hulle in 4ml Buffer A per milliliter sediment gesuspendeer. Hierna is lisisiem by die selle gevoeg tot 'n finale

konsentrasie van 1mg/ml, *DNase I* tot 'n finale konsentrasie van 1 μ g/ml en laastens PMSF tot 'n volume van 133 μ l per 20ml selsuspensie vanuit 'n 50mM oplossing. PMSF tree op as 'n serienprotease inhibeerder. Die selsuspensie is vervolgens by 37°C vir 30 minute geïnkubeer met gereelde roering.

Hierna is die mengsel by 4°C vir 45 minute teen 20 000xg gesentrifugeer. Die supernatant wat uit die sitoplasmiese inhoud van die selle bestaan (sitoplasmiese-fraksie) is gedekanteer en by 4°C bewaar. In die volgende Afdeling word beskryf hoe die sediment (insluitingsliggaamfraksie) wat onder andere uit selwande en moontlike insluitingsliggaame bestaan, verder behandel is.

7.6.4 Oplossing van die sediment

Die sediment (Afdeling 7.6.3) is in 5ml Buffer B (10mM TrisCl (pH 7.25); 1 mM EDTA; 1mM PMSF; 0.5% (v/v) Tween 20 en 0.5% (v/v) Nonidiet P40) gesuspendeer. Die volume is aangevul met nog 20ml Buffer B, waarna die oplossing vir 10 minute by kamertemperatuur gelaat is. Die mengsel is toe aan sentrifugering onderwerp by 4°C vir 45 minute teen 20 000xg. Die presipitaat is nog 2x soos hierbo beskryf is gewas. Die buise waarin die sentrifugering in uitgevoer is, is vooraf geweeg sodat die massa van die presipitaat bereken kan word.

Na die laaste sentrifugering is die sediment opgelos deur 6N Guanidien HCl by te voeg tot 'n volume van 1ml/mg sediment, β -merkpto-etanol is ook bygevoeg tot 'n finale konsentrasie van 50mM en die mengsel is liggies geskud totdat die sediment opgelos het. Onopgelosde stowwe is deur sentrifugering vir 15 minute by 4°C teen 30 000xg gesedimenteer.

7.6.5 Ammoniumsulfaatpresipitering

Ammoniumsulfaatpresipitering van proteïene uit die sitoplasmiese-fraksie en die insluitingsliggaamfraksie, is met geringe veranderinge uitgevoer volgens die metode beskryf

deur Scopes (1988). Daar is besluit op drie fraksioneringspersentasies, naamlik 0% tot 45% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 45% tot 75% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, en 75% tot versadiging met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Die onderskeie selffraksies is in glasbekers tesame met magnetiese roerders gevoeg. Die ammoniumsulfaat is fyn gemaak waarna dit volgens 'n uitgebreide tabel van Green en Hughs, (1955) stadig by die roerende fraksies gevoeg is. Die sout is in klein hoeveelhede bygevoeg en daar is eers gewag totdat al die sout opgelos het, voordat die volgende hoeveelheid bygevoeg is. Sodra die eindpunt genader is, is die sout nog stadiger bygevoeg. Nadat al die $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ opgelos het, is die mengsel vir nog 30 minute by kamertemperatuur geroer.

Die gepresipiteerde proteïene is met behulp van sentrifugering vir 10 minute by 20°C by 10 000xg versamel. Die supernatante is afgegooi en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ is op soortgelyke wyse tot by die volgende soutpersentasie bygevoeg.

Die presipitate is telkens na sentrifugering in 2 volumes dialisebuffer (50mM TrisCl (pH 7.25) en 1 mM EDTA) gesuspendeer. Die opgeloste fraksies is vervolgens teenoor twee ruilings elke twaalfuur telkens met honderd volumes dialisebuffer by 4°C met roering gedialiseer. Na die tyd is die proteïenkonsentrasie van die fraksies spektrofotometries by 'n golflengte van 280nm bepaal. Die fraksies is hierna by 4°C bewaar.

7.6.6 HPLC-analise van die onderskeie fraksies

Die HPLC-analise van die fraksies is met 'n Beckman System Gold apparaat uitgevoer. Die kolom wat gebruik is, is 'n Beckman C_{18} -ODS kolom van 4.6mm by 15cm. Die elueringsprofiel van die kolom is gemonitor by onderskeidelik 214nm en 280nm (Matsudaira, 1990). Die vloeitempo is konstant gehou by 0.8ml/min. Buffer A het bestaan uit 0.1% (v/v) TFA in dubbelgedistilleerde water, pH 2.0 (Matsudaira, 1990). Vir die instelling van die pH is tri-etiëlamien gebruik om die pH meer alkalies te maak. Buffer B het bestaan uit 0.085% (v/v) TFA in 80% (v/v) asetonitriël in dubbelgedistilleerde water, pH 2.0 (Matsudaira, 1990).

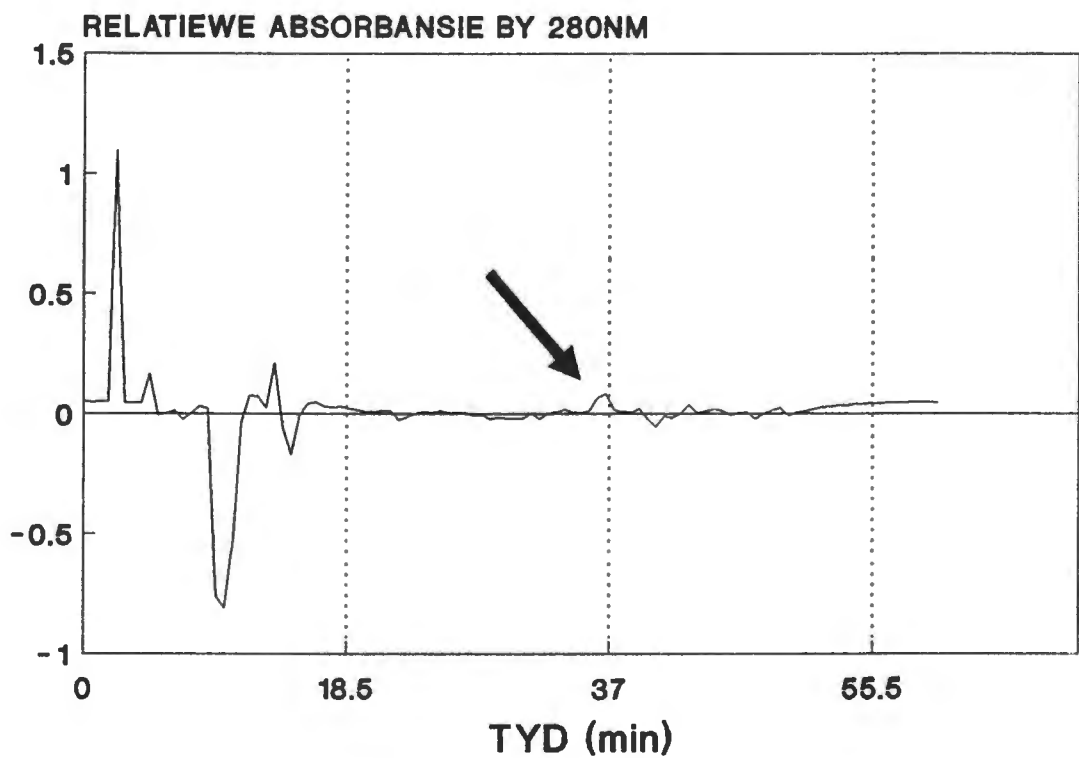
Die gradiëntprogram is gebaseer op die program van Matsudaira, (1990) met geringe

veranderinge en is as volg: 0 - 5 minute, 5% B; 5 - 45 minute, 70% B; 45 - 50 minute, 100% B; 50 - 55 minute, 100% B; 55 - 65 minute, 5% B.

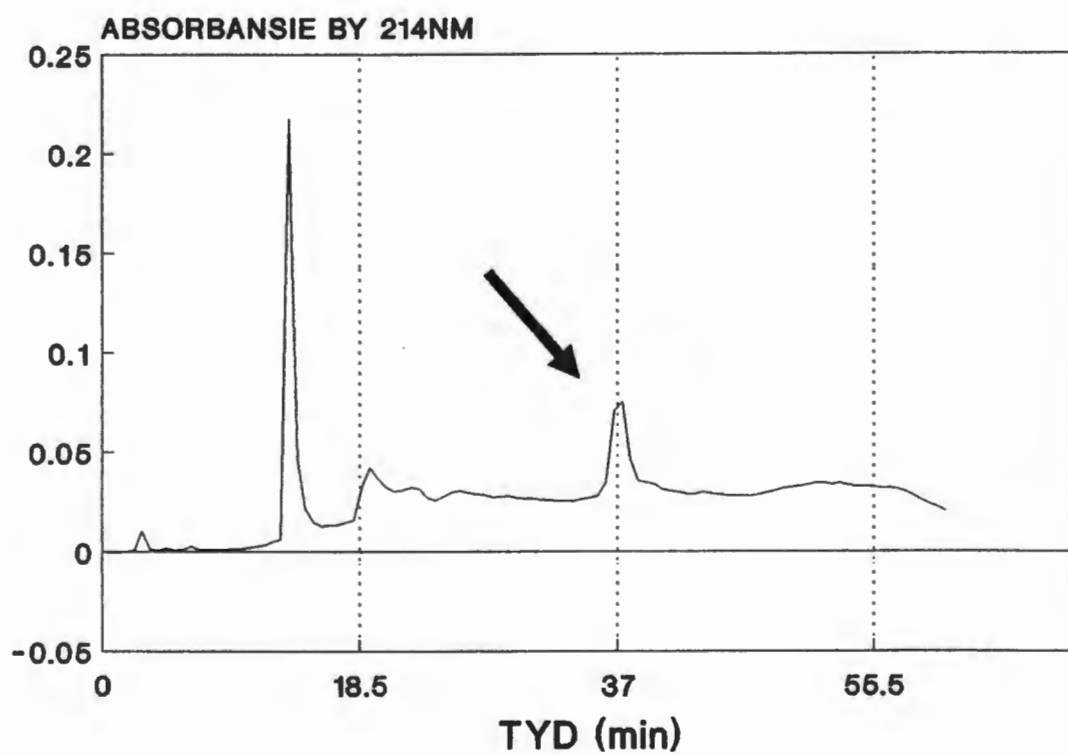
Die proteïenmonsters is ook volgens die metode van Matsudaira, (1990) voorberei. Eksperimenteel is bepaal dat ongeveer 350mg proteïen voldoende is om 'n profiel te lewer met goeie piekresolusie. Die HPLC-spuitstuk is voorts toegerus om 20 μ l monster te akkomodeer. Daar is gevolglik 350mg proteïene verteenwoordigend van al die onderskeie bereide fraksies (Afdeling 7.6.5) onttrek en aan vriesdroging onderwerp. Die gedroogde monsters is vervolgens gedenatureer en gereduseer deur dit in 30 μ l van die volgende mengsel op te los: 50% (v/v) 6N Guanidien-HCl (pH 8.5); 0.05M ditiotrietol in ddH₂O.

Al 12 die proteïenmonsters is op die C₁₈-kolom geanaliseer. Profiele van die skeidings is verkry, waarna die profiel van die negatiewe kontrole (die pSE420-ekwivalent van elke fraksie) telkens van die ooreenstemmende pSJIL-3(P) fraksie met behulp van die System Gold sagteware afgetrek is. Omdat die twee profiele vanaf dieselfde hoeveelheid proteïene berei is, behoort 'n reguitlyn verkry te word, soos identiese pieke mekaar neutraliseer.

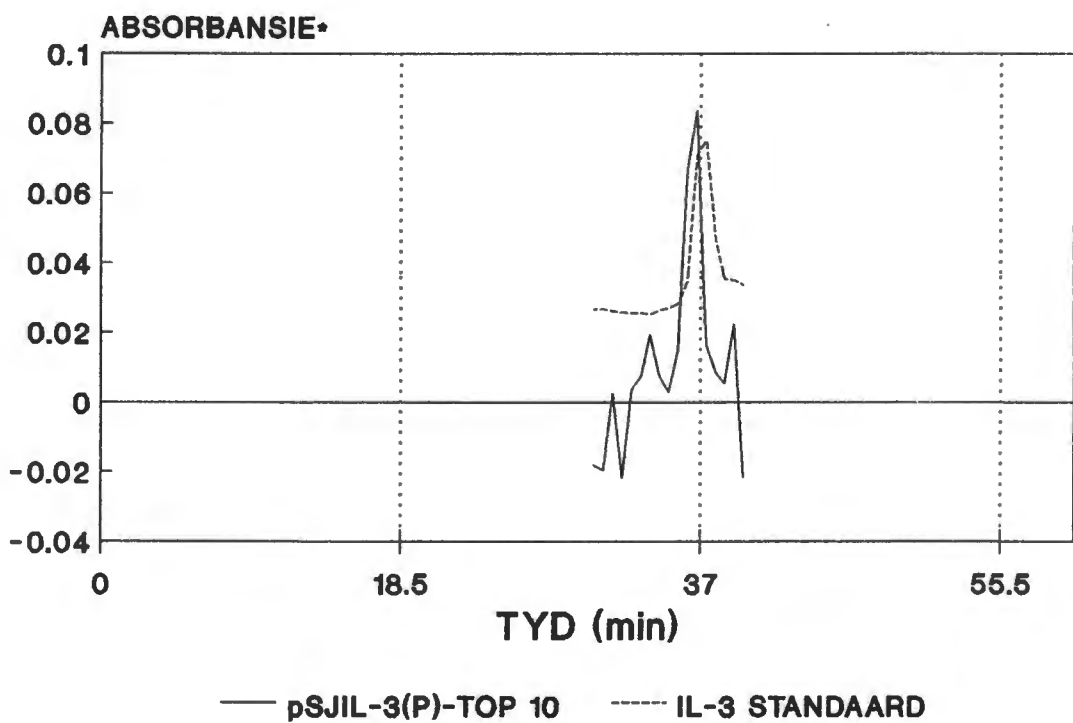
In Figuur 7.6 word 'n voorbeeld gegee van die verskil van die pSJIL-3(P) sitoplasmiese fraksie na 45% - 75% ammoniumsulfaatpresipitering en die ekwivalente pSE420-fraksie. Daar kan 'n piek by ongeveer 37 minute waargeneem word. Dit beteken dat die betrokke piek nie voorgekom het by die negatiewe kontrole nie. Om te bevestig dat die piek moontlik die rekombinante IL-3 proteïen is, is 3 μ g rekombinante mens IL-3 proteïen (Genzyme Katalogusnommer 1933-01) op dieselfde metode voorberei as die proteïenmonsters en op die C₁₈-kolom geskei. In Figuur 7.7 word die elueringsprofiel by 214nm gegee. Die elueringsprofiel by 280nm het 'n te breë piek gelewer wat nie gebruik kon word om die retensietyd presies te bepaal nie. Hiervolgens elueer die mens IL-3 proteïen ook by ongeveer 37 minute. In Figuur 7.8 word die elueringsprofiel van Figuur 7.6 en 7.7 direk met mekaar vergelyk vanaf 'n retensietyd van 30 minute tot 40 minute. Hieruit kan baie duidelik waargeneem word dat die IL-3 proteïenstandaardpiek en die piek wat verkry is nadat die pSJIL-3(P) sitoplasmiese fraksie na 45% - 75% ammoniumsulfaatpresipitering van die ekwivalente pSE420-fraksie afgetrek is, byna dieselfde retensietyd het. Hieruit wil dit voorkom dat daar 'n IL-3 spesifieke proteïen deur pSJIL-3(P) in TOP 10 selle geproduseer



FIGUUR 7.6
DIE VERSKIL TUSSEN DIE pSJIL-3(P) SITOPLASMIESE-FRAKSIE NA 45% - 75% AMMONIUMSULFAATPRESIPITERING EN DIE EKWIVALENTE pSE420-FRAKSIE
 Die pyl dui die betrokke piek aan.



FIGUUR 7.7
PROFIEL VAN DIE ELUERING VAN REKOMBINANTE MENS IL-3
PROTEIENSTANDAARD
Die pyl dui die betrokke piek aan.



FIGUUR 7.8

VERGELYKING TUSSEN DIE ELUERINGSPROFIELE VAN FIGUUR 7.6 EN 7.7

* Die Absorbansie van die pSJIL-3(P)-TOP 10 is relatief omdat dit die verskil tussen twee Absorbansiewaardes is. Die Absorbansie van die IL-3 standaard is bepaal by 214nm.

word. Die proteïene kom in die sitoplasma van die *E. coli*-selle voor en kan met 'n 45% - 75% ammoniumsulfaatkonsentrasie gepresipiteer word. Die proteïene kom nie voor in die ekwivalente pSE420-fraksie nie.

Daar is by geen van die elueringsprofiel van die ander proteïenbereidings of rekenaarverwerkteprofiel 'n piek by ongeveer 37 minute waargeneem nie.

7.7 SAMEVATTING

In hierdie Hoofstuk is die klonering en uitdrukking van die menslike vir IL-3 in 'n prokariotiese uitdrukkingssisteem beskryf. Die prokariotiese uitdrukkingsektor pSE420 is gebruik en die IL-3 cDNA is in die vektor gekloneer. Ses verskillende *E. coli*-sellyne is getransformeer met die rekombinante plasmied, pSJIL-3(P). Met die Westelike-oordraganalise is proteïene wat ten opsigte van grootte ooreenstem met die mens IL-3 proteïene by die pSJIL-3(P)-getransformeerde-*E. coli*-sellyne TOP 10 en JM101 waargeneem. Die proteïene het slegs na induksie met IPTG voorgekom en het nie by die negatiewe kontroles voorgekom nie. Ten spyte van die hoë agtergrond wat voorgekom het, wil dit voorkom dat TOP 10-selle en JM101-selle na induksie 'n proteïene sintetiseer wat in terme van grootte ooreenstem met die mens IL-3 proteïene.

Met die HPLC-analise is daar 'n unieke proteïene geïdentifiseer in die sitoplasmiese fraksie van die TOP 10-selle na 'n ammoniumsulfaatfraksioneringpersentasie van 45% - 75%. Hierdie proteïene het nie by die negatiewe kontrole voorgekom nie. Die proteïene se retensietyd stem baie goed ooreen met rekombinante mens IL-3 proteïene onder dieselfde kondisies.

In die prokariotiese uitdrukkingssisteem is daar dus unieke proteïene na induksie van die uitdrukkingsektor se promotor geproduseer wat in terme van grootte en retensietye ooreenstem met die rekombinante mens IL-3 proteïene.

HOOFSTUK 8

BESPREKING

8.1 INLEIDING

Die doelstellings van hierdie studie (Afdeling 2.5) is eerstens om die mensgeen vir IL-3 te kloneer en uit te druk en tweedens om opleiding in Biotegnologie te verseker. In hierdie Hoofstuk word die resultate wat tydens die studie verkry is bespreek om aan te toon hoedat die gestelde doelstellings verwesenlik is.

8.2 HEMATOPOÏETIESE GROEIFAKTORE

In Hoofstuk 2 is daar 'n literatuuroorsig gegee van die sitokiene (Afdeling 2.2) en meer spesifiek van die hematopoïetiese groeifaktore (Afdeling 2.3). As gevolg van hierdie faktore se terapeutiese sukses, het hulle dan ook op die voorgrond van biotegnologiese navorsing getree (Zuwawski, 1991). Die klonering van die gene van die hematopoïetiese groeifaktore en die produksie van die betrokke proteïene in groot hoeveelhede met behulp van die rekombinante DNA tegnologie, het 'n omwenteling in die eksperimentele en kliniese hematologie tot gevolg gehad omdat genoegsame hoeveelhede van hierdie faktore beskikbaar gekom het om kliniese toetse te kan uitvoer (Sieff, 1991). Die terapeutiese toepassings van die hematopoïetiese groeifaktore is in Afdeling 2.3.3 bespreek. Die hematopoïetiese groeifaktore funksioneer in die vorm van 'n kaskadereaksie (Figuur 2.1). Een faktor soos byvoorbeeld IL-3 het die produksie van kolonie-vormings-eenheid vir granulosisiete, eritrosiete, monosiete en megakariosiete (CFU-GEMM) vanaf pluripotente stamselle tot gevolg (Clemens, 1991; Yang en Clark, 1989). Die opeenvolgende sinergistiese inwerking van IL-3 en GM-CSF en ander meer lynbeperkte hematopoïetiese groeifaktore soos M-CSF, G-CSF, IL-5 en EPO op die CFU-GEMM het dan die vorming van die betrokke effektorselle soos eritrosiete,

neutrofiele ensovoorts, tot gevolg (Figuur 2.1). Hierdie sinergistiese werking van die hematopoïetiese groeifaktore het dan ook tot gevolg gehad dat bevind is dat die kliniese aanwending van IL-3 en GM-CSF in kombinasie meer effektief is as wat die enkele faktore alleen is (Hoelzer *et al.*, 1991; Oster *et al.*, 1991; Sieff, 1990; Morstyn *et al.*, 1989).

Die terapeutiese toepassings van IL-3 is gesetel in die behandeling van chemo- en radio-terapie geïnduseerde sekondêre hematopoïetiese disfunksies (Afdeling 2.4.4). Daar is besluit om die mensgeen vir IL-3 te kloner en uit te druk op grond van die faktor se terapeutiese potensiaal en vir die gekombineerde aanwending saam met GM-CSF omdat die geen reeds suksesvol gekloner en uitgedruk is in ons laboratorium (Greeff, 1993). Opleiding sal dan ook hierdeur in Biotegnologie verseker word veral as eksperimentele benaderingswyses geïdentifiseer word met die oog op opleiding.

8.3 DIE VERKRYGING VAN PEILERS VIR DIE KLONERING VAN DIE MENS IL-3 GEEN

Nadat die geskiedenis van die isolering en klonering van die mens IL-3 geen bestudeer is (Afdeling 3.1), is besluit om die mens IL-3 geen vanuit 'n cDNA-biblioteek te isoleer. Die besluit is grootliks op grond van die opleidingspotensiaal van die benaderingswyse geneem. Vir die aftasting van biblioteke word IL-3-spesifieke peilers benodig. Volgordes is in die nukleotiedvolgorde van die IL-3 geen geïdentifiseer wat as oligonukleotiede kan optree (Afdeling 3.2.1). Die oligonukleotiede kan onder andere as peilers vir die aftasting van biblioteke aangewend word of as voorvoeders vir die sintese van langer IL-3-spesifieke peilers deur middel van PCR.

Om 'n aanduiding te verkry of die oligonukleotiedvolgordes funksioneel sal wees onder reaksiekondisies, is 'n rekenaaranalise op die volgordes uitgevoer (Afdeling 3.2.1.1). Die resultate van die rekenaaranalise het aangedui dat daar nie volgordes in die oligonukleotiede voorkom wat die vorming van sekondêre strukture binne die oligonukleotied sal bevorder nie, dat elk van die oligonukleotiede oor unieke volgordes beskik en nie aan mekaar se teikengebiede sal hibridiseer nie, dat die oligonukleotiede nie komplementêr aan mekaar is

en voorvoerderdimere sal vorm nie en dat die oligonukleotiede spesifiek is vir hul onderskeie teikengebiede. Oligonukleotied IL-3 5A en oligonukleotied IL-3 5B kan volgens die rekenaaranalise ook aan Gibbon-IL-3 DNA-volgordes hibridiseer (Tabel 3.2). Hierdie bevinding sal nie die funksionaliteit van die twee oligonukleotiede beïnvloed nie omdat slegs mensbiblioteke gebruik is vir die isolering van die mensgeen vir IL-3. Die oligonukleotiede is vervolgens gesintetiseer (Afdeling 3.2.1.2) en tydens suiwing van die oligonukleotiede op 'n poli-akriëlamiedgel, is waargeneem aan die hand van groottestandaarde dat al vier die oligonukleotiede se lengtes korrek gesintetiseer is.

Die IL-3 oligonukleotiede is vervolgens aangewend om 'n IL-3-spesifieke PCR-fragment te sintetiseer om ook as peiler te gebruik vir die aftasting van biblioteke (Afdeling 3.3). Om optimale sintese van die korrekte PCR-produkte te verseker, is dit nodig om die optimale $MgCl_2$ -konsentrasie van die amplifiseringsbuffer vir elke voorvoerderpaar vas te stel omdat die $MgCl_2$ -konsentrasie die mees kritiese veranderlike tydens PCR is (Coen, 1991).

Die reaksie vir die sintese van die 500bp PCR-produk is eerste aangewend om die optimum $MgCl_2$ -konsentrasie van te bepaal (Afdeling 3.3.2) omdat die sintese van die produk nie beïnvloed kan word deur veranderlikes soos die onbekende introngroottes waaroor die ander PCR-produkte moet strek nie. Die betrokke PCR-produk bevat ook die 100bp PCR-produk met voorvoeders IL-3 5A en IL-3 5B. Die optimum $MgCl_2$ -konsentrasie vir die sintese van die 500bp PCR-produk is bepaal op 3.0mM $MgCl_2$ (Figuur 3.3). Die hibridiseringstemperatuur is die ander belangrike veranderlike wat die opbrengs van PCR kan beïnvloed (Innis en Gelfand, 1990). Die optimum hibridiseringstemperatuur vir die sintese van die 500bp PCR-produk is 'n temperatuurreeks van 57°C tot 53°C (Afdeling 3.3.3).

Die optimum $MgCl_2$ -konsentrasie en hibridiseringstemperatuur vir die sintese van die 100bp PCR-produk is bepaal op 3.0mM $MgCl_2$ en 54°C tot 50°C onderskeidelik (Afdeling 3.3.4).

Daar kon nie daarin geslaag word om langer PCR-produkte te sintetiseer nie. Die berekende lengtes van die twee lang PCR-produkte met voorvoeders IL-3 1A en 5B, en IL-3 1A en 5BB is onderskeidelik 2000bp en 2400bp (Figuur 3.2). Die optimum lengte vir suksesvolle PCR is tussen 100bp en 600bp (Lowe *et al.*, 1990) en dit kan wees dat *Taq*-polimerase in dié

geval nie die betrokke lengtes suksesvol kon amplifiseer nie, ten spyte van Saiki *et al.*, (1988) se bevinding dat *Taq*-polimerase wel instaat is om lengtes van tot 2kb effektief te amplifiseer. Omdat die lengte van onder andere die langste intron van die IL-3 geen bereken is met behulp van 'n grafiese voorstelling van die IL-3 geen deur Yang en Clark (1989), kan dit ook wees dat die betrokke introns in werklikheid groter is as wat hulle voorgestel is op Yang en Clark (1989) se geenkaart of as wat hulle bereken is. Dit kan tot gevolg hê dat die verlangde PCR-produkte totaal buite die vermoë van *Taq*-polimerase val. 'n Ander rede kan die onvermoë van oligonukleotied IL-3 1A wees om suksesvol as voorvoerder tydens PCR op te tree. Die ander twee voorvoeders wat betrokke is in die lewering van die lang PCR-produkte, naamlik IL-3 5B en IL-3 5BB, was reeds suksesvol tydens PCR (Afdelings 3.3.2, 3.3.3 en 3.3.4) en dit is onwaarskynlik dat die fout by hulle kon gewees het.

Die 500bp PCR-produk is in pSP65 gekloneer (Afdeling 3.3.6) en na suksesvolle restriksiekartering (Afdeling 3.3.6) en volgordebepaling van die 500bp-fragment (Afdeling 3.3.7), is dit bevestig dat die 500bp PCR-fragment wel die verlangde IL-3-fragment is en dat dit suksesvol in pSP65 gekloneer is.

Die oligonukleotiede en die 500bp PCR-produk is vervolgens as peilers aangewend om die mensgeen vir IL-3 uit cDNA- en genomiese-biblioteke te isoleer.

8.4 AFTASTING VAN 'N cDNA-BIBLIOTEEK MET 'N OLIGONUKLEOTIED VIR DIE VERKRYGING VAN DIE MENS IL-3 GEEN

Oligonukleotiede is al suksesvol aangewend as peilers vir die opsporing en klonering van cDNA-volgordes (Otsuka *et al.*, 1988; Conner *et al.*, 1983; Suggs *et al.*, 1981). Dit is egter bevind dat 5'-radio-aktiefgemerkte oligonukleotiedpeilers 30 tot 100 maal minder sensitief is as lang DNA-peilers wat deur middel van vervangingsmerking radio-aktief gemerk is (Berent *et al.*, 1985). Yang *et al.*, (1986) het bevind dat die voorkoms van IL-3 mRNA tussen 0.01% en 0.001% van die totale sellulêre mRNA is. Otsuka *et al.*, (1988) het ook bevind dat die voorkoms van IL-3 cDNA in cDNA-biblioteke baie laag is in vergelyking met GM-CSF

cdNA in dieselfde biblioteke (Afdeling 4.2.1).

Die vraag is vervolgens gevra of die IL-3 cDNA suksesvol uit 'n cDNA-biblioteek met 'n oligonukleotiedpeiler geïsoleer kan word. Om die vraag suksesvol te beantwoord is eerstens verseker dat die cDNA-biblioteek wat gebruik is, op so 'n manier gekonstrueer is dat selfs lae voorkoms mRNA wel teenwoordig sal wees in die betrokke cDNA-biblioteek (Afdeling 4.2.1). Verder is die hibridiseringskondisies en waskondisies vir die optimale effektiwiteit van die oligonukleotiedpeiler gestandaardiseer (Afdeling 4.2.3).

Tydens die standaardiseringsproses is dit vasgestel dat die nitrosellulosemembrane droog gebruik moet word en nie vooraf met 6xSSC benat moet word soos wat die geval is tydens Southern-oordraganalises nie (Afdeling 4.2.3.2). Tydens Southern-oordraganalises word die oordrag van DNA na die nitrosellulosemembrane bewerkstellig deur kapillêre suigkrag wat deur die aantal absorberende handdoekpapiere bo-op die nitrosellulosemembraan bewerkstellig word. Tydens aftasting van 'n biblioteek is daar geen absorberende papiere wat die opsuig van vloeistof kan bevorder wat kan bydra tot die oorbeweeg van die faag-DNA nie. Die enigste suigkrag is gesetel in die droë nitrosellulosemembraan self. Deur die membraan dus vooraf met vloeistof te versadig, word die absorbering van rekombinante faag-DNA nie bewerkstellig nie.

Die optimum hibridiseringstemperatuur van die oligonukleotiedpeiler is gestandaardiseer op 40°C (Afdeling 4.2.3.2). Die optimum wastemperatuur van die peiler is ook bepaal. Dit is egter bevind dat die soutkonsentrasie 'n baie groot invloed het op die behoud van hibridisering van die peiler aan teikenvolgordes (Afdeling 4.2.3.3). Die behoud van hibridisering by 'n hoë soutkonsentrasie is nie opgehef by hoër wastemperature nie. Om die wastemperature te verhoog kan verseker word dat die hibridiserings wel opgehef sal word. Dit sal egter die wasproses bemoeilik omdat daar dan by baie hoë wastemperature gewerk sal moet word. As alternatief is besluit om die finale wastemperatuur konstant te hou by 40°C en die finale wassoutkonsentrasie te verlaag (Afdeling 4.2.3.4). Dit het tot gevolg gehad dat die finale wassoutkonsentrasie op 0.5xSSC vasgestel is by 'n temperatuur van 40°C (Figuur 4.5).

Om te bepaal of die verlaagde finale wassoutkonsentrasie afhanklik is van die finale wastemperatuur van 40°C, is die eksperiment ook by kamertemperatuur uitgevoer. Die resultaat (Figuur 4.5) het duidelik getoon dat die finale wastemperatuur van 40°C wel 'n rol met opheffing van hibridisering speel tydens die finale wasstap van die membrane.

Nadat die hibridiseringstemperature en die waskondisies gestandaardiseer is, is 100 000 plake van die mens limfoma cDNA-biblioteek afgetas met die oligonukleotiedpeiler, IL-3 5A. Hieruit is 24 potensieel positiewe plake geïsoleer wat aan 'n tweede rondte van aftasting onderwerp is. Hieruit is 12 potensieel positiewe plake geïsoleer wat aan 'n derde rondte van aftasting onderwerp is waaruit weer 12 potensieel positiewe plake geïsoleer is. Die potensieel positiewe plake is baie versigtig aan die hand van spesifieke patrone op die X-straalfilm geïdentifiseer (Afdeling 4.2.5).

Vervolgens is die potensieel positiewe plake wat afkomstig is van die derde rondte aan dot-blot-analises onderwerp om te bepaal watter van die geïsoleerde plake definitief positief is. Ten spyte van baie duidelike hibridisering van die peiler aan die positiewe kontrole, het daar geen hibridisering voorgekom aan die onderskeie plake nie (Figuur 4.7). Die afleiding is vervolgens gemaak dat die plake van die derde rondte nie positief is nie. Hierna is die twaalf plake afkomstig van die tweede rondte van aftasting aan dieselfde dot-blot-analises onderwerp. Weereens het geen hibridisering van die peiler aan die plake voorgekom nie terwyl die positiewe kontrole baie duidelike hibridisering vertoon het (Figuur 4.8). Die potensieel positiewe klone van die derde en tweede rondtes van aftasting is dus nie positief nie.

Die moontlikheid bestaan dat, ten spyte van die versigtige identifisering van potensieel positiewe plake op grond van voorkoms en hibridiseringspatrone (Afdeling 4.2.5), plake geïsoleer is waaraan nie-spesifieke hibridisering van die peiler voorgekom het. Die nie-spesifieke hibridisering kan aan rekombinante cDNA, λ gt11 DNA, bakteriële DNA of bakteriële selreste toegeskryf word. Die selektiewe identifisering van die hibridiseringsresultaat kon moontlik nie onderskei het tussen spesifieke- en nie-spesifieke hibridisering van die peiler nie.

Berent *et al.*, (1985) het onderskei tussen ware en vals hibridiserings deur 'n DNA-biblioteek met duplikaat nitrosellulosemembrane af te tas. Een van die nitrosellulosemembrane is na die normale wasstappe aan 'n baie streng finale was onderwerp deur die membraan vir 5 minute in 'n kokende waterbad te laat. Ware Watson-Crick hibridisering word onder hierdie kondisies opgehef terwyl nie-Watson-Crick hibridiserings nie opgehef word nie. Die kolle op die X-straalfilm wat na die baie streng finale was verdwyn het, is dus afkomstig vanaf spesifieke hibridisering aan DNA. Hierdie kolle kan op die duplikaat membraan se X-straalresultaat geïdentifiseer word om sodoende die ooreenstemmende plake te isoleer. Hierdie metode kon moontlik beter onderskei het tussen spesifieke- en nie-spesifieke hibridiserings tydens die identifisering van potensieel positiewe plake.

'n Ander verklaring vir die onvermoë om positiewe plake te isoleer, mag daaraan toegeskryf word dat die oligonukleotied nie onder alle omstandighede spesifiek hibridiseer nie want tydens die dot-blot analyses (Afdeling 4.2.3.1) is slegs DNA wat die teikengebied van die peiler bevat het teenwoordig. Alhoewel die negatiewe kontroles geen hibridisering vertoon het nie, kan die peiler dalk nog steeds nie-spesifiek aan ander DNA volgordes hibridiseer. Die vermoë van oligonukleotied IL-3 5A om suksesvol as peiler tydens PCR op te tree, (Afdeling 3.3.2), impliseer nie dat die peiler altyd spesifiek aan die teiken-DNA hibridiseer nie. Slegs korrekte hibridiserings van die sin en anti-sin voorvoeders lei tot die verkryging van die korrekte PCR-produk.

Die baie lae voorkoms van mens IL-3 cDNA in geaktiveerde T-sel cDNA-biblioteke (Afdeling 4.2.1), kan tot gevolg hê dat IL-3 cDNA moontlik nie teenwoordig is in die Mens Limfoma cDNA-biblioteek nie. Nog 'n rede kan wees dat as gevolg van die baie lae sensitiviteit van 5'-radio-aktiefgemerkte peilers, is die IL-3-spesifieke cDNA-volgordes wat wel voorgekom het, nie opgetel nie. Die mens IL-3 cDNA kan dus nie suksesvol met 'n oligonukleotiedpeiler uit 'n cDNA-biblioteek geïsoleer word nie.

As gevolg van die lae voorkoms van IL-3 cDNA in cDNA-biblioteke en die lae sensitiviteit van die oligonukleotiedpeiler, is dit wenslik om meer klone af te tas met 'n peiler met hoër spesifiteit, soos byvoorbeeld die 500bp PCR-produk. Hierdeur sal die kans vergroot word om wel 'n positiewe kloon te verkry. Daar is egter besluit om eerder 'n genomiese-biblioteek

met die langer peiler af te tas omdat die kans groter is dat die mens IL-3 geen wel voorkom in 'n genomiese-biblioteek.

8.5 VERKRYGING VAN DIE MENS IL-3 GEEN DEUR MIDDEL VAN GENOMIESE-BIBLOTEEK AFTASTING

Die 500bp PCR-produk is as peiler gebruik om 'n mens leukosiet genomiese-biblioteek af te tas. 'n Baie duidelike toename in die aantal positiewe klone vanaf die eerste rondte tot by die derde rondte van aftasting het voorgekom (Figuur 5.2). Na die derde rondte is ses potensieel positiewe klone geïsoleer. Die klone het met dot-blots (Afdeling 5.3.2) en PCR (Afdeling 5.3.3) getoon om wel die vyfde ekson van die IL-3 geen te bevat. Hierna is Southern-oordraganalises op die klone uitgevoer (Afdeling 5.3.4) en is waargeneem dat 'n *Sma* I-restriksiefragment van 5600bp in plaas van 7100bp verkry is waaraan die 500bp peiler gehibridiseer het. Hieruit is twee afleidings gemaak, naamlik:

1. Die mikro-omgewing waarin die faag-DNA voorkom tydens elektroforese verskil van die omgewing waarin die genomiese-DNA voorkom as gevolg van verskillende bereidingsmetodes. Genomiese-DNA is 'n baie suiwerder preparaat as faag-DNA. Die verskil in mikro-omgewing kan dalk verantwoordelik wees vir die verskil in die grootte wat waargeneem is.
2. Die IL-3 geen is moontlik volledig vervat in die 5600bp *Sma* I-fragment.

Die 5600bp *Sma* I-fragment is gevolglik in pSP65 gekloneer en die vektor pSJ5600 is gekonstrueer (Afdeling 5.4.1). Die pSJ5600-vektor is as templaar aangewend tydens PCR met voorvoeders IL-3 5A en IL-3 5BB. 'n PCR-produk van 500bp is verkry wat dus bevestig het dat die fragment waaraan die 500bp peiler gehibridiseer het, in pSP65 gekloneer is. Hierna is pSJ5600 aan restriksie- en Southern-oordraganalises onderwerp. (Afdeling 5.4). Hieruit is waargeneem dat die *Sma* I-fragment waaraan die peiler gehibridiseer het, wel 5600bp groot is en dat die vyfde ekson en moontlik die vierde en derde eksone van die IL-3 geen teenwoordig is in die 5600bp *Sma* I-fragment (Figuur 5.11). Die twee afleidings wat dus

gemaak is, is hierdeur verkeerd bewys. 'n Aantal nuwe restriksiepunte en 'n aantal veranderde restriksiepunte is ook waargeneem (Figuur 5.11).

Om die onvolledige IL-3 geen wat in die 5600bp *Sma* I-fragment te probeer verklaar, is daar eerstens na die manier waarop die biblioteek gekonstrueer is gekyk. Dit is aangetoon dat die konstruksie van die genomiese-biblioteek met *Mbo* I nie die verkrygte resultate kan verklaar nie (Afdeling 5.4.3). Herbestudering van die *Sma* I-restriksiekartering van die klone (Figuur 5.6) het 'n *Sma* I-fragment van 1500bp by al die *Sma* I-verteerde klone aangetoon. Die afleiding is toe gemaak dat die fragment moontlik die ontbrekende 5'-kant van die IL-3 geen bevat en dat daar 'n ekstra *Sma* I-restriksiepoint in die tweede intron van die IL-3 geen voorkom wat nie deur Yang en Clark (1989) aangetoon is of geïdentifiseer is nie (Afdeling 5.5.1). Die "nuwe" *Sma* I-restriksiepoint kon dus die aanvanklike 7100bp *Sma* I-fragment in 'n fragment van 5600bp en 1500bp verdeel het. Daar is egter nie peilers spesifiek vir die 5'-kant van die IL-3 geen beskikbaar nie. Oligonukleotied IL-3 1A is nie oorweeg omdat daar twyfel bestaan oor die vermoë van die oligonukleotied om as peiler op te tree. Om die probleem op te los, is die klone met restriksie ensiem kombinasies verteer sodat eers net die vyfde ekson, dan die vyfde en vierde eksone, dan die vyfde, vierde en derde eksone en laastens al vyf die eksone van die IL-3 geen in restriksiefragmente bevat is wat oor die uitkenningsgebied van die 500bp-peiler beskik het (Afdeling 5.5.1.1). Op hierdie manier kan die teenwoordigheid van die 5'-kant van die IL-3 geen met die 500bp-peiler getoets word.

Hierdie eksperiment kon egter nie met sukses uitgevoer word nie. Na vele pogings wat insluit metodes om die faag-DNA suiwerder te kry, die radio-aktiewe peiler skoner te kry, hoër ensiemkonsentrasies te gebruik tydens die ensiemverterings van die klone, ander hibridiserings- en waskondisies, kon daar nooit geslaag word om volledige vertering van die klone te bewerkstellig nie. Figuur 5.15 toon 'n tipiese Southern-oordraganalise van 'n kloon. Die verkrygte patroon het nie altyd tot dieselfde mate voorgekom nie. Die resultate wat verkry is, is onverklaarbaar want die restriksie ensieme wat gebruik is, is ook op grond van lae voorkoms in faag lambda gekies. Die resultaat kan nie aangewend word om te bepaal of die totale IL-3 geen in een van die klone teenwoordig is nie.

Om te bepaal of die 1500bp *Sma* I-fragment die 5'-kant van die IL-3 geen bevat, is 'n

sintetiese IL-3 cDNA bekom (Afdeling 5.5.1.2) en 'n peiler wat nie die vyfde ekson van die IL-3 geen bevat nie is uit die sintetiese IL-3 cDNA berei. Die peiler het nie aan die 1500bp *Sma* I-fragment gehibridiseer nie maar wel aan die 5600bp *Sma* I-fragment (Afdeling 5.5.1.2). Hierdeur is aangetoon dat die 5'-kant van die geen nie voorkom in die 1500bp *Sma* I-fragment nie. Hieruit is die afleiding gemaak dat die hibridisering van die peiler aan die 5600bp *Sma* I-fragment moontlik die gevolg is van die teenwoordigheid van die vierde en derde eksone van die IL-3 geen en dat die res van die IL-3 geen nie teenwoordig is in die ses geïsoleerde klone nie.

Om hierdie afleiding te toets, is die sintetiese geen in peilers verdeel wat spesifiek vir die 5'-kant, die middelste gedeelte en die 3'-kant van die IL-3 geen is (Afdeling 5.5.2). Om te kan bepaal of van die potensiële hibridiserings aan faag-DNA of aan die DNA van die genomiese invoegsel plaasvind, is die genomiese invoegsel uit die EMBL-3 vektor gesny met *Sal* I. Die resultaat van hierdie eksperiment (Figuur 5.20) het bewys dat die vyfde ekson van die IL-3 geen teenwoordig is in die klone, maar dat die middelste en 5'-kant van die IL-3 geen nie teenwoordig is in die klone nie. Die hibridisering van die peiler wat nie oor die vyfde ekson van die IL-3 geen beskik het nie, aan die 5600bp *Sma* I-fragment, het dus aan die vierde en derde eksone of dele daarvan voorgekom.

Die volledige mens IL-3 geen kon dus nie met die 500bp PCR-fragment as peiler uit 'n genomiese biblioteek geïsoleer word nie. Slegs die vyfde ekson en ten minste 'n deel van die vierde en derde eksone van die IL-3 geen is geïsoleer.

Die isolering van slegs 'n gedeelte van die IL-3 is nie noodwendig die oorsaak van die 500bp-peiler wat gebruik is nie. Die mens IL-3 geen is ongeveer 3200bp groot (Afdeling 2.4.1) en die genomiese invoegsels in die biblioteek is tussen 8kb en 22kb. Omdat die 500bp-peiler wel sy eie teikengebied tussen al die plake wat afgetas is suksesvol uitgeken het, beteken dat as die vollengte IL-3 geen in 'n kloon voorgekom het, die peiler dit ook suksesvol sou opgetel het. Dit is egter interessant om daarop te let dat die gemiddelde genomiese invoegsel in die betrokke biblioteek volgens die vervaardigers 16kb is. Met die uitsnyding van die genomiese invoegsels uit EMBL-3 met *Sal* I, is bevind dat die genomiese invoegsels in al ses die klone ongeveer 9kb is. Dit is nie net kleiner as die gemiddeld van 16kb nie maar is ook kleiner as

die gedeelte van EMBL-3, naamlik 13.7kb, wat verwyder word vir die konstruksie van die genomiese-biblioteek. Of die verskynsel noodwendig iets te doen het met die gedeeltelike IL-3 gene van die geïsoleerde klone, kan nie met sekerheid gesê word nie. Dit kan egter moontlik wees dat die kleiner genomiese invoegsel kan dui op genetiese herrangskikkings in die faag-DNA wat gevolglik die IL-3 geen telkens op dieselfde wyse gehalveer het. Laasgenoemde stelling is egter suiwer spekulasie.

Die logiese stap hierna sal wees om weer terug te gaan na die biblioteke en dan met onder andere die sintetiese IL-3 geen as peiler te poog om die vollengte IL-3 geen op te spoor. Tyd was egter 'n beperkende faktor en uit 'n opleidingsoogpunt beskou, is voldoende ondervinding reeds opgedoen wat biblioteekafasting aanbetref. Die sintetiese IL-3 geen is gevolglik in 'n eukariotiese- en prokariotiese uitdrukkingsektor gekloneer en uitgedruk met die oog op die realisering van die eerste doelwit van hierdie studie. Beide uitdrukkingssysteme is gebruik om ook die tweede doelwit van hierdie studie verder uit te bou.

8.6 KLONERING EN UITDRUKKING VAN DIE MENS IL-3 GEEN IN 'N EUKARIOTIESE UITDRUKKINGSSISTEEM

In Hoofstuk 6 is die klonering van die sintetiese IL-3 cDNA in 'n eukariotiese uitdrukkingssisteem beskryf. pMAMneo is as die uitdrukkingsektor gebruik (Afdeling 6.2.2) terwyl CHO-K1-selle as die soogdiersellyn vir die produksie van biologies-aktiewe proteïen ingespan is (Afdeling 6.2.1). Die uitdrukkingsektor, pSJIL-3(E), is gekonstrueer (Afdeling 6.2.4) nadat nuttige restriksiepunte vir klonering geskep is deur die konstruksie van die tussensektor pSJ100 (Afdeling 6.2.3). Die CHO-K1-selle is gevolglik met pSJIL-3(P) getransfekteer (Afdeling 6.3.2) en aan seleksie onderwerp (Afdeling 6.3.3). Die selle van die negatiewe kontrole het afgesterf (Figuur 6.7) terwyl pSJIL-3(E) getransfekteerde selle foki gevorm het (Figuur 6.8). Die foki is geïsoleer (Afdeling 6.3.4) en na indusering van die MMTV-LTR promotor (Afdeling 6.3.5) is die selinhoud van die klone onderwerp aan 'n biologiese-aktiwiteitstoets (Afdeling 6.4.2.3).

Die toets is deur Prof. Mendelow aan die Departement Hematologie van die Universiteit van

die Witwatersrand uitgevoer. Slegs een van tien klone het IL-3 spesifieke biologiese-aktiwiteit vertoon (Tabel 6.2). Kloon 5.6 het biologiese-aktiwiteit vertoon. Die aktiwiteit is 6% van die maksimum biologiese-aktiwiteit wat deur 'n IL-3 proteïen in die betrokke sisteem geïnduseer kan word. Die rede vir die lae biologiese-aktiwiteit is moontlik dat die oopbreekproses van die selle nie effektief genoeg is of dat die vrystelling van sellulêre proteolitiese ensieme onder andere van die IL-3 proteïen gedegradeer het. Daar kom egter genoeg proteïene in die selmedium in die vorm van fetale kalfserum voor om die effek van die protease ensieme te velaag. Die vries-en-ontvries siklusse kan dalk ook van die proteïene se aktiewe struktuur beskadig het. 'n Ander moontlikheid kan 'n lae voorkoms van die IL-3 geen in die CHO-K1-genoom wees.

Laasgenoemde afleiding is bevestig deurdat slegs in die geval van die kloon wat biologiese-aktiwiteit vertoon het, aangetoon is om waarskynlik 1 kopie van die IL-3 cDNA per diploïede genoom te bevat (Afdeling 6.4.3). Die res van die klone het baie lae geenkopiegetalle gelewer wat waarskynlik dui op geen IL-3 cDNA-kopie in die selle nie. Die lae voorkoms van IL-3 cDNA-kopie in die CHO-K1-genoom van kloon 5.6 kan die lae biologiese-aktiwiteit van die kloon verklaar.

Die resultate wil egter nie sê dat pSJIL-3(E) nie in die genoom van die selle geïntegreer het nie, want die klonen is op grond van neomisienweerstandbiedende geselekteer. Die IL-3 cDNA is baie klein (0.4kb) in vergelyking met die 1.7kb neomisiengen en kan moontlik tydens integrering of as gevolg van sellulêre herrangskikkings, verlore gegaan het. Die aanvanklike seleksie is gedoen op grond van die uitdrukking van die neomisiengen en nie van die IL-3 geen nie. Indien die transfeksie, seleksie en induksie herhaal word, is die kans groot dat 'n kloon met 'n baie hoë geenkopiegetal en biologiese-aktiwiteit verkry kan word.

Die doelstellings van hierdie studie is egter verweselik deurdat die mens IL-3 geen gekloneer en uitgedruk is en 'n biologiese-aktiewe mens IL-3 proteïen gesintetiseer is. Om die opleidingsdoelwit verder uit te bou, eerder as om bekende prosesse te herhaal, is die IL-3 cDNA ook in 'n prokariotiese uitdrukkingssisteem uitgedruk.

8.7 KLONERING EN UITDRUKKING VAN DIE MENS GEEN VIR IL-3 IN 'N PROKARIOTIESE UITDRUKKINGSSISTEEM

Vir die uitdrukking van die mens IL-3 geen is die prokariotiese uitdruktingsvektor pSE420 gebruik. Die vektor is ontwikkel vir die effektiewe translasie van eukariotiese gene (Afdeling 7.2.2). Met die klonering van die IL-3 cDNA in pSE420 is die vektor pSJIL-3(P) gekonstrueer (Afdeling 7.2.3). Om die eienskappe van die uitdruktingsvektor te komplementeer is ses *E. coli* sellyne geselekteer (Afdeling 7.3). Nadat die sellyne kompetent gemaak is en met pSJIL-3(P) getransformeer is (Afdeling 7.4.2), is die plasmiedbevattende *E. coli* sellyne op groot skaal gekweek (Afdeling 7.4.3). Western-oordraganalises is vervolgens op die selle uitgevoer (Afdeling 7.5).

Die resultate van die Western-oordraganalises het deurgaans baie hoë agtergrond vertoon (Figuur 7.5). Ten spyte van 'n verlenging van die blokkeringstyd, blootstelling van die antiliggaammengsel aan 'n *E. coli*-lissaat en verlenging van die wasstappe, kon die agtergrond van die Westelike-oordrag nie verminder word nie. Hieruit is die afleiding gemaak dat die agtergrond nie deur nie-spesifieke hibridisering van die anti-liggaam veroorsaak word nie maar eerder deur Proteïen-A veroorsaak is wat nie-spesifiek aan die proteïene gebind het. Ten spyte van die hoë agtergrond kan daar wel unieke proteïene waargeneem word. In Figuur 7.5A kan by bane 2 en 4 'n band waargeneem word wat volgens die groottestandaard in baan 9 dieselfde grootte, naamlik 14.6kD, as die mens IL-3 proteïen het. Die twee bane bevat die sellulêre proteïene van TOP 10-selle wat met pSJIL-3(P) getransformeer is. Baan 4 is die sellulêre proteïene 16 uur na induksie en die band vertoon baie dik. Baan 2 is egter die sellulêre proteïene net voor induksie maar lewer 'n proteïen van 14.6kD. Dit kan wees dat die onderdrukking van die *trc*-promotor nie baie effektief was in die geval nie. As gevolg van die feit dat die betrokke proteïenbande nie by die negatiewe kontroles (Bane 1 en 3) voorgekom het nie en dat die proteïenband se intensiteit na-induksie vermeerder het, is die afleiding gemaak dat die verkrygte proteïenbande van 14.6kD die produk is van die aktiwiteit van die geïnduseerde *trc*-promotor van pSJIL-3(P) is en dus die mens IL-3 proteïen is.

In Figuur 7.5B bane 5 tot 8 word 'n meer klassieke voorbeeld van geïnduseerde uitdrukking van 'n geen waargeneem. Daar is by JM101-getransformeerde selle met pSJIL-3(P), 16 uur

na induksie 'n proteïen, wat volgens die grootte standarde in baan 9, dieselfde grootte, naamlik 14.6kD, as die mens IL-3 proteïen het. Die proteïen is nie teenwoordig voor induksie nie (baan 6) en ook nie by die negatiewe kontroles nie (bane 5 en 7). Vervolgens is die afleiding gemaak dat die verkrygte proteïenbande van 14.6kD die produk is van die aktiwiteit van die geïnduseerde *trc*-promotor van pSJIL-3(P) is en dus die mens IL-3 proteïen is.

Uit die genotipiese eienskappe van TOP 10-selle en JM101-selle (Tabel 7.4) kan 'n verklaring gevind word vir die aktiwiteit van die *trc*-promotor voor induksie in TOP 10-selle. JM101-selle beskik ook oor die *Laq^R*-genotipe wat saam met die *Laq^R*-geen in pSJIL-3(P), 'n dubbele onderdrukking van die *trc*-promotor tot gevolg gehad het. TOP 10-selle het nie die *Laq^R*-genotipe nie en gevolglik is die *trc*-promotor onderdruk met slegs die produk van die *Laq^R*-geen in pSJIL-3(P). Die feit dat die produkte van twee gene nodig is om die *trc*-promotor te onderdruk dui op geweldige sterk aktiwiteit van die *trc*-promotor.

Die teenwoordigheid van die *RecA*-genotipe is nie bepalend vir die produksie van die IL-3 proteïen in JM101-selle nie want JM101-selle het nogsteeds die IL-3 proteïen gesintetiseer sonder dat die selle oor die *RecA*-genotipe beskik. TOP 10-selle beskik oor die *RecA*-genotipe.

Geen definitiewe verklarings kan gegee word vir die onvermoë van die ander sellyne waarin die IL-3 proteïen nie gesintetiseer is nie.

Om die afleidings wat bepaal dat die proteïen van 14.6kD wat na induksie by pSJIL-3(P) getransformeerdeselle waargeneem is, wel die mens IL-3 proteïen is te toets, is die sellulêre proteïene van die TOP 10-selle aan HPLC-analises onderwerp (Afdeling 7.6). Die sellulêre inhoud is in 'n sitoplasmiese fraksie (Afdeling 7.6.3) en 'n insluitingsliggaamfraksie (Afdeling 7.6.3) verdeel. Die onderskeie fraksies is verder in drie fraksies elk verdeel deur middel van ammoniumsulfaatpresipitering (Afdeling 7.6.5). HPLC-analises van die fraksies is vervolgens uitgevoer (Afdeling 7.6.6). As negatiewe kontroles is die ooreenstemmende pSE420-fraksies ook geanaliseer. Om te bepaal in watter fraksie daar 'n proteïen voorkom wat nie in die ooreenstemmende negatiewe kontrole fraksie voorkom nie, is die elueringsprofiel van die betrokke negatiewe kontrole telkens van die ooreenstemmende pSJIL-3(P)-fraksie afgetrek met

behulp van rekenaarprogrammatuur. Op hierdie manier is daar 'n proteïen wat by ongeveer 37 minute elueer van die 45% tot 75% ammoniumsulfaatpresipitering van die sitoplasmiese fraksie opgemerk wat nie by die ooreenstemmende negatiewe kontrole voorgekom het nie (Figuur 7.6). Om te bepaal of die proteïen wel die IL-3 proteïen is, is 'n IL-3 proteïenstandaard op identies dieselfde wyse op die HPLC geanaliseer. Die IL-3 proteïenstandaard het ook by ongeveer 37 minute geëluëer (Figuur 7.7). Die twee betrokke elueringsprofiel is op mekaar geplaas om 'n vergelyk te tref (Figuur 7.8). Dit het baie duidelik getoon dat die twee pieke binne 'n paar sekondes van mekaar elueer. Hierdeur is aangetoon dat die unieke piek wat by die 45% - 75% ammoniumsulfaatpresipitering van die sitoplasmiese fraksie waargeneem is, die mens IL-3 proteïen is.

Hierdeur is ook die afleidings bevestig wat gemaak is dat die 14.6kD proteïene wat tydens die Westelike-oordraganalise by TOP 10-selle en JM101-selle waargeneem is, mens IL-3 proteïene is.

Die voorkoms van die IL-3 proteïen in die sitoplasmiese fraksie, eerder as in die insluitingsliggaamfraksie, kan moontlik daarop dui dat ten spyte van die hoë aktiwiteit van die *trc*-promotor, word die IL-3 proteïen nie teen so 'n hoë tempo gesintetiseer dat die proteïene onoplosbare insluitingsliggaame vorm nie. Hierdie afleiding kan verklaar hoekom die IL-3 proteïene tydens die Westelike-oordraganalises nie baie breër bande vertoon het nie. Die matige IL-3 piek wat tydens die HPLC-analise verkry is, ondersteun ook hierdie afleiding. Die voorkoms van die proteïen in die 45% - 75% ammoniumsulfaatfraksie voldoen aan die verwagting deurdat die meeste sellulêre proteïene in die betrokke ammoniumsulfaatfraksie presipiteer (Scopes, 1988).

Hierdeur is die mensgeen vir IL-3 suksesvol in 'n prokariotiese uitdrukkingstelsel uitgedruk

8.8 SLOTSOM

Die doelwitte wat gestel is vir die suksesvolle uitvoering van hierdie studie is bereik. Die mensgeen vir IL-3 is in 'n eukariotiese- en 'n prokariotiese uitdrukkingsektor gekloneer

waarna IL-3 spesifieke biologiese-aktiwiteit by 'n kloon van die eukariotiese uitdrukkingssisteem waargeneem is en mens IL-3 proteïene in prokariotiese uitdrukkingssisteme geproduseer is. Die tweede doelwit om opleiding in Biotegnologie te verseker is ook deeglik nagekom deurdat 'n groot aantal tegnieke gebruik was om die eerste doelwit te bereik. Baie van die benaderingswyses wat gevolg was, is beïnvloed om tegnieke ter wille van opleiding te bevat.

Verdere werk is nodig om die twee uitdrukkingssisteme wat ontwikkel is te optimaliseer vir die grootskaalse produksie van rhIL-3. In die geval van die eukariotiese uitdrukkingssisteem met die geenkopiegetal van die IL-3 cDNA in die CHO-K1-genoom verhoog word om hoër vlakke van uitdrukking te bewerkstellig. Ander gasheerselle, uitdrukkingsektore en isoleringstegnieke kan ook ondersoek word. Die prokariotiese uitdrukkingssisteem kan geoptimaliseer word deur aspekte soos voorinduksietydperk, induseerder konsentrasie, na-induksie kweektyd, verskillende kwekingstemperature, ander uitdrukkingsektore en ander gashere te ondersoek, om maar net 'n paar veranderlikes te noem.

LITERATUURVERWYSINGS

AGGARWAL, B.B., POCSIK, E. (1992) Cytokines: From clone to clinic. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 292:335-359.

AMANN, E., BROSIUS, J. (1985) "ATG vectors" for regulated high-level expression of cloned genes in *Escherichia coli*. **Gene**, 40:183-190.

AMANN, E., BROSIUS, J., PTASHNE, M. (1983) Vectors bearing a hybrid *trp-lac* promoter useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*. **Gene**, 25:167-178.

ARAI, K., LEE, F. MIYAJIMA, A., MIYATAKE, S., ARAI, N., YOKOTA, T. (1990) Cytokines: Coordinators of immune and inflammatory responses. **Annual Review of Biochemistry**, 59:783-836.

ASENJO, J.A., PATRICK, I. (1990) Large-scale protein purification. In **Protein Purification Applications - a practical approach**, E. L. V. Harris & S. Angal, eds. (England: IRL Press), p.4.

AVANZI, G.C., LISTA, P., GIOVINAZZO, B., MINIERO, R., SAGLIO, G., BENETTON, G., CODA, R., CATTORETTI, G., PEGARARO, L. (1988) Selective growth response to IL-3 of a human leukaemic cell line with megakaryoblastic features. **British Journal of Haematology**, 69:359-366.

BALKWILL, F.R., BURKE, F. (1989) The cytokine network. **Immunology Today**, 10:299-304.

BENTON, W.D., DAVIS, R.W. (1977) Screening λ gt recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. **Science**, 196:180-182.

BERENT, S.L., MAHMOUDI, M., TORCZYNSKI, R.M., BRAGG, P.W., BOLLON, A.P. (1985) Comparison of oligonucleotide and long DNA fragments as probes in DNA and RNA dot, southern, northern, colony and plaque hybridizations. **BioTechniques**, 3:208-220.

BREWER, S.J., SASSANFELD, H.M. (1990) Engineering proteins for purification. In **Protein Purification Applications - a practical approach**, E. L. V. Harris & S. Angal, eds. (England: IRL Press), p.94.

BROSIUS, J. (1992) Compilation of superlinker vectors. **Methods in Enzymology**, 216:469-483.

BROSIUS, J., DULL, T.J., SLEETER, D.D., NOLLER, H.F. (1981) Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Biology**, 148:107-127.

BROSIUS, J., ERFLE, M., STORELLA, J. (1985) Spacing of the -10 and -35 regions in the *tac* promoter. **The Journal of Biological Chemistry**, 260:3539-3541.

BROWN, T., BROWN, D.J.S. (1991) Modern machine-aided methods of oligodeoxyribonucleotide synthesis. In: **Oligonucleotides and analogues - a practical approach**, F. Eckstein, ed. (Oxford: IRL-Press), p.9.

CARUTHERS, M.H. (1985) Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses. **Science**, 230:281-285.

CARUTHERS, M.H., (1989) Synthesis of oligonucleotides and oligonucleotide analogues. In **Oligodeoxynucleotides: Antisense inhibitors of gene expression**, J.S. Cohen, ed. (London: The McMillan Press Ltd), pp.7-11.

CARUTHERS, M.H., BARONE, A.D., BEAUCAGE, S.L., DODDS, D.R., FISHER, E.F., McBRIDE, L.J., MATTEUCCI, M., STABINSKY, Z., TANG, J.-Y. (1987) Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides by the phosphoramidite method. **Methods in**

Enzymology, 154:287-293.

CATTY, D., RAYKUNDALIA, C. (1989) ELISA and related enzyme immunoassays. In: **Antibodies, Vol 2: A practical approach**, D. Catty, ed. (England: IRL Press), pp.97-154.

CHEN, C., OKAYAMA, H. (1987) High efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. **Molecular and Cellular Biology**, 7:2745-2752.

CHEN, C., OKAYAMA, H. (1988) Calcium Phosphate-mediated gene transfer: A highly efficient system for stably transforming cells with plasmid DNA. **BioTechniques**, 6:632-638.

CLARK, S.C., KAMEN, R. (1987) The human hematopoietic colony-stimulating factors. **Science**, 230:1229-1237.

CLEMENS, M.J. (1991) Cytokines. In **Medical Perspectives Series**, A.P. Read & T. Brown, eds. (BIOS Scientific Publishers Limited), 121p.

COEN, D.M. (1991) Enzymatic amplification of DNA by PCR: Standard procedures and optimization. In **Current Protocols in Molecular Biology**, F.A. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, & K. Struhl, eds. (Greene Publishing & Wiley-Interscience: New York), pp. 15.1.1.-15.1.7.

COHEN, D.R., HAPPEL, A.J., YOUNG, I.G. (1986) Cloning and expression of the rat interleukin-3 gene. **Nucleic Acids Research**, 14:3641-3658.

CONNER, B.J., REYES, A.A., MORIN, C., ITAKURA, K., TEPLITZ, R.L., WALLACE, R.B. (1983) Detection of sickle cell β^s -globin allele by hybridization with synthetic oligonucleotides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 80:278-282.

COWLING, G.J., DEXTER, T.M. (1992) Erythropoietin and myeloid colony stimulating factors. **Trends in Biotechnology**, 10:349-356.

DENIZOT, F., LANG, R. (1986) Rapid colometric assay for cell growth and survival - Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, 89:271-277.

DROSSERS, L., BURGER, H., BOT, F., DELWEL, R., GEURTS VAN KESSEL, A.H.M., LÖWENBERG, B., WAGEMAKER, G. (1987) Characterization of a human multilineage-colony-stimulating factor cDNA identified by a conserved noncoding sequence in mouse interleukin-3. **Gene**, 55:115-124.

EMERSON, S.G., SIEFF, C.A., WANG, E.A., WONG, G.G., CLARK, S.C., NATHAN, D.G. (1985) Purification of fetal hematopoietic progenitors and demonstration of recombinant multipotential colony-stimulating activity. **Journal of Clinical Investigation**, 76:1286-1290.

ENGELKE, D.R., KRIKOS, A., BRUCK, M.E., GINSBURG, D. (1990) Purification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. **Analytical Biochemistry**, 191:396-400.

FALK, S., SEIPELT, G., GANSER, A., OTTMANN, O.G., HOELZER, D., STUTTE, H.J., HÜBNER, K. (1991) Bone marrow findings after treatment with recombinant human interleukin-3. **American Journal of Clinical Pathology**, 95:355-362.

FOON, K.A. (1989) Biological response modifiers: The new immunotherapy. **Cancer Research**, 49:1621-1639.

FRIEHS, K., REARDON, K.F. (1993) Parameters influencing the productivity of recombinant *E. coli* cultivations. In **Advances in Biochemical Engineering, Biotechnology**, Vol 48, A. Fiechter, ed. (New York: Springer-Verlag), pp. 53-77.

GALLAGHER, S., WINSTON, S.E., FULLER, S.A., HURRELL, J.G.R. (1992) Immunoblotting and Immunodetection. In **Current Protocols in Molecular Biology**, F.A. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, & K. Struhl,

eds. (Greene Publishing & Wiley-Interscience: New York), pp. 10.8.1.-10.8.16.

GANSER, A., LINDEMANN, A., SEIPELT, G., OTTMANN, O.G., EDER, M., FALK, S., HERRMANN, F., KALTWASSER, J.P., MEUSERS, P., KLAUSMANN, M., FRISCH, J., SCHULZ, G., MERTELSMANN, R., HOELZER, D. (1990a) Effects of recombinant human interleukin-3 aplastic anemia. **Blood**, 76:1287-1292.

GANSER, A., SEIPELT, G., LINDEMANN, A., OTTMANN, O.G., FALK, S., EDER, M., HERRMANN, F., BECHER, R., HÖFFKEN, T., BÜCHNER, T., KLAUSMANN, M., FRISCH, J., SCHULZ, G., MERTELSMANN, R., HOELZER, D. (1990b) Effects of recombinant human interleukin-3 in patients with myelodysplastic syndromes. **Blood**, 76:455-462.

GANSER, A., LINDEMANN, A., SEIPELT, G., OTTMANN, O.G., HERRMANN, F., EDER, M., FRISCH, J., SCHULZ, G., MERTELSMANN, R., HOELZER, D. (1990c) Effects of recombinant human interleukin-3 in patients with normal hematopoiesis and in patients with bone marrow failure. **Blood**, 76:666-676.

GOTTESMAN, M.M. (1987) Chinese hamster ovary cells. **Methods in Enzymology**, 151:3-8.

GREEFF, S. (1993) **Klonering en uitdrukking van die mensgene vir granulosiet-makrofaagkolonie-stimuleringsfaktor (GM-CSF) en granulosietkolonie-stimuleringsfaktor (G-CSF)**. Verhandeling vir M.Sc.-graad, PU vir CHO.

GREEN, A.A., HUGS, W.L. (1955) Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. **Methods in Enzymology**, 1:67-90.

GRUISSEM, W., GREENBERG, B.M., ZURAWSKI, G., HALLICK, R.B. (1986) Chloroplast gene expression and promoter identification in chloroplast extracts. **Methods in Enzymology**, 118:253-245.

HAM, R.G. (1963) An improved nutrient solution for diploid Chinese Hamster and human cell lines. *Experimental Cell Research*, 29:515-598.

HERRMANN, F., VELLENGA, E. (1990) The role of colony-stimulating factors in acute leukemia. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 116:272-282.

HOELZER, D., SEIPELT, G., GANSER, A. (1991) Interleukin-3 alone and in combination with GM-CSF in the treatment of patients with neoplastic disease. *Seminars in Hematology*, 28:17-24.

INNIS, M.A., GELFAND, D.H. (1990) Optimization of PCRs. In *PCR Protocols: A guide to methods and applications*, M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White, eds. (San Diego: Academic press, Inc), pp.3-12.

ITAKURA, K., ROSSI, J.J., WALLACE, R.B. (1984) Synthesis and use of synthetic oligonucleotides. *Annual Review of Biochemistry*, 53:323-356.

KANNOURAKIS, G., JOHNSON, G.R. (1990) Proliferative properties of unfractionated, purified, and single cell human progenitor populations stimulated by recombinant human interleukin-3. *Blood*, 75:370-377.

KAO, F-T., CHASIN, L., PUCK, T.T. (1969) Genetics of somatic mammalian cells, X. Complementation analysis of glycine-requiring mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 64:1284-1291.

KAUFMAN, R.J. (1987) High level production of proteins in mammalian cells. In *Genetic engineering: Principles and methods*, Vol. 9, J.K. Setlow, ed. (Plenum Publishing, New York), pp.155-170.

KINGSTON, R.E. (1987) Stable transfer of genes into mammalian cells. In *Current Protocols in Molecular Biology*, F.A. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, & K. Struhl, eds. (Greene Publishing & Wiley-Interscience: New

York), pp. 9.5.1-9.5.6.

KITAMURA, T., TANGE, T., TERASAWA, T., CHIBA, S., KUWAKI, T., MIYAGAWA, K., PIAO, Y-F., MIYAZONO, K., URABE, A., TAKAKU, F. (1989) Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or Erythropoietin. **Journal of Cellular Physiology**, 140:323-334.

KOBAYASHI, M., YUMIBA, C., KAWAGUCHI, Y., TANAKA, Y., UEDA, K., KOMAZAWA, Y., OKADA, K. (1990) Abnormal responses of myeloid progenitor cells to recombinant human colony-stimulating factors in congenital neutropenia. **Blood**, 75:2143-2149.

KWOK, S., KELLOGG, D.E., MCKINNEY, N., SPASIC, D., GODA, L., LEVENSON, C., SNINSKY, J.J. (1990) Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: Human immunodeficiency virus type 1 model studies. **Nucleic Acids Research**, 18:999-1005.

LE BEAU, M.M., EPSTEIN, N.D., O'BRIEN, S.J., NIENHUIS, A.W., YANG, Y-C., CLARK, S.C., ROWLEY, J.D. (1987) The interleukin-3 gene is located on human chromosome 5 and is deleted in myeloid leukemias with a deletion of 5q. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 84:5913-5917.

LEE, F., MULLIGAN, R., BERG, P., RINGOLD, G. (1981) Glucocorticoids regulate expression of dihydrofolate reductase cDNA in mouse mammary tumour virus chimaeric plasmids. **Nature**, 294:228-232.

LI, S.C., SQUIRES, C.L., SQUIRES, C. (1984) Antitermination of *E.coli* rRNA transcription is caused by a control region segment containing lambda *nut*-like sequences. **Cell**, 38:851-860.

LIN, F-K., SUGGS, S., LIN, C-H., BROWNE, J.K., SMALLING, R., EGRIE, J.C., CHEN, K.K., FOX, G.M., MARTIN, F., STABINSKY, Z., BADRAWI, S.M., LAI, P-H.,

GOLDWASSER, E. (1985) Cloning and expression of the human erythropoietin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 82:7580-7584.

LOWE, T., SHAREFKIN, J., YANG, S.Q., DIEFFENBACH, C.W. (1990) A computer program for selection of oligonucleotide primers for polymerase chain reactions. **Nucleic Acids Research**, 18:1757-1761.

MARSTON, F.A.O., HARTLEY, D. (1990) Solubilization of protein aggregates. **Methods in Enzymology**, 182:264-276.

MATSUDAIRA, P. (1990) Limited N-terminal sequence analysis. **Methods in Enzymology**, 182:607-209.

MELTON, D.A., KRIEG, P.A., REBAGLIATI, M.R., MANIATIS, T., ZINN, K., GREEN, M.R. (1984) Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. **Nucleic Acids Research**, 12:7035-7037.

MILLAR, B.C., BELL, J.B.G., MONTES, A., MILLAR, J.L., MAITLAND, J.A., TRELEAVEN, J., VINER, C., GORE, M., McELWAIN, T.J. (1990) Colony stimulating activity in the serum of patients with multiple myeloma is enhanced by interleukin-3: a possible role for interleukin-3 after high dose melphalan and autologous bone marrow transplantation for multiple myeloma. **British Journal of Haematology**, 75:366-372.

MOORE, M.A.S. (1991) The future of cytokine combination therapy. **Cancer**, 67:2718-2726.

MORSTYN, G., LIESCHKE, G.J., SHERIDAN, W., LAYTON, J., CEBON, J. (1989) Pharmacology of the colony-stimulating factors. **Trends in Pharmaceutical Sciences**, 10:154-159.

MOSMAN, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application

to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65:55-63.

MULLIS, K.B., FALOONA, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, 155:335-350.

OLINS, P.O., DEVINE, C.S., RANGWALA, S.H., KAVKA, K.S. (1988) The T7 phage gene 10 leader RNA, a ribosome-binding site that dramatically enhances the expression of foreign genes in *Escherichia coli*. **Gene**, 73:227-235.

OSTER, W., FRISCH, J., NICOLAY, U., SCHULZ, G. (1991) Interleukin-3: Biological effects and clinical impact. **Cancer**, 67:2712-2717.

OTSUKA, T., MIYAJIMA, A., BROWN, N., OTSU, K., ABRAMS, J., SAELAND, S., CAUX, C., MALEFIJT, R.D., DE VRIES, J., MEYERSON, P., YOKOTA, K., GEMMEL, L., RENNICK, D., LEE, F., ARAI, N., ARAI, K-I., YOKOTA, T. (1988) Isolation and characterization of an expressible cDNA encoding human IL-3: Induction of IL-3 mRNA in human T cell clones. **The Journal of Immunology**, 140:2288-2295.

PAREKH, R.B., DWEK, R.A., EDGE, C.J., RADEMACHER, T.W. (1989) N-glycosylation and the production of recombinant glycoproteins. **Trends in Biotechnology**, 7:117-121.

PERLMAN, D., HALVORSON, H.O. (1983) A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides. **Journal of Molecular Biology**, 167:391-409.

PHILLIPS, J.A., LOPEZ, A.F., MILTON, S.E., VADA, M.A., SHANNON, M.F. (1989) Synthesis and expression of the gene encoding human interleukin-3. **Gene**, 84:501-507.

PUCK, T.T., CIECUIRA, S.J., ROBINSON, A. (1958) Chinese Hamster Ovary cells. **Journal of Experimental Medicine**, 65:353-358.

SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B., ERLICH, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487-491.

SAMBROOK J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. (1989) **Molecular cloning- A laboratory Manual**. Second Edition. New York: Gold Spring Harbour laboratory press.

SCAHILL, S.J., DEVOS, R., VAN DER HEYDEN, J., FIERS, W. (1983) Expression and characterization of the product of a human immune interferon cDNA gene in Chinese hamster ovary cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80:4654-4658.

SCHAAPER, R.M., DANFORTH, B.N., GLICKMAN, B.W. (1985) Rapid repeated cloning of mutant *lac* repressor genes. *Gene*, 39:181-189.

SCHARF, S.J., HORN, G.T., ERLICH, H.A. (1986) Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science*, 233:1076-1078.

SCHONER, B.E., BELAGAJE, R.M., SCHONER, R.G. (1986) Translation of a synthetic two-cistron mRNA in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83:8506-8510.

SCHUITEMAKER, H., KOOTSTRA, N.A., VAN OERS, M.H.J., VAN LAMBALGEN, R., TERSMETTE, M., MIEDEMA, F. (1990) Induction of monocyte proliferation and HIV expression by IL-3 does not interfere with anti-viral activity of zidovudine. *Blood*, 76:1490-1493.

SCOPES, R.K. (1988) Separation by precipitation. In: **Protein Purification - Principles and Practice**, 2nd ed, R.K. Scopes. (New York: Springer-Verlag), pp.41-54.

SHAW, G., KAMEN, R. (1986) A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell*, 46:659-667.

SIEFF, C.A. (1987) Hematopoietic growth factors. **Journal of Clinical Investigation**, 79:1549-1557.

SIEFF, C.A. (1990) Biology and clinical aspects of the hematopoietic growth factors. **Annual Review of Medicine**, 41:483-496.

SIEFF, C.A., EMMERSON, S.G., DONAHUE, R.E., NATHAN, D.G., WANG, E.A., WONG, G.G., CLARK, S.C. (1985) Human recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: A multilineage hematopoietin. **Science**, 230:1171-1173.

SUGGS, S.V., WALLACE, R.B., HIROSE, T., KAWASHIMA, E.H., ITAKURA, K. (1981) Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: Isolation of cloned cDNA sequences for human β_2 -microglobulin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 78:6613-6617.

STEWART, W.P., THATCHER, N., KAYE, S.B. (1990) Clinical applications of myeloid colony stimulating factors. **Cancer Treatment Reviews**, 17:77-87.

TADA, H., SHIHO, O., KUROSHIMA, K., KOYAMA, M., TSUKAMOTO, K. (1986) An improved colorimetric assay for interleukin 2. **Journal of Immunological Methods**, 93:157-165.

TONOUCHI, N., MIWA, K., KARASUYAMA, H., MATSUI, H. (1989) Deletion of 3' untranslated region of human BSF-2 mRNA causes stabilization of the mRNA and high-level expression in mouse NIH 3T3 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 163:1056-1062.

VAN DER WESTHUIZEN, F.H. (1993) **Klonering en uitdrukking van die mensgeen vir interleukin-5 (IL-5)**. Verhandeling vir M.Sc.-graad, PU vir CHO.

VERGEER, W.P. (1988) **Transfeksie van soogdiersellyne vir die bestudering van transkripsionele reguleringsvolgordes in die mensgeen vir Pro- α 1(I)-kollageen**.

Verhandeling vir M.Sc.-graad, PU vir CHO.

YANG, Y-C., CIARLETTA, A.B., TEMPLE, P.A., CHUNG, M.P., KOVACIC, S., WITEK-GIANNOTTI, J.A., LEARY, A.C., KRIS, R., DONAHUE, R.E., WONG, G.G., CLARK, S.C. (1986) Human IL-3 (multi-CSF): Identification by expression cloning of a novel hematopoietic growth factor related to murine IL-3. *Cell*, 47:3-10.

YANG, Y-C., CLARK, S.C. (1989) Interleukin-3: Molecular biology and biologic activities. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 3:441-452.

YEE, G.C. (1989) Colony-stimulating factors and tomorrow's pharmacy: Why we must be ready. *American Journal of Hospital Pharmacy*, 46:S24-S29.

ZSEBO, K.M., WILLIAMS, D.A., GEISLER, E.N., BROUDY, V.C., MARTIN, F.H., ATKINS, H.L., HSU, R-Y., VIRKETT, N.C., OKINO, K.H., MURDOCK, D.C., JACOBSEN, F.W., LANGLEY, K.E., SMITH, K.A., TAKEISHI, T., CATTANACH, B.M., GALLI, S.J., SUGGS, S.V. (1990) Stem cell factor is encoded at the *Sl* locus of the mouse and is the ligand for the *c-kit* tyrosine kinase receptor. *Cell*, 63:213-224.

ZUWAWSKI, G. (1991) Analysing lymphokine-receptor interactions of IL-1 and IL-2 by recombinant DNA-technology. *Trends in Biotechnology*, 9:250-256.

BEDANKINGS

My opregte dank aan die volgende persone en instansies:

- * Dr. Piet Pretorius vir al u hulp, leiding en vriendelike bystand oor die afgelope aantal jare.
- * Salome vir al haar liefde, geduld en groot hulp met hierdie studie.
- * My ouers, susters en familie vir hulle liefde, ondersteuning en finansiële steun gedurende die afgelope aantal jare.
- * My oupa en ouma vir hulle volgehoue belangstelling, aanmoediging en bydrae tot die finale druk van die verhandeling.
- * Al die studente van Biotegnologie vir hulle belangstelling en vriendskap. In die besonder wil ek vir Francois van der Westhuizen en Sarita Greeff bedank vir hulle belangstelling en hulp met hierdie studie.
- * Al my kollegas in die Departement Biochemie vir hulle hulp en belangstelling.
- * Oom Wouter Jooste vir sy hulp met die neem van die foto's
- * J. Patel en Prof. B. Mendelow vir raad en die uitvoering van die biologiese toetse.
- * Al my vriende vir hulle aanmoediging.
- * Die SNO vir hulle geldelike hulp tydens hierdie studie.

Alle dank aan my hemelse Vader wat my die vermoë gegee het om dit wat hy gemaak het, van naderby kon bestudeer het.