

GETEIKENDE INHIBISIE VAN HEPATITIS-B-VIRUS GEENUITDRUKKING

JAN HENDRIK GROENEWALD
B.Sc., B.Sc. Honns. (Biochemie)

Verhandeling voorgelê as gedeeltelike nakoming van die vereistes vir die graad
Magister Scientiae in Biochemie met spesialisering in Bioteegnologie in die
Fakulteit Natuurwetenskappe van die Potchefstroomse Universiteit vir Christelike
Hoër Onderwys.

Studieleier: Prof. P.J. Pretorius

Potchefstroom
November 1995

The only way to discover the limits of the possible is to go beyond them into the impossible.....

Aan my ouers, Piet en Ems Groenewald

INHOUDSOPGAWE

ABSTRACT	1
OPSOMMING	3
HOOFSTUK 1	
INLEIDING	5
HOOFSTUK 2	
LITERATUUROORSIG	8
2.1. INLEIDING	8
2.2. ANTISENS-VOLGORDES AS REGULEERDERS VAN GEENUITDRUKKING	9
2.2.1. ANTISENS-RNA AS REGULEERDER VAN GEENUITDRUKKING	11
2.2.2. ANTISENS-OLIGONUKLEOTIEDE AS REGULEERDERS VAN GEENUITDRUKKING	13
2.2.3. HIBRIDISERING, MOONTLIKE TEIKENVOLGORDES EN DIE MEGANISMES VAN ANTISENS-INMENGING IN SELLULÊRE PROSESSE	14
2.2.3.1. DNA AS TEIKEN	17
2.2.3.2. RNA AS TEIKEN	20
2.2.3.3. PROTEÏENE AS TEIKEN - DIE SENS- BENADERING	23
2.2.4. DIE EIENSKAPPE VAN ANTISENS- OLIGONUKLEOTIEDE, DIE PROBLEME WAT HIERDIE EIENSKAPPE SKEP EN STRATEGIEË OM DIT TE OORBRUG	25
2.2.4.1. FISIES-CHEMIESE EIENSKAPPE	26
2.2.4.2. STEREOCHEMIESE EIENSKAPPE	29
2.2.4.3. SPESIFISITEIT	30
2.2.4.4. STABILITEIT TEN OPSIGTE VAN NUKLEASES	31
2.2.4.5. INDRINGING DEUR MEMBRANE	34
2.2.4.6. ANTISENS-OLIGONUKLEOTIEDE KOVALENT GEKOPPEL AAN FUNKSIONELE GROEPE ..	37
2.2.4.7. SITOTOKSISITEIT	42
2.2.5. DIE KEUSE VAN EFFEKTIEWE TEIKENVOLGORDES	43
2.2.6. TOEPASBAARHEID VAN DIE ANTISENS-TEGNOLOGIE EN TOEKOMSVERWAGTINGE	45
2.3. MENS-HEPATITIS-B-VIRUS	51
2.3.1. DIE STRUKTUUR VAN MENS-HEPATITIS-B-VIRUS	55

2.3.2.	DIE GENETIESE ORGANISASIE VAN MENS-HEPATITIS-B-VIRUS	57
2.3.3.	BIOLOGIESE ASPEKTE VAN HBV-INFEKSIE	59
2.3.3.1.	VASHEGTING AAN DIE TEIKENSEL EN INTERNALISERING	59
2.3.3.2.	VIRALE REPLISERING	61
2.3.3.3.	VIRALE GEENUITDRUKKING	62
2.3.3.4.	VIRALE INTEGRERING	63
2.4.	PROBLEEMSTELLING EN BENADERINGSWYSE	64

HOOFSTUK 3

'n VERGELYKENDE GENETIESE STUDIE VAN HBV EN VERWANTE HEPADNAVIRIDAE	66
3.1. INLEIDING EN DOELSTELLING	66
3.2. DNA-VOLGORDE-ANALISES VAN VERSKEIE <i>HEPADNAVIRIDAE</i>	68
3.3. RESULTATE EN BESPREKING VAN DIE VERGELYKINGS	71
3.3.1. VERGELYKINGS TUSSEN DIE HBV-SUBTIPES	73
3.3.2. VERGELYKINGS TUSSEN MENS-HBV EN VERWANTE <i>HEPADNAVIRIDAE</i>	82
3.4. GEVOLGTREKKING	87

HOOFSTUK 4

SUBKLONERING EN KARAKTERISERING VAN HBV-DNA-VOLGORDES	89
4.1. INLEIDING EN DOELSTELLING	89
4.2. SUBKLONERING EN KARAKTERISERING VAN DIE VOLLEDIGE HBV-GENOOM	91
4.3. KONSTRUKSIE EN KARAKTERISERING VAN 'N ANTISENS-RNA-UITDRUKKINGSVEKTOR	105
4.4. GEVOLGTREKKING	111

HOOFSTUK 5

KARAKTERISERING VAN DRIE HEPATOSELLULÊRE KARSINOOMSELLYNE	113
5.1. INLEIDING EN DOELSTELLING	113
5.2. SELEKSIE VAN DRIE HEPATOSELLULÊRE KARSINOOMSELLYNE	115
5.3. KARAKTERISERING VAN DIE HSK-SELLYNE	118
5.3.1. FASEKONTRAS- EN LIGMIKROSKOPIE	119
5.3.2. SOUTHERN-OORDRAGANALISES	122
5.3.3. RNA-KOLKLADANALISES	125
5.3.4. IMMUNOGOUDKLEURING EN ELEKTRONMIKROSKOPIE	

5.3.5.	KWANTIFISERING VAN HBsAg-UITDRUKKING MET BEHULP VAN ENSIEMGEKOPPELDE IMMUNO- ADSORPSIE ANALISES (ELISA's)	128 130
5.4.	GEVOLGTREKKING	133

HOOFSTUK 6

INHIBISIE VAN HBsAg-UITDRUKKING IN PLC/PRF/5-SELLE MET BEHULP VAN ANTISENS-OLIGONUKLEOTIEDE		135
6.1.	INLEIDING EN DOELSTELLING	135
6.2.	ONTWERP, SINTESE EN VOORBEREIDING VAN DIE ANTISENS- OLIGONUKLEOTIEDE	136
6.3.	INHIBISIE VAN HBsAg-UITDRUKKING MET BEHULP VAN ANTISENS- OLIGONUKLEOTIEDE	140
6.3.1.	EFFEKTIWITEIT VAN SES ANTISENS- OLIGONUKLEOTIEDE WAT TEEN TWEE VERSKILLEND TEIKENVOLGORDES IN DIE S-GEEN GERIG WAS	143
6.3.2.	EFFEK VAN DIE DOSIS EN VERSKILLEND TRANSFEKSIE-TEGNIEKE OP DIE EFFEKTIWITEIT VAN AO-1M	161
6.4.	EFFEKTIWITEIT VAN 'n ANTISENS-RNA- UITDRUKKINGSVEKTOR, GERIG TEEN DIE UITDRUKKING VAN HBsAg, IN GETRANSFEKTEERDE PLC/PRF/5-SELLE.	167
6.5.	GEVOLGTREKKING	171

HOOFSTUK 7

BESPREKING		173
7.1.	INLEIDING	173
7.2.	VERGELYKENDE GENETIESE STUDIE VAN HBV EN VERWANTE <i>HEPADNAVIRIDAE</i>	175
7.3.	SUBKLONERING EN KARAKTERISERING VAN DIE HBV-DNA- VOLGORDES	178
7.4.	KARAKTERISERING VAN DRIE HSK-SELLE	180
7.5.	ANTISENS-INHIBISIE VAN HBsAg-UITDRUKKING IN PLC/PRF/5-SELLE	182
7.6.	SLOTSOM	189

BYLAES	191
------------------	-----

AFKORTINGSLYS	201
-------------------------	-----

LITERATUURVERWYSINGS	204
--------------------------------	-----

BEDANKINGS	219
----------------------	-----

ABSTRACT

TARGETED INHIBITION OF HEPATITIS B VIRUS GENE EXPRESSION.

Inhibition of Rous Sarcoma Virus replication in cell culture with oligonucleotides complementary to strategic regions of the viral genome first suggested the therapeutic potential of antisense technology. Complementary oligonucleotides were subsequently employed to inhibit Human Immunodeficiency Virus, Vesicular Stomatitis Virus, Influenza Virus, Herpes Simplex Virus, and the expression of various oncogenes. Because infection with Hepatitis B Virus (HBV) is endemic throughout much of the world, possibly affecting 200 million people, and is associated with serious clinical consequences such as liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma, we investigated the possibility of inhibiting HBV gene expression by antisense technology. Antisense 9-, 15-, and 21-mer oligonucleotides were targeted against two conserved regions in the HBsAg ORF, one overlapping the initiation codon of the S gene and the other 300 bp downstream. HBsAg expression by PLC/PRF/5 hepatocellular carcinoma cells was determined after transfection with the various antisense oligonucleotides. Pronounced inhibition of HBsAg expression was observed; a single dose of 20 μ M of a 15-mer targeted at the initiation region of the gene resulted in more than 60% inhibition of HBsAg expression over a period of five days. Our results strongly suggested that antisense technology may be employed to inhibit HBV gene expression.

The results and other aspects of this study have been presented at national conferences as follows:

1. P.C.J. Strydom, J.H. Groenewald, A. van Dyk & W.J. de Wet.
"Comparative sequence analysis of Hepatitis B virus genomes."
Poster at the 10th annual congress of the S.A. Biochemical Society, UNP, 1991.
2. J.H. Groenewald, E. van Rensburg, P.C.J. Strydom, A. Van Dyk & W.J. de Wet.
"Comparative sequence analysis of Hepatitis B virus genomes (II)."
Oral presentation at the 7th biennial congress of the S.A. Microbiology Society, UOFS, 1992.
3. P.C.J. Strydom, A. Van Dyk, J.H. Groenewald, O. Koekemoer & W.J. de Wet.
"Comparative sequence analysis of Hepatitis B virus Genomes (III)."
Poster at the 11th annual congress of the S.A. Biochemical Society, Sun City, 1992.
4. J.H. Groenewald & W.J. de Wet.
"Targeted inhibition of Hepatitis B virus gene expression."
Poster at the 11th annual congress of the S.A. Biochemical Society, Sun City, 1992.
5. J.H. Groenewald & W.J. de Wet.
"Targeted inhibition of Hepatitis B Virus gene expression."
Oral presentation at the Annual Symposium of the Natal branch of the S.A. Biochemical Society, University of Durban-Westville, 1993.

OPSOMMING

GETEIKENDE INHIBISIE VAN HEPATITIS-B-VIRUS

GEENUITDRUKKING

Die inhibisie van Rous-sarkoom virusreplisering in selkulture met behulp van oligonukleotiede wat komplementêr aan strategiese gebiede in die virale genoom was, was die eerste voorbeeld van die moontlike terapeutiese potensiaal van antisens-oligonukleotiede. Daarna is antisens-oligonukleotiede ook gebruik om die replisering van mens-Immunitetsgebreksvirus, Vaskulêre-stomatitisvirus, Influensavirus en Herpes-simpleksvirus en ook die uitdrukking van verskeie onkogene te inhibeer. Hepatitis-B-virusinfeksies (HBV-infeksies) is endemies aan die grootste gedeelte van die wêreld en affekteer moontlik soveel as 200 miljoen mense. Verder word HBV-infeksies ook met ernstige kliniese gevolge soos byvoorbeeld lewersirroze en heptosellulêre karsinome geassosieer. Om hierdie rede is besluit om die inhibisie van HBV-geenuitdrukking met behulp van die antisens-tegnologie te evalueer. Antisens-oligonukleotiede met verskillende lengtes, naamlik 9-, 15- en 21-mere onderskeidelik, wat teen twee gekonserveerde gedeeltes in die HBsAg-oopleesraam gerig was, is ontwerp. Die eerste teikengebied het met die S-geen se inisiasiekodon oorvleuel terwyl die tweede ongeveer 300bp stroom-af in die middel van die koderingsvolgorde geleë was. HBsAg-uitdrukking is tot 'n groot mate in PLC/PRF/5-selle geïnhibeer nadat hulle aan die verskillende antisens-oligonukleotiede blootgestel was. Geenuitdrukking is oor 'n tydperk van vyf dae met meer as 60% deur 20 μ M van die 15-meer antisens-oligonukleotied, wat met die inisiasiekodon oorvleuel het, geïnhibeer. Hierdie resultate het voorgestel dat die antisens-tegnologie wel gebruik kan word om HBV-geenuitdrukking te inhibeer.

Die resultate en ander aspekte van hierdie studie is soos volg by nasionale kongresse voorgedra:

1. P.C.J. Strydom, J.H. Groenewald, A. van Dyk & W.J. de Wet.
"Comparative sequence analysis of Hepatitis B virus genomes."
'n Plakkaat by die tiende jaarlikse kongres van die S.A. Biochemiese Vereniging, UNP, 1991.
2. J.H. Groenewald, E. van Rensburg, P.C.J. Strydom, A. Van Dyk & W.J. de Wet.
"Comparative sequence analysis of Hepatitis B virus genomes (II)."
'n Mondelinge voordrag by die sewende tweejaarlikse kongres van die S.A. Mikrobiologie Vereniging, UOVS, 1992.
3. P.C.J. Strydom, A. Van Dyk, J.H. Groenewald, O. Koekemoer & W.J. de Wet.
"Comparative sequence analysis of Hepatitis B virus Genomes (III)."
'n Plakkaat by die elfde jaarlikse kongres van die S.A. Biochemiese Vereniging, Sun City, 1992.
4. J.H. Groenewald & W.J. de Wet.
"Targeted inhibition of Hepatitis B virus gene expression."
'n Plakkaat by die elfde jaarlikse kongres van die S.A. Biochemiese Vereniging, Sun City, 1992.
5. J.H. Groenewald & W.J. de Wet.
"Targeted inhibition of Hepatitis B Virus gene expression."
'n Mondelinge voordrag by die jaarlikse simposium van die Natalse tak van die S.A. Biochemiese Vereniging, Universiteit van Durban-Westville, 1993.

HOOFSTUK 1

INLEIDING

Mens-Hepatitis-B-virus (HBV) is endemies aan die grootste gedeelte van die wêreld met veral 'n hoë insidensiesyfer in ontwikkelende lande. Alhoewel 'n verskeidenheid effektiewe entstowwe kommersieel beskikbaar is, is daar na beraming meer as 300 miljoen kroniese draers van HBV regoor die wêreld. In Suid-Afrika alleen word beraam dat HBV-infeksies vir ongeveer 14 000 sterftes per jaar verantwoordelik is (Schoub, 1992). In mense word HBV-infeksies met 'n wye verskeidenheid kliniese toestande, wat vanaf die gesonde draerstatus tot akute hepatitis, lewersirroze en hepatosellulêre karsinome varieer, geassosieer. Daar bestaan dus 'n behoefte vir die ontwikkeling van genesende, in teenstelling met voorkomende middels, soos entstowwe, om die verspreiding van die virus te stuit.

Tydens konvensionele terapeutiese ingryping in 'n lewende sisteem, word geneesmiddels in die algemeen teen spesifieke proteïene, soos ensieme, reseptore en ionkanale, gerig. In baie gevalle is die werking van hierdie middels egter baie gekompliseerd en word die werking daarvan nie volledig verstaan nie (Uhlmann en Peyman, 1990). Die *in vivo*-regulering van geenuitdrukking is selfs nog meer kompleks en berus op die selektiewe binding van spesifieke proteïene aan spesifieke nukleïensuurvolgordes (Hélène en Lancelot, 1982). Nuwe terapeutiese middels wat dus die kompleksiteit van proteïen-interaksies kan sistap en direk op nukleïensure kan inwerk, behoort baie voordele in te hou. Spesifieke interaksies tussen twee nukleïensuurvolgordes is moontlik deur Watson-Crick-baseparing, waartydens die base in twee komplementêre volgordes deur middel van waterstofbrugbindings assosieer. 'n Deurbraak in die kennis aangaande die regulering van geenuitdrukking is deur Green en sy medewerkers (1986) gemaak toe hulle kort RNA-volgordes, wat

as direkte onderdrukkers van geenuitdrukking kan optree, in bakterieë geïdentifiseer het. Hierdie klein transkripte hibridiseer spesifiek aan boodskapper RNA's (mRNA's) en voorkom translase so op 'n selektiewe wyse. Sulke volgordes wat komplementêr aan mRNA is, die *sens*-volgorde, staan as *antisens*-volgordes bekend. Inhibisie van geenuitdrukking deur middel van die antisens-tegnologie, is in beginsel 'n eenvoudige en kragtige metode wat as basis vir nuwe terapeutiese toepassings kan dien.

Inhibisie van Rous-sarkoom virusreplisering (RSV-replisering) in selkulture met behulp van antisens-oligonukleotiede, was die eerste voorbeeld van die voorgestelde gebruik van antisens-volgordes as terapeutiese middels (Zamecnik en Stephenson, 1978). Hierna is die effektiwiteit van antisens-oligonukleotied inhibisiesisteme ook vir die mens-Immunitetsgebreksvirus (HIV) (Agrawal *et al.*, 1989), Vaskulêre-stomatitisvirus (VSV) (Leonetti *et al.*, 1988), Influensavirus (IV) (Knorre en Vlassov, 1985), Herpes-simpleksvirus (HSV) (Smith *et al.*, 1986) en HBV (Goodarzi *et al.*, 1990) bewys.

Die omvang van die HBV-probleem regdeur die wêreld en spesifiek in Suid-Afrika en die feit dat nog baie min werk aangaande antisens-inhibisie van HBV-geenuitdrukking gedoen is, het aanleiding tot hierdie studie gegee. Die primêre doel was die evaluering van antisens-oligonukleotiede as spesifieke inhibeerders van HBV-geenuitdrukking in selkulture. 'n Omvattende literatuurstudie (Hoofstuk 2) is in die eerste plek gedoen om die voordele, nadele, behoeftes en moontlike resultate van 'n antisens-sisteem vas te stel, waarvolgens verdere beplanning kon geskied. Die literatuurstudie het beide die antisens-tegnologie en HBV gedek. Hierna is uitgebreide analyses op al die HBV-DNA-volgordes in die internasionale databasis (Hoofstuk 3) sowel as 'n gekloneerde HBV-genoom (Hoofstuk 4) uitgevoer om dit ten opsigte van die behoeftes van hierdie projek te karakteriseer. Hierdie behoeftes sluit onder andere die identifisering van teikenvolgordes, peilers en moontlike antisens-RNA-koderingsgebiede in. In Hoofstuk 5 word die keuse van 'n

toetssisteem en die karakterisering daarvan bespreek. Die inhibisie-eksperimente en die resultate wat daaruit verkry is, word in Hoofstuk 6 bespreek. Inhibisie-veranderlikes wat bestudeer is, sluit verskillende teikengebiede, oligonukleotiedlengtes, oligonukleotiedkonsentrasies, toedieningsdosisse, transfeksietegnieke en 'n antisens-RNA-uitdrukkingsvektor in. In die laaste plek word al die resultate wat uit hierdie studie verkry is, geëvalueer en bespreek in Hoofstuk 7.

HOOFSTUK 2

LITERATUUROORSIG

2.1. INLEIDING

Geenuitdrukking en die regulering daarvan in lewende organismes berus hoofsaaklik op komplekse interaksies tussen nukleïensuurvolgordes en proteïene. Met die ontwikkeling van die rekombinante DNA-tegnologie is dit nou vir die eerste keer moontlik om die aktiwiteit van gene spesifiek te manipuleer. Antisens-inhibisie is in beginsel een van die eenvoudigste tegnieke om die uitdrukking van 'n geen spesifiek te inhibeer. Antisens-werking behels hoofsaaklik die spesifieke hibridisering van die teikengeen se boodskapper-RNA (mRNA) met die komplementêre-, antisens-volgorde (Verwys na Afdeling 2.2 en die volgende oorsigartikels, Weintraub, 1990; Crooke, 1991; Cohen, 1991; Crooke, 1992; Stein en Cheng, 1993; Hill, 1993 en Mol *et al.*, 1994). Hierdie interaksie tussen die twee volgordes verhoed dat translase plaasvind deur die spesifieke afskerming van bindingspunte (Green *et al.*, 1986) en dit induseer ook die degradering van die mRNA (Krinke en Wulff, 1987). Die vermoë om gene spesifiek te inaktiveer, hou vanselfsprekend voordele vir onder andere die mediese wetenskappe in. Kanker, virale infeksies en metaboliese afwykings kan byvoorbeeld behandel word deur die patogeniese geen(e) af te skakel.

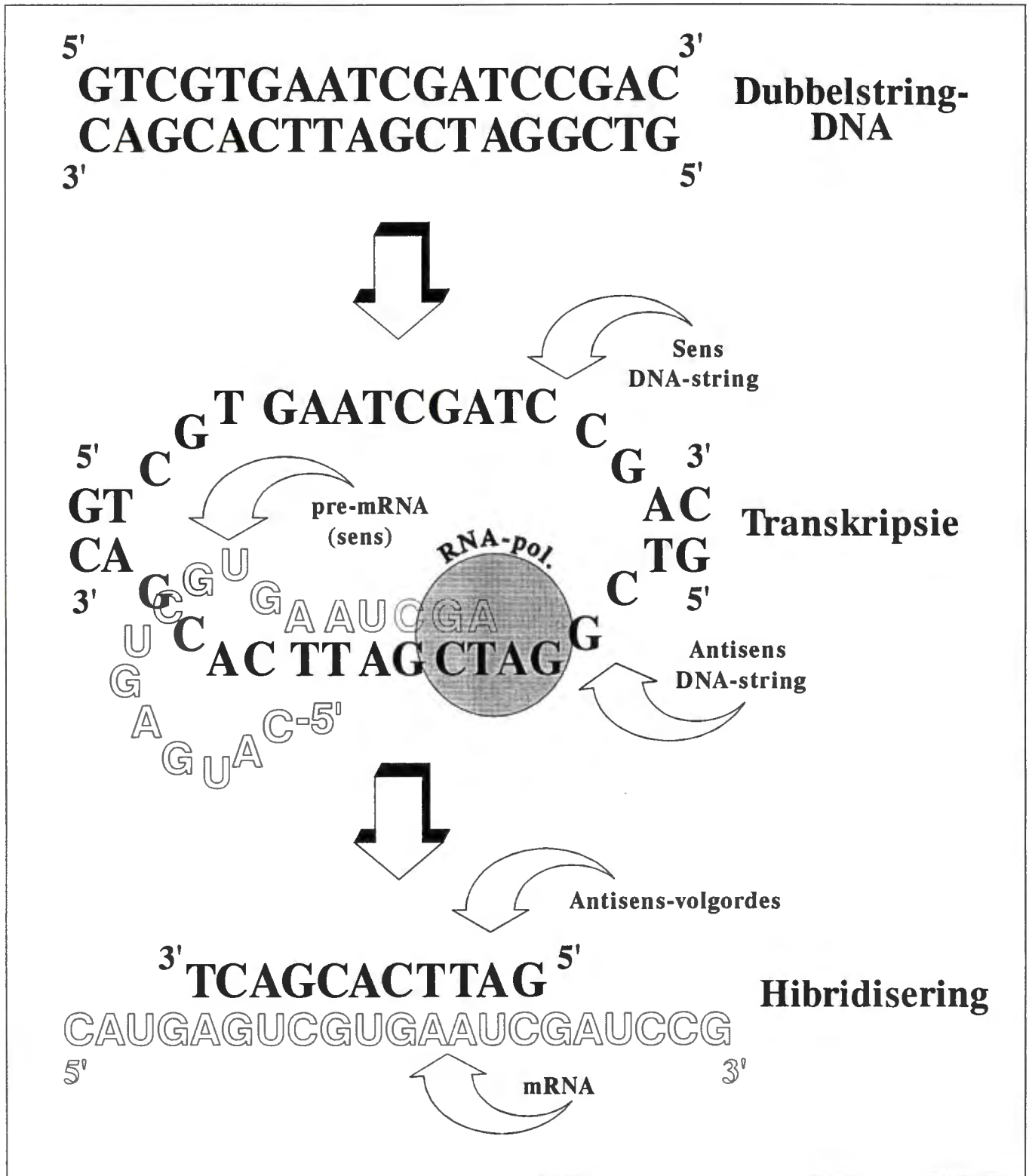
'n Voorbeeld van so 'n patogeniese virus wat die lewens van miljoene mense bedreig, is mens-Hepatitis-B-virus (HBV). Met meer as 300 miljoen draers van die virus regoor die wêreld en die verband tussen HBV-infeksies en hepatosellulêre karsinome, is die omvang van die probleem vanselfsprekend (Dusheiko *et al.*, 1989 en Schoub, 1992). Antisens-inmenging kan die uitdrukking van een van die

essensiële gene in die lewenssiklus van die virus spesifiek inhibeer en sodoende virusreplisering in die gasheer onderdruk. Die weefselspesifisiteit van HBV en die feit dat die molekulêre basis van die virus reeds volledig opgeklaar is, dra verder tot die toepasbaarheid van die antisens-tegnologie in hierdie geval by.

In hierdie hoofstuk word daar 'n oorsig oor die antisens-tegnologie, met spesifieke klem op antisens-oligonukleotiede, gegee. Die omvang van die HBV-probleem en die kenmerke van die virus, wat 'n invloed op die effektiwiteit van 'n antisens-sisteem mag hê, word ook bespreek. Hierdie agtergrond is noodsaaklik om die teoretiese toepasbaarheid van die antisens-tegnologie op 'n HBV-sisteem te bepaal en dan 'n benaderingswyse daaruit te formuleer wat uiteindelik tot die inhibisie van virusreplisering kan lei.

2.2. ANTISENS-VOLGORDES AS REGULEERDERS VAN GEENUITDRUKKING

Fundamentele biologiese prosesse, soos DNA-replisering en transkripsie, pre-mRNA splytting en mRNA-translasie, is almal van die uitkenning van spesifieke nukleotiedvolgordes deur proteïene afhanklik. Regulering van geenuitdrukking berus ook op die selektiewe binding van spesifieke proteïene, naamlik aktiveerders en repressors, aan spesifieke nukleïensuurvolgordes, die sogenaamde promotor- en aktiveringsvolgordes ("enhancers"), (Hélène en Lancelot, 1982 en Schleif, 1988). 'n Meer direkte wyse van geenregulering is in bakterieë geïdentifiseer waar kort stukkies RNA as direkte onderdrukkers van geenuitdrukking kan optree (Green *et al.*, 1986). Hierdie klein transkripte hibridiseer spesifiek aan boodskapper RNA's (mRNA's) deur middel van Watson-Crick-baseparing en voorkom so translasie op 'n selektiewe wyse. In beginsel kan die uitdrukking van enige geen dus eenvoudig onderdruk word deur 'n komplementêre, enkelstring nukleïensuurvolgorde aan die mRNA te laat hibridiseer. Sulke volgordes wat komplementêr is aan mRNA, die *sens*-volgorde, staan as *antisens*-volgordes bekend (Figuur 2.1).



Figuur 2.1. Basepaar-spesifisiteit - die sleutel tot die antisens-tegnologie.
 Komplementêre nukleïensuurvolgordes kan selektief met mekaar deur middel van Watson-Crick-waterstofbrugbindings hibridiseer (Aangepas uit Weintraub, 1990).

Inhibisie van geenuitdrukking, deur middel van die antisens-tegnologie, is in beginsel 'n eenvoudige en kragtige metode vir die analise van rekombinante DNA en ander molekulêre en sellulêre meganismes. Hierdie tegniek kan onder andere gebruik word om die identiteit van 'n gekloneerde DNA-fragment te bevestig, die verband tussen 'n sekere mRNA en sy polipeptiedproduk aan te toon en om genetiese afwykings in selkulture te simuleer. Hierdie manier om geenuitdrukking spesifiek te inhibeer, kan dan ook as basis vir nuwe terapeutiese toepassings dien.

2.2.1. ANTISENS-RNA AS REGULEERDER VAN GEENUITDRUKKING

Aangesien 'n spesifieke antisens-RNA die komplementêre volgorde van die ooreenstemmende mRNA is, kan dit in die eenvoudigste vorm vanaf die nie-koderende (sens) DNA-string getranskribeer word (Figuur 2.1). Transkripsie van beide komplementêre DNA-stringe in dieselfde omgewing, is vir die eerste keer in 1969 deur Bovre en Szybalski in faag lambda waargeneem, maar op daardie stadium kon daar slegs gespekuleer word oor die regulatoriese rol van antisens-RNA. Eers in 1983 is 'n transkrip in *Escherichia coli* (*E.coli*) wat komplementêr was aan die ribosoombindingspunt, insluitende die inisiasiekodon, van 'n mRNA en wat die uitdrukking van hierdie geen selektief onderdruk het, waargeneem (Simons en Kleckner, 1983 en Light en Molin, 1983). Interessant genoeg het Paterson en sy medewerkers alreeds ses jaar vroeër komplementêre enkelstring-DNA teen mRNA's geteiken en so ook translase in 'n selvrye sisteem onderdruk (Paterson *et al.*, 1977).

Vandat antisens-RNA in prokariote geïdentifiseer is, is die rol wat hulle in 'n wye verskeidenheid komplekse prosesse speel, reeds beskryf. Prosesse wat deur antisens-RNA gereguleer word, sluit onder andere plasmiedreplisering, osmoregulering, faagreproduksie en die sintese van die sikliese adenosienmonofosfaat- (cAMP) reseptorproteïen in (Green *et al.*, 1986). Die

meganismes, waardeur natuurlike antisens-RNA-volgordes hul invloed uitoefen, is as een of 'n kombinasie van die volgende bewys:

- Fisiese afskerming van die ribosoombindingspunt en die translasië-inisiasiegebied deur selektiewe binding aan mRNA's (Green *et al.*, 1986).
- Indusering van die degradering van teiken-mRNA's deur RNase III-aktiwiteit; RNase III is spesifiek vir RNA/RNA-hibriede (Krinke en Wulff, 1987).
- Hibridisering aan groeiende pre-mRNA's kan tot vervroegde terminering van transkripsie aanleiding gee (Okamoto en Freundlick, 1986).
- Antisens-RNA kan ook onomkeerbare strukturele veranderinge in die teiken-RNA induseer (Kimelman en Kirschner, 1989).

Bevindings dat antisens-RNA geenuitdrukking in natuurlike sisteme kan inhibeer, het aanleiding tot die ontwikkeling van 'n verskeidenheid strategieë, waardeur geenuitdrukking kunsmatig deur antisens-RNA's gereguleer kan word, gegee. Deur relatief eenvoudige manipulerings, kan spesifieke antisens-RNA's *in vivo* gesintetiseer word, wat dan 'n gekose geen se uitdrukking selektief sal onderdruk. Die potensiële gebruike van antisens-RNA word goed deur die wye verskeidenheid van gene wat reeds suksesvol geteiken is, gedemonstreer (vir oorsigartikels wat breedvoerig hieroor handel, verwys na Green *et al.*, 1986; Inouye, 1988; Baserga en Denhardt, 1992; Hill, 1993 en Bourque, 1995). Voorbeelde hiervan is gene wat vir produkte wat nadelig mag wees vir die gasheer, soos onkogene en virusgene kodeer. Antisens-RNA kan dus nie net in geenterapie as 'n genesende middel gebruik word nie, maar ook as 'n voorkomende middel teen byvoorbeeld virus-infeksies.

In eukariote moet die funksie van transkripte wat in die teenoorgestelde oriëntasie van bekende gene gesintetiseer word, nog vasgestel word (Heywood *et al.*, 1974 en Khochbin en Lawrence, 1989), maar tot op datum is egter nog geen natuurlike antisens-inmenging in eukariote bewys nie (Weintraub, 1990).

2.2.2. ANTISENS-OLIGONUKLEOTIEDE AS REGULEERDERS VAN GEENUITDRUKKING

Statisties sal 'n nukleotiedvolgorde van tussen elf en vyftien nukleotiede, afhangende van die spesifieke volgorde, slegs een maal in die mensgenoom voorkom. 'n Sintetiese antisens-oligonukleotied wat uit ongeveer vyftien of meer nukleotiede bestaan, sal dus selektief slegs aan sy teikenvolgorde hibridiseer en sodoende in staat wees om geenuitdrukking te moduleer. Zamecnik en Stephenson het dit bewys toe hulle in 1978 vir die eerste keer antisens-oligonukleotiede gebruik het as inhibeerders van geenuitdrukking. Hulle het die replisering van RSV selektief met 'n 13-meer antisens-oligonukleotied, geteiken teen die virale-RNA, in selkulture geïnhibeer (Zamecnik en Stephenson, 1978 en Stephenson en Zamecnik, 1978).

Antisens-oligonukleotiede hou dus groot belofte vir die ontwikkeling van nuwe molekulêre en sellulêre tegnieke en ook nuwe terapeutiese middels in. Voordele wat antisens-oligonukleotiede vir sodanige ontwikkeling inhou, is:

- In die algemeen is dit eenvoudiger om modifiserende aksies op nukleïensure te rig, aangesien hulle struktureel minder kompleks as proteïene is.
- Hoe vroeër die prosesse van geenuitdrukking gemoduleer kan word, hoe doeltrefferder sal die modulator op 'n vergelykende molêre basis wees.
- Sintese- en modifiseringsreaksies vir oligonukleotiede is relatief eenvoudige prosesse.

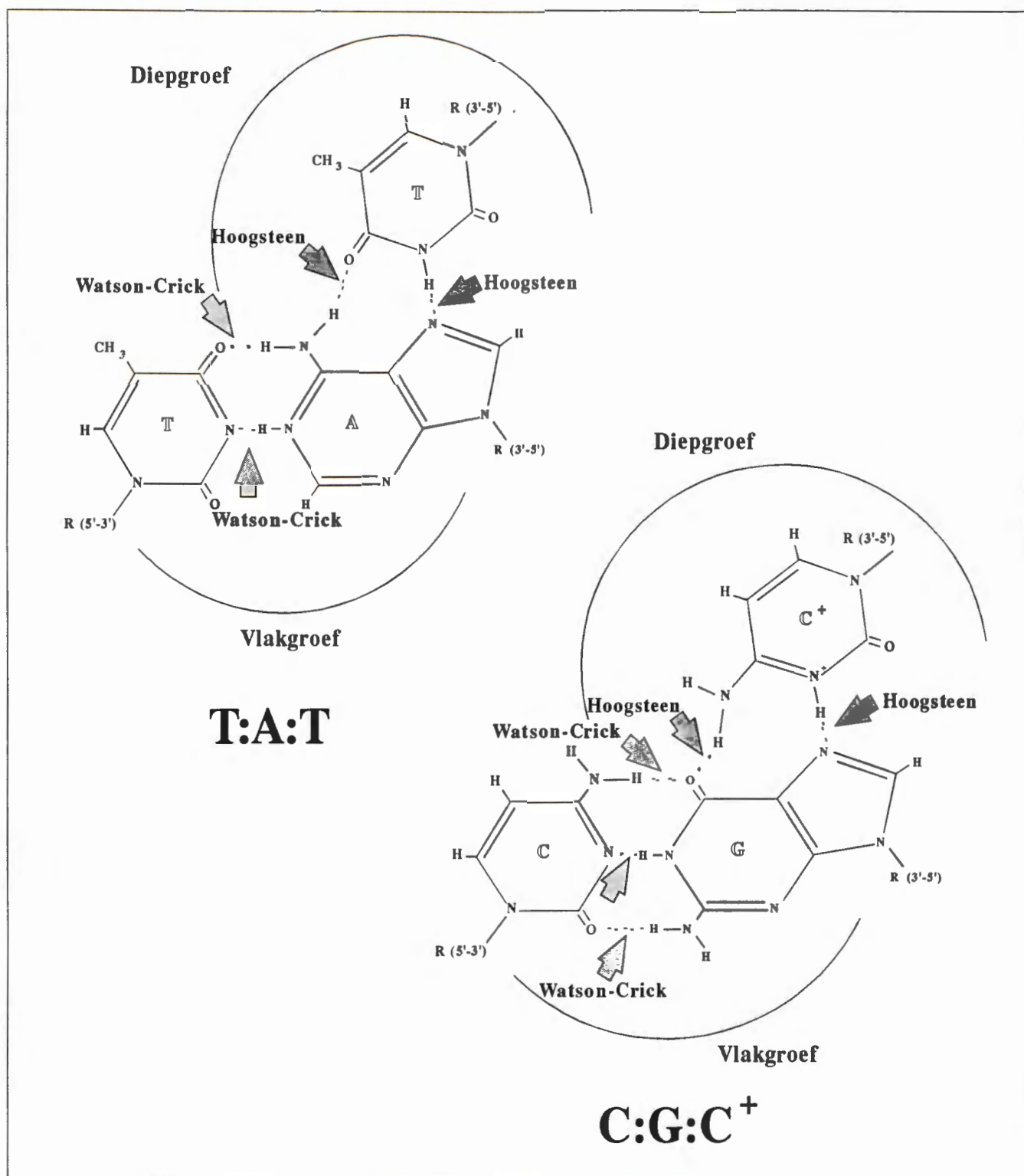
Daar moet egter klem gelê word op die feit dat antisens-oligonukleotiede nie alleenlik geenuitdrukking kan inhibeer nie, maar dit wel ook kan stimuleer. Indirekte stimulering van geenuitdrukking kan byvoorbeeld bewerkstellig word deur die biosintese van natuurlike repressors te onderdruk (Inouye, 1988), of direk deur die terminasie van transkripsie te verhinder (Winkler *et al.*, 1982).

2.2.3. HIBRIDISERING, MOONTLIKE TEIKENVOLGORDES EN DIE MEGANISMES VAN ANTISENS-INMENGING IN SELLULÊRE PROSESSE

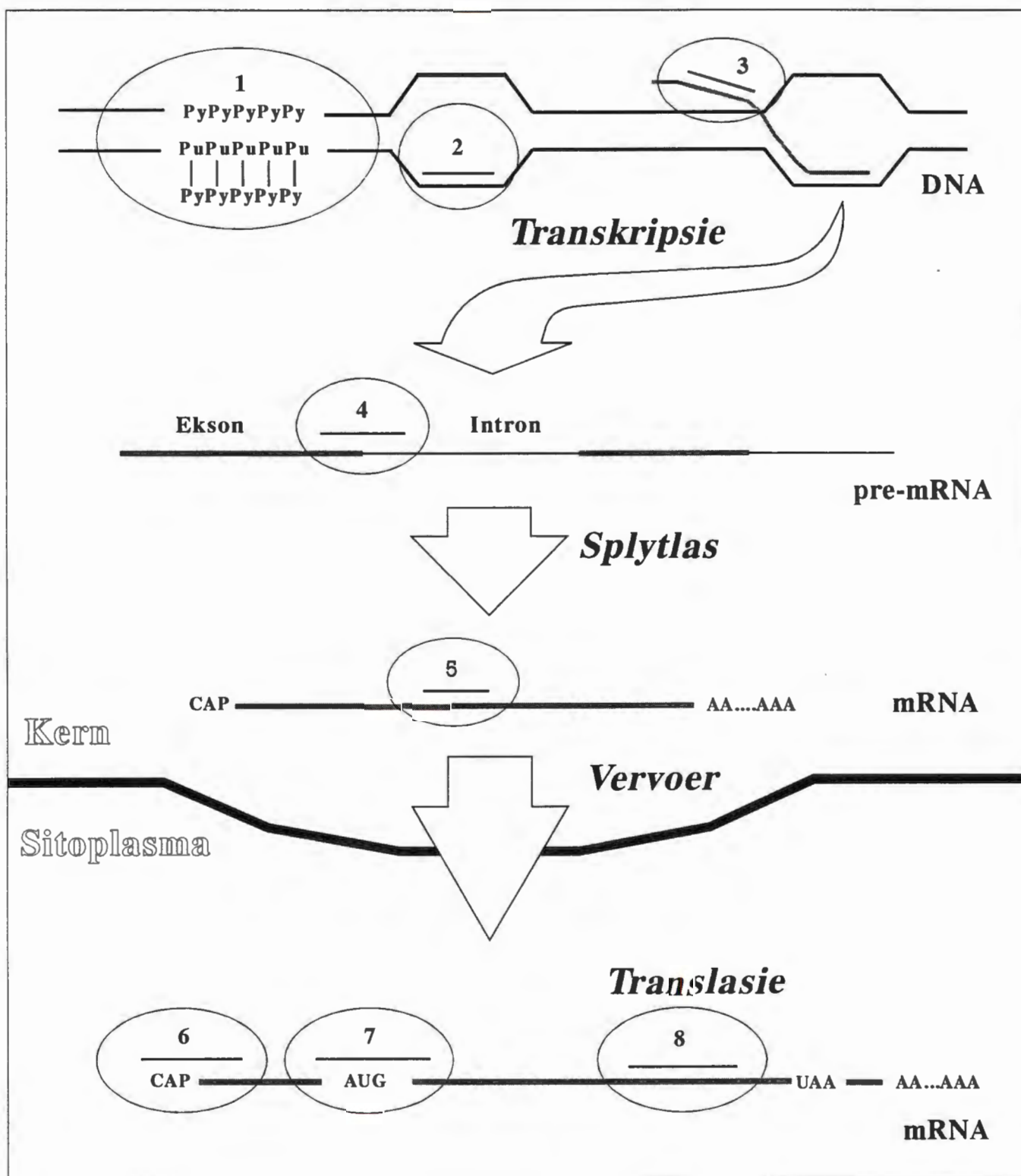
Soos reeds genoem is, berus die inhibisie-effek van antisens-volgordes op hul selektiewe hibridisering aan die teikenvolgordes. Hierdie hibridisering geskied deur middel van Watson-Crick-baseparing in die geval van enkelstring-teikens en deur Hoogsteen-baseparing in die geval van dubbelstring-teikens (Figuur 2.2), (Watson en Crick, 1953 en Felsenfeld *et al.*, 1957). Elke base besit waterstofbinding skenker- en ontvangergroepe, wat dit in staat stel om spesifieke interaksies met verskillende ligande aan te gaan. In die geval van baseparing word twee komplementêre base in 'n spesifieke oriëntasie deur middel van hierdie groepe gebind. So kan elke paar komplementêre base in twee ten volle komplementêre polinukleotiedstringe, deur hierdie waterstofbindings gebind word. Die gevolg hiervan is die hibridisering van die twee polinukleotiedstringe in die anti-parallelle oriëntasie, om 'n dubbelheliks te vorm. Enige nukleïensuurvolgorde waarvan die waterstofbindingsgroepe beskikbaar is, kan dus geteiken word deur antisens-volgordes.

Verskeie sellulêre prosesse kan deur antisens-volgordes geïnhibeer word, afhangende van waar die volgordes hibridiseer (Figuur 2.3). Sellulêre prosesse wat geïnhibeer kan word is die volgende (verwys na die nommers in Figuur 2.3):

- Transkripsie. Hibridisering aan 'n homopurien/pirimidien (Pu/Pi) DNA-dubbelheliks in die regulatoriese gedeeltes van 'n geen, kan die binding van transkripsiefaktore, en gevolglik transkripsie, inhibeer (1). So kan RNA-polimerase ook verhoed word om te bind aan die DNA-templaar in die enkelstring-"borrel" wat tydens transkripsie gevorm word (2). Laastens kan die hibridisering van 'n antisens-volgorde aan 'n groeiende RNA-string, die vervroegde terminasie van transkripsie induseer (3).



Figuur 2.2. Watson-Crick- en Hoogsteen-baseparing. Elke twee komplementêre base in twee ten volle komplementêre polinukleotiedstringe kan waterstofbrugbindings vorm. Sodoende kan die twee stringe hibridiseer om 'n Watson-Crick-dubbelheliks te vorm. Homopirimidien-oligonukleotiede kan in die diepgroef van 'n Watson-Crick homopurien-pirimidien dubbelstring hibridiseer deur Hoogsteen-waterstofbrugbindings om sodoende 'n lokale driedubbele heliks te vorm (Aangepas uit Hélène *et al.*, 1989a).



Figuur 2.3. Teikenvolgorde waar antisens-volgorde specifieke interaksies met nukleïensure, in die genetiese inligtingsweg, kan ondergaan. Die meganismes van die interaksies word volledig in die teks bespreek (Aangepas uit Héliène en Toulhé, 1990).

- Splytlas. Indien 'n antisens-volgorde so geteiken word dat dit oor 'n intron-ekson-oorgangsgebied hibridiseer, kan dit die vorming van 'n funksionele splytlaskompleks voorkom (4). Foutiewe splytlas het dan die vorming van onstabiele RNA-spesies wat vinnig degradeer tot gevolg.
- Vervoer van mRNA. 'n Antisens-volgorde wat in die kern aan die mRNA hibridiseer, kan voorkom dat die mRNA oor die kernmembraan na die sitoplasma vervoer word (5).
- Translasie. Die translasie van mRNA kan deur antisens-volgordes wat die bindingspunte van regulatoriese proteïene blokkeer (6) of ribosoombinding deur die afskerming van die uitkenningsvolgorde steries te verhoed (7), geïnhibeer word. Die DNA/RNA- of RNA/RNA-hibriede vorm ook spesifieke substrate vir RNases, wat die degradering van die mRNA kataliseer (8) (Hélène en Toulmé, 1990).

2.2.3.1. DNA AS TEIKEN

Indien DNA as teiken vir antisens-volgordes gekies word, kan gewone Watson-Crick-baseparing met enkelstring-gedeeltes, asook Hoogsteen-baseparing met dubbelstring-gedeeltes plaasvind. Adenien (A) kan waterstofbindings vorm met twee timiene (T) op onderskeidelik die N(7), NH₂(6) en die NH₂(6), N(1) posisies om 'n triploïed te vorm. Op soortgelyke wyse kan 'n geprotoneerde sitosien (C⁺) met 'n Watson-Crick guanosien-sitosien-basepaar (G:C) bind (Figuur 2.2). So kan 'n homopirimidienoligonukleotied, wat slegs T's en C's bevat, in die diepgroef van 'n homopurien-pirimidien DNA-dubbelstring hibridiseer, om 'n lokale driedubbele heliks te vorm (Felsenfeld *et al.*, 1957 en Le Doan *et al.*, 1987a).

Die vorming van driedubbele helikse, is bevestig deur die volgende eksperimentele metodes;

- afskermingsanalises ("footprinting"), (François *et al.*, 1988),
- gel-vertragingsanalises (Lyamichev *et al.*, 1988),
- kruisbinding met alkileringsreagense (Vlassov *et al.*, 1988),
- kernmagnetiese resonansstudies (KMR) (Rajagopal en Feigon, 1989),
- fotokruisbinding (Praseuth *et al.*, 1988),
- chemiese splyting (Povsic en Dervan, 1989 en François *et al.*, 1989a) en
- fotochemiese splyting (Perroualt *et al.*, 1990).

Hierdie ondersoeke het ook getoon dat homopirimidienoligonukleotiede, wat met die normale β -anomere gesintetiseer is, in die antiparallelle oriëntasie ten opsigte van die homopurienstring hibridiseer. In die geval van α -anomeer-oligonukleotiede hang die oriëntasie van die oligonukleotied se volgorde af (vergelyk Le Doan *et al.*, 1987a met Hélène *et al.*, 1989b).

Binding van 'n homopirimidienoligonukleotied in die diepgroef van dubbelstring-DNA, kan die binding van volgorde-spesifieke proteïene verhoed. Voorbeelde van proteïene wat so verhoed is om te bind, is;

- restriksie-endonukleases (François *et al.*, 1989b, Maher *et al.*, 1989 en Hanvey *et al.*, 1990),
- metilases (Maher *et al.*, 1989) en
- 'n transkripsie-aktiveringsfaktor (Maher *et al.*, 1989).

'n Belangrike feit wat in ag geneem moet word, is dat die vorming van 'n driedubbele heliks, pH-afhanklik is aangesien die oligonukleotied se sitosiene geprotoneer moet wees om twee waterstofbrugbindings met die guanosiene in 'n G:C Watson-Crick-basepaar te vorm. Ioniese toestande speel ook nog 'n belangrike rol, omdat die driedubbele heliks se elektrostatiese potensiaal hoër as dié van 'n dubbelheliks is. Laastens is die dissosiasie van die driedubbele heliks 'n koöperatiewe proses, met die gevolg dat die leeftyd van die kompleks baie afhanklik

van die reaksie-omgewing se temperatuur is. Stabilisering van die drie-dubbele heliks onder fisiologiese toestande kan deur die volgende verkry word:

- Sitosien en timien in die oligonukleotied te vervang met onderskeidelik 5-metielsitosien en/of 5-bromo-urasiel (Povsic en Dervan, 1989 en Sun *et al.*, 1989),
- Die kovalente koppeling van 'n positief-gelaaide interkaleerder aan die oligonukleotied (Sun *et al.*, 1989).
- Die teenwoordigheid van multivalente katione soos byvoorbeeld spermiën in *in vitro*-studies (Praseuth *et al.*, 1988 en Povsic en Dervan, 1989).

Die fyn besonderhede van die kinetika van driedubbele heliksvorming is nog nie beskryf nie, maar daar is al bepaal dat die kompleks 'n baie lang leeftyd kan hê en dat die biomolekulêre assosiasiestap stadiger as wat verwag kan word van 'n diffusie-afhanklike reaksie is. Verder blyk dit ook dat die konformasieverandering wat die dubbelheliks moet ondergaan om by die driedubbele heliks se struktuur aan te pas, die snelheidsbepalende stap is (Hélène en Toulmè, 1990). Hierdie konformasieverandering kan aanleiding gee tot die dissosiasie van proteïene, wat aan die dubbelheliks gebind was en ook die binding van nuwe trans-aktiveringsfaktore verhoed. Aangesien homopurien-pirimidien-volgordes veral in die reguleringsgebiede van gene voorkom, skep dit die ideale teikenvolgorde vir antisens-volgordes, omdat die binding van transkripsiefaktore so voorkom kan word.

Verkieslik moet daar egter meer algemene teikenvolgordes uitgeken kan word. 'n Stap in hierdie rigting is die beskrywing van G:T:A, G:G:C en A:A:T triplete (Letai *et al.*, 1988 en Griffin en Dervan, 1989). Hibridisering van 'n purienryke 27-meer oligonukleotied aan 'n dubbelheliks-fragment van die *myc*-onkogene, wat hoofsaaklik puriene in die een string het, is ook reeds beskryf (Cooney *et al.*, 1988). Hierdie oligonukleotied het parallel ten opsigte van die purienryke string gehibridiseer en het die binding van transkripsiefaktore geïnhibeer.

Indien funksionele groepe kovalent aan oligonukleotiede gekoppel word, hou dubbelstring-DNA veral belofte in as teiken vir antisens-oligonukleotiede. Hierdie funksionele groepe kan snitte in of onomkeerbare kruisbindings met die teikenvolgordes induseer en sodoende die DNA vernietig. Sêlle wat draers van virale of ander karsinogeniese volgordes is, kan dus so selektief vernietig word.

Tydens sekere sellulêre prosesse denatureer die DNA-dubbelheliks in 'n spesifieke omgewing om twee DNA-enkelstringe te vorm. Die DNA-enkelstringe dien as template vir die sintese van komplementêre DNA- en RNA-stringe. Hierdie enkelstring-"borrel" ontstaan tydens replisering, wanneer DNA-polimerase kopieë van beide DNA-stringe moet sintetiseer en ook tydens transkripsie wanneer RNA-polimerase, RNA vanaf die antisens-DNA-string sintetiseer. Die grootte van hierdie enkelstring-"borrel" in eukariote is nie bekend nie, maar is in *E.coli* bepaal as ongeveer 17 base. Afgesien daarvan dat hierdie volgordes nie so toeganklik soos naakte enkelstring nukleïensure sal wees nie, mag dit wel potensiaal as teikens vir antisens-oligonukleotiede hê. 'n Voorbeeld hiervan is die inhibisie van transkripsie-inisiasie vir die *E.coli bla*-geen, deur 'n gederivatiseerde oligonukleotied. Hierdie oligonukleotied was komplementêr aan die enkelstring-DNA- gedeelte in die RNA-polimerase-promotor-kompleks (Hélène *et al.*, 1985).

2.2.3.2. RNA AS TEIKEN

Die gebruik van antisens-nukleïensure as instrumente in die molekulêre genetica, word goed deur studies met oligonukleotiede wat komplementêr was aan die RNA-gedeelte van die klein kernribonukleoproteïendeeltjies (snRNP's) geïllustreer. Die rol van snRNA's in splytlasgebeure is met behulp van antisens-oligonukleotiede opgeklaar, deur:

- die gebiede in die snRNP's wat betrokke is by splytlasgebeure te identifiseer,
- snRNA in gis wat homolog aan RNA in metasoë-spesies is, te identifiseer en
- die stappe in die vorming van die splytlaskompleks te beskryf.

Verminderde *in vitro*-splytlasaktiwiteit van die adeno laat-pre-mRNA in 'n HeLa-selekstrak waarby 'n 7-meer oligonukleotied, komplementêr aan nukleotiede 2 tot 8 van die U1 snRNA, en *E.coli* RNase H gevoeg is, is vir die eerste keer in 1984 aangetoon (Krämer *et al.*, 1984). Hierdie inhibisie van splytlasaktiwiteit is aan die degradering van die snRNA deur RNase H toegeskryf. Op soortgelyke wyse is die rol van verskeie ander U snRNA's vasgestel en is daar ook bepaal dat die byvoeging van eksogene RNase H onnodig is, aangesien RNase H-aktiwiteit in die kernekstrakte voorkom (Krainer en Maniatis, 1985).

Die inhibisie van splytlasaktiwiteit deur oligonukleotiedgerigte degraderingsreaksies vereis dat die meeste, indien nie alle, teiken U snRNA vernietig moet word. In verskeie ondersoeke is die waarneming dat die volwassewording van pre-mRNA nie noemenswaardig beïnvloed word deur die degradering van soveel as 50% van U1 en U2 snRNA's nie, gemaak (Krainer en Maniatis, 1985 en Black *et al.*, 1985). Dit wil egter voorkom asof dit baie afhang van die spesifieke pre-mRNA se eienskappe (Pan *et al.*, 1989). Daar moet ook klem gelê word op die feit dat anti-U snRNP oligonukleotied-inhibisie van geenuitdrukking nie geen- of selfs spesie-spesifiek is nie. In *Xenopus*-oösiere wat byvoorbeeld vooraf met anti-U1 en -U2 oligonukleotiede behandel is, is splytlasaktiwiteit herstel nadat kern-RNA van HeLa-selle (mens selle) vier uur later in die oösiere gespuut is (Pan en Prives, 1988).

Antisens-volgordes wat komplementêr aan intron-eksonoorgangsgebiede is, kan met die splyting van die pre-mRNA en/of die ligering van die eksone inmeng. Die inhibisie-effek van sulke antisens-oligonukleotiede op die ontwikkeling van HIV en RSV is reeds beskryf (Agrawal *et al.*, 1989 en Goodchild *et al.*, 1988a). So ook het 'n metielfosfonaatoligonukleotied wat komplementêr is aan die mRNA-4 splytlaspunt die ontwikkeling van HSV tipe 1 geïnhipeer (Smith *et al.*, 1986). Antisens-RNA's komplementêr aan óf die 5'-splytlaspunt van ekson 1 óf die 3'-splytlaspunt van ekson 2 van die mens β -globien pre-mRNA, het ook splytlasaktiwiteit voorkom. Selfs 'n antisens-RNA wat komplementêr aan 'n 70 base volgorde stroom-af van die 3'-splytlaspunt was, was net so effektief. Hierdie

waarneming word aan die vervorming van die kritiese pre-mRNA struktuur wat gevolglik die korrekte samestelling van die splytlaskompleks verhoed, toegeskryf (Munroe, 1988).

Tot dusver is die meeste antisens-volgordes ontwerp om translase te inhibeer en met die oog hierop is verskeie teikenvolgordes in mRNA's geïdentifiseer. Antisens-volgordes wat reeds in die kern aan mRNA hibridiseer, kan voorkom dat die boodskappers oor die kernmembraan na die sitoplasma, waar die translase daarvan moet plaasvind, vervoer word. In die sitoplasma kan antisens-volgordes teen die 5'- of 3'-nie-transleerbare gedeeltes, die ribosoombindingspunt en inisiasiekodon of die koderende gebied gerig word. Hibridisering van antisens-volgordes aan die 5'-nie-transleerbare gebied kan die binding van inisiasie-faktore steries verhoed, of ook deur die RNA se sekondêre struktuur onherkenbaar te verander. Die sensitiwiteit van die CAP-gebied is byvoorbeeld deur Lawson *et al.* gedemonstreer met 'n 20-meer, komplementêr aan die 5'-nie-transleerbare gedeelte van die konyn- β -globien-mRNA (1986). Hulle kon aantoon dat kruisbinding tussen die inisiasiefaktor eIF-4F en die RNA toegeneem het en dié van eIF-4A en eIF-4B afgeneem het.

Die doeltreffendste teikenvolgordes in mRNA is die gebiede wat met die Shine-Dalgarno-volgorde en die inisiasiekodon geassosieer word. Dit is bewys vir onder andere antisens-RNA's wat gerig is teen onderskeidelik die 5'-nie-transleerbare gedeelte en die Shine-Dalgarno-volgorde van die OmpA mRNA in *E.coli* (Coleman *et al.*, 1984). 'n Aantal verskillende eksperimente op konyn- (Blake *et al.*, 1985a, Cazenave *et al.* 1986 en 1987, Lawson *et al.*, 1986 en Audet *et al.*, 1987) en mens-globien-mRNA's (Liebhaber *et al.*, 1984 en Shakin en Liebhaber, 1986) in selvrye sisteme het getoon dat antisens-oligonukleotiede teen die translase-inisiasiegebied geteiken moet wees om enige noemenswaardige invloed op geenuitdrukking uit te oefen. Oligonukleotiede wat komplementêr was aan die koderende gedeeltes, is van die mRNA gestroop deur 'n ontwindingsaktiwiteit wat met die translaserende ribosome geassosieer word (Liebhaber *et al.*, 1984, Shakin en Liebhaber, 1986 en Gupta, 1987).

Mettertyd is egter waargeneem dat die koderende volgordes in mRNA ook effektief geteiken kan word, in die geval van vars sellisaat preparate en selkulture, ten spyte van die feit dat ribosome wat reeds aan die mRNA gebind het, die antisens-oligonukleotiede kan afstroop (Vergelyk Minshull en Hunt, 1986 met Walder en Walder, 1988). Inhibisie van translase word in hierdie gevalle deur die degradering van die teiken-mRNA, wat deur die ensiem RNase H gekataliseer word, bemiddel. RNase H is spesifiek vir DNA/RNA-hibriede en kom natuurlik in eukariotiese selle voor waar dit die RNA-voorvoeders tydens DNA-replisering degradeer (Walder en Walder, 1988 en Cazenave *et al.*, 1989). Die degradering van RNA in DNA/RNA-hibriede deur RNase H en deur RNase III in RNA/RNA-hibriede, vorm dus 'n integrale deel van die meganismes van die antisens-tegnologie. Hierdie meganisme is onafhanklik van waar of wanneer die antisens-volgordes hibridiseer. Antisens-oligonukleotiede kan dus, in die teenwoordigheid van RNase H, as katalisatore vir die degradering van RNA optree, soos gedemonstreer is deur 'n 17-meer fosfotioaatoligonukleotied wat teen die koderende gedeelte van die konyn- β -globien-mRNA geteiken was. Wanneer hierdie oligonukleotied in *Xenopus*-oösiete in konsentrasies vier maal laer (3nM) as dié van die transkrip ingespuut word, word globien-sintese met 50% geïnhibeer (Cazenave *et al.*, 1989).

2.2.3.3. PROTEÏENE AS TEIKEN - DIE SENS-BENADERING

Oligonukleotiede kan proteïene wat aan nukleïensure bind of ensieme wat by die nukleïensuurmetabolisme betrokke is, adsorbeer en hulle sodoende uit die metabolisme verwyder. So kan geenuitdrukking dus indirek gemoduleer word. Alhoewel nie-spesifieke effekte mag voorkom, kan 'n enkele proteïen selektief geteiken word indien die volgorde van die oligonukleotied versigtig gekies word. In hierdie geval het die oligonukleotied presies dieselfde volgorde as die natuurlike substraat en staan daarom as sens-oligonukleotiede bekend. Die binding van proteïene aan oligonukleotiede is reeds vir dubbelstring- en enkelstringvolgordes beskryf (Harel-Bellan *et al.*, 1989 en Gagnor *et al.*, 1989).

- 'n Sintetiese dubbelstringoligonukleotied wat dieselfde volgorde as 'n cis-reguleringsvolgorde het, kan as 'n kompeteerder vir trans-reguleringsfaktore optree. Die uitdrukking van die hitteskokgene is op hierdie wyse deur 'n 14-basepaar hitteskok-element wat in mens-T-selle geëlektroporeer is, gemoduleer (Harel-Bellan *et al.*, 1989). Indien van die antisens-RNA-strategie gebruik gemaak word, kan kompetisie vir transkripsiefaktore dus vir nie-spesifieke effekte verantwoordelik wees. Wanneer getransfekteerde selle 'n hoë plasmiedkopiegetal het, kan dit 'n groot gedeelte van die gasheersel se regulatoriese proteïene bind. Gevolglik kan die transkripsie-effektiwiteit van die gene wat deur hierdie faktore beheer word, verminder word. 'n Voorbeeld hiervan is die inhibisie van hsp26 én hsp70 deur 'n antisens hsp26 plasmied (McGarry en Lindquist, 1986).

Enkelstringoligonukleotiede kan ook as kompeteerders vir natuurlike substrate, soos byvoorbeeld voorvoerders vir polimerases, gebruik word. Hierdie sens-benadering is onder andere gebruik om die *in vitro*-replisering van die Raap-geel-mosaïekvirus te inhibeer (Morch *et al.*, 1987). Op soortgelyke wyse kan die kompetisie tussen 'n konvensionele voorvoerder en 'n oligonukleotiedanaloo, wat nie deur RNA-afhanklike DNA-polimerase verleng kan word nie, tot verlaagde cDNA-sintese lei. 'n Voorbeeld hiervan is 'n 20-meer α -deoksi-homoloog wat in die parallelle oriëntasie aan sy komplementêre RNA-volgorde hibridiseer en dus nie as 'n voorvoerder deur AMV-omgekeerde transkriptase herken kan word nie (Gagnor *et al.*, 1989).

'n Ander tipe oligonukleotied-gemedieerde effek, is hul onverwagte assosiasie met 'n verskeidenheid proteïene. Alhoewel die nukleotiedvolgorde van die oligonukleotied 'n rol by kompleksvorming met proteïene mag speel, word hierdie verskynsel eerder aan nie-spesifieke interaksies toegeskryf. 'n Verskeidenheid voorbeelde van sulke oligonukleotied-proteïen-interaksies is in die literatuur beskryf. 'n Dekameer wat kovalent aan akridien gekoppel was, het die sintese van proteïene in *E.coli* nie-spesifiek geïnhibeer (Toulmé *et al.*, 1986). Later is gevind dat die oligonukleotied wel translase spesifiek onderdruk het, maar dat dit 'n nie-spesifieke

invloed op transkripsie gehad het. Hierdie nie-spesifieke effek op transkripsie was van die nukleotiedvolgorde en die spesifieke interkaleerder afhanklik. Interaksies tussen oligonukleotiede en omgekeerde transkriptases wat die nie-spesifieke inhibisie van hierdie polimerases tot gevolg gehad het, is ook reeds beskryf (Bloch *et al.*, 1988 en Majumdar *et al.*, 1989). Sulke interaksies kan die inhibisie van HIV-ontwikkeling deur 'n (dC)₂₈-fosfotioaatanaloog, verklaar (Matsukura *et al.*, 1987). In die lig van hierdie waarneming is dit dus belangrik om die spesifisiteit van die effekte, wat deur oligonukleotiede in 'n biologiese sisteem geïnduseer word, deeglik in ag te neem. Die gebruik van verskillende oligonukleotiede (sens, antisens en willekeurig) as kontroles om die spesifisiteit van 'n oligonukleotied te bepaal, kan dus nie bewys dat die oligonukleotied nie met proteïene assosieer nie.

2.2.4. DIE EIENSKAPPE VAN ANTISENS-OLIGONUKLEOTIEDE, DIE PROBLEME WAT HIERDIE EIENSKAPPE SKEP EN STRATEGIEË OM DIT TE OORBRUG

Vir enige gegewe sisteem waarin die antisens-tegnologie suksesvol toegepas wil word, moet daar aan sekere vereistes voldoen word:

- Die kompleks wat gevorm word tussen die antisens- en die teikenvolgordes moet onder fisiologiese toestande stabiel genoeg wees.
- Hierdie interaksie tussen die twee volgordes moet spesifiek wees.
- Om die gekose effek te induseer, moet die antisens-volgordes 'n lang genoeg halfleeftyd *in vivo* hê. Hulle moet dus verkieslik weerstandbiedend teen ensieme wat nukleïensure degradeer wees.
- Antisens-oligonukleotiede moet in staat wees om deur die selmembraan te kan beweeg en eweredig in die sel te versprei (Uhlmann en Peyman, 1990).

2.2.4.1. FISIES-CHEMIESE EIENSKAPPE

Die fisies-chemiese eienskappe van antisens-oligonukleotiede speel 'n baie belangrike rol in die bepaling van hul doeltreffendheid. Die affiniteit van die binding tussen 'n oligonukleotied en sy teikenvolgorde, word deur die smelttemperatuur (T_M) van die dubbelstring wat gevorm word tydens hibridisering, gekarakteriseer. Die T_M -waarde is daardie temperatuur waar 50% van die dubbelstring gedissosieer het om enkelstringe te vorm. Die T_M -waarde word hoofsaaklik bepaal deur die oligonukleotied se base-samestelling en -volgorde sowel as die oplosmiddel se eienskappe. 'n Benaderde T_M -waarde vir ongemodifiseerde oligonukleotiede van tussen 12 en 20 base kan met die reël van Wallace uitgewerk word:

$$T_M = 2^{\circ}\text{C}(\text{A} + \text{T}) + 4^{\circ}\text{C}(\text{C} + \text{G})$$

Hierdie reël geld vir dubbelstring-DNA met perfekte baseparing by hoë soutkonsentrasies (Wallace *et al.*, 1979). Onder fisiologiese toestande, 37°C en lae soutkonsentrasies, is ten minste 12 basepare nodig om 'n redelik stabiele hibried te kan vorm. 'n Meer akkurate voorspelling van die T_M -waarde ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) kan verkry word deur gebruik te maak van die vrye energie parameters en die naaste-buurman model (Freier *et al.*, 1986). Watson-Crick baseparing kan tussen DNA/DNA-, DNA/RNA- en RNA/RNA-volgordes onderhou word, om dubbelstringe te vorm waarvan die stabiliteit (T_M -waardes) soos volg vergelyk; RNA/RNA > RNA/DNA > DNA/DNA (Inouye *et al.*, 1987).

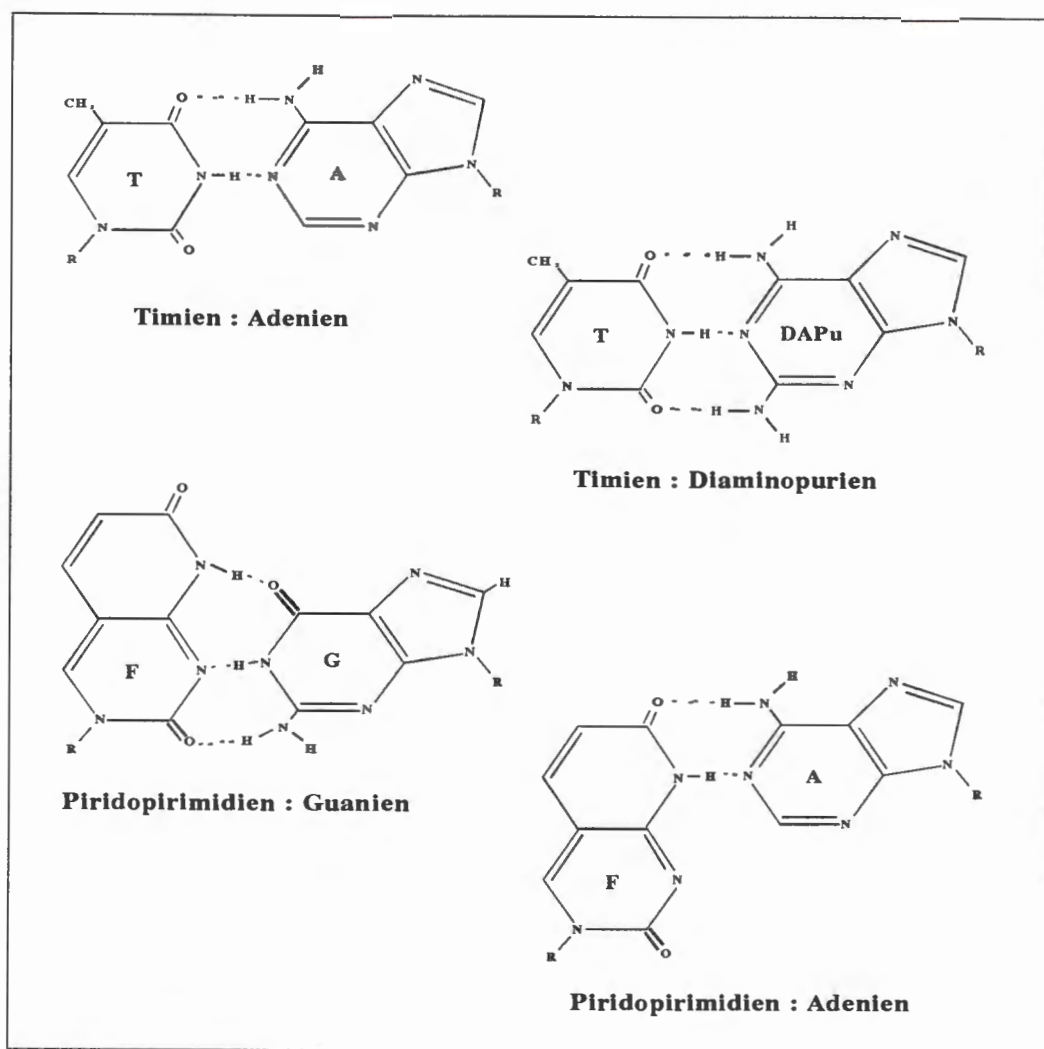
Veranderinge aan die fosfodiëster-rugstring van antisens-oligonukleotiede (verwys na afdeling 2.1.5.4.) kan tot 'n veranderde T_M -waarde aanleiding gee. Eienskappe van die internukleotiedgroep wat 'n invloed op die T_M -waarde mag hê, is: (1) die lading, (2) die steriese vereistes en (3) die absolute stereochemiese rangskikking van die groep. Afstotende kragte as gevolg van gelyksoortige ladings, soos in die geval van natuurlike fosfodiësterbindings, kan deur internukleotiedgroepe wat geen lading dra nie (fosfaatesters, metielfosfonate en defosfoverbindinge) opgehef word,

om sodoende die dupleks te stabiliseer. Alhoewel hierdie stelling eksperimenteel bevestig is (Bower *et al.*, 1987 en Quartin en Wetmur, 1989), is uitsonderinge ook bekend (Sarin *et al.*, 1988). Die T_M -waarde se afhanklikheid van die buffer se ioniese sterkte en die stereochemie van die hibridiseringsreaksie, mag faktore wees wat tot hierdie uitsonderings aanleiding gee.

Die bepalende rol wat die bindingsaffiniteit van antisens-oligonukleotiede op hul effektiwiteit het, blyk duidelik uit die verlaging in hul biologiese aktiwiteit by hoër temperature. Hierdie waarneming word verder deur die feit dat antisens-oligonukleotiede se effektiwiteit toeneem met toenemende kettinglengtes ondersteun (Lee *et al.*, 1988 en Crum *et al.*, 1988). Hierdie korrelasie verval egter wanneer die oligonukleotied langer as ongeveer 30 nukleotiede is. Hierdie verskynsel kan verduidelik word as in ag geneem word dat groot natuurlike DNA-molekules se T_M -waardes in die omgewing van 80 tot 95°C is, afhangende van die G:C inhoud.

Verskeie ander tegnieke waardeur die dupleks se stabiliteit verhoog kan word, is reeds beskryf. Hélène *et al.* het byvoorbeeld die T_M -waarde van 'n (T) - oligonukleotied van 33.5 tot 47.3°C verhoog deur 'n interkaleerder (akridien), kovalent aan die oligonukleotied te koppel (Hélène *et al.*, 1985). 'n Ander moontlikheid is om gemodifiseerde base, wat stabielere Watson-Crick-basepare sal vorm, in die oligonukleotied in te bou. 'n Voorbeeld hiervan is diaminopurien (DAPu) wat drie waterstofbindings met timien vorm (Figuur 2.4), (Chollet en Kawashima, 1988). Op soortgelyke wyse hibridiseer pirido-pirimidien ook sterker as sitosien met guanien en dit kan ook met adenien hibridiseer (Inouye *et al.*, 1984). So is daar ook 'n dramatiese toename in T_M -waardes indien die α -anomeer nukleotiede gebruik word om antisens-oligonukleotied te sintetiseer (Morvan *et al.*, 1986). Die T_M -waarde vir 'n α -d(G₂T₁₂G₂)-RNA dupleks is byvoorbeeld 53°C, terwyl dit vir die ooreenstemmende natuurlike β -anomeer slegs 27°C is. Hierdie waarneming word verklaar aan die hand van die feit dat die α -anomeeroligonukleotied in die parallelle oriëntasie ten opsigte van die RNA-teiken hibridiseer (Morvan *et al.*, 1987). In die

laaste plek kan ook aanvaar word dat kationiese oligonukleotiede 'n groter bindingsaffiniteit vir hul natuurlike, anioniese polinukleotiedteikens sal hê, aangesien die afstotende kragte tussen die soortgelyke ladings sodoende opgehef word. *In vitro* kan die hibridisering van sulke positief gelaaide oligonukleotiede ook deur die soutkonsentrasie en die pH van die reaksie-omgewing gereguleer word (Letsinger *et al.*, 1982 en Letsinger *et al.*, 1988).



Figuur 2.4. Nukleotiedanaloe wat sterker waterstofbrugbindings met hul komplementêre base vorm en beperkte kruisbindingsreaksies toelaat. Indien hierdie analoe in antisens-oligonukleotiede ingebou word, sal die oligonukleotiede stabielier hibriede met hul teikenvolgordes vorm en sodoende die inhibisie-effektiwiteit vergroot (Aangepas uit Uhlmann en Peyman, 1990).

2.2.4.2. STEREOCHEMIESE EIENSKAPPE

Soos hierbo genoem is, gaan veranderinge in die negatief gelaaide fosfodiëstergroep nie noodwendig met 'n toename in die T_M -waarde gepaard nie. Dit kan onder andere aan stereochemiese oorwegings toegeskryf word. 'n Nuwe chelaatsentrum word geskep deur die nuwe groep of atoom wat aan die P-atoom bind (Figuur 2.5). Hierdie plaasvervangergroep of -atoom kan in beginsel óf na die binnekant óf na die buitekant van die DNA-dubbelheliks gerig wees. Bower en sy medewerkers het vir 'n metielfosfonaat-oligonukleotied bewys dat die dupleks stabiel is indien die metielgroep na buite (in die oplosmiddel in) gerig is (1987). Indien meer as een internukleotiedfosfaatgroep verander word, raak die situasie meer kompleks aangesien daar twee diastereomere by elke internukleotiedbinding kan vorm. Verandering van al die internukleotiedgroepe sal dus aanleiding gee tot 2^n diastereomere, wat nie almal ewe sterk aan die teikenvolgorde sal hibridiseer nie. Tidd *et al.* (1988) het affiniteitschromatografie gebruik om 'n metielfosfonaat 9-meer in sterk- en swak-bindende fraksies te verdeel. Hibridiseringseksperimente met die twee fraksies het getoon dat die T_M -waarde in die sterk-bindende fraksie 5°C hoër was en dié van die swak-bindende fraksie 2.6°C laer was as dié van die oorspronklike mengsel. In teenstelling met metielfosfonate, het die chelariteit van die P-atoom in metielfosfaat-triësters geen invloed op die stabiliteit van die kompleks nie. Die rede hiervoor is dat die fosfaat-triësters, eerder as die metielfosfonate, 'n helikskonformasie sal aanneem tydens hibridisering. Die invloed wat die stereochemie van 'n oligonukleotied op die T_M -waarde kan hê, word goed geïllustreer deur hierdie drie verskillende 12-meer oligonukleotiedanaloeë, waarvan die T_M -waardes soos volg verskil; metielfosfaat-triëster = 55°C , metielfosfonaat = 32°C en normale fosfodiëster = 40°C (Uhlmann en Peyman, 1990).

2.2.4.3. SPESIFISITEIT

Een van die mees basiese vereistes vir antisens-oligonukleotiede om doeltreffend te kan wees, is dat hulle absoluut spesifiek met die teikenvolgorde moet kan hibridiseer. As in ag geneem word dat 'n 15-meer volgorde statisties slegs een maal in die mensgenoom sal voorkom en dat minder as 20% van die gene in 'n sel op 'n gegewe tydstip uitgedruk word, is dit duidelik dat antisens-oligonukleotiede van 15 nukleotiede en langer, uiters selektief met geenuitdrukking sal inmeng. Hierdie spesifisiteit en die universaliteit van die tegniek, is uiteraard van die belangrikste eienskappe en voordele van die antisens-oligonukleotiedstrategie. Die spesifisiteit van onveranderde antisens-oligonukleotiede is in 'n hele aantal ondersoeke volledig beskryf. Holt *et al.* (1988) het aangetoon dat 'n 15-meer met tussen 2 en 12 mispassings nie die groei van HL-60 selle beïnvloed het nie, terwyl die regte volgorde selvermeerdering spesifiek geïnhibeer het. Verder is ook aangetoon dat antisens-oligonukleotiede die inhibisie-effek van die ooreenstemmende antisens-oligonukleotied kan ophef. Hierdie waarneming bewys dat antisens-oligonukleotiede nie geenuitdrukking deur 'n algemene "vergiftigingsmeganisme" inhibeer nie (Harel-Bellan *et al.*, 1988). Die sintese van β -globien is ook selektief onderdruk, sonder dat α -globiensintese beïnvloed is (Goodchild *et al.*, 1988a).

Kovalent-gekoppelde funksionele groepe verminder nie die spesifisiteit van antisens-oligonukleotiede nie (Zerial *et al.*, 1987 en Verspieren *et al.*, 1987), alhoewel een uitsondering waar 'n oligonukleotied-interkaleerderkompleks nie-spesifiek aan RNA-polimerase gebind het, reeds beskryf is (Hélène *et al.*, 1985). Nie-spesifieke effekte van antisens-oligonukleotiede is onder andere deur Agrawal en sy medewerkers, wat waargeneem het dat 'n fosfotioaat oligonukleotied met 'n willekeurige volgorde, HIV-replisering by konsentrasies van 20 μ g/ml en hoër inhibeer, beskryf. Nog meer verrassend is dat homo-oligomere ook antivirale aktiwiteit vertoon (Matsukura *et al.*, 1987) .

Tegnieke om die spesifisiteit van antisens-oligonukleotiede te bepaal, sluit die volgende in:

- Volgordebepaling. Oligonukleotiede met 'n 3'-hidroksielgroep kan as voorvoerder vir DNA-polimerase optree, sodat die volgorde van die teiken met behulp van die Sanger-metode bepaal kan word (Sanger *et al.*, 1977 en Murakuri *et al.*, 1985).
- Bestudering van die proteïenprodukte van mRNA's wat in die koderende gedeelte geteiken is. Die grootte van die proteïene, wat spesifiek verkort sal wees aan die COOH-terminuskant, kan dus 'n aanduiding gee van die posisie waar die oligonukleotied gehibridiseer het (Häuptle *et al.*, 1986).
- Bepaling van RNA-fragmentlengtes. Indien die DNA-RNA-hibried met RNase H gedegradeer sou word, kan die lengtes van die resulterende RNA-fragmente 'n aanduiding gee van waar hibridisering plaasgevind het (Uhlmann en Peyman, 1990).

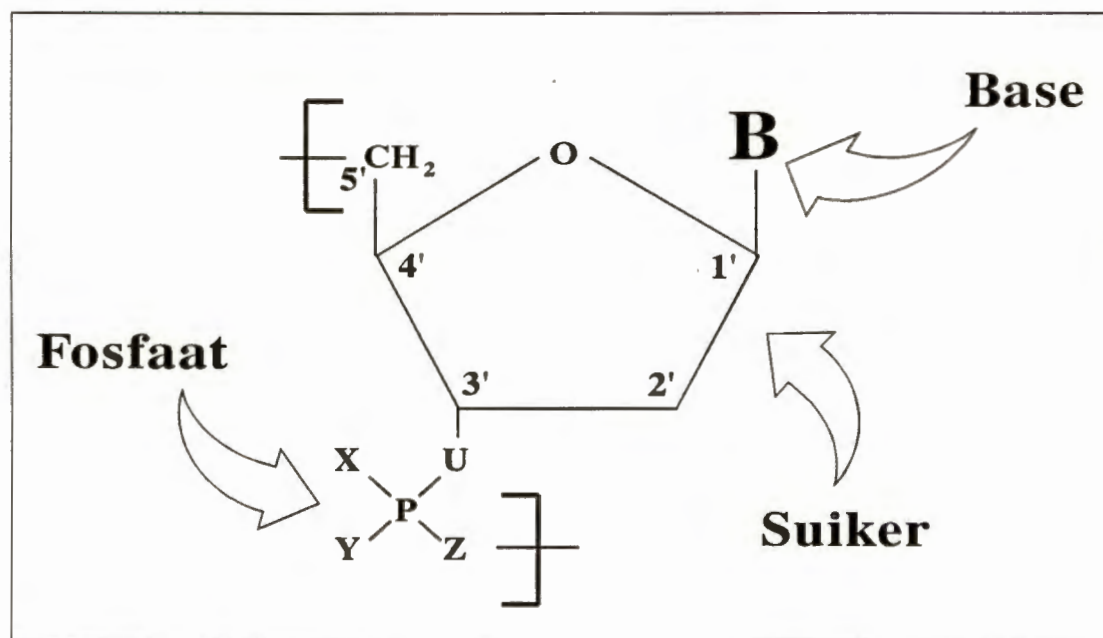
2.2.4.4. STABILITEIT TEN OPSIGTE VAN NUKLEASES

Die sleutelparameter vir antisens-modulering van geenuitdrukking is die intrasellulêre konsentrasie van die antisens-oligonukleotied. Een van die belangrikste faktore wat hierdie konsentrasie bepaal, is die mate waartoe die oligonukleotiede deur nukleases gedegradeer word. Onder optimale toestande kan oligonukleotiede binne 15 minute ten volle in kalfserum gedegradeer word (Wickstrom, 1986). Verdere ondersoeke het getoon dat eksonukleases en meer spesifiek 3'-eksonukleases, hoofsaaklik vir die degradering verantwoordelik is (Uhlmann en Peyman, 1990). *In vivo* hang die snelheid waarteen oligonukleotiede gedegradeer word ook van die seltipe wat gebruik word, af. So byvoorbeeld is 'n 20-meer na 3 uur in HeLa-selle bykans volledig vernietig, terwyl dit feitlik glad nie gedegradeer was nadat dit oornag in hoender-embriofibroblaste was nie (Kariko *et al.*, 1987). Die halfleeftyd van 'n 5'-gefosforileerde 15-meer in 'n HL-60 leukemie-selkultuur met geïnaktiveerde kalfserum, was 1-2 dae (Holt *et al.*, 1988). Wickstrom (1986) het

verder ook aangetoon dat die mate van degradering in verskillende subcellulêre ekstrakte verskil.

Dit blyk dus dat natuurlike fosfodiëster-oligonukleotiede in die algemeen nie stabiel genoeg is om onder *in vivo*-toestande gebruik te word nie. Om die effektiewe konsentrasie van antisens-oligonukleotiede onder fisiologiese toestande te verhoog, kan hul struktuur sodanig gemodifiseer word dat hulle nie deur nukleases gedegradeer kan word nie. Die ideaal is dat hierdie veranderinge die biologiese leeftyd van die oligonukleotiede sal verleng, opname deur selle sal verhoog en sterker hibridisering onder fisiologiese omstandighede tot gevolg sal hê. Modifiserings aan die fosfodiëster-rugstring, die suikergroepe of die base in 'n oligonukleotied asook die kovalente koppeling van funksionele groepe aan die oligonukleotiede, kan onder andere tot hierdie ideaal bydra.

Die fosfodiëster-rugstring van oligonukleotiede kan gemodifiseer word deur een of meer van die vier O-atome rondom die P-atoom in die internukleotiedbinding, met 'n ander geskikte atoom of groep te vervang (Figuur 2.5). Voorbeelde van sulke gemodifiseerde oligonukleotiede wat reeds gesintetiseer is, word in Tabel 2.1 gegee. Oligonukleotiede wat met die α -anomere gesintetiseer is, is weerstandbiedend teen nukleases, maar kan nie RNase H-aktiwiteit induseer nie. Derivatisering van oligonukleotiede se 3'- en/of 5'-punte beskerm die oligonukleotied teen eksonukleases en verhoog die doeltreffendheid van die interaksie tussen die oligonukleotied en die teikenvolgorde (Figuur 2.6). Funksionele groepe wat aan oligonukleotiede gekoppel kan word, word in drie groepe verdeel, naamlik; interkaleerders, reaktiewe groepe en draers (verwys na Afdeling 2.2.4.6). In *in vitro*-studies het selfs 'n enkele 5'-fosfaatgroep 'n oligonukleotied teen milt-fosfodiësterase beskerm (Urdea en Horn, 1986). Onder *in vivo*-omstandighede sal so 'n fosfaatgroep egter vinnig verwyder word.



Figuur 2.5. Die drie komponente van 'n nukleotied wat verander kan word om nukleaseweerstandbiedendheid aan oligonukleotiede te verleen. Vir moontlike plaasvervangers van U, X, Y en Z vergelyk met Tabel 2.1.

Tabel 2.1. Moontlike plaasvervangers vir suurstof in die internukleotiedbinding van oligonukleotiede.

Internukleotiedbinding	U	X	Y	Z
Fosfaat	O	O	O ⁻	O
Fosfotioaat	O	O	S ⁻	O
Fosfoditioaat	O	S	S ⁻	O
3'-alkieltioaat	S	O	O	O
5'-alkieltioaat	O	O	O	S
3', 5'-alkielditioaat	S	O	O	S
Metielfosfonaat	O	O	CH ₃	O
3'-metileenfosfonaat	CH ₂	O	O ⁻	O
5'-metileenfosfonaat	O	O	O ⁻	CH ₂
3', 5'-dimetileenfosfonaat	CH ₂	O	O	CH ₂
Metielfosfonotioaat	O	S	CH ₃	O
3'-metileentiofosfonaat	CH ₂	O	S ⁻	O
5'-metileentiofosfonaat	O	O	S ⁻	CH ₂
3', 5'-dimetileentiofosfonaat	CH ₂	O	S ⁻	CH ₂
3', 5'-dimetileenditiofosfonaat	CH ₂	S	S ⁻	CH ₂

Verwys na Figuur 2.5 vir die posisies van U, X, Y en Z.

2.2.4.5. INDRINGING DEUR MEMBRANE

Antisens-oligonukleotiede se doeltreffendheid word grootliks bepaal deur die mate waartoe hulle die reaksie-omgewing bereik. Aangesien proteïensintese in die sitoplasma plaasvind, moet die mRNA wat in die kern vanaf die DNA getranskribeer word, na die sitoplasma vervoer word waar dit getransleer word tot die ooreenstemmende proteïen. Antisens-oligonukleotiede moet dus deur die selmembraan kan beweeg om enige effek uit te kan oefen. Aangesien die selmembraan 'n natuurlike hindernis vir baie groot, hidrofiele en negatief gelaaide molekules is, kan verwag word dat dit die bottelnek van die antisens-oligonukleotiedetegnologie sal vorm.

Verrassend genoeg word oligonukleotiede beter deur selle opgeneem as wat verwag sou word vir sulke groot poli-anione. Eksperimente met radioaktief-gemerkte oligonukleotiede het getoon dat hul opname, afhangende van die sel tipe en die eksperimentele toestande, tussen 15 minute en 'n paar uur neem. Internalisering geskied deur endositose wat 'n energie-afhanklike proses is en wat deur verminderde ATP-sintese geïnhibeer word (Goodchild, 1989). Die binding van oligonukleotiede aan en die oordrag oor die selmembraan, word deur 'n spesifieke reseptor bewerkstellig (Loke *et al.*, 1989). Die bestaan van sodanige meganisme word ondersteun deur die bevinding dat fosfotioaatanaloë die opname van normale fosfodiëster-oligonukleotiede inhibeer, terwyl metielfosfonate geen invloed op hul opname het nie (Stein *et al.*, 1988). 'n Tagtig kDa oppervlakproteïen wat vir die vervoer van oligonukleotiede oor die selmembraan verantwoordelik kan wees, is met oligo-(dT)-sellulose affiniteitschromatografie geïsoleer. Daar is egter ook 'n moontlikheid, veral in die geval van gemodifiseerde oligonukleotiede, van nie-spesifieke binding aan die membraan. Hierdie membraangebonde oligonukleotiede kan dan geleidelik deur membraan-heroriëntasie geïnternaliseer word (Wickstrom *et al.*, 1988). Passiewe opname deur selle is ook in die geval van metielfosfonate waargeneem (Jayaraman *et al.*, 1981).

In die geval van selkulture is die oligonukleotiedkonsentrasie binne-in die sel ongeveer 7.5 - 10% van die konsentrasie in die medium (Zamecnik *et al.*, 1986). Ondersoeke met HeLa-selle en tritium-gemerkte oligonukleotiede, het getoon dat die meeste radioaktiwiteit na 'n baie kort inkuberingstyd buite die sel was en dat die radioaktiwiteit na 15 minute eksklusief in die kern geleë was. Slegs 6% van die oligonukleotiede is buite die sel tot enkele nukleosiede afgebreek, maar dit is nie bekend hoeveel binne die sel gedegradear is nie (Goodchild, 1989). Die doeltreffendheid van oligonukleotiede wat teen splytlasaktiwiteit geteiken is, dui ook daarop dat oligonukleotiede tot in die kern kan penetreer (Smith *et al.*, 1986, Munroe, 1988 en Agrawal *et al.*, 1989).

Die tydsverloop vir die sellulêre opname van oligonukleotiede is liniêr in die eerste fase en bereik dan 'n plato na ongeveer 2 tot 3 uur (Harel-Bellan *et al.*, 1988). Oligonukleotiede wat kovalent aan akridien gekoppel is, bereik nie hierdie plato voor ongeveer 50 uur nie. In die geval van oligonukleotiede van tussen 3 en 20 base, is die intrasellulêre konsentrasie wat bereik kan word, omgekeerd eweredig aan die lengte van die oligonukleotied. Miller en Ts'O (1987) het waargeneem dat 'n metielfosfonaat-oligonukleotied, wat in die stert van 'n muis ingespuut is, deur alle organe en weefsel, behalwe die brein, versprei word. Indien hierdie metielfosfonaat-antisens-oligonukleotied in 'n room aan die oor van 'n HSV-geïnfekteerde muis gesmeer word, voorkom dit die ontwikkeling van sere. Dit dui dus daarop dat die metielfosfonaatanaloog die vermoë besit om deur die muis se vel te beweeg.

Verskeie metodes is al ontwikkel om die opname van antisens-oligonukleotiede deur selle te verbeter. Die belangrikste hiervan kan saamgevat word in liposoomtegnieke en die kovalente koppeling van draergroepe aan die oligonukleotiede. Verbindings wat as draers kan optree sluit hidrofobe molekules en polikatione in. Lipofiliese veranderinge is ook al aan oligonukleotiede self aangebring, maar hul effektiwiteit moet nog bewys word (Goodchild, 1989 en Letsinger *et al.*, 1989).

Liposome is mikroskopiese deeltjies wat uit mono- of multilaminêre lipied-dubbellae bestaan en kan selle maklik as gevolg van hul lipofiliese aard deur fagositose of endositose binnedring. Verhoogde antivirale aktiwiteit van 2'-5'-oligo-adenilate wat in liposome verpak is, is deur Bayard en sy medewerkers (1985) beskryf. Alhoewel die werking van hierdie verbinding nie op antisens-tegnologie berus nie, is dit aan dieselfde probleme onderhewig, naamlik die moeilike opname deur selle en degradering deur nukleases. 'n Nadeel van konvensionele liposome wat tot dusver hul algemene toepaslikheid verhoed het, is hul relatief kort halfleeftyd in serum. Die rede hiervoor is die hoë tempo waarteen liposome deur die retikulo-endoteliale sisteem (lewer en milt) opgeneem word (Uhlmann en Peyman, 1990). 'n Nuwe generasie liposome wat hierdie probleem omseil, is egter onlangs beskryf (Gabizon en Papahadjopoulos, 1988). Nog 'n ontwikkeling wat 'n belangrike rol kan speel, is immuno-liposome. 'n Spesifieke teenliggaam word in die liposoom geïnkorporeer sodat selle wat die ooreenstemmende antigeen besit, selektief binnegedring word. HSV-geïnfekteerde selle is reeds so geteiken (Ho *et al.*, 1987).

Poli-L-lisien, 'n polikatioon, is tot dusver die verbinding wat die beste gekarakteriseer is as draer vir oligonukleotiede oor die selmembraan. Schell (1971 en 1974) het die poli-L-lisien-gemedieerde opname van oligonukleotiede deur selle aan die hand van twee moontlike meganismes verduidelik. In die eerste plek kan poli-L-lisien 'n kompleks met die selwand vorm en kan sodoende, as gevolg van die netto positiewe lading, die selwand meer deurlaatbaar vir poli-anione maak. Alternatiewelik kan poli-L-lisien met die oligonukleotiede assosieer om komplekse te vorm wat 'n hoër affiniteit vir die sellulêre membraan sal hê. Lemaitre *et al.* (1987) het aangetoon dat 'n 15-meer antisens-oligonukleotied die ontwikkeling van Vaskulêre-stomatitis-virus (VSV) in selkulture slegs inhibeer wanneer poli-L-lisien kovalent aan die 3'-punt gekoppel is. Hierdie bykomende effektiwiteit kan waarskynlik aan die verbeterde opname deur selle, weerstandbiedendheid teenoor 3'-eksonukleases en die stabilisering van die dubbelheliks deur die polikatioon toegeskryf word.

Ongelukkig is daar ook nadele verbonde aan die gebruik van poli-L-lisien. Poli-L-lisien het by konsentrasies hoër as $2\mu\text{M}$, 'n sitotoksiese effek op byna al die sellyne wat getoets is (Leonetti *et al.*, 1988). Oligonukleotied-poli-L-lisien-konjugate vorm ook aggregate wat praktiese probleme tot gevolg kan hê (Marcus-Sekura, 1988). Die belangrikste teenstrydigheid is egter die feit dat, alhoewel poli-L-lisienkonjugate VSV-replisering in L929-selle geïnhibeer het, dit geen effek op dieselfde virus in ander selte soos HeLa- en LM-fibroblaste gehad het nie (Leonetti *et al.*, 1988).

Ander verbindings wat al as draers beskryf is, is cholesterol (Boutorin *et al.*, 1989 en Letsinger *et al.*, 1989), hendesiel (Alexander *et al.*, 1990) en 'n poliamiedgroep (Haralambidis *et al.*, 1990).

2.2.4.6. ANTISENS-OLIGONUKLEOTIEDE KOVALENT GEKOPPEL AAN FUNKSIONELE GROEPE

In beginsel is daar drie tipes interaktiewe verbindings wat kovalent aan oligonukleotiede gekoppel kan word:

- Interkaleerders - wat geen modifikasies in die teikenvolgorde kan aanbring nie, maar slegs die hibried stabiliseer deur ekstra bindingsenergie te verskaf.
- Reaktiewe groepe - wat onomkeerbare reaksies in die teikenvolgorde kan induseer.
- Draergroepe - wat die oordrag van die oligonukleotiede oor die selmembraan fasiliteer, soos reeds in Afdeling 2.2.4.5. bespreek is.

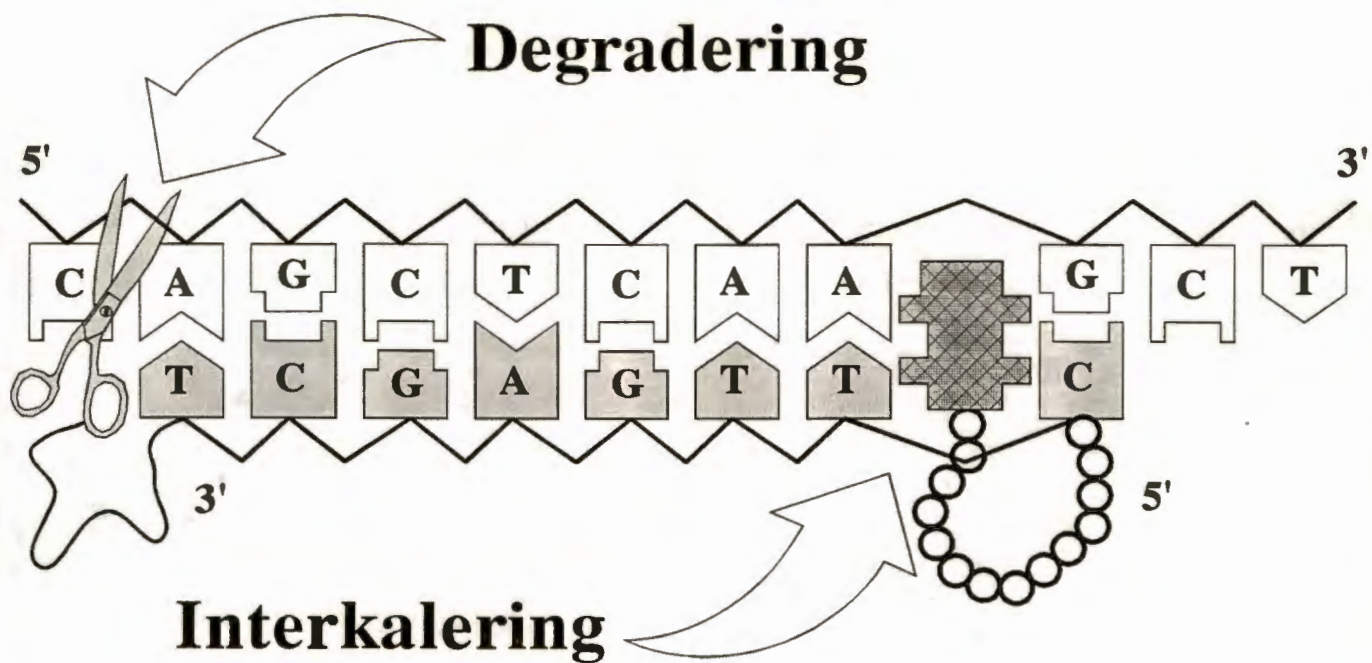
Alhoewel redelike kort oligonukleotiede van ongeveer 15 base spesifiek aan hul komplementêre volgorde sal hibridiseer, is dit moontlik dat die hibriede wat gevorm word, nie stabiel genoeg sal wees om 'n biologiese respons af te dwing nie. Interkaleerders wat via 'n poli-etileenskakel kovalent aan oligonukleotiede gekoppel is, kan ekstra bindingsenergie aan die dubbelheliks wat met hibridisering gevorm word, verskaf en die kompleks sodoende stabiliseer (Asseline *et al.*, 1983 en

Lancelot *et al.*, 1985). Die planêre, aromatiese gedeelte van interkaleerders voeg tussen twee aangrensende basepare in en vorm nie-kovalente bindings met die nukleotiede (Figuur 2.6). Interkalering is ook 'n omkeerbare proses wat die vervorming van die dubbelheliks se suikerfosfaatrugstring tot gevolg het. Afhangende van die poli-etileenskakel se lengte, kan interkalering in die dupleks, wat tydens hibridisering gevorm het, of in 'n nabygeleë dubbelstring-struktuur wat in die teikenvolgorde teenwoordig is, plaasvind. Akridien en sy derivate is van die bekendste interkaleerders en ook die eerstes wat aan oligonukleotiede gekoppel is (Figuur 2.7)(Asseline *et al.*, 1983). Ander verbindings wat as interkaleerders kan optree, is fenantrolien, aktinomisien en etidium. Verbindings soos fenantrolien en 2-hidroksi-etaantiolato-2,2',2''-terpiridien-platinum(II), wat terselfdertyd as interkaleerders én reaktiewe groepe kan optree, mag meer voordelig wees. Netropsien en 'n verwante antibiotikum, distamisien A, bind ook sterk deur nie-kovalente bindings aan die buitekant van 'n nukleïensuurdupleks, langs die vlak-groef in A/T-ryke gebiede.

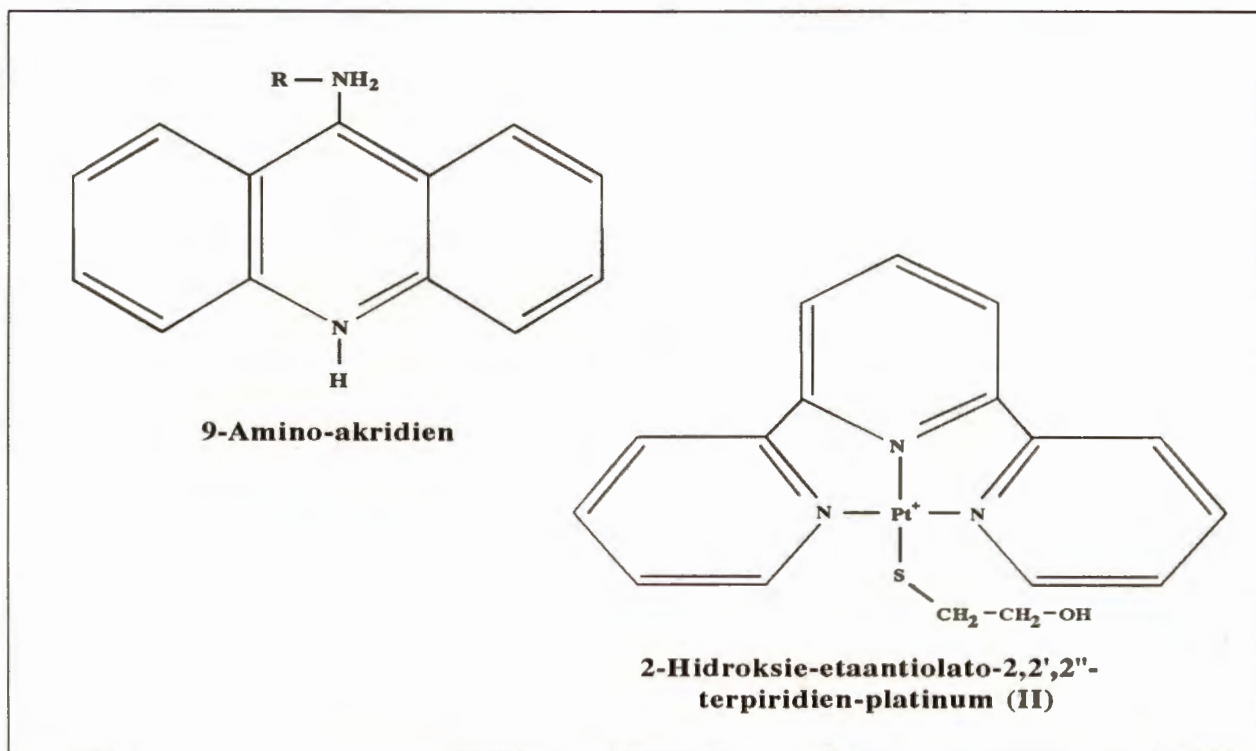
Daar moet egter onthou word dat interkaleerders as mutagene optree, wat enkelbase-invoegings of -delesies tydens replisering kan induseer (Zubay, 1983) en dat hulle nie-spesifieke interaksies tot gevolg kan hê (Hélène *et al.*, 1985).

In die algemeen kan die voordele van interkaleerders soos volg saamgevat word:

- Hulle verhoog die bindingsaffiniteit tussen 'n antisens-oligonukleotied en sy teikenvolgorde. 'n Stabieler kompleks word dus gevorm.
- Gederivatiseerde oligonukleotiede is meer stabiel teenoor eksonuklease-aktiwiteit.
- Die lipofiele aard van interkaleerders verbeter gewoonlik die opname van die oligonukleotied deur selle.
- Akridien-oligonukleotiede hibridiseer baie sterker met oligoribonukleotiede as met oligodeoksiribonukleotiede.
- Behalwe vir 'n paar uitsonderings (Toulmé *et al.*, 1986 en Hélène *et al.*, 1985), word die hoë spesifisiteit van die antisens-oligonukleotied behou.



Figuur 2.6. 'n Skematiese voorstelling van 'n gederivatiseerde antisens-oligonukleotied wat kovalent aan twee interaktiewe groepe gebind is. Interkaleerders voeg tussen twee aangrensende basepare in om so deur nie-kovalente bindings addisionele bindingsenergie aan die kompleks te verkaf. Reaktiewe groepe induseer die degradering van die teikenvolgorde of vorm onomkeerbare, kovalente bindings daarmee.



Figuur 2.7. Twee voorbeelde van interaktiewe groepe. Akridien tree as 'n interkaleerder op terwyl 2-hidroksie-etaantiolato-2, 2', 2''-terpiridien-platinum(II) as 'n interkaleerder sowel as 'n reaktiewe groep kan optree (Aangepas uit Saenger, 1984).

Hibridisering tussen 'n antisens-oligonukleotied en sy komplementêre volgorde is 'n omkeerbare proses, met die gevolg dat geenuitdrukking nie 100% onderdruk word nie. Reaktiewe groepe wat kovalent aan oligonukleotiede gekoppel kan word, kan onomkeerbare reaksies met die teikenvolgorde aangaan of daarin induseer. Twee tipes reaktiewe groepe kan onderskei word, naamlik:

- Verbindings wat snitte in die nukleïensuurteiken kan aanbring en
- verbindings wat kovalente kruisbindings met die teikenvolgorde kan aangaan.

Antisens-oligonukleotiede waaraan reaktiewe groepe, wat snitte in die teikenvolgorde kan aanbring, gekoppel is, is veral bruikbaar indien oligonukleotiedanaloeë wat nie RNase H-aktiwiteit kan induseer nie, gebruik word. Boutorin en sy medewerkers (1984) was die eerstes om hierdie "sintetiese nukleases" te bou, deur etileendiamientetra-asynsuur (EDTA) kovalent aan die 5'-punt van 'n homotimien-oligonukleotied te bind. Nadat die oligonukleotied aan sy komplementêre volgorde gehibridiseer het, het die EDTA-groep in die teenwoordigheid van die reduseermiddel ditiotreitol (DTT) en Fe(II), 'n snit in die teikenvolgorde aangebring.

Hierdie splytingsreaksie is gebaseer op die lokale generering van reaktiewe suurstofspesies (O_2^- -vryradikale) deur die oordrag van 'n elektron vanaf die metaalsentrum na molekulêre suurstof. Die omvang van die reaksie wat in die teikenvolgorde geïnduseer word, hang van die oligonukleotied- en soutkonsentrasies en ook van die temperatuur af (Piette *et al.*, 1977 en Boidot-Forget *et al.*, 1988). Dreyer en Dervan (1985) het 'n EDTA-groep, ongeveer in die middel van 'n 19-meer, via die C5-atoom van timien gebind. Na hibridisering en die toevoeging van DTT, Fe(II) en O_2 , is snitte binne 'n 16-base-radius rondom die timien in die teikenvolgorde aangebring. Ander reaktiewe groepe wat al aan oligonukleotiede gekoppel is, is fenantrolien-Cu (Chen en Sigman, 1986 en 1988) en porfirien-Fe (Co, Mn) (Le Doan *et al.*, 1986 en 1987b). Die metaalkomplekse van porfirien en dalk ook fenantrolien, vorm eerder intermediêre metaal-okso spesies as vry diffundeerbare hidroksiradikale. So kan die breuke wat in die teikenvolgorde

aangebring word, tot die onmiddellike omgewing van die metaalkompleks en dus die antisens-oligonukleotied, gelokaliseer word. Fenantrolien en porfirien kan self ook interaksies met die base in die teikenvolgorde aangaan en so verdere lokalisering en stabilisering tot gevolg hê (Chen en Sigman, 1986 en Le Doan *et al.*, 1987b).

Snitte kan dus spesifiek in dubbelstringvolgordes aangebring word met tussen 15 en 25% effektiwiteit vir EDTA-Fe en so hoog as 70% vir fenantrolien-Cu. Die snitpunte in die twee DNA-stringe is egter nie regoor mekaar nie, aangesien die reaktiewe spesies (hidroksiradikale) wat deur die metaal-chelate gegenereer word, die suikergroep wat die naaste in die ruimte is, aanval. As 'n chelaat in een van die twee groewe lê, is die naaste nukleotiede dié wat reghoekig ten opsigte van die groef-as lê. Gevolglik word die verspreiding van snitpunte asimmetries na die 3'-punt, indien die radikale in die vlakgroef gegenereer word en na die 5'-punt as die radikale in die diepgroef gevorm word, verskuif (Hélène en Toulmé, 1990).

As gevolg van die chemie van bogenoemde reaksies en die asimmetriese termini, kan hierdie DNA-fragmente nie ensiemgekataliseerde reaksies, soos byvoorbeeld polimerisering en ligering, onderhou nie. 'n Hidrolitiese splytingsreaksie op 'n enkele fosfodiësterbinding, soos gekataliseer deur 'n restriksie-endonuklease, sal dus bepaalde voordele inhou. Zuckermann *et al.* het RNA selektief by een fosfodiësterbinding gesplyt deur 'n nie-spesifieke, ekstrasellulêre *Staphylococcus*-nuklease van 149 aa aan die 3'-punt van 'n antisens-oligonukleotied te bind (Zuckermann *et al.*, 1988, Zuckermann en Schultz, 1989 en Corey *et al.*, 1989). Hierdie tegniek sal egter net *in vitro* uitvoerbaar wees, aangesien die Ca^{2+} -kofaktor nie *in vivo* geëlimineer kan word nie. Dit sal beteken dat die oligonukleotied-nukleasekompleks homself sal hidroliseer. Hierdie probleem kan egter maklik opgelos word deur van 'n oligonukleotiedanalooë gebruik te maak wat nuklease-weerstandbiedend is.

Kruisbindingsreaksies kan óf chemies óf fotochemies gekataliseer word. Alkileringsreagense soos stikstofmosterd (Vlassov *et al.*, 1978 en Knorre en Vlassov, 1985) en broomalkielverbindings (Summerton en Bartlett, 1978) kan chemies gekataliseer word om kruisbindings met die teikennukleotiedvolgorde te vorm. Alkilerende oligonukleotiede is al gebruik om die translasië van immunoglobuliengene in miëloomsellyne te inhibeer en ook om die replisering van die influensavirus te onderdruk (Knorre en Vlassov, 1985).

Groepe wat fotochemies gekataliseer kan word om kovalente kruisbindings met die teikenvolgorde te vorm, sluit die volgende in: proflavien (Praseuth *et al.*, 1988), porfirien (Le Doan *et al.*, 1987b), asidoderivate en diasopireenderivate (Praseuth *et al.*, 1988). Wanneer hierdie verbindings met sigbare of nabye-UV-lig bestraal word, vorm hulle kruisbindings met die teikennukleïensuur. Onder alkaliese omstandighede (1M piperidien, 90°C) kan hierdie bindings breuke in die teikenvolgorde induseer (Praseuth *et al.*, 1988). Fotochemies-gekataliseerde groepe kan baie bruikbaar wees in biologiese sisteme soos bioreaktore, aangesien slegs lig as kofaktor nodig sal wees om geenuitdrukking te moduleer. Kruisbindingsreagense sal egter nie algemeen gebruik kan word nie, omdat hulle nie regtig biologies-versoenbare reaksietoestande het nie en ook meer selektief ten opsigte van ander makromolekules, soos proteïene en lipiede is, wat dus nie-spesifieke reaksies tot gevolg sal hê (Hélène en Toulmé, 1990 en Yakubov *et al.*, 1989).

2.2.4.7. SITOTOKSISITEIT

Geen vasgestelde reëls waarvolgens die sitotoksiteit van 'n spesifieke oligonukleotied voorspel kan word, kan uit die literatuur afgelei word nie. Dit is wel duidelik dat oligonukleotiede by hoë konsentrasies 'n toksiese effek kan hê. Indien die teikenvolgorde versigtig gekies word, is die konsentrasies wat nodig is vir effektiewe inmenging heelwat laer as wat toksies is (verwys na Tabela 2.1.3. en 2.1.5. en oorsigartikels soos byvoorbeeld Crooke, 1991; Crooke, 1992; Cohen,

1992 en Hélène en Toulmé, 1990). Resultate van eksperimente wat in die literatuur beskryf is vir die bepaling van die sitotoksiteit van oligonukleotiede, verskil in so 'n mate dat dit raadsaam sal wees om die sitotoksiteit van 'n antisens-oligonukleotied in 'n spesifieke sisteem prakties te bepaal (vergelyk byvoorbeeld die resultate van Woolf *et al.*, 1990 met dié van Matsukura *et al.*, 1987). Dit blyk dat die sitotoksiteit van 'n spesifieke oligonukleotied afhang van die oligonukleotied se eienskappe en samestelling, die sisteem waarin dit gebruik word en die volgorde wat geteiken word.

Gewone fosfodiëster-oligonukleotiede is in die algemeen die mees toksiese, terwyl die fosfotioaatanaloë die minste toksies is (Tabel 2.2) (Matsukura *et al.*, 1987 en Agrawal *et al.*, 1988). Woolf en sy medewerkers (1990) het getoon dat, indien *Xenopus*-oösite met fosfodiëster-oligonukleotiede ingespuut word, hulle van dosisse van 20ng en hoër abnormaal ontwikkel en sterf. Sarin *et al.* (1988) het in 'n reeks eksperimente aangetoon dat 'n 19-meer fosfotioaat wat komplementêr is aan HIV-RNA, tot en met dosisse van 40mg/kg liggaamsmassa, geen invloed op muis het nie. By dosisse van 160mg/kg is die helfte van die muis binne drie dae dood en teen 640mg/kg is al die proefdiere binne minute dood. Metielfosfonate het ook 'n laer sitotoksiteit as onveranderde oligonukleotiede: Vero-selle wat in die teenwoordigheid van 150-300 μ M van 'n metielfosfonaat-oligonukleotied geïnkubeer is, het na 24 uur geen nadelige effekte getoon nie (Smith *et al.*, 1986). Fosforamidietanaloe, daarenteen, toon toksiese effekte by konsentrasies so laag as 100 μ M (Agrawal *et al.*, 1988).

2.2.5. DIE KEUSE VAN EFFEKTIEWE TEIKENVOLGORDES

Die doeltreffendheid van antisens-volgordes staan in noue verband met die meganisme waardeur hulle hul invloed uitoefen. Indien RNA byvoorbeeld geteiken word en die RNase H-meganisme oorheers, sal die teikenvolgorde in die RNA nie so 'n groot rol speel nie, net solank dit geredelik beskikbaar is vir hibridisering met die

antisens-oligonukleotied. Soos reeds in Afdeling 2.2.3. beskryf is, is daar 'n groot verskeidenheid potensiële teikenvolgordes. Om saam te vat: Op translasionele vlak, met mRNA as teiken, is daar die 5'-nie-transleerbare gedeelte, die ribosoombindingspunt, die translasië-inisiasiegebied, die koderende gedeelte en die 3'-nie-koderende gebied. Potensiële teikenvolgordes op transkripsionele vlak is die promotor, operator, attenuator, terminator en die groeiende pre-mRNA-string. Post-transkripsionele teikens sluit die splytlaspunte en die poli-adenileringsin in.

Tabel 2.2. 'n Opsomming van die antivirale effek van verskillende oligonukleotiedanaloe in vergelyking met hul sitotoksisiteit.

Oligonukleotied	% Antivirale effek [@]				% Sitotoksisiteit [#]			
	Konsentrasie (µM)				Konsentrasie (µM)			
	1	5	10	25	1	5	10	25
Fosfodiëster	3	2	9	4	35	22	27	14
Metielfosfonaat	8	20	13	10	20	27	20	20
Fosfotioaat	0	43	72	95	0	0	0	20

Uit Matsukura *et al.*, 1987.

- [@] Die persentasie beskerming wat die oligonukleotiede teen HIV-infeksie verleen het, is bereken met die formule: 100 x [(aantal lewende selle aan HIV blootgestel en saam met antisens-oligonukleotied geïnkubeer - aantal lewende selle aan HIV blootgestel, wat sonder 'n oligonukleotied geïnkubeer is) / (aantal lewende selle wat alleen geïnkubeer is - aantal lewende selle aan HIV blootgestel, wat sonder 'n oligonukleotied geïnkubeer is)].
- [#] Die persentasie sitotoksisiteit van die oligonukleotiede is met die volgende formule bereken: 100 x [(1 - aantal lewende selle wat in die teenwoordigheid van 'n oligonukleotied geïnkubeer is) / (aantal lewende selle wat alleen geïnkubeer is)].

Uit die meeste *in vitro*-studies is dit duidelik dat die 5'-nie-koderende gebied naby die CAP-struktuur en die gebiede rondom die inisiasiekodon die doeltreffendste teikenvolgordes vir antisens-oligonukleotiede is (Letsinger *et al.*, 1989; Goodchild *et al.*, 1988b; Sumikawa en Miledi, 1988 en Blake *et al.*, 1985b). Hierdie volgordes lewer beter resultate as die ander nie-koderende gedeeltes en die koderingsvolgordes. Die 3'-nie-transleerbare gedeelte is gewoonlik glad nie effektief

nie. Die beste gebiede om te teiken is dus dié waar die regulatoriese DNA- en RNA-bindingsproteïene gewoonlik bind. In die geval van HSV en HIV was oligonukleotiede wat teen die splytlaspunte geteiken was, ook baie effektief (Smith *et al.*, 1986 en Goodchild *et al.*, 1988b). Teoreties kan hierdie volgordes en voorvoerderbindingspunte by retrovirusse waar omgekeerde transkripsie geïnisieer word, baie voordelig wees, aangesien hulle geredelik toeganklik behoort te wees. Soortgelyke gevolgtrekkings is ook vir die teikenvolgordes van antisens-RNA gemaak (Inouye, 1988).

Soos wat verwag kan word, het die individuele sekondêre en tersiêre strukture van elke teikenvolgorde ook 'n bepalende invloed op die doeltreffendheid van die antisens-reaksie (Blake *et al.*, 1985). Alhoewel die sekondêre struktuur van mRNA voorspel kan word, sal die doeltreffendheid van elke teikenvolgorde eksperimenteel bepaal moet word. Die belang hiervan word beklemtoon deur die bevinding dat die translase van globien-mRNA slegs geïnhibeer kan word deur oligonukleotiede wat teen spesifieke gedeeltes van die mRNA geteiken is. Deur middel van voorafanalises van die mRNA, is aangetoon dat hierdie gedeeltes deur 'n enkelstring-spesifieke nuklease verteer kan word (Coleman, 1989).

2.2.6. TOEPASBAARHEID VAN DIE ANTISENS-TEGNOLOGIE EN TOEKOMSVERWAGTINGE

As gevolg van die universaliteit en die relatiewe eenvoud van die tegniek, hou die antisens-tegnologie 'n wye spektrum van toepassingsmoontlikhede in. Hierdie toepassings val in een van twee groepe, naamlik fundamentele navorsing en *in vivo*-manipulering van geenuitdrukking (geenterapie).

In fundamentele navorsing kan dit byvoorbeeld gebruik word om proteïene te berei wat spesifiek aan die COOH-terminuspunt verkort is. So kan die verband tussen die

struktuur en die funksie van 'n proteïen vasgestel word (Häuptle *et al.*, 1986). Verder is dit ook goeie instrumente wat gebruik kan word vir die opklaring van meganistiese probleme. Antisens-volgordes het byvoorbeeld reeds gehelp om die funksie van sekere proto-onkogene produkte in seldifferensiëring te bepaal (Gewirtz en Calabretta, 1988, Heikkilä *et al.*, 1987 en Jaskulski *et al.*, 1988) en ook om die funksie van snRNP's in splytlasgebeure op te klaar. Ander potensiële endogene teikens waarvan die uitdrukking onderdruk kan word om sodoende 'n aanduiding van die geenproduk se biologiese funksie te kry, is: ensieme, ionkanale, reseptore, immunomoduleerders en vele ander regulatoriese proteïene. 'n Raakvlak tussen fundamentele navorsing en die terapeutiese toepassings van die antisens-tegnologie, kan geskep word deur metaboliese en genetiese defekte in selkulture te simuleer.

Soos wat hierbo breedvoerig uiteengesit is, kan afgelei word dat antisens-oligonukleotiede deur lewende selle opgeneem word, dat hulle geenuitdrukking selektief moduleer en dat hulle nie toksies is vir biologiese sisteme by daardie konsentrasies wat nodig is om 'n respons af te dwing nie. Twee groepe het reeds die *in vivo*-effektiwiteit van antivirale oligonukleotiede in muis bewys (Miller en Ts'o, 1987 en Yakubov *et al.*, 1989). Baie meer uitgebreide *in vivo*-studies sal egter nog gedoen moet word. Uit 'n molekulêre oogpunt lyk die gebruik van antisens-oligonukleotiede as terapeutiese middels vir enige siekte wat deur foutiewe geenuitdrukking veroorsaak word, logies (Tabel 2.2). Die replisering van verskeie virusse, onkogene en selfs parasiete, is byvoorbeeld reeds geïnhibeer (Tabel 2.3). Dit sal dus moontlik wees om antisens-volgordes te gebruik om die ontwikkeling van kanker te bestudeer en hulle dan op 'n latere stadium as anti-kankermiddels te gebruik.

Die uiteindelijke uitdaging vir antisens-oligonukleotiedterapie, is egter nie biologies van aard nie, maar wel finansieel. Oplossings vir bekostigbare oligonukleotiede moet in die optimalisering van die sinteseproses en die effektiwiteit van die produk gesoek word. Die kostes kan byvoorbeeld tussen 10 en 20 maal verminder word deur ribonukleotiede in plaas van deoksiribonukleotiede te gebruik. 'n Ander

moontlikheid is om sintetiese DNA met die polimerase-kettingreaksie (PCR) te vermeerder. Die terapeutiese gebruik van antisens-oligonukleotiede sal ook afhang van die konsentrasie wat nodig is vir die doeltreffende modulering van geenuitdrukking. In selkulture is dit op die oomblik in die omgewing van gemiddeld $10\mu\text{M}$, maar hul biologiese aktiwiteit kan byvoorbeeld verbeter word deur chemiese modifikasies, verbeterde opname deur selle en die lokalisering van die antisens-oligonukleotiede in die reaksie-omgewing.

Alhoewel dit miskien verder in die toekoms lê, hou die antisens-RNA-tegnologie die meeste belofte vir *in vivo*-gebruik en dit sal ook waarskynlik hand aan hand met geenterapie-tegnieke ontwikkel. Vir plante is antisens-RNA-tegnieke reeds binne bereik en behoort die ontwikkeling van veral landbougewasse met antisens-gene groot finansiële voordele in te hou (Ecker en Davis, 1986; Smith *et al.*, 1988; Miroshnichenko *et al.*, 1988; Bejarano en Lichtenstein, 1992; Hill, 1993; Hofgen *et al.*, 1995 en Bourque, 1995).

Tabel 2.3. Siektetoestande wat moontlik vatbaar mag wees vir antisens-oligonukleotiedterapie.

Baie siektes is die gevolg van die foutiewe funksie of uitdrukking van 'n spesifieke geen. Sommige van die siektes uit hierdie wye spektrum, wat deur antisens-oligonukleotiede geteiken kan word, word hieronder opgesom.

Kanker.

Die begrip "kanker" omsluit 'n wye verskeidenheid van siektetoestande wat deur ongebeheerde selgroei en -vermeerdering gekenmerk word. Soliede tumore en leukemies vertoon mutasie-geaktiveerde of oormatige uitdrukking van onkogene, asook die inaktivering of verminderde uitdrukking van die onderdrukkergene (Bishop, 1991). Indien die onkogene geïdentifiseer kan word, kan die transformering van die sel dus omgekeer word deur oligonukleotiede teen die aktiewe onkogene te rig (Daaka en Wickstrom, 1990 en Bacon en Wickstrom, 1991).

Virale infeksies.

Oligonukleotiede gerig teen virale gene kan die replisering en produksie van 'n virus in gasheerselle inhibeer en sodoende verdere ontwikkeling van die siektetoestand in pasiënte wat nie ingeënt is nie, verhoed.

Auto-immuunreaksies.

Indien teenliggame, wat teen normale weefsel en strukture gerig is, geproduseer word, kan antisens-oligonukleotiede, gerig teen spesifieke volgordes van die outo-immune B-sel-immunoglobuliengene of T-sel-reseptorgene, die outo-immuunreaksie onderdruk. Hierdie benadering kan onder andere gebruik word om siektes soos artritis (gewrigsontsteking), eritromatose (veltering) en miastemie gravis (spierswakheid) te behandel. So kan DNA-chemoterapie help om weefselverwerping te voorkom, sonder dat dit nodig is om die pasiënt se hele immuunsisteem te onderdruk.

Tabel 2.3. (vervolg).

Endokriene siektetoestande.

Hoë bloeddruk kan die gevolg wees van abnormale hoë vlakke van rennien, angiotensinase of die voorloper van vasopressien (Barrett *et al.*, 1992). Deur die produksie van hierdie peptiede te onderdruk, kan hipertensie beter gereguleer word. Enige peptiedhormoon wat gesondheidsprobleme kan veroorsaak, soos byvoorbeeld transformerende groeifaktor- β (TGF- β) (by nier-versaking), groeihormoon (by akromegalie) en gastrien (by rousere), kan dus so selektief onderdruk word.

Neurologiese siektetoestande.

Alzheimer se siekte kan in sommige gevalle aan genetiese letsels in die β -amiloïedgeen toegeskryf word. Deur die mutante alleel uit te skakel, kan die siekte dus voorkom word. Op soortgelyke wyse is die opeenhoping van mono-amienoksidase gekoppel aan 'n verskeidenheid van neurologiese siektetoestande. Antisens-oligonukleotiedterapie kan dus as 'n meer spesifieke behandeling, met minder nadelige gevolge as enige ander medikament tot dusver, gebruik word.

Bakteriële infeksies.

Oligonukleotiede wat komplementêr aan die 3'-terminus van prokariotiese 16S rRNA is, is in staat om mRNA-translokasie te inhibeer (Jayaraman *et al.*, 1981). Hierdie oligonukleotiede kan dus as 'n nuwe klas antibiotika teen sekere tuberkuloses en mikoplasmas wat weerstandbiedend teen bekende antibiotika is, gebruik word.

Parasiete.

Parasiete soos malaria en tripanosome kan in hul gasheer oorleef deur gereelde mutasies in hul immunologiese determinantgebiede te ondergaan en sodoende die immuunrespons te ontduik. Antisens-oligonukleotiede wat teen gekonserveerde gedeeltes van die parasietgenoom gerig is, kan dus gebruik word om hierdie probleem te omseil (Verspieren *et al.*, 1987).

(Saamgestel uit Wickstrom, 1992)

Tabel 2.4. Antisens-oligonukleotiede - 'n opsomming van hul *in vitro*-aktiwiteit.

TEIKEN	SELTIPE	OLIGOTIPE*	LENGTE®	KONSENTRASIE#
Virusse				
HTLV-III	H9	P	12-26	5-50mg/ml
HIV (gag/pol)	H-T	PS	14-28	0.5-10
HIV	H9	PS, ander	20	4-20µg/ml
HIV	CZM	PS	18-28	10
HSV	Vero	CH ₃ P	7	50-100
HSV	HeLa	PS	28	1-10
HSV	Vero	CH ₃ P	12	5-50
HSV	HeLa	PS	21	0.2-4
VSV	L929	CH ₃ P	9	25-50
VSV	L929	P-lipied	11	50-150
VSV	L929	P-L-lisien	10-15	0.1
IV	MDCK	P-akridien	11	50
Bosluivlek	-	Verskeie	Verskeie	0.1-1
Enkefelitis SV40	MDCK	CH ₃ P	6-9	25
RSV	Hoenderfibroblaste	Verskeie	Verskeie	10
HBV	PLC/PRF/5	P	15	8.5
Bees Papilloom	C-127	PS	4-30	0.01-1
Onkogene				
c-myc	T-limfosiete	P	15	30
c-myc	HL-60	P, PS	15	10
c-myc	Burkitt	P	21	100
c-myb	PMBC	P	18	40mg/ml
BCL-2	L697	P, PS	20	25-150
N-myc	Neuroblastoom	P	15	1-5
N-ras	T15	CH ₃ P	9	Nie aktief
Gasheergene				
Veelvuldige medikament- weerstandbiedenheid				
PCNA (siklien)	MCF-1	PS	15	-
Protimosien	3T3	P	18	30
T-selreseptor	Mens miëlloom	P	16-21	40
GM-CSF	T-selle	P	22	
CSF-1	Endoteliaal	P	15, 18	1
EGF-reseptor	FL-ras/myc	P	-	-
BFGF	-	P	13	30
β-globien	Mens astrosiete	P	15	10-75
TAU	Haas retikulosiete	CH ₃ P	9	100
cAMP-proteïn	Neurons	P	20-25	3-50
Kinase II β-Miëlblastien	HL-60	P	21	15
Fosfolipase A ₂	HL-60	P	18	-
Aktiveringsproteïen-ICAM-1	BC3H ₁	P	25	25
IL-2	A549-HVEC	PS	18-20	0.01-1
IL-1α	T-limfosiete	P	15	5
IL-1β	HUVEC	P	18	10
IGF-1	Monosiete	PS	15	0.1-2.5
Perforien	Mioblaste	P	15	10
	T-limfosiete	P	18	5-35
Ander				
Chlooramfenikol	CV-1 en C-127	P, PS, CH ₃ P	14-21	1-30
Alkaliese fosfatase	SK-mel-2	PS	18-28	0.25-5
Tripanosome	-	P-akridien	6, 8, 12	30

* P = Fosfodiëster PS = Fosfotioaat CH₃P = Metielfosfonaat

® Lengte van die antisens-oligonukleotiede in nukleotiede.

µM indien nie anders vermeld.

(Saamgestel uit Crooke, 1992)

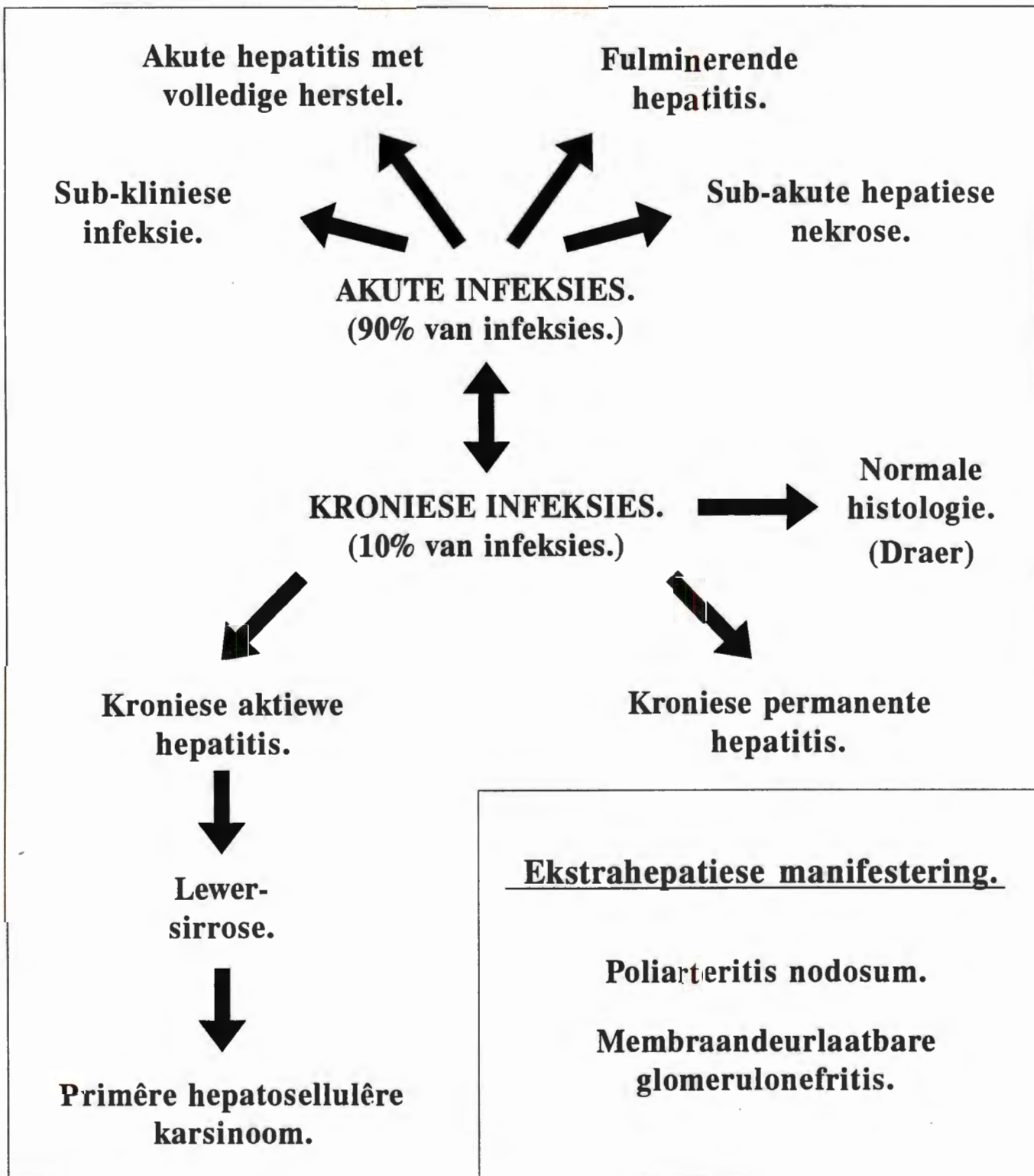
2.3. MENS-HEPATITIS-B-VIRUS

Hepatitis of inflammasie van die lewer is 'n wyd verspreide en ernstige gesondheidsprobleem wat deur 'n verskeidenheid virale en nie-virale faktore geïnduseer kan word. Die twee mees algemene vorme van hepatitis word egter deur twee verskillende virusse veroorsaak.

Hepatitis-A-virus (HAV) is 'n enterovirus; 'n klein virus met 'n enkelstring-RNA-genoom in 'n naakte nukleokapsied. Dit word normaalweg deur die fekaal-orale weg versprei, veral deur besoedelde voedsel en water en veroorsaak oor die algemeen milde hepatiese siektes wat normaalweg sonder enige nagevolge opklaar.

Hepatitis-B-virus (HBV) met sy gedeeltelike dubbelstring-DNA-genoom wat deur 'n omgekeerde transkripsiestap vanaf 'n RNA-pregenoom gesintetiseer word, en sy ongewone fisiese voorkoms, is die prototipe van 'n nuwe klas van virusse, die *Hepadnaviridae*. Alle bewyse dui daarop dat HBV deur intieme en seksuele kontak oorgedra word. Die oppervlaksantigeen (HBsAg) is al in bloed en verskeie ander liggaamsvloeistowwe, soos speeksel, vaginale afskeidings, semen en moedersmelk gevind. Hierdie vloeistowwe word dus geïmpliseer as middels waardeur die virus versprei kan word (Zuckerman, 1986).

Na 'n latente fase van twee tot ses maande kan HBV-infeksie aanleiding gee tot 'n wye spektrum van kliniese toestande soos akute hepatitis, lewersirroze en hepatosellulêre karsinoom (Figuur 2.8). Oor die algemeen bly die siekte egter permanent asimptomaties en persone met akute hepatitis herstel ten volle, na gelang meer teenliggame teen HBV geproduseer word. In uitsonderlike gevalle kan HBV-infeksie aanleiding gee tot fulminerende hepatitis - 'n vinnig progressiewe, dikwels fatale vorm van die siekte wat massiewe gedeeltes van die lewer vernietig. Die beskadiging van die lewer word nie aan 'n meer virulente vorm van die virus toegeskryf nie, maar eerder aan 'n oordadige immuunreaksie deur die gasheer. Die



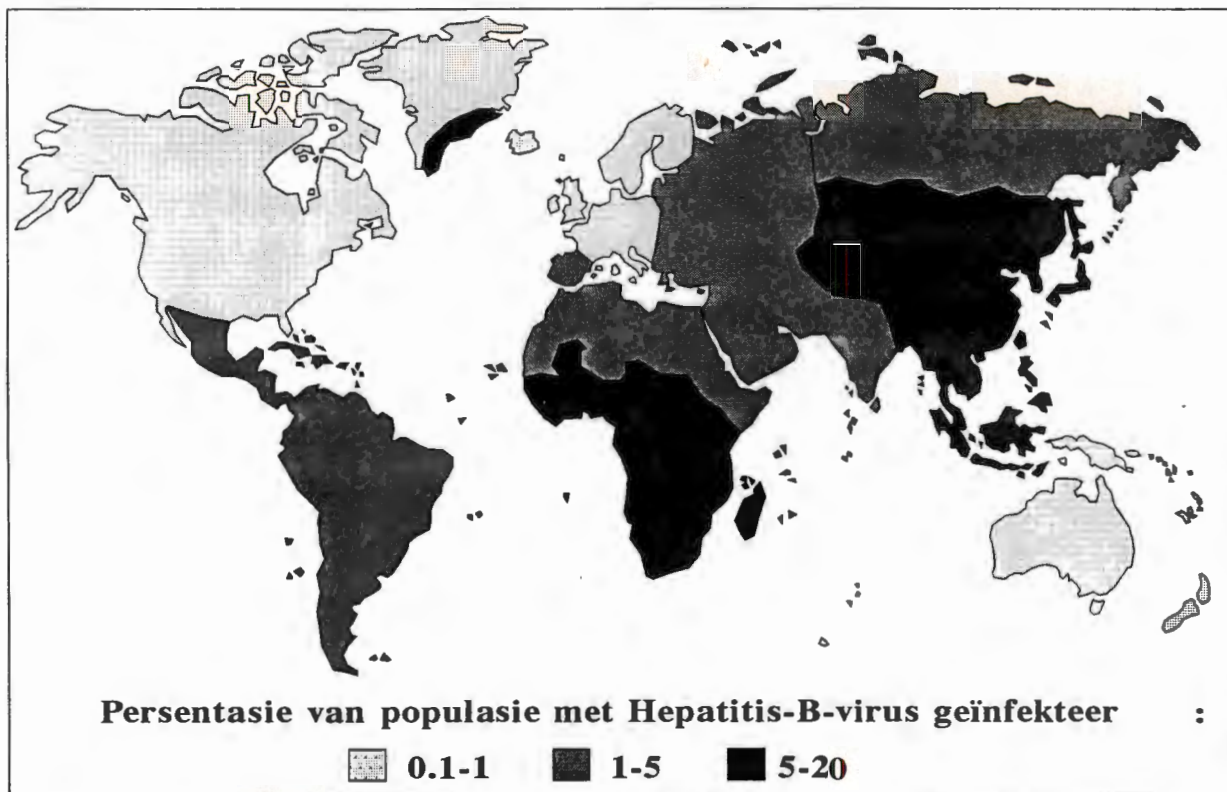
Figuur 2.8. Kliniese sindrome wat met akute en kroniese HBV geassosieer word.
(Saamgestel uit Thomas en Novick, 1984).

gasheer se moord T-limfosiete vernietig geïnfekteerde selle wat van die virale antigene bevat.

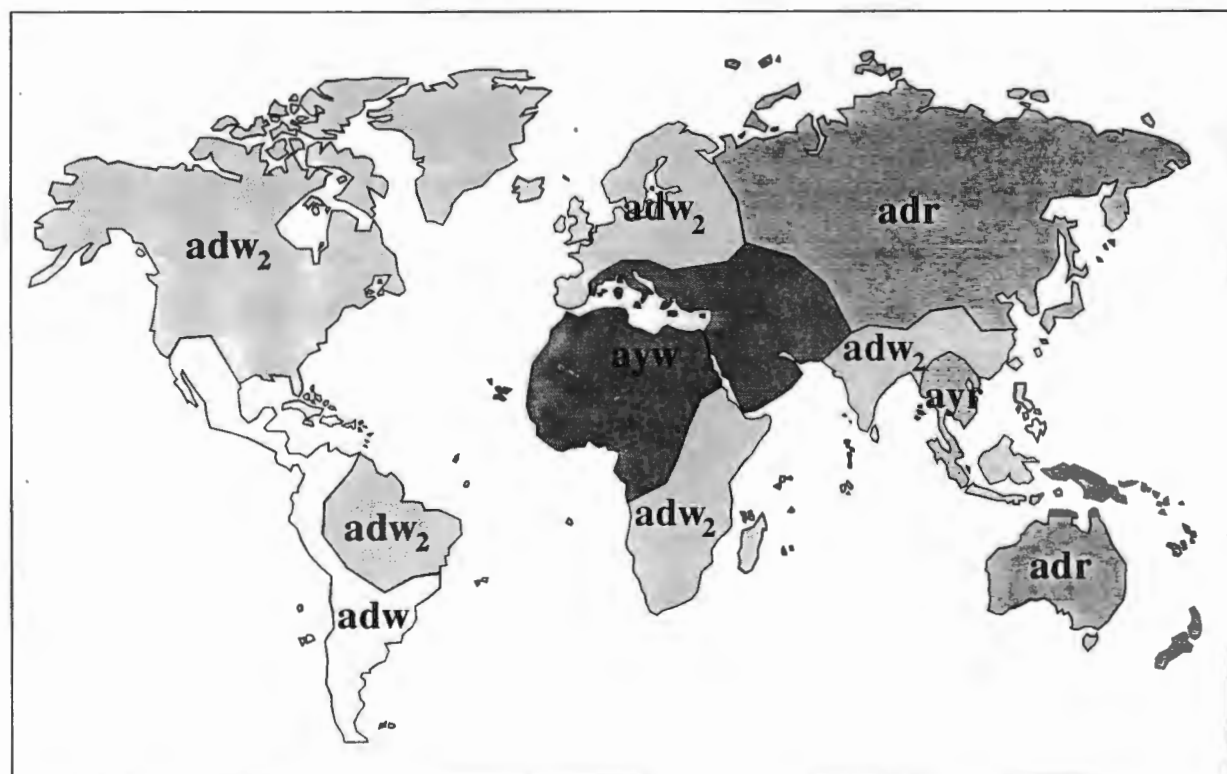
Daarenteen bly die vlakke van virale antigene in sommige pasiënte hoog, terwyl geen teenliggame teen die HBsAg voorkom nie. So kan die virus dan oorleef in die lewer en die pasiënt 'n kroniese draer van HBV word. Die meganisme waardeur hierdie kroniese toestand daargestel word, is nie duidelik nie, maar hou waarskynlik met 'n swak immuunreaksie verband. Hierdie afleiding kan verduidelik waarom ongeveer 80% van alle geïnfekteerde babas kroniese draers word, terwyl die syfer in die geval van volwassenes so laag as 5% is.

Kroniese infeksies kan 'n verskeidenheid vorms aanneem. Sommige kroniese draers is heeltemal gesond en vertoon slegs geringe lewerskade, met geen funksionele afwykings nie. Ander doen kroniese volhardende hepatitis, wat in die algemeen asimptomaties is, op, maar in sommige gevalle ontwikkel dit tot kroniese aktiewe hepatitis wat tot lewersirroze en uiteindelik 'n hepatosellulêre karsinoom aanleiding kan gee. Gewoonlik ontwikkel die kanker nie voor 'n 30- tot 50-jaar lange latente fase nie, maar daar is ook al HBV-verwante hepatosellulêre karsinome by kinders waargeneem. Die duidelike verband tussen kroniese HBV-infeksie en die ontwikkeling van hepatosellulêre karsinome is deur epidemiologiese studies, soos dié deur R. Palmer Beasley (1981) in Taiwan, bevestig. In hierdie ondersoek is aangetoon dat die risiko om 'n hepatosellulêre karsinoom te ontwikkel, 'n honderd maal hoër is in die geval van kroniese draers van HBV.

Indien die groot aantal HBV-geïnfekteerde mense wêreldwyd in ag geneem word, kan die belang van die bogenoemde verband na waarde geskat word en so ook die ontwikkeling van voorkomende en genesende middels wat teen HBV-infeksies gerig is. Van die ongeveer 300 miljoen draers wêreldwyd, kom die oorgrote meerderheid in Suidoos-Asië en tropiese Afrika voor, terwyl Noord-Amerika, die grootste gedeelte van Wes-Europa en Australasië die minste draers het (Figuur 2.9) (Blum *et al.*, 1989, Sherlock, 1990 en Tiollais en Buendia, 1991).



Figuur 2.9. Wêreldverspreiding van HBV. (Aangepas uit Tiollais en Buendia, 1991).



Figuur 2.10. Wêreldverspreiding van die verskillende HBV-hoofsubtypes. Die relatiewe voorkoms van die verskillende subtypes is soos volg: $adw_2 > ayw > adr > adw > ayr$ (Aangepas uit Courouce-Pauty *et al.*, 1983).

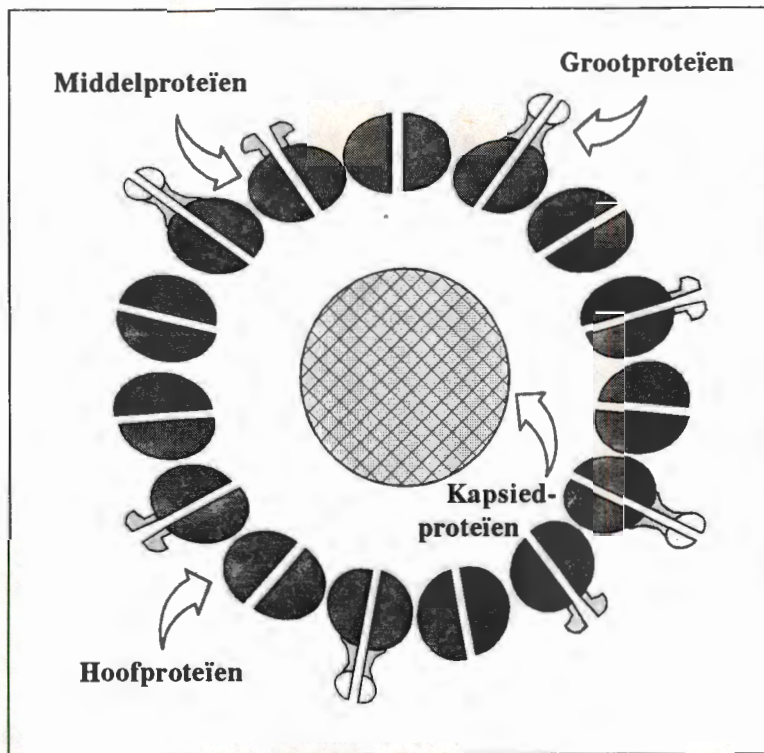
2.3.1. DIE STRUKTUUR VAN MENS-HEPATITIS-B-VIRUS

HBV word in drie morfologies onderskeibare vorms in die bloed van geïnfekteerde pasiënte aangetref :

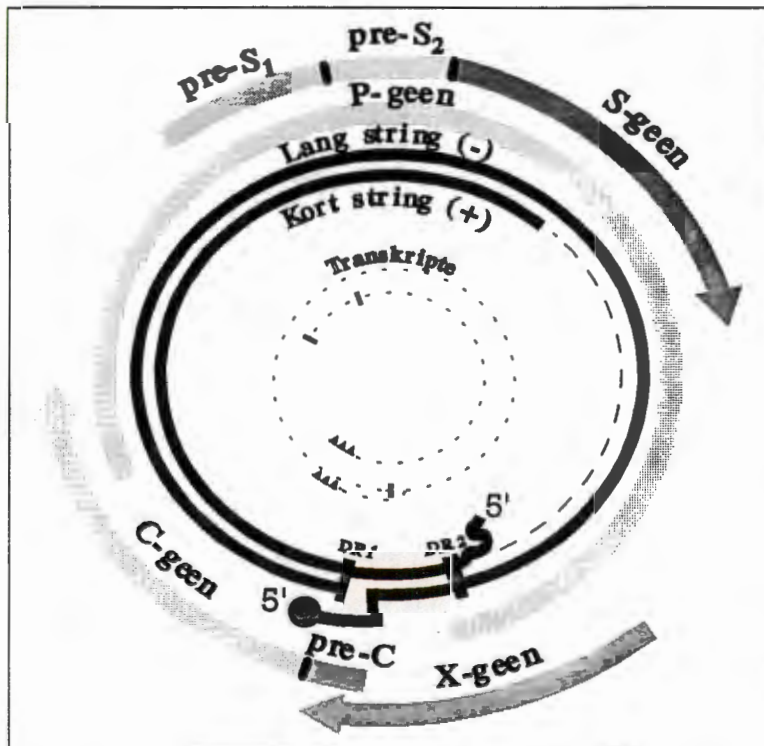
- as sferiese deeltjies met 'n deursnee van ongeveer 22nm,
- as filamentagtige deeltjies met dieselfde deursnee, maar wat etlike honderde nanometer lank kan wees en
- as 'n meer komplekse struktuur van 43nm wat die volledige virion verteenwoordig, bekend as die Dane-partikel (Dane *et al.* 1970).

Al drie hierdie partikels besit die Hepatitis-B-oppervlaksantigeen (HBsAg), 'n 24kD glikoproteïen, op hul oppervlakte. Die 22nm-sfeer en -filamente bestaan uitsluitlik uit 'n kombinasie van die HBsAg en gasheer-afgeleide lipiede. Hierdie is onvolledige, nie-infektiewe viruspartikels sonder nukleïensure en kom in baie hoë konsentrasies, wat van 50 tot 300µg HBsAg/µl serum kan wissel, in die bloed voor (Tiollais *et al.*, 1985). Die rede vir hierdie oormatige sintese is nie seker nie, maar daar word vermoed dat dit as fopvirusse kan optree om teenliggame te adsorbeer tydens 'n immuunreaksie.

Die virion van Hepatitis-B-virus, of die sogenaamde Dane-partikel, bestaan uit 'n mantel en 'n interne nukleokapsied wat die genetiese materiaal omsluit (Figuur 2.11). Analises het getoon dat die mantel uit drie polipeptiede bestaan, naamlik die hoof- (226aa), middel- (281aa), en grootproteïen (389aa). Hierdie proteïene kom in hul geglikosileerde sowel as nie-geglykosileerde vorme voor en word onderskeidelik deur die S-geen, die Pre-S2/S-geen en die Pre-S1/Pre-S2/S-geen gekodeer. Mens-HBV kan op grond van immunologiese determinantgebiede op die virusoppervlak, in verskillende subtypes verdeel word. Die HBsAg besit 'n groepspesifieke determinant, a, en twee subtipiese determinante, een uit die groep d/y en die ander uit die w/r-groep (Le Bouvier, 1971 en Bancroft *et al.*, 1972). Gevolglik kan vier hoofsubtypes onderskei word, naamlik; adw, adr, ayw en ayr, elk met 'n spesifieke geografiese verspreiding (Figuur 2.10) (Courouce-Pauty *et al.*, 1983).



Figuur 2.11. Skematiese voorstelling van die struktuur van HBV. Die mantel bestaan uit drie proteïene, naamlik die groot-, middel- en hoofproteïen, wat onderskeidelik deur die pre-S1/pre-S2/S-, pre-S2/S-, en S-geen gekodeer word. Die kapsied bestaan uit die C-geenprodukt (HBcAg) en omsluit die genetiese materiaal (Aangepas uit Tiollais en Buendia, 1991).



Figuur 2.12. Skematiese voorstelling van die genetiese organisasie van HBV. Oopleesrame word deur pyle aan die buitekant van die genoom voorgestel, terwyl die twee groepe transkripte deur stippellyne binne-in die genoom aangedui word. (Aangepas uit Blum *et al.*, 1989).

Hierdie subtypes word as die fenotipiese uitdrukking van vier genotipes van HBV aanvaar (Le Bouvier *et al.*, 1972). Subtypespesifisiteit kan dus toegeskryf word aan veranderinge in die aminosuurvolgorde van die 226aa polipeptied (HBsAg), wat deur die S-geen gekodeer word (Gold *et al.*, 1976 en Shih *et al.*, 1978). Veelvuldige mutasies in die S-geen se koderingsvolgorde het dan ook bykomende determinante, soos q, x en g en ook die heterogenisiteit van byvoorbeeld w, tot gevolg (Siddiqui *et al.*, 1979). So kan meer komplekse en minder algemene subtypes soos adyw en adywr gevorm word (Courouc -Pauty *et al.*, 1983). Die nukleokapsied bestaan uit die Hepatitis-B-kernantigeen (HBcAg), wat deur die C-geen gekodeer word, en omsluit die DNA-polimerase/omgekeerde transkriptase en die virale DNA.

2.3.2. DIE GENETIESE ORGANISASIE VAN MENS-HEPATITIS-B-VIRUS

Die HBV-genoom is 'n gedeeltelike dubbelstring, oop sirkelvormige molekule (Figuur 2.12) met 'n lang DNA-string (L-string of (-)-string) van ongeveer 3200bp en 'n kort DNA-string (S-string of (+)-string) van tussen 1600 en 2800bp (Summers *et al.*, 1975). Aan die 5'-punt van die L-string is daar vyf tot tien oortollige base wat dus tot gevolg het dat die 3'-punt en die 5'-punt ooreenstem. Die 5'-punte van die twee stringe oorvleuel met ongeveer 250 tot 300 base, om sodoende die sirkelvormige struktuur van die DNA te behou. Verder is daar ook 'n kovalentgekoppelde prote en aan die 5'-punt van die L-string en 'n oligoribonukleotied aan die 5'-punt van die S-string. 'n Elf-basevolgorde in die oligoribonukleotied is komplement r aan die aangrensende L-string en dieselfde volgorde word naby die einde van die oorvleueling herhaal. Hierdie twee direkte herhalingsvolgordes (DR1 en DR2) speel 'n belangrike rol tydens DNA-replisering en word gereeld as punte vir integrering met die gasheergenoom gebruik.

Klonering en volgordebepaling van die HBV-genoom het getoon dat vier oop leesrame (ORF's) eksklusief in die L-string voorkom (Figuur 2.12). Alhoewel die presiese posisies van die leesrame mag verskil, is die algehele organisasie van die leesrame gekonserveer tussen die verskillende subtypes. Vir sub tipe adw₂ is hierdie gene soos volg gespesifiseer:

- Pre-S/S-geen; drie in-fase oop leesrame bekend as die Pre-S1-, Pre-S2- en S-gebiede wat kodeer vir die drie oppervlaksproteïene (HBsAg). Die Pre-S2/Pre-S1/S-geen, Pre-S2/S-geen en S-geen kodeer onderskeidelik vir die groot-(389aa), middel-(281aa) en hoofproteïen (226aa). Hierdie gene oorvleuel ten volle met die P-geen.
- Pre-C/C-geen; twee in-fase oop leesrame. Die C-geen kodeer vir die Hepatitis-B kernproteïen (HBcAg), wat die nukleokapsied vorm, terwyl die kort opstroom Pre-C-gebied 'n seinvolgorde spesifiseer wat essensieel is vir die sintese en uitskeiding van 'n verwerkte kernproteïen, die e-antigeen (HBeAg). Die 3'-punt van die C-geen oorvleuel met die P-geen en die 5'-punt van die Pre-C-gebied oorvleuel met die X-geen.
- P-geen; kodeer vir die DNA-polimerase/omgekeerde transkriptase en vir die proteïen wat kovalent aan die 5'-punt van die L-string gekoppel is.
- X-geen; hierdie geen kodeer vir 'n proteïen met transaktiveringsaktiwiteit, waarvan die funksie nog nie vasgestel is nie (Al hierdie gegewens word in Tabel 2.5 opgesom).

Twee groepe mRNA's word vanaf die genoom getranskribeer (Figuur 2.12). Die groot: transkripte of genomiese RNA-spesies; van ongeveer 3.5kb begin naby die 5'-punt van die Pre-C/C-geen en kodeer vir die HBcAg, HBeAg en DNA-polimerase/omgekeerde transkriptase. Hierdie transkrip tree ook as die pre-genoom tydens virusreplisering op. Korter transkripte of subgenomiese RNA-spesies van ongeveer 2.4kb, 2.1kb en 0.65kb begin in die 5'-punt, stroomop of stroomaf van die Pre-S/S-geen en kodeer vir die oppervlaksproteïene en die X-proteïen.

Tabel 2.5. Opsomming van die verskillende oopleesrame in die HBV-genoom soos vir subtipte adw₂ bepaal.

Geen	Ligging *	Lengte (bp)	Lengte (aa)	Proteïen	Funksie
S-geen	157-837	681	226	HBsAg	Mantel
pre-S1	2856-3212	357	118	pre-S1	Mantel
pre-S2	3213-156	165	55	pre-S2	Mantel
pre-C	1816-1902	87	29	HBeAg	?
C-geen	1903-2460	558	185	HBcAg	Kapsied
P-geen	2309-1625	2538	845	Polimerase	Pol/Otr [®]
X-geen	1376-1840	465	154	HBxAg	?

* Ligging van inisiasie- en terminasiekodon deur gebruik te maak van die enkele EcoR I restriksiepunt as die raamverwysing.
 ® DNA-polimerase en omgekeerde transkriptase.

2.3.3. BIOLOGIESE ASPEKTE VAN HBV-INFEKSIE

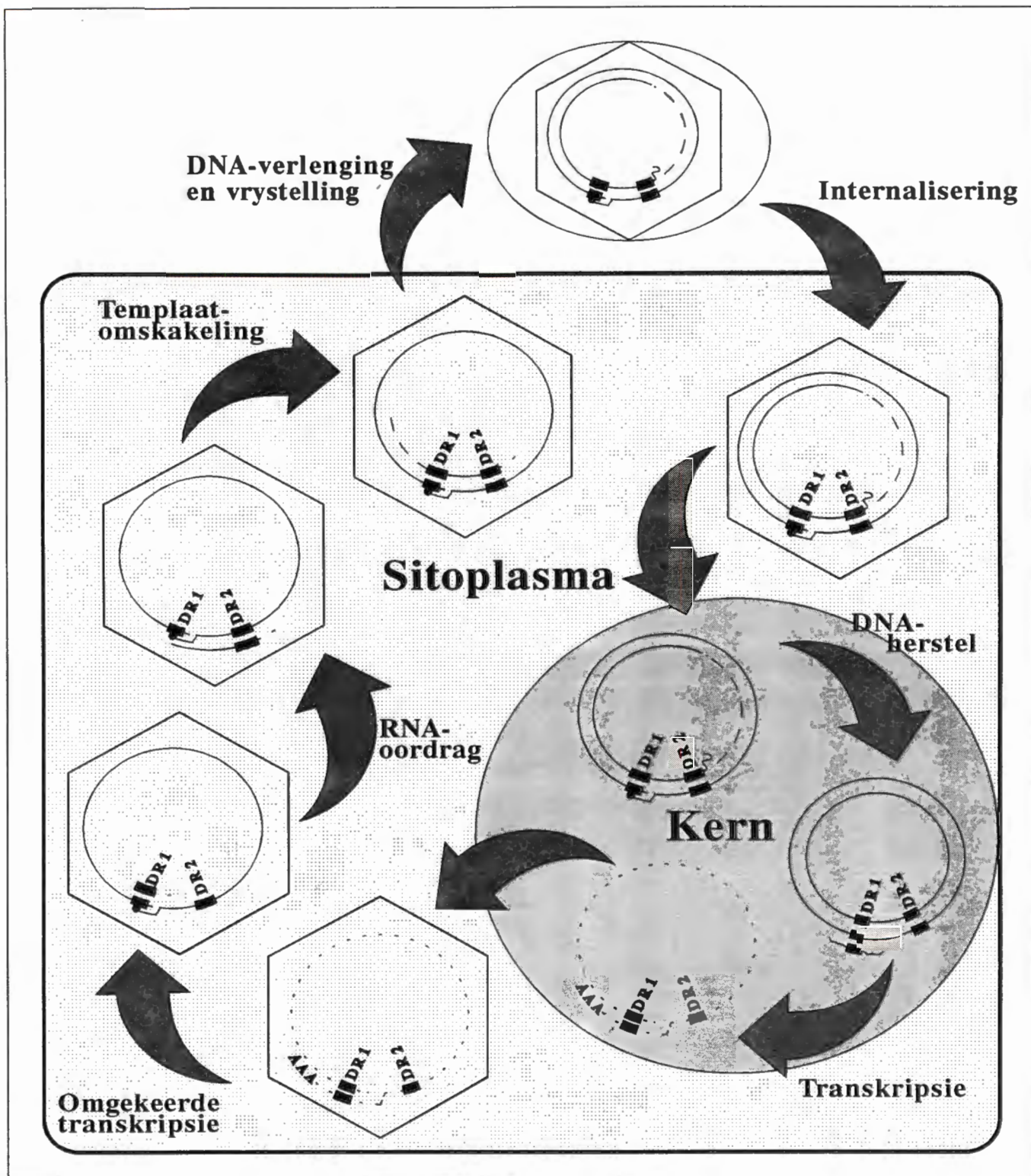
HBV-infeksie kan in vier stadia verdeel word, naamlik :

- Vashegting aan die teikenselle en internalisering.
- Virusreplisering.
- Virale geenuitdrukking.
- Virale integrering.

(Figuur 2.13)

2.3.3.1. VASHEGTING AAN DIE TEIKENSEL EN INTERNALISERING

'n Uitsonderlike kenmerk van hepadnavirusinfeksies is hul spesie-spesifisiteit en hepatotropisme. Alhoewel die meganismes onderliggend aan hierdie spesifisiteit nie duidelik is nie, lyk dit asof die binding aan lewerselle en internalisering deur 'n



Figuur 2.13. Die voorgestelde strategie vir HBV-replisering. In hierdie voorstelling word virale DNA deur 'n soliede lyn en RNA deur 'n stippellyn voorgestel. Die replisering van HBV word onder dieselfde punte soos in die figuur uiteengesit, volledig in die teks beskryf (Saamgestel uit Schaller, 1988 en Blum *et al.*, 1989).

spesifieke reseptor op die lewersel gefasiliteer word. Hierdie reseptor herken en bind 'n peptied wat deur die Pre-S1-geen gekodeer word. Nadat die virus geïnternaliseer is en die mantel en die nukleokapsied verwyder is, beweeg virale DNA na die kern. Op hierdie stadium kan die virale genoom een van drie weë volg, naamlik: dit kan in die latente fase bly, begin repliseer en transkribeer of in die gasheersel se genoom integreer (Blum *et al.* 1989).

2.3.3.2. VIRALE REPLISERING

Hepadnavirusse verskil van ander dier-DNA-virusse deurdat hulle replisering 'n omgekeerde transkripsiestap vanaf 'n intermediêre RNA insluit. Die replisering van 'n hepadnavirusgenoom behels die volgende stappe (Figuur 2.13):

- **Virion DNA-herstel.** Die oop sirkelvormige DNA word herstel om 'n kovalent geslote sirkelvormige DNA-molekule te vorm, wat as templaar vir transkripsie kan optree. Hierdie stap behels die voltooiing van die S-string deur DNA-polimerase, die verwydering van die oligoribonukleotied aan die 5'-punt van die S-string deur RNase en die proteïene aan die 5'-punt van die L-string deur proteases, die verwydering van die oortollige volgordes aan die 5'-punt van die L-string deur DNase en die finale stap, ligering van die DNA-punte deur 'n DNA-ligase.
- **RNA-pregenoomsintese.** 'n Gepoliadenileerde RNA-pregenoom van ongeveer 3.5kb, met oortollige terminale volgordes, word vanaf die L-string getranskribeer; geïnisieer deur die C-geenpromotor. Hierdie stap word waarskynlik deur die gasheersel se RNA-polimerase II gekataliseer. Hierna word die RNA-pregenoom na die sitoplasma verplaas en in 'n nukleokapsied (HBcAg) verpak waarbinne omgekeerde transkripsie plaasvind.
- **L-string DNA-sintese.** L-string DNA-sintese begin in die DR1-gebied van die pregenoom se 3'-oortollige volgordes. Deur omgekeerde transkripsie word die L-string gegenereer, terwyl RNase H die RNA-templaar degradeer.

- S-string DNA-sintese. 'n Kort oligoribonukleotied wat waarskynlik die 5'-punt van die pregenoom was, verskuif na die DR2-gebied van die L-string en tree as voorvoerder vir S-stringsintese op. Die S-string kan nou egter net tot by die 5'-punt van die L-string verleng word, sodat 'n intramolekulêre templaatomskakeling nodig is. Hiervoor word die oortollige volgordes aan die 5'-punt van die L-string gebruik, aangesien vyf tot tien base aan die 3'-punt van die nuwe S-string nou komplementêr aan die eerste vyf tot tien base aan die 3'-punt van die L-string is. Hierdie templaatomskakeling het ook die 250 tot 300 base-oorvleueling van die 5'-punte tot gevolg, sodat die virale genoom sy sirkelvormige vorm kan behou.
- Gedurende die sintese van die L- en S-stringe word volledige virione gevorm, deurdat die nukleokapsied deur die oppervlaksproteïene bedek word om die mantel te vorm. Die volledige virus word dan uit die lewerselle vrygestel en in die bloed gestort (Blum *et al.* 1989 en Will *et al.* 1987).

2.3.3.3. VIRALE GEENUITDRUKKING

Al die virale transkripte is ongesplyt, besit S-stringpolariteit en is gepoliadenileer by 'n gemeenskaplike 3'-punt wat in die C-geen geleë is (Seeger *et al.*, 1987). Daar is min bekend oor die meganismes en faktore wat die transkripsie van die verskillende RNA-spesies reguleer. Twee gebiede in die HBV-genoom is as transkripsionele aktiveringsvolgordes geïdentifiseer, naamlik; 'n gebied tussen nukleotide 1080 en 1234 wat die transkripsie van die C-geen en die S-gene beheer (Roossinch *et al.*, 1986 en Faktor *et al.*, 1988) en 'n glukokortikoïed-responsiewe element (Tur-Kaspa *et al.*, 1986). HBV-aktiveringselemente is veral aktief in lewerselle wat die hoë lewerspesifieke uitdrukking van HBV tot gevolg het. Verder is daar aanduidings dat die X-proteïen van HBV 'n trans-aktiveringsfaktor vir virale aktiveringsvolgordes is, wat in staat is om virale geenuitdrukking en dalk replisering te moduleer. Die produksie van beide RNA-spesies in 'n wye verskeidenheid getransfekteerde selle

dui daarop dat die meeste seltipes HBV-geenuitdrukking en replisering tot 'n mate kan onderhou as die virale DNA eers geïntegreer het (Ganem *et al.*, 1987 en Moeroey *et al.*, 1986). Die feit dat hoëvlak geenuitdrukking en replisering slegs in hepatosiete onderhou kan word, word aan weefselspesifieke transkripsiefaktore toegeskryf.

2.3.3.4. VIRALE INTEGRERING

Geïntegreerde HBV-DNA is al waargeneem in die genome van nie-neoplastiese hepatosiete van pasiënte met kroniese HBV-infeksie, in neoplastiese lewerselle van pasiënte met hepatosellulêre karsinome en in hepatosellulêre karsinoom-afgeleide sellyne (Tiollais *et al.*, 1985 en Ganem *et al.*, 1987). Omvangryke ondersoeke na die struktuur en volgorde van geïntegreerde virale DNA en die aangrensende gasheervolgordes, het die volgende feite aan die lig gebring:

- Geïntegreerde HBV-DNA het altyd subgenomiese groottes (dit is kleiner as die genoom).
- Dit kan koliniêr of omgekeerd ten opsigte van die gasheergenoom geïntegreer wees.
- Veelvuldige herrangskikkings, insluitende delesies en direkte en/of omgekeerde duplisering, kom gereeld voor.

Afhangende van die fisiese struktuur en die mate van metilering van die geïntegreerde virale DNA, word virale proteïene (HBsAg, HBcAg, HBxAg en DNA-polimerase/omgekeerde transkriptase) in hepatosellulêre karsinoomselle uitgedruk. Aangesien die integrasies altyd subgenomies is en veelvuldige herrangskikkings voorkom, kan die pregenomiese RNA as intermediêr vir virale replisering nooit getranskribeer word nie.

Die molekulêre meganismes wat virale integrering en moontlike uitsplyting beheer, is tans nog onbekend. HBV-integrasies is al in 'n verskeidenheid chromosome

geïdentifiseer en dit lyk asof integrasie op 'n ewekansige wyse plaasvind. Dit wil voorkom asof die enigste aspek van virale integrering wat nie ewekansig plaasvind nie, die gereelde gebruik van volgordes naby die twee direkte herhalingsgebiede as integreringspunte, is (Dejean *et al.*, 1984).

2.4. PROBLEEMSTELLING EN BENADERINGSWYSE

Soos reeds beklemtoon is, is HBV-infeksies 'n groot probleem regdeur die wêreld en veral ook in Suid-Afrika. Met ongeveer 14 000 HBV-verwante sterftes per jaar in Suid-Afrika, wat voorkom kan word deur HBV-replisering en -geenuitdrukking in geïnfekteerde pasiënte te inhibeer, is die belang van so 'n geneesmiddel vanselfsprekend. Aan die ander hand is die potensiaal van die antisens-tegnologie om geenuitdrukking selektief te inhibeer, ook breedvoerig bespreek. Teoreties wil dit voorkom asof hierdie relatief nuwe tegnologie een van die beste strategieë sal wees om HBV-replisering in die gasheer te inhibeer.

Hierdie studie is daarom van stapel gestuur om die toepasbaarheid van antisens-inhibisie van HBV-geenuitdrukking te evalueer. Aangesien geen soortgelyke werk voorheen in hierdie laboratorium gedoen is nie, was die spesifieke doel van hierdie studie die daarstelling van 'n verwysingsraamwerk vir antisens-oligonukleotiedgemedieerde inhibisie van HBV-geenuitdrukking, wat later tot die inhibisie van virale replisering kan lei. In hierdie projek is die inhibisie van HBsAg-uitdrukking in heptosellulêre karsinoomsellyne ondersoek.

Die studie kan in twee dele verdeel word, naamlik:

- Beplanning en karakterisering van die "projek-infrastruktuur" wat die volgende insluit:
 - Genetiese analise van al die beskikbare HBV-DNA-volgordes in die internasionale databasis om moontlike antisens-teikengebiede en

gekonserveerde gene, wat 'n belangrike rol tydens replisering mag speel, te identifiseer (Hoofstuk 3).

- Die subklonering van 'n HBV-genoom in 'n vektor waarmee dit maklik vermenigvuldig kan word vir verdere gebruik. Hierdie gebruike sluit onder andere die karakterisering van die HBV-genoom ten opsigte van sy sub tipe en die subklonering van verskeie fragmente in uitdrukings- en antisensuitdrukingsvektore in (Hoofstuk 4).
- Identifisering van 'n geskikte toetsstelsel en die karakterisering daarvan ten opsigte van HBV-nukleïensuurvolgordes (Hoofstuk 5).
- Uitvoering van die inhibisie-eksperimente. HBsAg-uitdrukking is spesifiek in PLC/PRF/5-selle geïnhibeer met behulp van 6 antisens-oligonukleotiede wat teen 2 verskillende teikengebiede in die S-geen gerig is (Hoofstuk 6).

HOOFSTUK 3

'n VERGELYKENDE GENETIESE STUDIE VAN HBV EN VERWANTE HEPADNAVIRIDAE

3.1. INLEIDING EN DOELSTELLING

Soos reeds in Hoofstuk 2 genoem is, kan HBV op grond van antigeniese determinantgebiede in die mantel van die virus, met ander woorde in die HBsAg, in verskillende subtypes ingedeel word. 'n Groepspesifieke determinant, a, asook twee subdeterminante, d óf y en w óf r, is in alle HBsAg-preparate teenwoordig en gevolglik kan vier hoofsubtypes, adw, adr, ayw en ayr onderskei word (Le Bouvier, 1971 en Bancroft *et al.*, 1972). Die feit dat die subdeterminante as 'n reël onderling eksklusief voorkom, dit wil sê slegs d óf y en w óf r, dui daarop dat hulle op twee spesifieke allele geleë is (Le Bouvier, 1971 en Bancroft *et al.*, 1972). Verder word beide die groepspesifieke en die subtypespesifieke HBsAg- determinante in die hoofproteïen (22kDa) aangetref, wat weer daarop dui dat die variasie in antigenisiteit verband hou met veranderinge in die primêre struktuur van die reaktiewe polipeptiede (Gold *et al.*, 1976 en Shih *et al.*, 1978).

Hierdie subtypes word aanvaar as die fenotipiese vergestaltung van verskillende HBV-genotipes (Le Bouvier *et al.*, 1972). Ondersoeke deur Okamoto en sy medewerkers het egter getoon dat die vier hoof antigenies-gedefinieerde subtypes nie 'n betroubare aanduiding van die werklike genotipiese variasie gee nie (Okamoto *et al.*, 1986 en 1988). Dit wil dus voorkom asof die genotipiese variasie, wat

gekarakteriseer kan word deur veranderinge in die antigenisiteit van die mantelpolipeptied, slegs die puntjie van die ysberg is. Aansienlike volgordeverskille wat geen invloed op die epitope in die mantel sal hê nie, mag dus in die res van die HBV-genoom voorkom. Die nukleotiedvervangings tempo vir die HBV-genoom op 'n spesifieke posisie per jaar is tussen 1.4×10^{-5} en 3.2×10^{-5} (Okamoto *et al.*, 1987), wat soortgelyk is aan dié van RNA-retrovirusse (Holland *et al.*, 1982), 10^2 maal laer as dié van die *env*-geen van HIV (Hahn *et al.*, 1986) en 10^4 maal hoër as dié van die meeste DNA-genome (Holland *et al.*, 1982).

Die belang van sulke mutasies vir die ontwikkeling van volgorde- en struktuur-afhanklike antivirale middels, soos byvoorbeeld vir die antisens-tegnologie en entstowwe, is vanselfsprekend. 'n Omvangryke vergelyking van al die beskikbare HBV-nukleotiedvolgordes was dus noodsaaklik alvorens die teikenvolgordes vir die antisens-oligonukleotiede, met inagneming van die verskille, gekies kon word. Deur die verskillende subtypes se nukleotiedvolgordes te vergelyk, kan gebiede wat in al die subtypes gekonserveer is, geïdentifiseer word. 'n Enkele antisens-oligonukleotied wat teen sulke volgordes geteiken is, sal dus in staat wees om selektief met hierdie volgordes in al die subtypes te hibridiseer. Terselfdertyd kan die stabiliteit van 'n spesifieke geen of slegs 'n gedeelte daarvan, 'n aanduiding van die belang van hierdie gebied in die lewenssiklus van die virus gee. Die grootste invloed op virusreplisering behoort dus die eliminerings van juis hierdie proteïen(e) wat die meeste gekonserveer is, te wees.

As gevolg van sy interessante en unieke eienskappe, is HBV met sy identifisering in die laat 1960's en selfs lank daarna, as 'n unieke virustipe beskou. In 1978 is die eerste van verskeie ander diervirusse wat dieselfde ultrastruktuur, molekulêre en biologiese eienskappe as HBV besit het, geïsoleer (Summers *et al.*, 1978). Hierdie ander virusse wat in die *Hepadnaviridae*-familie ingesluit word, is:

- Drie knaagdiervirusse, naamlik die Virginiese marmot-hepatitisvirus (WHV) wat uit *Marmota monax* geïsoleer is (Summers *et al.*, 1978 en Werner *et al.*, 1980),

die grondeekhoring-hepatitisvirus (GSHV) uit *Spermophilus beecheyi* (Marion *et al.*, 1980a en Seeger *et al.*, 1984) en die muis-hepatitisvirus (MHV), wat deur Spaan *et al.* (1983) geïsoleer is.

- Twee voëlvirusse, naamlik die eend-hepatitisvirus (DHV)(Mandart *et al.*, 1984) en die reier-hepatitisvirus (HHV)(Sprengel *et al.*, 1988), wat onderskeidelik uit *Anus domesticus* en *Ardea cinerea* geïsoleer is.
- Hierbenewens is daar ook 'n primatevirus uit sjimpansees geïsoleer, die sjimpansee-hepatitisvirus (CHV)(Vaudin *et al.*, 1988) en laastens is 'n hond-hepatitisvirus (CNHV) deur Shinagawa en sy medewerkers (1983) geïsoleer.

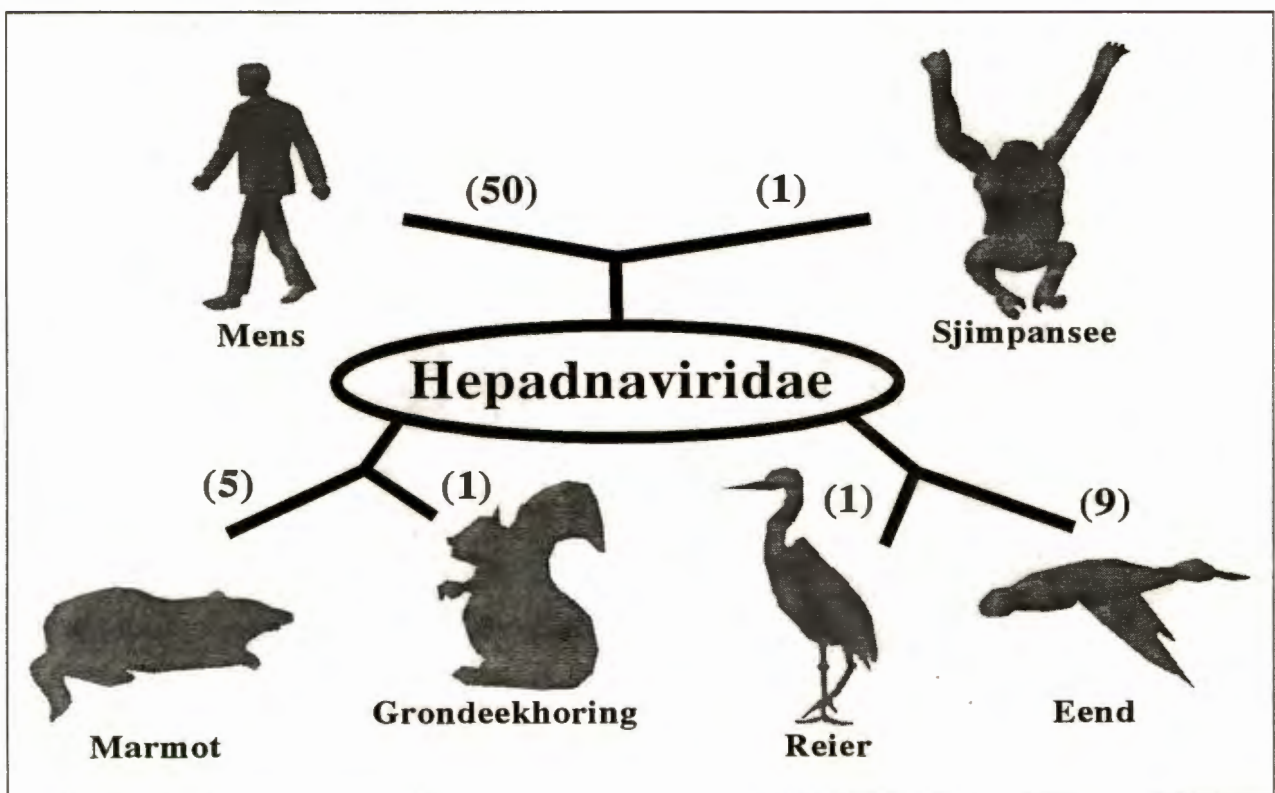
Alhoewel die virale- en geenstrukture van hierdie virusse sekere basiese eienskappe gemeen het, verskil hul mate van patogenisiteit dramaties. So byvoorbeeld is WHV 'n hoogs onkogeniese virus, wat hepatosellulêre karsinoom veroorsaak in meer as die helfte van die kronies geïnfekteerde diere (Summers *et al.*, 1978 en Summers, 1981). In teenstelling hiermee is GSHV glad nie karsinogenies nie en het dit geen noemenswaardige patogeniese gevolge in geïnfekteerde grondeekhorings nie, ten spyte daarvan dat die virus wel in sy gasheer repliseer (Ganem *et al.*, 1987, Marion *et al.*, 1980b en Mason *et al.*, 1982). Indien die rede(s) vir hierdie groot verskil in patogenisiteit tussen twee sulke naverwante virusse vasgestel kan word, kan dit dalk bydra tot die opklaring van die karsinogenisiteit van HBV. Deur die verskillende virusse se genetiese samestellings en hul verskillende proteïenprodukte te vergelyk, kan daar dalk 'n aanduiding verkry word van die meganisme waardeur patogenese geïnduseer word. So kan hierdie vergelykings help om 'n spesifieke volgorde uit te sonder wat as teken vir antisens-volgordes kan dien.

3.2. DNA-VOLGORDE-ANALISES VAN VERSKEIE *HEPADNAVIRIDAE*

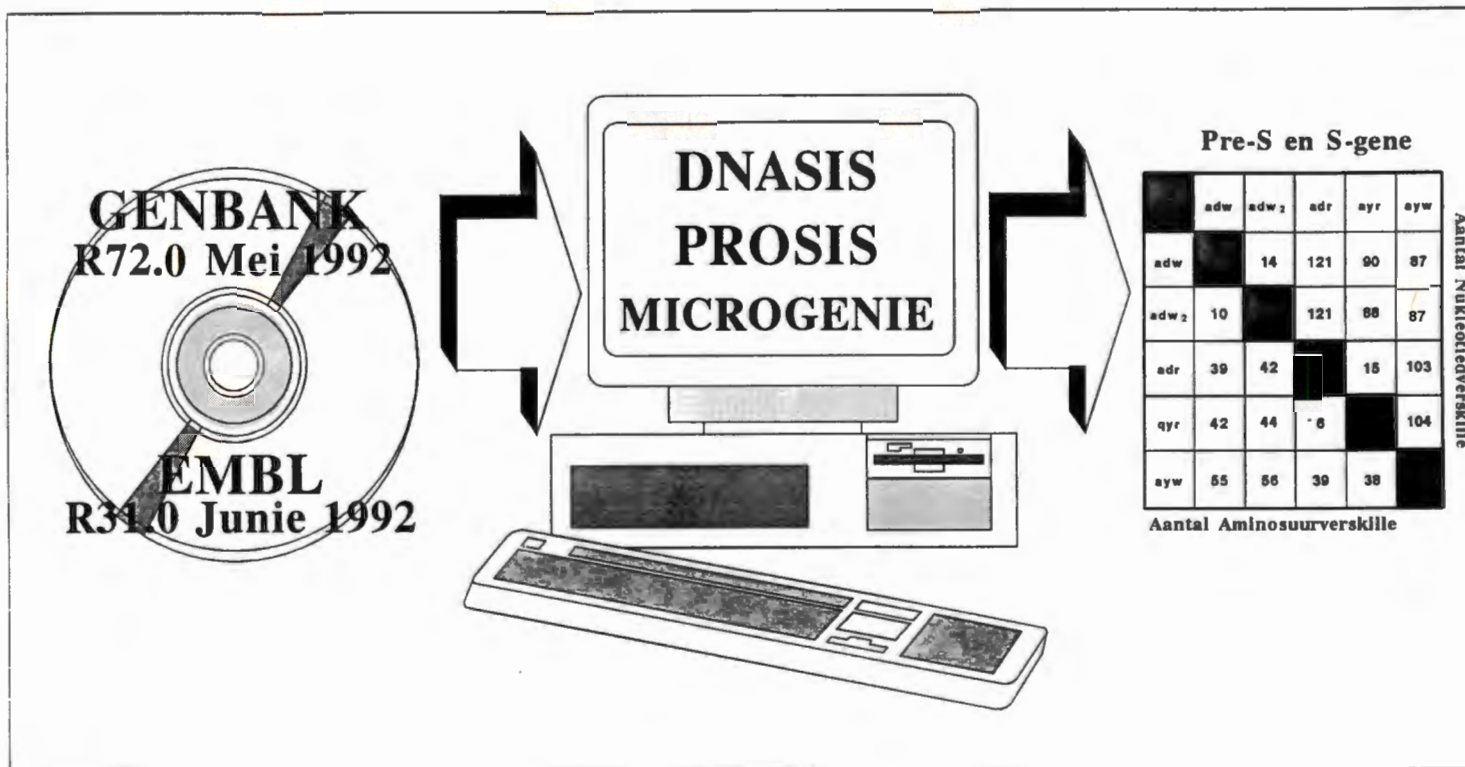
Meer as 800 verskillende hepadnavirus- en verwante DNA-volgordes is in die twee genetiese databanke, GENBANK en EMBL onder "hepatitis" gelys. Die meeste van hierdie volgordes kom egter in beide databanke voor, met die gevolg dat slegs

sowat 400 verskillende volgordes onderskeibaar was waaruit die volgordes vir die analyses gekies kon word. Volgordes wat nie vir hierdie analyses in ag geneem is nie, sluit die volgende in:

- Onvolledige volgordes, soos byvoorbeeld spesifieke mRNA-domeine en integreringsgebiede.
- Volgordes wat slegs indirek met HBV geassosieer is, soos byvoorbeeld volgordes van anti-HBV-immunoglobuliene.
- Al die volgordes van Hepatitis-A, -nie-A/nie-B, -C, -D en -E.
- Die enigste beskikbare HBV-verwante virusvolgordes wat nie in hierdie analyses gebruik is nie, is muis- en hond-hepatitisvirus, aangesien slegs klein gedeeltes van hierdie virusgenome se volgordes reeds bepaal is.



Figuur 3.1. 'n Skematiese voorstelling van die *Hepadnaviridae*-volgordes wat tydens hierdie analyses vergelyk is. Die getalle in hakies verteenwoordig die aantal verskillende volgordes van elke tipe wat vir die analyses beskikbaar was.



Figuur 3.2. 'n Vloediagram wat die metodologie van die volgordevergelykings aantoon. Hepadnaviridae-volgordes in twee internasionale databanke is met behulp van verskeie sagtewarepakette geanaliseer en vergelyk. Resultate van hierdie analyses word in verskilmatrikse en filogenetiese bome saamgevat.

Die virusvolgordes en die aantal volgordes van elk wat beskikbaar was vir die vergelykings, word skematies in Figuur 3.1 voorgestel. Al die vergelykings en analyses is met die sagtewarepakette MICROGENIE (V5.0, 1988), DNASIS (V7.0, 1991) en PROSIS (V7.0, 1991) gedoen (Figuur 3.2).

In die eerste analyse wat uitgevoer is, is die volledige nukleotiedvolgordes van die verskillende H₃V-subtipies met mekaar vergelyk. Hieruit kon 'n aanduiding verkry word van die mate waarin die volgordes ooreenstem en kon enige opvallende ooreenkomste (gekonserveerde volgordes) en verskille (delesies en leesrame) geïdentifiseer word. Die volledige nukleotiedvolgordes is aan mekaar gelyk gestel deur die enkele EcoR I-restriksiepunt wat in die pre-S₂-gebied geleë is, as die gemeenskaplike 5'-punt te neem (Bylaag 1). Subtype adw₂ is gebruik as die basis

vir hierdie vergelykings, omdat dit die grootste genoom het en die mees volledige genoom sonder enige deleesies is. Verder is dit ook die sub tipe wat mees algemeen in Suider Afrika voorkom (Courouc -Pauty *et al.*, 1983). Hierna is die afsonderlike gene se nukleotied- en aminosuurvolgordes ook met mekaar vergelyk om vas te stel of die verwantskappe wat tussen die subtypes se volledige genome waargeneem is, tussen die onderskeie gene herhaal word (Bylaag 2). Die mate waarin 'n sekere geen of gedeeltes daarvan gekonserveer bly, gee terselfdertyd ook 'n aanduiding van daardie geenproduk, of ten minste 'n gedeelte daarvan, se belang in die lewenssiklus van die virus.

In die geval van die ander dier-hepadnavirusse was die eerste stap die identifisering van oop leesrame, om sodoende 'n aanduiding van die virusse se genetiese organisasies te verkry (Figuur 3.15). Hierna is die volledige genome en die afsonderlike gene se volgordes op dieselfde wyse as wat hierbo beskryf is, met mens-HBV, sub tipe adw₂, en die ander diervirusse vergelyk.

3.3. RESULTATE EN BESPREKING VAN DIE VERGELYKINGS

Soos reeds genoem is, was die hoofdoel van hierdie volgordevergelings die identifisering van geskikte teikenvolgordes vir antisens-oligonukleotiede. Drie dinge word met die begrip "geskikte teikenvolgordes" bedoel, naamlik:

- Effektiewe hibridisering moet tussen die teikenvolgorde en die antisens-oligonukleotiede kan plaasvind. In die eerste plek beteken dit natuurlik dat die twee volgordes ten volle komplement r moet wees. Hierdie voorvereiste word veral belangrik indien daar in ag geneem word dat HBV verskeie subtypes het. 'n Effektiewe antisens-volgorde moet dus die teikengeen spesifiek inhibeer en dit terselfdertyd vir al die subtypes doen. Dit kan bewerkstellig word deur gekonserveerde volgordes in die teikengeen as die teikengebied te identifiseer.
- Antisens-volgordes sal ook meer effektief wees indien hulle met meerdere sellul re prosesse, wat te doen het met die uitdrukking van die teikengeen,

inmeng. So sal 'n antisens-oligonukleotied wat byvoorbeeld met die translasië-inisiasiegebied oorvleuel, terselfdertyd die mRNA met behulp van Rnase H-aktiwiteit help degradeer en ribosoombinding verhoed.

- In hierdie geval waar die uiteindelijke doel van 'n meer uitgebreide projek die inhibisie van virusreplisering mag wees, is dit ook belangrik om 'n geen wat 'n kritiese rol in die lewenssiklus van die virus mag speel, as teiken te identifiseer. Volgordes wat belangrik is vir die oorlewing van die virus kan met behulp van volgorde-analises geïdentifiseer word, indien aangeneem word dat sulke volgordes gekonserveer behoort te wees. Die mate waartoe 'n geen in sy totaal tussen verskillende subtypes gekonserveer is, kan dus 'n aanduiding van die kritiese aard van die geen se funksie gee. Hierdie aanname word gebaseer op die feit dat hierdie gekonserveerde gedeeltes nie ontstaan omdat mutasies nie hier plaasvind nie, maar deurdat klone wat wel mutasies in hierdie gebiede ondergaan, nie kan oorleef nie. Al die subtypes wat bekend is en wat hier vergelyk is, is dus klone wat in staat was om die mutasies wat hulle ondergaan het, te oorleef.

Aangesien die volledige volgordevergelykings lank en omslagtig is, word dit slegs aan die hand van enkele voorbeelde geïllustreer (verwys na Bylae 1 en 2). Alle vergelykings se resultate word egter in meer hanteerbare vorms, soos byvoorbeeld in verskil- of ooreenstemmingsmatrikse en skematiese voorstellings, opgesom en weergegee (Patterson, 1980 en Kimura, 1982). Die doel van hierdie matrikse is uitsluitlik om aan te toon watter van die gene die meeste gekonserveer gebly het. Indien meer as een volgorde van 'n spesifieke mens-HBV-subtype of diervirus vir die vergelykings beskikbaar was, is die gemiddelde ooreenstemming vir die verskillende volgordes bepaal en in die matrikse weergegee. Filogenetiese verwantskappe tussen die verskillende subtypes word ook skematies uitgebeeld om 'n meer visuele aanduiding van die verwantskappe tussen die verskillende HBV-genome te kry.

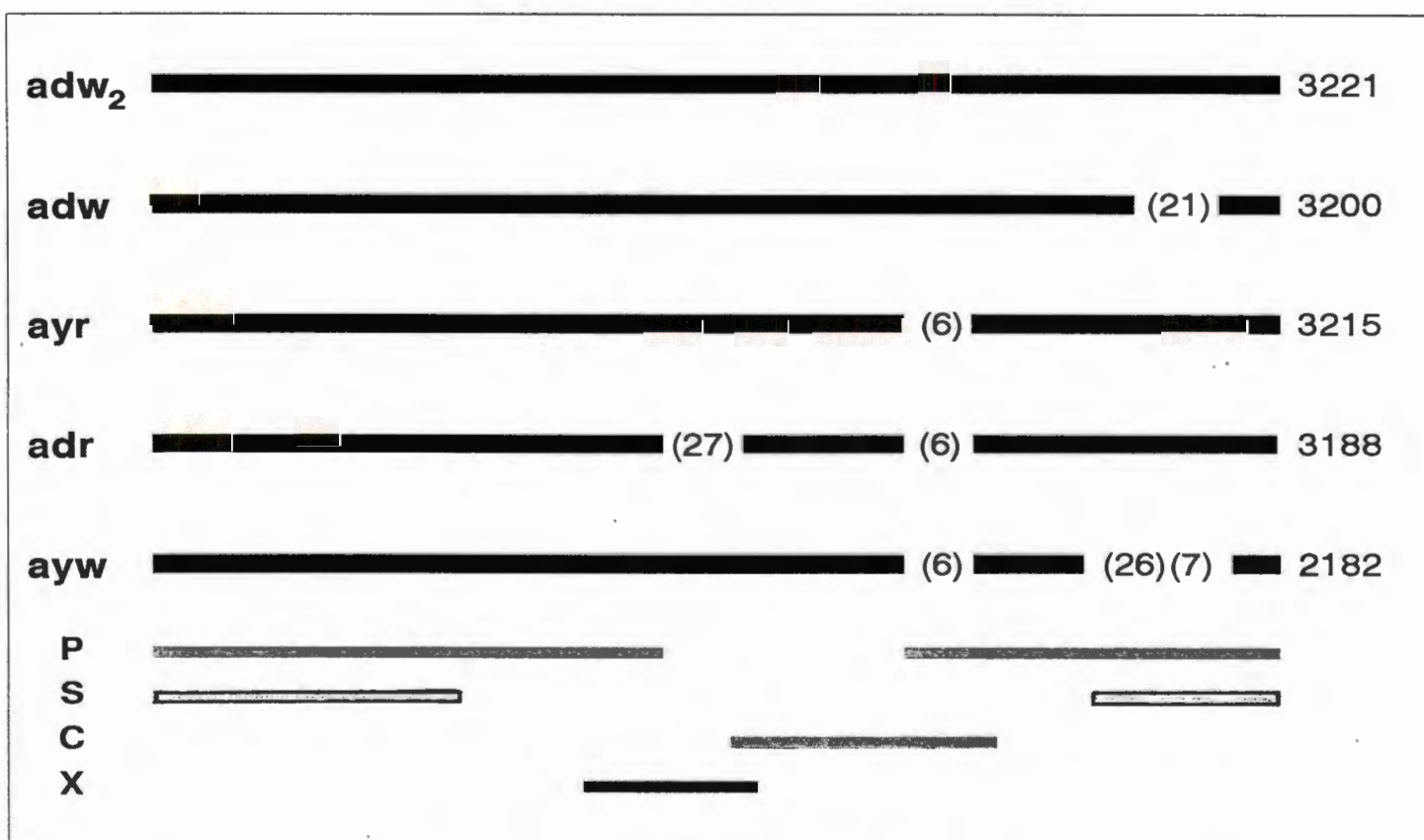
3.3.1. VERGELYKINGS TUSSEN DIE HBV-SUBTIPES

In Bylaag 1 word die nukleotiedvolgordevergelyking tussen die mens-HBV-subtypes se volledige genome as voorbeeld gegee. Uit hierdie vergelyking is dit duidelik dat basevervangings nie ewekansig in die genoom versprei is nie. Gebiede wat hoogs gekonserveer is, kom in die genome voor. Vergelyk byvoorbeeld die gebied tussen basepaar 170 en 290 met dié tussen 850 en 970. Dit wil dus voorkom asof daar gebiede is waar mutasies verhoed of beperk word deur die uiteindelijke funksie van die proteïen. Klone waarin mutasies voorkom, wat die struktuur en/of die funksie van die proteïenproduk ingrypend beïnvloed, sal met ander woorde nie kan oorleef nie. 'n Eenvoudige voorbeeld hiervan is die mate waartoe inisiasie- en terminasiekodons asook die twee direkte herhalingsvolgordes tussen die verskillende subtypes, onveranderd behoue bly (verwys na Bylaag 1). Die enigste uitsondering hierop is die afwesigheid van 'n pre-C-inisiasiekodon in een van die adr-klone wat vergelyk is. Subtype adw se pre-S1-inisiasiekodon is ook vernietig deur 'n delesie, maar dit word deur 'n ander een slegs 33 basepare stroomaf van die oorspronklike inisiasiekodon vervang (Bylaag 1 en 2).

Met die uitsondering van die gedeelte waar die pre-S-gebied en die P-geen oorvleuel, wil dit verder voorkom asof die gebiede waar twee uitfase leesrame oorvleuel, meer gekonserveer is as die gebiede waar slegs een leesraam voorkom - vergelyk byvoorbeeld die gebied net vóór basepaar 840 en dié direk daarna. Hierdie waarneming kan maklik verklaar word indien in ag geneem word dat gebiede wat vir twee verskillende proteïene kodeer, aan 'n dubbele dosis strukturele en funksionele beperkinge om die basevolgorde te konserveer, onderwerp is. 'n Mutasie in die derde base van 'n kodon wat geen invloed op die een aminosuurvolgorde mag hê nie, kan met ander woorde funksioneel of struktureel deur die ander leesraam beperk word. Die uitsondering van die pre-S/P-geenoorvleueling mag iets te doen hê met die feit dat die polipeptiedgedeeltes wat deur die pre-S-gedeeltes gekodeer word, slegs op die oppervlak van die virusdeeltjies aangetref word (Figuur 2.3). Mutasies in hierdie gedeeltes van die

mantelproteïen sal die virus dus teen 'n immuunreaksie beskerm. In die geval van die P-geen maak hierdie gedeelte maar sowat 20% van die totale polimerase-proteïen uit. Vergelykings van die twee proteïene se sekondêre strukture, hidrofobisiteit en ladingsverspreiding, toon ook dat hierdie veranderinge 'n groter invloed op die pre-S-poliipeptiede as op die P-geenproduk het.

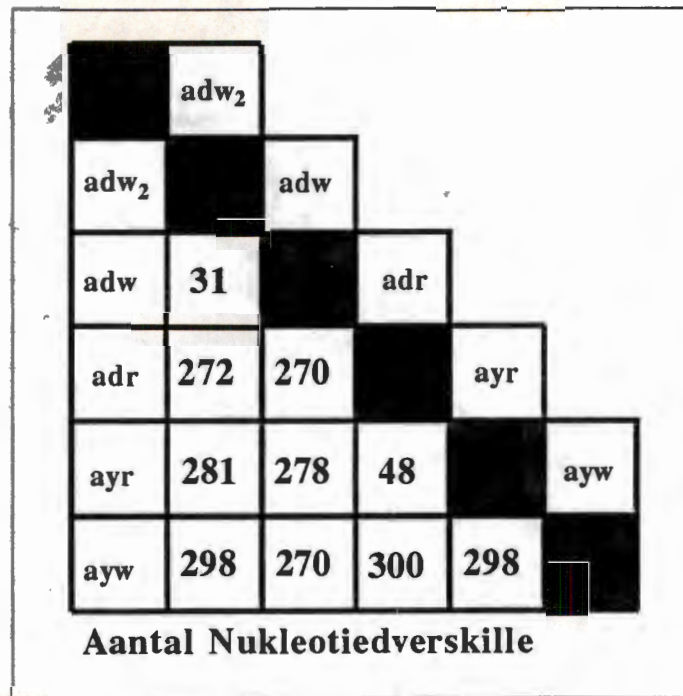
Daar is ook vasgestel dat nukleotiede slegs in veelvoude van drie uitgelaat is in al die delesies wat voorkom. Hierdie spesifieke klone (subtypes) kon dus die delesies oorleef, omdat die leesrame nie verskuif het nie en omdat geen ander belangrike volgordes soos inisiasie- en terminasiekodons verlore gegaan het nie. Die delesies word skematies in Figuur 3.3 voorgestel.



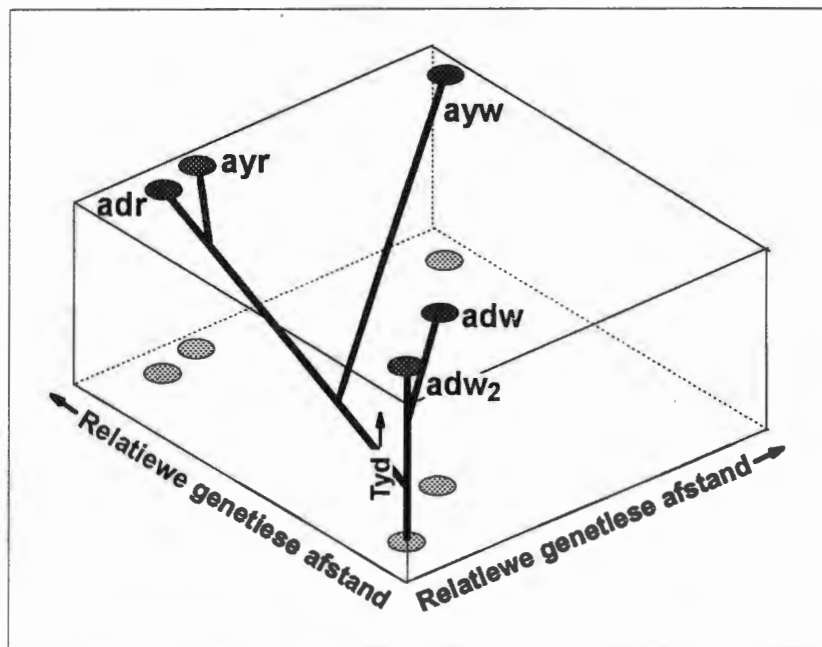
Figuur 3.3. 'n Skematiese voorstelling van die delesies in die algemeenste HBV-subtypes. Elk van die breë lyne verteenwoordig 'n volledige genoom en die smaller lyne onderaan dui die relatiewe posisies van die gene in die genome aan. Die getalle aan die regterkant en dié in hakies dui onderskeidelik die groottes van die genome en die groottes van die delesies in basepare aan.

Nog 'n belangrike feit wat uit hierdie vergelykings na vore gekom het, is dat die volgordeverskille 'n invloed op restriksie-ensiemuitkenningspunte in die verskillende genome het. Hierdie invloed word in unieke restriksiekaarte vir elke sub tipe weerspieël. Teoreties beteken dit dat daar op grond van restriksie-ensiemanalises tussen die verskillende subtypes onderskei kan word. Hierdie stelling is later bevestig deurdat die sub tipe van 'n gekloneerde HBV-volgorde met behulp van restriksie-ensieme bepaal is. Resultate van dié analises word volledig in Hoofstuk 4 bespreek.

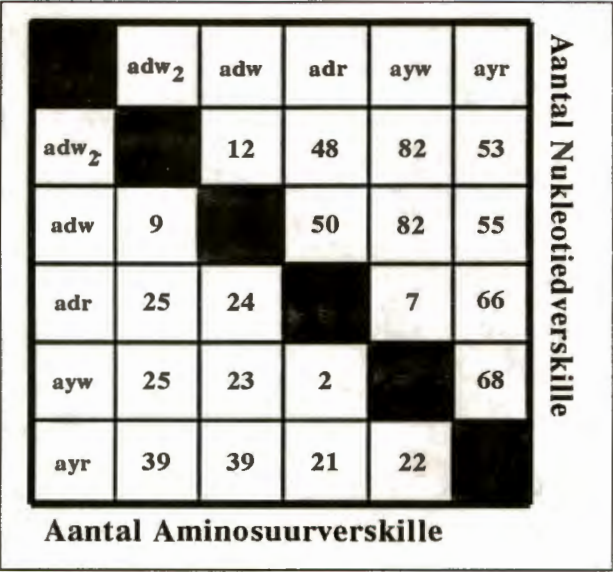
Die mate waarin die verskillende volgordes ooreenstem, met die uitsondering van die delesies, kan in verskil- of ooreenstemmingsmatrikse opgesom word, soos die voorbeeld in Figuur 3.4. Volgordes wat vergelyk word, word sodanig in die matrikse gerangskik dat die volgordes wat die meeste verskil, die verste van mekaar geplaas word. Die doel hiermee is dat die verwantskappe tussen die verskillende volgordes met die eerste oogopslag waargeneem kan word (Kimura, 1982). Hierdie filogenetiese verwantskappe tussen die verskillende subtypes kan ook grafies voorgestel word, soos in Figuur 3.5, waar die driedimensionele aard van hierdie verwantskappe aangetoon word. In hierdie grafiese voorstellings verteenwoordig die y-as die relatiewe tydsverloop en die x- en z-as die relatiewe verskil tussen die verskillende volgordes, gebaseer op die aantal nukleotied- of aminosuurverskille (Patterson, 1980 en Kimura, 1982). Nukleotiedverskille is slegs in die gevalle waar die volledige genome met mekaar vergelyk is, gebruik om die filogenetiese verwantskappe te bepaal. Vir die vergelykings van die afsonderlike gene, is die aminosuurverskille in berekening gebring. Al die resultate van hierdie analises word in Figure 3.6 - 3.14 saamgevat.



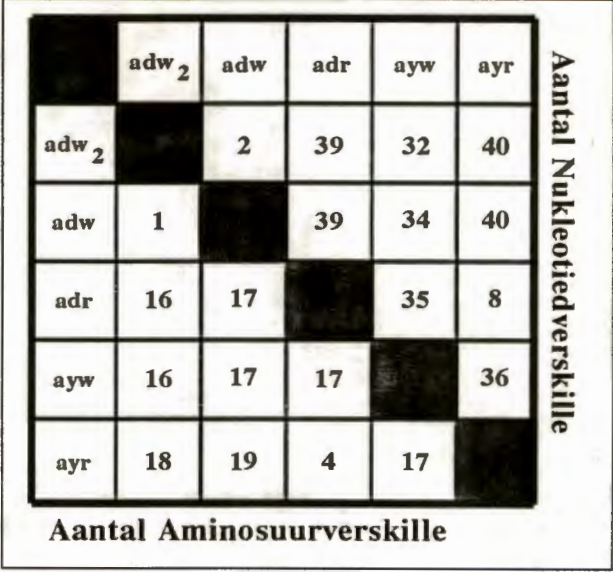
Figuur 3.4. Verskilmatriks van die volledige genome van die HBV-subtypes. Die aantal nukleotiedverskille tussen die verskillende genome met die uitsondering van delesies, word aangedui. Subtype adw₂ se genoom is 3221bp groot.



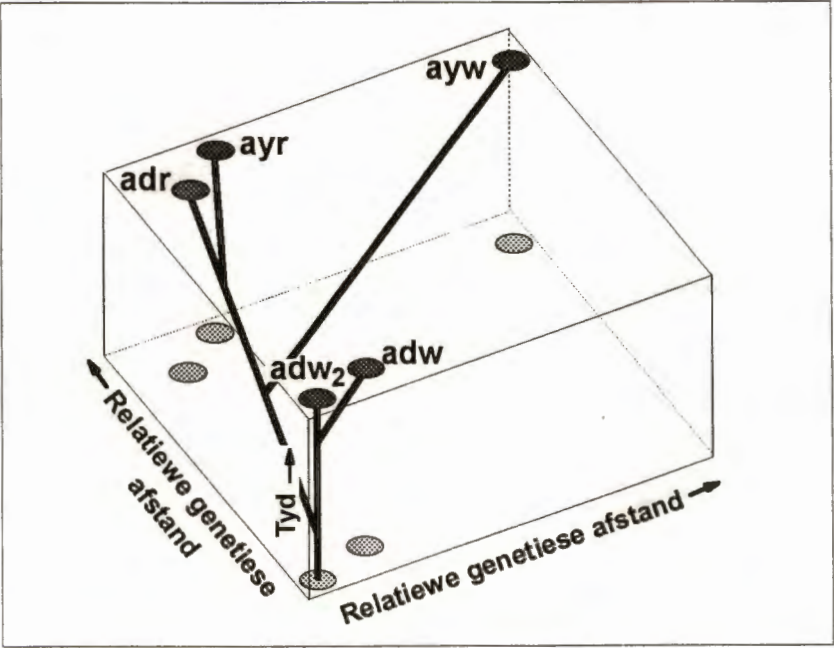
Figuur 3.5. Filogenetiese verwantskappe tussen die verskillende HBV-subtypes gebaseer op die volledige genome. Die filogenetiese bome word só voorgestel dat die driedimensionele aard van die verwantskappe na vore kan kom. Hierdie verwantskappe word ook sonder die inagneming van tyd, as skadukolle op 'n plat vlak voorgestel om die verwantskappe duideliker te stel.



Figuur 3.6. Verskilmatriks van die pre-S-koderingsgebied van die verskillende HBV-subtypes. Die aantal nukleotied- en aminosuurverskille tussen die verskillende genome word aangedui. In subtipo adw₂ bestaan die pre-S-koderingsgebied uit 522bp wat vir 174aa kodeer.



Figuur 3.7. Verskilmatriks van die S-geenkoderingsgebied van die verskillende HBV-subtypes. Die aantal nukleotied- en aminosuurverskille tussen die verskillende genome word aangedui. In subtipo adw₂ bestaan die S-geenkoderingsgebied uit 681bp wat vir 227aa kodeer.



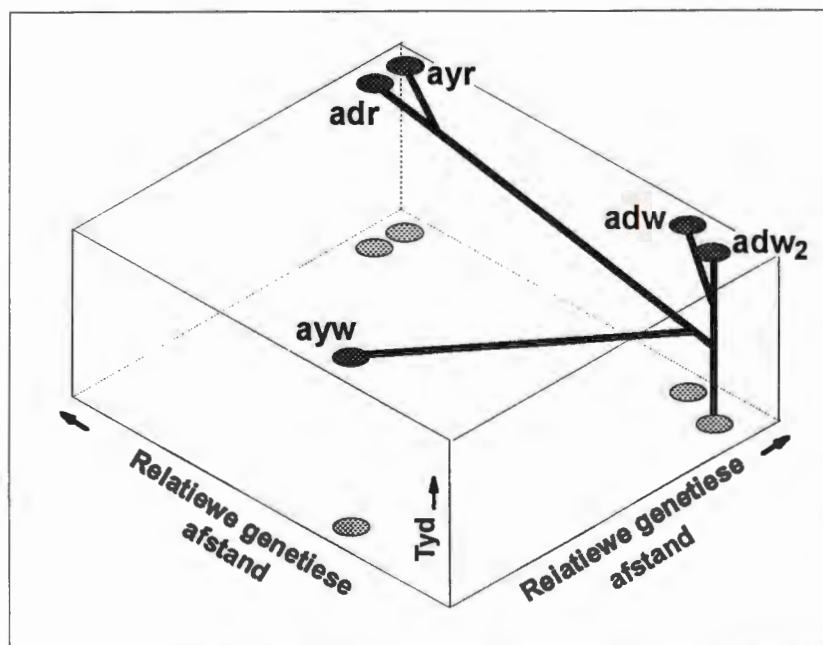
Figuur 3.8. Filogenetiese verwantskappe tussen die verskillende HBV-subtypes gebaseer op die pre-S- en S-geen se koderingsgebiede.

	adw	adw ₂	ayw	adr	ayr
adw		9	41	58	54
adw ₂	3		46	62	58
ayw	5	6		55	55
adr	8	9	8		58
ayr	8	9	8	0	

Aantal Nukleotiedverskille

Aantal Aminosuurverskille

Figuur 3.9. Verskilmatriks van die C-geenkoderingsgebied van die verskillende HBV-subtypes. Die aantal nukleotied- en aminosuurverskille tussen die verskillende genome word aangedui. In subtipo adw_2 bestaan die C-geenkoderingsgebied uit 558bp wat vir 186aa kodeer.



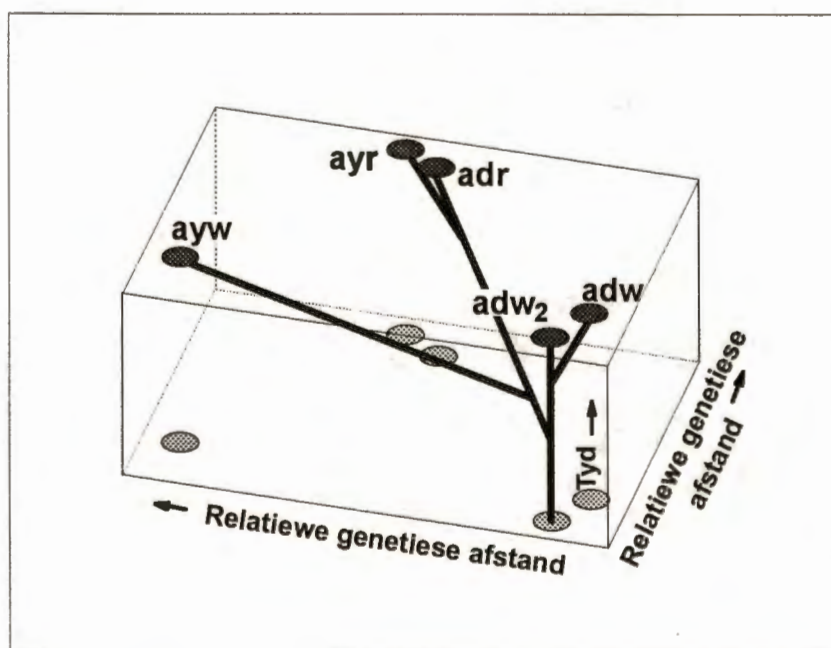
Figuur 3.10. Filogenetiese verwantskappe tussen die verskillende HBV-subtypes gebaseer op die C-geen se koderingsgebied.

	adw ₂	adw	adr	ayr	ayw
adw ₂		20	203	212	248
adw	14		204	212	253
adr	87	87		35	243
ayr	88	88	15		239
ayw	115	116	100	96	

Aantal Nukleotiedverskille

Aantal Aminosuurverskille

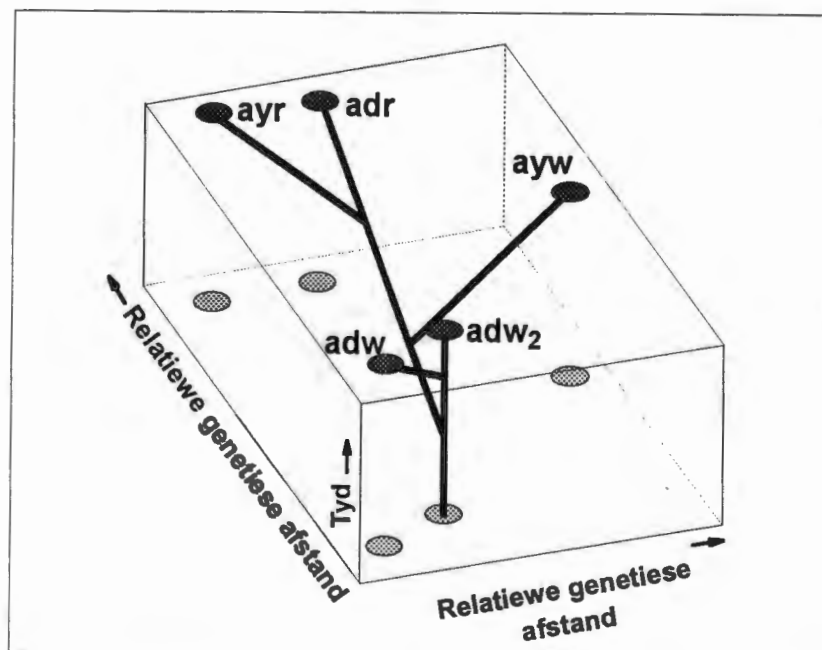
Figuur 3.11. Verskilmatriks van die P-geenkoderingsgebied van die verskillende HBV-subtypes. Die aantal nukleotied- en aminosuurverskille tussen die verskillende genome word aangedui. In subtipte adw₂ bestaan die P-geenkoderingsgebied uit 2538bp wat vir 846aa kodeer.



Figuur 3.12. Filogenetiese verwantskappe tussen die verskillende HBV-subtypes gebaseer op die P-geen se koderingsgebied.

	adw ₂	adw	ayw	adr	ayr	Aantal Nukleotiedverskille
adw ₂		5	21	25	27	
adw	3		22	26	28	
ayw	9	12		19	20	
adr	11	14	11		8	
ayr	13	16	12	5		
	Aantal Aminosuurverskille					

Figuur 3.13. Verskilmatriks van die X-geenkoderingsgebied van die verskillende HBV-subtypes. Die aantal nukleotied- en aminosuurverskille tussen die verskillende genome word aangedui. In subtipo adw_2 bestaan die X-geenkoderingsgebied uit 465bp wat vir 155aa kodeer.



Figuur 3.14. Filogenetiese verwantskappe tussen die verskillende HBV-subtypes gebaseer op die X-geen se koderingsgebied.

Afleidings wat uit hierdie vergelykings van die verskillende subtypes se nukleotied- en aminosuurvolgordes gemaak is, kan as volg opgesom word:

- Behalwe vir stilmutasies, kom baie aminosuurvervangings voor. Hierdie vervangings is egter nie ewekansig deur die genoom versprei nie en duidelik gekonserveerde gebiede kom voor.
- Die frekwensie van hierdie gekonserveerde gedeeltes verskil van geen tot geen en ook binne-in 'n spesifieke geen, wat daarop dui dat mutasies na gelang van die invloed wat so 'n spesifieke mutasie op die proteïen se funksie sal hê, beperk word.
- In al die delesies is die nukleotiede in veelvoude van drie weggelaat, wat dus geen invloed op die onderskeie leesrame het nie.
- Uit die grafiese voorstellings van die virusse se filogenetiese verwantskappe, is dit duidelik dat die verwantskapspatroon tussen die verskillende subtypes vir die hele genoom en vir elke afsonderlike geen dieselfde is.
- Uit hierdie verwantskappe, die delesies en die geografiese verspreiding van die verskillende subtypes, wil dit voorkom asof adw_2 die moedervolgorde van al die ander subtypes is. Die subtypes wat die meeste met mekaar ooreenstem (adw/adw_2 en adr/ayr) is ook geografies geassosieer (Figuur 2.10).
- Die gemiddelde persentasie nukleotiedveranderinge wat tot aminosuurveranderinge in elke leesraam aanleiding gegee het, gee 'n aanduiding van die mate waartoe 'n spesifieke geen gekonserveer gebly het tussen al die subtypes en is soos volg :

Pre-S-gebied	: 43%	S-geen	: 46%
Pre-C- en C-geen	: 13%	P-geen	: 43%
X-geen	: 52%		

Die C-geen is dus die mees gekonserveerde koderingsvolgorde met die kleinste gemiddelde verhouding tussen die aantal aminosuur- en nukleotiedveranderinge - slegs 13% van alle nukleotiedveranderinge word in aminosuurveranderinge omskryf. Hieruit blyk dit dus dat die C-geen 'n goeie teiken vir antisensvolgordes sal wees, aangesien die verskillende subtypes deur 'n enkele, goed gekose antisens-volgorde geteiken kan word. Hierbenewens speel die C-

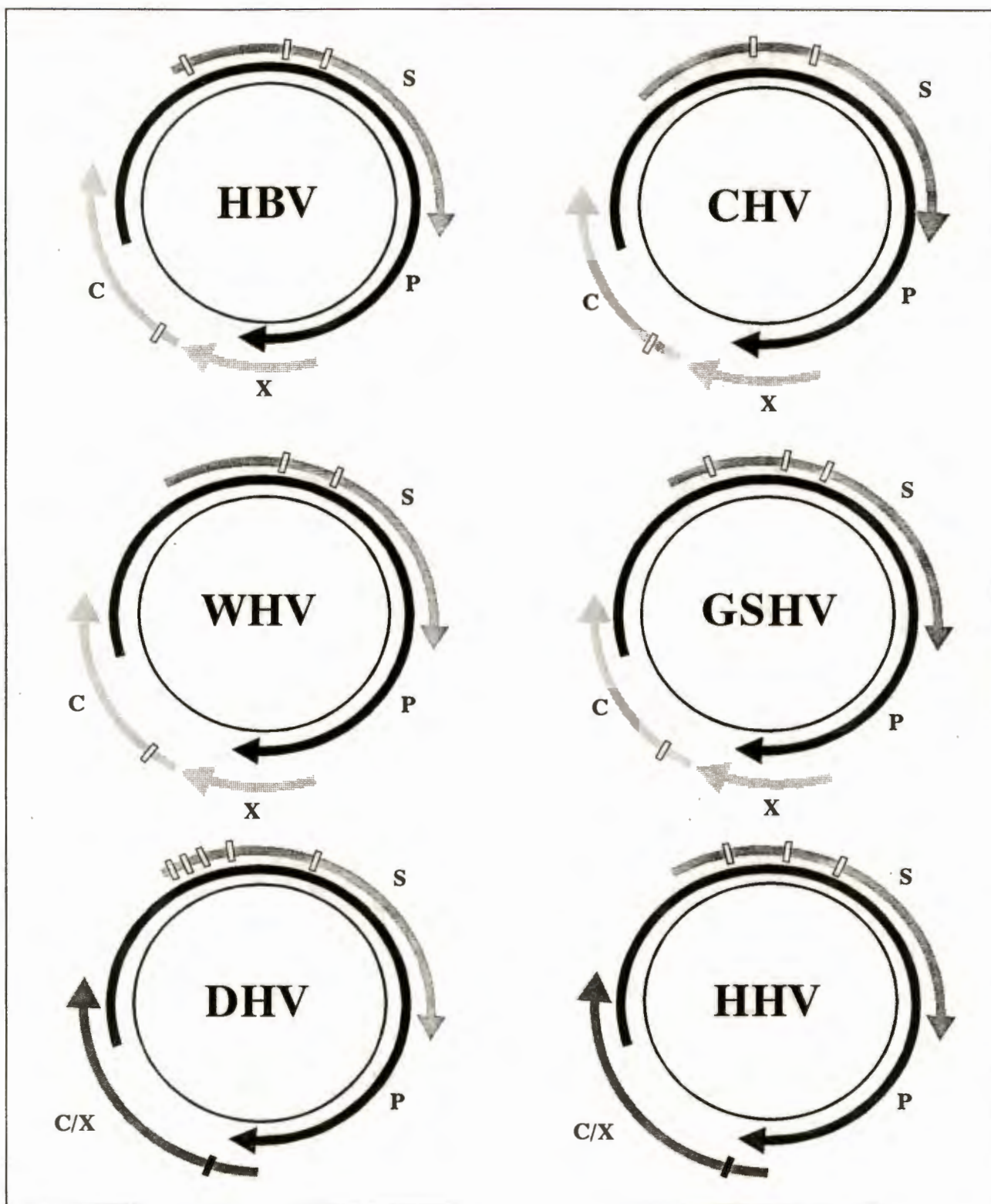
geenproduk ook 'n belangrike rol as kapsiedproteïen in die lewenssiklus van die virus, wat deur die mate waarin dit gekonserveer is, beklemtoon word.

3.3.2. VERGELYKINGS TUSSEN MENS-HBV EN VERWANTE *HEPADNAVIRIDAE*

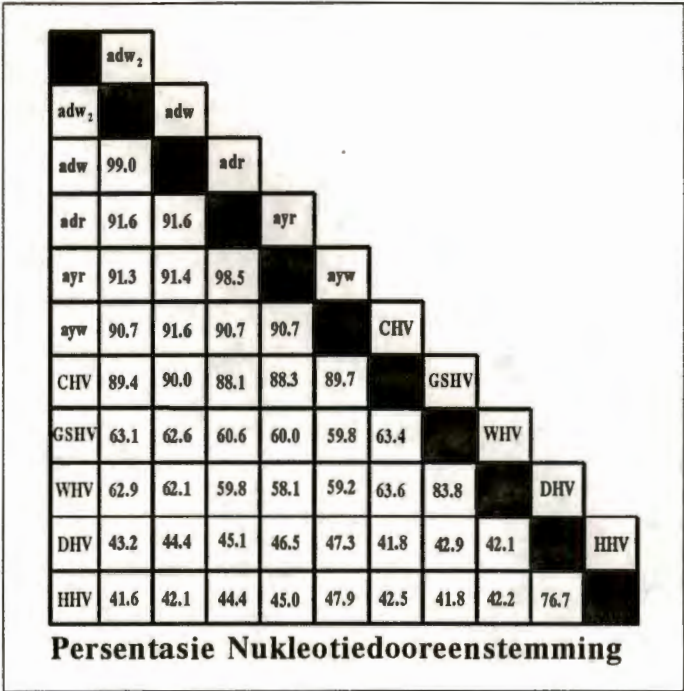
Al die dier-Hepatitis-virusse is in die eerste plek ondersoek om die teenwoordigheid van moontlike ooppleesrame aan te toon. 'n Aanduiding van die mate waartoe die algemene genetiese uitleg van hierdie virusse ooreenstem, is so verkry. Die organisasie van die genome het later gehelp om die verskillende volgordes vir verdere analyses, soos vir die vergelyking van die afsonderlike gene, ten opsigte van mekaar te oriënteer.

Hierdie analyses het aangetoon dat die sjimpanseevirus (CHV) en die twee knaagdiervirusse (WHV en GSHV) net soos in die geval van mens-HBV, vier ooppleesrame het terwyl die twee voëlvirusse (DHV en HHV) albei slegs drie ooppleesrame het (Figuur 3.15). In die geval van die voëlvirusse word die C- en X-gene gesamentlik as 'n fusieproteïen uitgedruk wat waarskynlik albei hierdie geenprodukte se funksies kan verrig (Mandart *et al.*, 1984). Alhoewel klein verskille soos die posisies van die inisiasiekodons van die S- en C-gene voorkom, is dit duidelik dat die algemene genetiese organisasie van die ses verskillende virusse grotendeels ooreenstem.

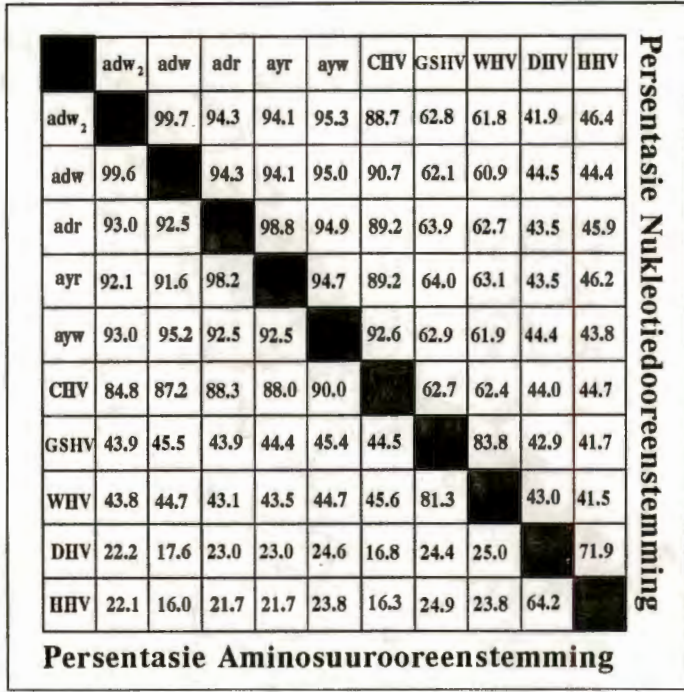
Na hierdie analyses is die volledige volgordes en die afsonderlike gene van die verskillende virusse met mekaar vergelyk soos wat dit gedoen is vir die subtypes van mens-HBV. Die resultate van hierdie vergelykings word in ooreenstemmingsmatrikse saamgevat (Figuur 3.16 - 3.20) en die dienooreenstemmende filogenetiese verwantskappe word in Figuur 3.21 grafies voorgestel.



Figuur 3.15. 'n Skematiese voorstelling van die genetiese organisasie van die verskillende Hepadnaviridae wat in hierdie studie vergelyk is. Die dwarsstreepe deur die pyle wat die gene aandui, verteenwoordig infase inisiasiekodons in hierdie leesraam. (Saamgestel uit Kodama *et al.*, 1985; Sprengel *et al.*, 1988 en Vaudin *et al.*, 1988)



Figuur 3.16. Ooreenstemmingsmatriks van die volledige *Hepadnaviridae*- genome van wat vergelyk is. Die mate van ooreenstemming tussen die verskillende genome word as ‘n persentasie uitgedruk.



Figuur 3.17. Ooreenstemmingsmatriks van die pre-S- en S-geenkoderingsgebiede van die *Hepadnaviridae* wat vergelyk is. Die mate van ooreenstemming tussen die verskillende koderingsgebiede op nukleotied- sowel as aminosuurvlak, word as ‘n persentasie uitgedruk.

	adw ₁	adw	adr	ayr	ayw	CHV	GSHV	WHV	DHV*	HHV*
adw ₁		98.4	88.0	88.7	90.9	76.9	68.9	67.0	32.5	29.7
adw	98.4		88.7	89.4	91.8	77.2	68.8	66.8	30.0	29.9
adr	94.1	94.6		98.4	90.0	78.6	68.5	67.6	31.9	30.3
ayr	94.1	94.6	100.0		90.0	79.0	68.8	67.5	31.4	30.5
ayw	95.7	96.2	95.2	95.7		76.8	68.3	66.4	31.5	30.3
CHV	81.9	82.3	81.2	81.2	81.7		57.8	56.2	26.1	27.1
GSHV	68.9	69.4	68.9	68.9	68.9	58.4		90.1	31.2	32.1
WHV	68.5	68.9	68.5	68.5	68.0	58.0	91.8		29.9	32.2
DHV*	24.8	24.8	24.2	25.2	24.1	22.5	22.1	22.8		81.3
HHV*	21.6	21.9	24.4	21.9	21.6	23.5	22.4	22.4	83.3	

Persentasie Nukleotiedooreenstemming

Persentasie Aminosuurooreenstemming

Figuur 3.18. Ooreenstemmingsmatriks van die pre-C- en C-geenkoderingsgebiede van die *Hepadnaviridae* wat vergelyk is. Die mate van ooreenstemming tussen die verskillende koderingsgebiede op nukleotied- sowel as aminosuurvlak word as 'n persentasie uitgedruk. * C/X-fusiegeen.

	adw ₁	adw	adr	ayr	ayw	CHV	GSHV	WHV	DHV	HHV
adw ₁		98.4	91.8	91.5	88.8	89.4	63.2	63.1	45.1	42.4
adw	97.5		91.0	90.7	89.3	89.9	63.1	63.1	45.1	43.1
adr	89.5	88.7		98.6	89.2	89.4	63.7	63.4	43.8	43.5
ayr	89.4	88.5	98.2		89.3	89.2	63.9	63.6	43.8	44.2
ayw	84.9	85.5	86.8	86.7		91.1	63.3	63.0	44.6	44.4
CHV	85.4	86.5	86.3	86.6	87.9		63.4	63.9	44.2	43.8
GSHV	49.7	49.5	50.4	50.7	49.7	50.6		83.1	44.5	43.4
WHV	50.7	50.7	52.0	51.7	52.0	52.1	77.1		44.2	43.7
DHV	22.0	21.0	22.5	22.4	22.0	21.7	22.1	22.7		76.2
HHV	22.4	22.0	22.1	22.1	22.5	22.3	22.5	22.6	68.8	

Persentasie Nukleotiedooreenstemming

Persentasie Aminosuurooreenstemming

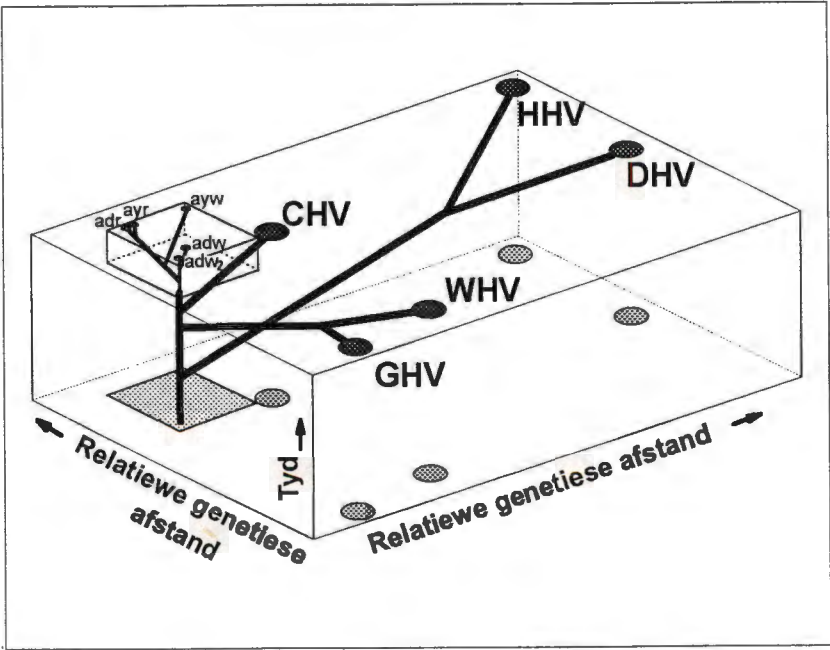
Figuur 3.19. Ooreenstemmingsmatriks van die P-geenkoderingsgebiede van die *Hepadnaviridae* wat vergelyk is. Die mate van ooreenstemming tussen die verskillende koderingsgebiede op nukleotied- sowel as aminosuurvlak word as 'n persentasie uitgedruk.

	adw ₂	adw	adr	ayr	ayw	CHV	GSHV	WHV	DHV*	HHV*
adw ₂		98.9	89.0	94.2	95.5	92.0	57.9	59.4	20.9	22.9
adw	98.1		88.8	94.0	95.3	91.4	57.9	60.1	20.6	23.5
adr	87.1	85.2		92.7	90.3	82.8	61.2	61.3	21.1	21.0
ayr	91.6	89.7	91.0		95.7	90.1	57.5	57.9	21.1	21.8
ayw	94.2	92.3	87.1	92.3		90.8	58.2	59.1	20.2	22.2
CHV	86.5	84.5	80.6	84.5	87.1		58.5	59.5	20.9	21.3
GSHV	41.8	41.1	44.3	43.7	42.4	42.8		82.2	19.3	20.0
WHV	43.1	43.8	45.6	45.6	45.0	42.5	69.0		20.7	19.2
DHV*	15.7	15.4	13.1	16.7	16.0	17.0	14.1	15.7		81.3
HHV*	17.3	16.6	15.0	16.3	16.0	18.6	15.7	14.1	83.3	

Persentasie Nukleotiedooreenstemming

Persentasie Aminosuurooreenstemming

Figuur 3.20. Ooreenstemmingsmatriks van die X-geenkoderingsgebiede van die *Hepadnaviridae* wat vergelyk is. Die mate van ooreenstemming tussen die verskillende koderingsgebiede op nukleotied- sowel as aminosuurvlak word as 'n persentasie uitgedruk. * C/X-fusiegeen.



Figuur 3.21. Filogenetiese verwantskappe tussen HBV en die ander *Hepadnaviridae* wat vergelyk is. Verwantskappe tussen die HBV-subtypes soos dit in Figuur 3.5 gegee word.

Afleidings wat uit hierdie vergelykings van die verskillende *Hepadnaviridae*-volgordes gemaak kon word, is soos volg:

- Die virusse se algemene genetiese organisasie stem baie ooreen. Die enigste noemenswaardige uitsondering is die drie, in plaas van vier, oopleesrame in die geval van die twee voëlvirusse.
- Tussen die pare naverwante virusse (mens- en sjimpanseevirus; eend- en reivirus; marmot- en grondeekhoringvirus) kon gekonserveerde volgordes waargeneem word, maar geen sulke volgordes kom tussen die verskillende groepe voor nie.
- Die voël- en knaagdiervirusse verskil onderling meer ten opsigte van mekaar as die HBV-subtypes.
- Verder blyk dit ook dat indien twee volgordes minder as 50% met mekaar ooreenstem, geen waterdigte afleidings uit die verwantskap gemaak kan word nie. Twee nie-verwante volgordes soos dié van HBV-subtype adw₂ en dié van die mens sitoplasmiese β -aktiengene, wat as 'n kontrole vergelyk is, stem byvoorbeeld 44.3% ooreen.

3.4. GEVOLGTREKKING

Soos reeds in Afdeling 3.3. aangetoon is, kan 'n hele aantal afleidings uit die vergelykings tussen die HBV-subtypes en die ander diervirusse gemaak word. Van die belangrikste gevolgtrekkings wat uit hierdie analyses na vore gekom het, is onder andere die identifisering van gekonserveerde gebiede in die genome, die identifisering van die C-geen as die mees stabiele koderingsvolgorde in mens-HBV en die bevinding dat daar tussen die verskillende subtypes van mens-HBV onderskei kan word met behulp van restriksie-ensiemanalises. Die hoofdoel van hierdie analyses is bereik deurdat ideale teikengebiede vir antisens-oligonukleotiede met behulp van hierdie inligting geïdentifiseer kon word. In Hoofstuk 4 word beskryf hoe

restriksie-ensiemanalises gebruik is, om die sub tipe van die HBV-kloon wat in hierdie studie gebruik is, te bevestig.

Ten slotte moet dit duidelik gestel word dat daar nie gepoog is om die evolusionêre ontwikkeling van die *Hepadnaviridae* volledig te beskryf nie. Die filogenetiese verwantskappe tussen die verskillende HBV-subtypes en die ander diervirusse, word slegs in relatiewe terme ten opsigte van die mate van verskil tussen die volgordes gegee. Uit hierdie analises is dit egter duidelik dat die immunologies-getipeerde subtypes nie 'n getroue weerspieëling van die genetiese variasie in die virusvolgordes gee nie. Op molekulêre vlak dien dit dus geen doel om die virusse te groepeer op grond van fenotipiese eienskappe, soos subtypes nie, aangesien groot genotipiese verskille tussen die subtypes mag voorkom. Vergelyk hier byvoorbeeld die mate waarin die verskillende adr-kclone ten opsigte van mekaar verskil (Bylaag 1). Hierdie resultate stem ooreen met die bevindinge van Okamoto *et al.* (1986 en 1988).

Daar moet daarteen gewaak word om nie te veel te wil lees in die ooreenkomste en verskille tussen die subtypes of diervirusse nie. Genetiese variasie is die gevolg van mutasies wat tot 'n groot mate ewekansig in die virusgenoom plaasvind, maar slegs die mutante wat in staat is om 'n spesifieke mutasie te oorleef, sal vermeerder. Afhangende van die aard en posisie van so 'n mutasie kan dit dus as 'n veranderde epitoot of nuwe sub tipe waargeneem word, of heeltemal onbespeurbaar in die fenotipe bly. Die verskil tussen 'n gekonserveerde gedeelte en 'n gebied in 'n geen waar baie verandering voorkom in 'n geen, lê dus in die strukturele en/of funksionele rol wat die ooreenstemmende polipeptied of gedeelte daarvan in die lewenssiklus van die virus speel.

HOOFSTUK 4

SUBKLONERING EN KARAKTERISERING VAN HBV-DNA-VOLGORDES

4.1. INLEIDING EN DOELSTELLING

HBV-DNA-volgordes is in verskeie fasette van hierdie en ander verwante projekte gebruik, soos byvoorbeeld vir die:

- Subtipebepaling van 'n gekloneerde HBV-genoom. Die resultate wat uit die genetiese analyses in Hoofstuk 3 verkry is, het daarop gedui dat dit moontlik sou wees om met behulp van restriksie-analises tussen die verskillende HBV-subtypes te onderskei. Hierdie teorie kon dus net op 'n volledige, gekloneerde HBV-genoom beproef word (Afdeling 4.2).
- Karakterisering van hepatosellulêre karsinoomsellyne (HSK-sellyne). Gekloneerde HBV-DNA-volgordes is gebruik as peilers en kontroles tydens die karakterisering van drie HSK-sellyne (Hoofstuk 5).
- Konstruksie van HBV-uitdrukkingsvektore.
Verskeie gedeeltes van die HBV-genoom is in uitdrukkingsvektore gekloneer vir die daarstelling van uitdrukkingsisteme vir spesifieke HBV-proteïene of antisens-RNA-inhibisiesisteme (Afdeling 4.3).
- Karakterisering van getransformeerde sellyne.
Gekloneerde HBV-DNA-volgordes is, soos in die geval van die HSK-sellyne, as peilers gebruik om die teenwoordigheid van HBV-nukleïensuurvolgordes in getransformeerde sellyne te bevestig en om die kopiegetal te bepaal.

Aangesien HBV-DNA dus so 'n belangrike werktuig in hierdie en ander studies was, was dit belangrik om hierdie volgordes vrylik in 'n veilige en gerieflike vorm beskikbaar te hê. Dit kon deur klonering van die HBV-genoom in 'n plasmied bewerkstellig word. Op hierdie manier sou dit moontlik wees om die HBV-DNA-volgordes in relatief groot hoeveelhede te produseer deur dit as deel van die plasmied in bakterieë te laat repliseer. Die vereiste eienskappe van 'n bruikbare sisteem is die volgende:

- Dit moet veilig wees. Geen infektiewe deeltjies of mutageniese produkte mag tydens die vermeerdering en voorbereiding van die gekloneerde volgordes geproduseer of gevorm word nie.
- Die HBV-genoom moet volledig wees. Indien spesifieke gene van HBV gesubkloneer moet word, moet die volledige genoom beskikbaar wees om te verseker dat enige ooplesraam volledig gesubkloneer kan word. Die volledige volgorde was ook noodsaaklik vir die subtipiebepaling.
- Dit moet goed gekarakteriseer wees. Dit is belangrik dat soveel as moontlik omtrent die finale plasmied waarin die HBV-DNA-volgordes gerepliseer gaan word, bekend is. 'n Volledige restriksiekaart van die plasmied moet verkieslik beskikbaar wees. Dit sal verseker dat die plasmied en die HBV-DNA-volgordes maklik gemanipuleer en gebruik kan word. In die geval van 'n HBV-genoom is dit verder ook belangrik dat die sub tipe daarvan bekend moet wees, veral as die belang van die nukleotiedvolgorde ten opsigte van peiler- en antisens-RNA-volgordes in ag geneem word.
- Dit moet maklik en eenvoudig hanteerbaar wees. Vermeerdering en isolering van die gekloneerde HBV-DNA-volgordes moet eenvoudig wees. 'n Stabiele plasmied wat nie herrangskik tydens replisering nie en waaruit die gekose fragment maklik geïsoleer kan word, moet met ander woorde gekonstrueer word.

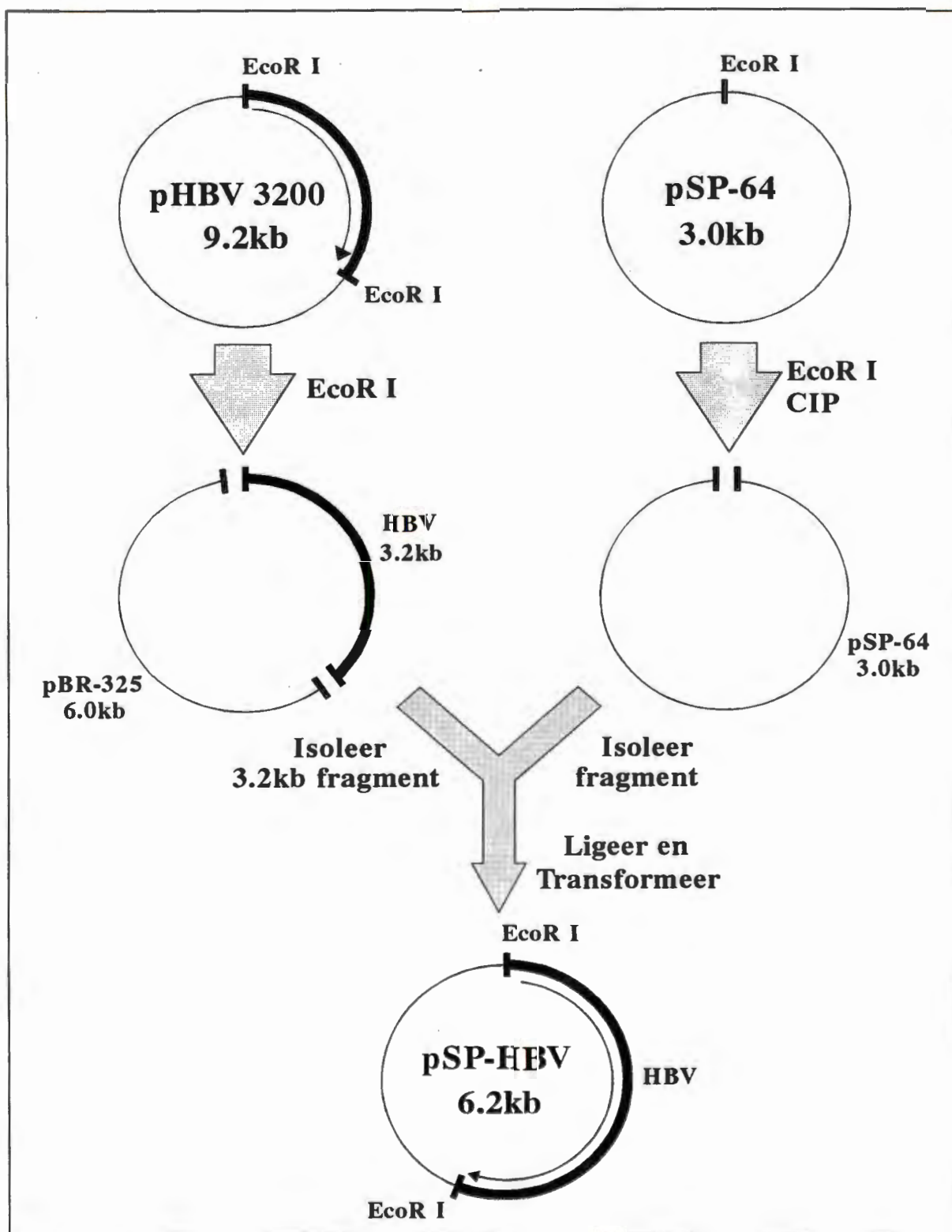
In hierdie hoofstuk word die oordrag, subklonering en karakterisering van die HBV-genoom beskryf, met die oog op die daarstelling van vermeerderingsvektore. Hieruit

kon peilervolgordes geïsoleer word en antisens-RNA-uitdrukkingsvektore vir die daarstelling van 'n inhibisiesisteem gekonstrueer word.

4.2. SUBKLONERING EN KARAKTERISERING VAN DIE VOLLEDIGE HBV-GENOOM

Aangesien die HBV-genoom so klein is, ongeveer 3.2kb, behoort die volledige volgorde maklik in 'n vektor gekloneer te kan word (Summers *et al.*, 1975). Hierdie afdeling word spesifiek aan die beskrywing van die subklonering van die volledige HBV-genoom in die bekende kloneringsvektor, pSP64, gewy. Die resulterende plasmied, pSP-HBV, is gebruik om die virusvolgordes op 'n veilige, roetine basis in bakterieë te vermeerder en ook om die sub tipe van die HBV-genoom met behulp van restriksie-analises te bepaal. Al die metodes en tegnieke wat tydens hierdie studie gebruik is, is behalwe waar anders vermeld word, presies volgens die standaardmetodes soos wat dit in Sambrook *et al.* (1989), Ausubel *et al.* (1990), Möhr (1989) en Vergeer (1988) beskryf word, uitgevoer.

Alle HBV-DNA-volgordes wat in hierdie studie gebruik is, is oorspronklik vanuit die plasmied pHBV 3200, wat in die laboratorium van W.J. Rutter gekonstrueer is, verkry (Valenzuela *et al.*, 1979). pHBV 3200 is gekonstrueer deur die EcoR I-HBV-fragment van ongeveer 3200bp, wat uit Dane-partikels geïsoleer is, in pBR325 te kloner (Figuur 4.1). Volgens die groottes wat deur Summers *et al.* (1975) vir die HBV-genoom bepaal is, behoort hierdie grootte fragment die volledige genoom van die virus te verteenwoordig. Vir die daarstelling van 'n klein, makliker hanteerbare plasmied, wat gebruik kan word vir die karakterisering en vermeerdering van die HBV-DNA-volgordes, is die HBV-fragment uit pHBV3200 geïsoleer en in die EcoR I-kloneringspunt van pSP64 gekloneer, om die plasmied pSP-HBV daar te stel. Die klonering en karakterisering van hierdie plasmied sal in besonderhede bespreek word en sal as voorbeeld vir alle ander klonerings- en karakteriseringsmetodes wat in die verloop van hierdie studie gebruik is, dien (vergelyk met Figuur 4.1).



Figuur 4.1. 'n Skematiese voorstelling van die subklonering van die volledige HBV-genoom in die kloneringsvektor pSP64. Die metodes en tegnieke wat gebruik is, word volledig in die teks beskryf.

Die eerste stap in die konstruksieproses van 'n nuwe plasmied, is die voorbereiding van die vektor en die fragment wat daarin gekloneer moet word. Vektor verwys hier na die plasmied-DNA wat as 'n "draer" dien vir vreemde DNA-fragmente wat gekloneer moet word. 'n Kloneringsvektor beskik oor al die essensiële DNA-volgordes en koderingsgebiede wat die seleksie en replisering daarvan in bakteriese selle moontlik maak. 'n Antibiotikumweerstandbiedendheidsgeen in die vektor maak die seleksie van rekombinante klone, wat met die plasmied getransformeer is, moontlik (Bolivar *et al.*, 1977).

Vir die klonering van die HBV-genoom is die kloneringsvektor pSP64 voorberei deur dit met die restriksie-ensiem EcoR I (Boehringer Mannheim) te behandel. Aangesien pSP64 slegs een EcoR I-uitkenningspunt besit, word 'n enkele liniêre DNA-molekuul na die behandeling gevorm. Nadat die volledigheid van die ensiemreaksie elektroforeties in 'n 1% agarosegel getoets is, is die reaksiemengsel een maal met 'n chloroform:isoamielalkoholmengsel (24:1) geëkstraheer, om sodoende die proteïene te verwyder. Hierna is die DNA by -20°C in die teenwoordigheid van 0.3M NaCl en twee en 'n half volumes 100% vrieskoue (-20°C) etanol gepresipiteer om van die ongewenste bufferkomponente ontslae te raak. Na sentrifugering by 4°C is die DNA weer in Roberts-buffer (6mM Tris (pH 8.0), 0.1mM EDTA (pH 8.0), 6mM NaCl) gesuspendeer waarna die termini van die vektor met die ensiem alkaliese fosfatase (CIP) (Boehringer Mannheim) behandel is. Hierdie behandeling defosfateer die 5'-termini van die vektorfragment en verhoed sodoende dat die vektor, sonder die invoeging van 'n fragment tydens ligering, herstel. Hierdie reaksie is twee maal vir 30 minute by 37°C uitgevoer en een eenheid (1U) ensiem is aan die begin van elke 30 minute by die reaksiemengsel gevoeg. Die defosfateringsreaksiemengsel is na verloop van die reaksie net so in 'n 1% agarosegel geëlektroforeer om die vektor-DNA te suiwer. Die liniêre DNA is met behulp van DEAE-membrane (Schleicher en Schuell, NA 45) of 'n "GeneClean"-pakket (Bio 101) uit die gel geëluëer. Die geëluëerde DNA-fragmente is soos hierbo beskryf is, met chloroform:isoamielalkohol geëkstraheer en gepresipiteer om van die agarose en ander bufferkomponente ontslae te raak. Ten laaste is die voorbereide

vektor in Roberts-buffer gesuspendeer in 'n finale konsentrasie van ongeveer 50ng/ μ l.

Aangesien die HBV-genoom in die EcoR I-punt van pBR325 gekloneer is, is pHBV3200 ook met EcoR I behandel om die HBV-fragment uit die vektor te verwyder. Nadat die volledigheid van die reaksie bevestig is, is die reaksiemengsel in 'n 1% agarosegel geëlektroforeer om die pBR325-vektorfragment van 6.0kb van die HBV-fragment van 3.2kb te skei. Die HBV-fragment is met behulp van 'n DEAE-membraan of die "GeneClean"-pakket geëlueer, net soos wat dit vir die vektor beskryf is. Na presipitering, is die HBV-fragment ook in Roberts-buffer gesuspendeer in 'n finale konsentrasie van ongeveer 50ng/ μ l.

Na die voorbereiding van die fragmente, is 50ng van die vektorfragment en 'n ekwimolêre hoeveelheid van die HBV-fragment, ongeveer 47ng, met behulp van 1U T4-DNA-Ligase (Boehringer Mannheim) vir ongeveer 5 uur by 16°C geligee. Suksesvolle ligering van hierdie twee liniêre DNA-fragmente sou dus die nuwe plasmied, pSP-HBV, vorm (Figuur 4.1 en Figuur 4.2).

Na ligering is kompetente *E.coli* K12-MC1061-selle met die ligeringsmengsel getransformeer. Kompetente *E.coli*-selle is voorberei deur selle in die logaritmiese groeifase met 'n transformeringsbuffer (60mM CaCl₂, 10mM Pipes.HCl (pH 7.0) en 15% gliserol) te behandel. Vyf mikroliter van die ligeringsmengsel is met 20 μ l van hierdie kompetente selle gemeng en vir 20 minute op ys geïnkubeer, waarna 'n hittedkok by 37°C vir 5 minute toegedien is. Hierna is 200 μ l Luria Bertani-medium (LB-medium) (1%(m/v) Bakto-triptoon, 0.5% (m/v) gisekstrak, 0.5% (m/v) NaCl, 0.1% (m/v) glukose), sonder enige antibiotikum, by die transformeringsmengsel gevoeg en vir 'n verdere 30 minute by 37°C geïnkubeer. Hierna is tussen 30 en 100 μ l van die transformeringsmengsel op LB-agarplate (LB-medium met 1.2% (m/v) agar), wat 50 μ g/ml ampisillien bevat het, uitgeplaas en oornag by 37°C geïnkubeer om ampisillienweerstandbiedende kolonies te selekteer. Van hierdie kolonies is hierna ewekansig gekies en gekweek vir die karakterisering van die plasmiede.

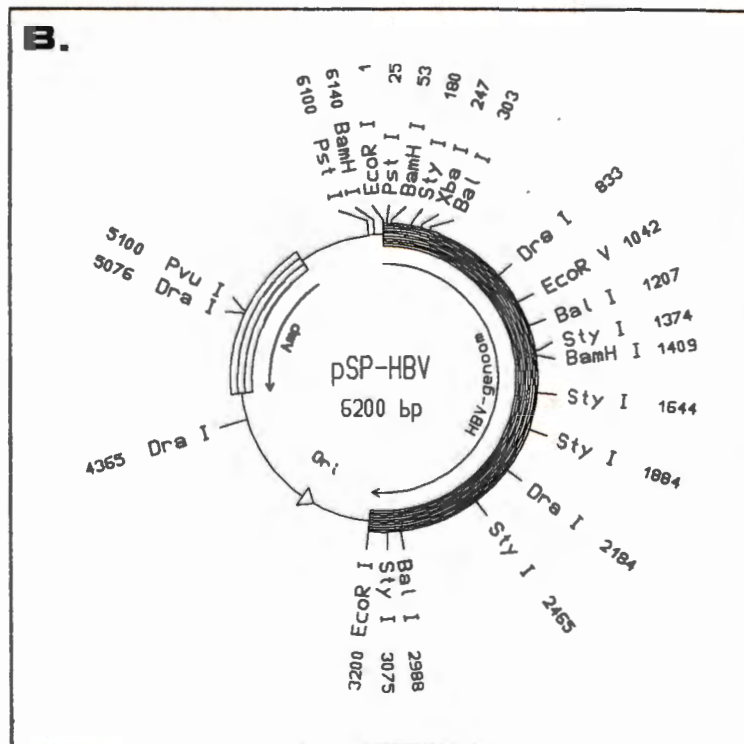
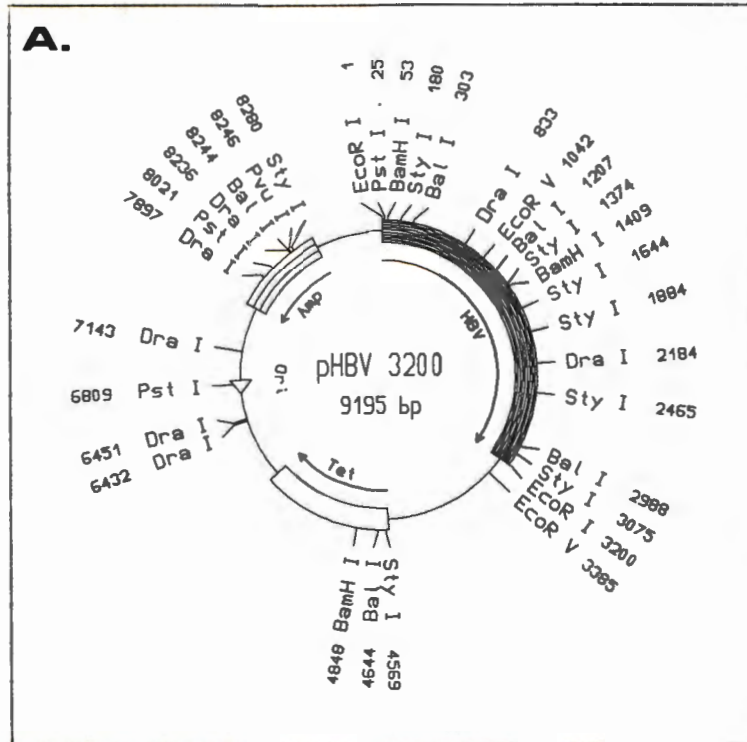
Plasmied-DNA wat mbv die vinnige isoleringsmetode (RAPS-protokol) (Holmes en Quigley, 1981) voorberei is, is gekarakteriseer. Vyf milliliter LB-medium is geïnkuleer met 'n enkele ampicillienweerstandbiedende kloon en oornag by 37°C geïnkubeer. Nadat die selle met behulp van sentrifugering versamel is en in STET-buffer (8% (m/v) sukrose, 5% (v/v) triton X-100, 50mM EDTA (pH 8.0) en 50mM Tris.Cl (pH 8.0)) gesuspendeer is, is lisosiem (Boehringer Mannheim) tot 'n finale konsentrasie van 1mg/ml bygevoeg. Die selle is hierna geliseer deur dit vir presies 60 sekondes in 'n kokende waterbad te inkubeer. Alle selreste is deur middel van sentrifugering verwyder en die DNA is uit die resulterende supernatant by -20°C gepresipiteer met 'n gelyke volume isopropanol. Die DNA-presipitaat is in 60µl Roberts-buffer gesuspendeer en is daarna gebruik vir die karakterisering van die plasmiede.

Karakterisering en seleksie van verlangde plasmiede is altyd volgens die volgende, logies opeenvolgende stappe gedoen:

- Verskeie van die ampicillienweerstandbiedende klone, in hierdie geval moontlike pSP-HBV-klone, is ewekansig gekies en die plasmiede is daarna volgens die RAPS-protokol hieruit geïsoleer. 'n Kloon van die oorspronklike vektor, in hierdie geval pSP64, is ook altyd voorberei om te dien as 'n kontrole waarmee die invoeging van die vreemde fragment bevestig kon word.
- Hierdie onbehandelde plasmiedbereidings is eerstens net so in 'n 1% agarosegel geëlektroforeer om die groottes van die superheliese DNA van moontlike mutante plasmiede met dié van die oorspronklike vektor te vergelyk. Hieruit kon klone wat groter as die oorspronklike vektor was, gekies word; met ander woorde plasmiede waarin daar waarskynlik een of meer fragment(e) ingevoeg het.
- Klone met moontlike invoegings is hierna aan restriksiekartering onderwerp om die volgende te bevestig:
 - **Grootte van die plasmied.** Die grootte van die plasmied kan bepaal word deur dit met 'n ensiem, wat slegs 'n enkele snit sal aanbring, te behandel. Die enkele liniêre DNA-molekuul wat so gevorm word, se grootte kan dan deur

elektroforese bepaal word. Fragmentgroottes kan met dié van die vektor, die negatiewe groottekontrole, en met die grootte wat teoreties verwag word indien invoeging wel plaasgevind het, vergelyk word. Restriksie-ensiembehandeling van die DNA is nodig omdat die migrasietempo van superheliese- en liniêre DNA in agarose verskil en aangesien die DNA-groottestandaarde liniêre DNA is, sal die grootte van die plasmied só met groter akkuraatheid bepaal kan word. Hierdie enkele restriksiepunt moet verkieslik in die ingevoegde fragment geleë wees, sodat die teenwoordigheid van die fragment met selfs nog groter sekerheid bevestig kan word.

- **Herstel van die kloneringspunte.** Indien identiese restriksie-ensieme vir die voorbereiding van die vektor en die invoeging gebruik is, beteken dit dat hierdie uitkenningspunte tydens ligering in die kloneringspunte herstel moet word. Deur die nuwe plasmiede dus met die kloneringsensiem te behandel, kan die integriteit van die kloneringspunte en die onderskeie groottes van die vektor en fragment bevestig word. Vir 'n preparatiewe plasmied soos pSP-HBV wat gebruik is om die HBV-DNA-volgordes te vermeerder, is dit veral belangrik dat hierdie kloneringspunte herstel moet word, sodat die HBV-DNA-volgordes later weer maklik uit die vektor geïsoleer kan word.
- **Oriëntasie van die fragment.** Indien slegs 'n enkele restriksie-ensiem of stomptermiini gebruik is vir klonering, kan die fragment in beide oriëntasies in die vektor invoeg. Die oriëntasie van die invoeging ten opsigte van die vektor sal dus deur restriksiekartering vasgestel moet word. Dit kan gedoen word deur 'n restriksie-ensiem te kies wat naby die een punt van die fragment sny en ten minste een keer in die vektor. Die groottes van die fragmente kan elektroforeties bepaal word en na gelang van die oriëntasie van die invoeging, sal fragmente van spesifieke groottes vorm (soos byvoorbeeld vir BamH I in Figuur 4.2).



Figuur 4.2. Restriksiekaarte van die twee plasmiede met die volledige HBV-genoom daarin gekloneer. A. pHBV 3200 en B. pSP-HBV. Al die stappe in die konstruksie van pSP-HBV en die eienskappe van beide plasmiede word volledig in die teks beskryf.

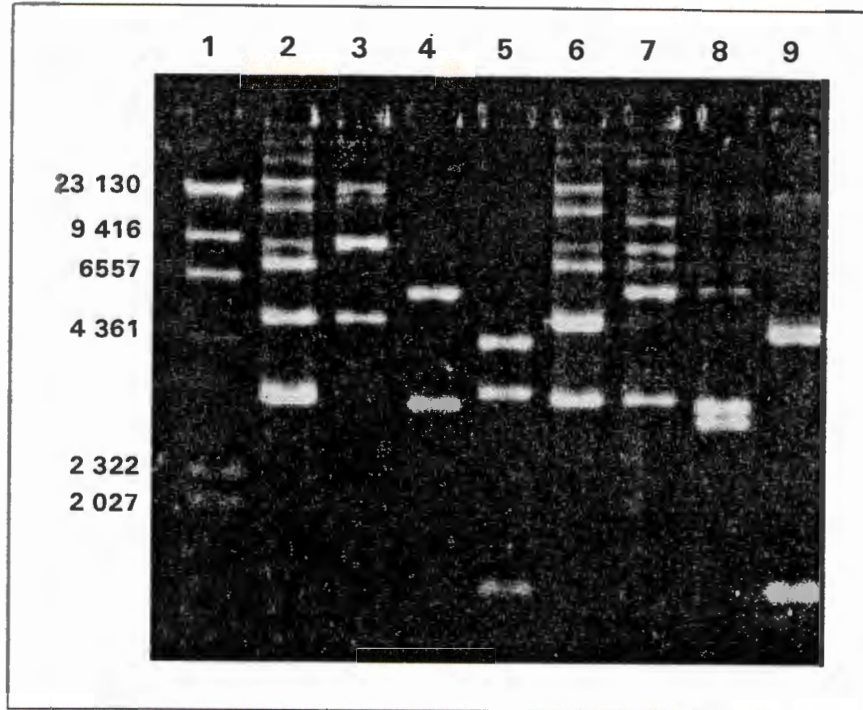
Die twee plasmiede, pHBV 3200 en pSP-HBV, is volgens die beginsels soos dit hierbo beskryf is, gekarakteriseer (Figuur 4.3 en Tabel 4.1). Pvu I is gebruik om die groottes van die plasmiede mee te bepaal, aangesien dit slegs een keer in beide plasmiede sny. Hierdeur is die onderskeie verwagte groottes vir pHBV3200 en pSP-HBV bevestig as ongeveer 9.2 en 6.2kb. Die herstel van die kloneringspunte is met EcoR I bevestig. Na EcoR I-behandeling is twee fragmente, naamlik die vektor- en die HBV-fragment, van onderskeidelik 6.0 en 'n 3.2kb vir pHBV3200 en 3.0 en 3.2kb vir pSP-HBV, in 'n agarosegel waargeneem.

Die oriëntasie van die HBV-invoeging is soos volg bepaal: Indien die HBV-fragment in die kloksgewyse oriëntasie in pHBV3200 ingevoeg is, behoort BamH I-behandeling drie fragmente van onderskeidelik 4.4, 3.4 en 1.4kb te lewer, terwyl die antikloksgewyse oriëntasie fragmente van onderskeidelik 6.1, 1.7 en 1.4kb sal gee. Soortgelyk sal 'n kloksgewyse HBV-invoeging in pSP-HBV ook drie fragmente van onderskeidelik 4.7, 1.4 en 0.1kb lewer, terwyl die antikloksgewyse oriëntasie se fragmente 3.0, 1.8 en 1.4kb sal wees; vergelyk met die plasmiedkaarte in Figuur 4.2. Uit die resultate in Figuur 4.3 is dit duidelik dat die HBV-genoom in beide die plasmiede in die kloksgewyse oriëntasie ingevoeg is.

Tabel 4.1. Verwagte fragmentgroottes vir die restriksie-analises van die twee plasmiede, pHBV3200 en pSP-HBV.

Baan *	Ensiem	Groottes van die fragmente	
		pHBV3200	pSP-HBV
2 en 6	Geen	-	-
3 en 7	Pvu I	9.0kb	6.0kb
4 en 8	EcoR I	6.0 en 3.2kb	3.2 en 2.9kb
5 en 9	BamH I	4.3, 3.3 en 1.4kb	4.7 en 1.4kb

* Bane van die gel in Figuur 4.3.



Figuur 4.3. Restriksie-analises van die twee plasmiede wat die volledige HBV-genoom bevat, pHBV 3200 en pSP-HBV. Bane: (1) λ /Hind III groottestandaard; (2-5) pHBV 3200 behandel met (2) geen ensiem; (3) Pvu I; (4) EcoR I; (5) BamH I; (6-9) pSP-HBV behandel met (6) geen ensiem (7) Pvu I; (8) EcoR I; (9) BamH I. Die groottes van die verwagte fragmente word in Tabel 4.1 gegee.

Daar is vroeër reeds in hierdie hoofstuk en in Hoofstuk 3 na die belangrike rol wat die sub tipe van die HBV-genoom in verskeie fasette van hierdie projek speel, verwys. Aangesien HBV-subtypes op grond van verskillende antigeniese determinantgebiede op die oppervlak van die viruspartikel onderskei word, het dit nog nooit die omvang van verskille in die primêre struktuur van die genoom weerspieël nie. In Hoofstuk 3 is daar gewys dat daar omvangryke verskille tussen die primêre strukture van die verskillende subtypes se genome voorkom, wat 'n definitiewe invloed op die effektiwiteit van antisens-volgordes kan hê. Tydens die verdere karakterisering van die gekloneerde HBV-genoom in hierdie deel van die projek, is daar gepoog om hierdie verskille in die primêre volgordes te gebruik as instrument om die sub tipe van die genoom te bepaal.

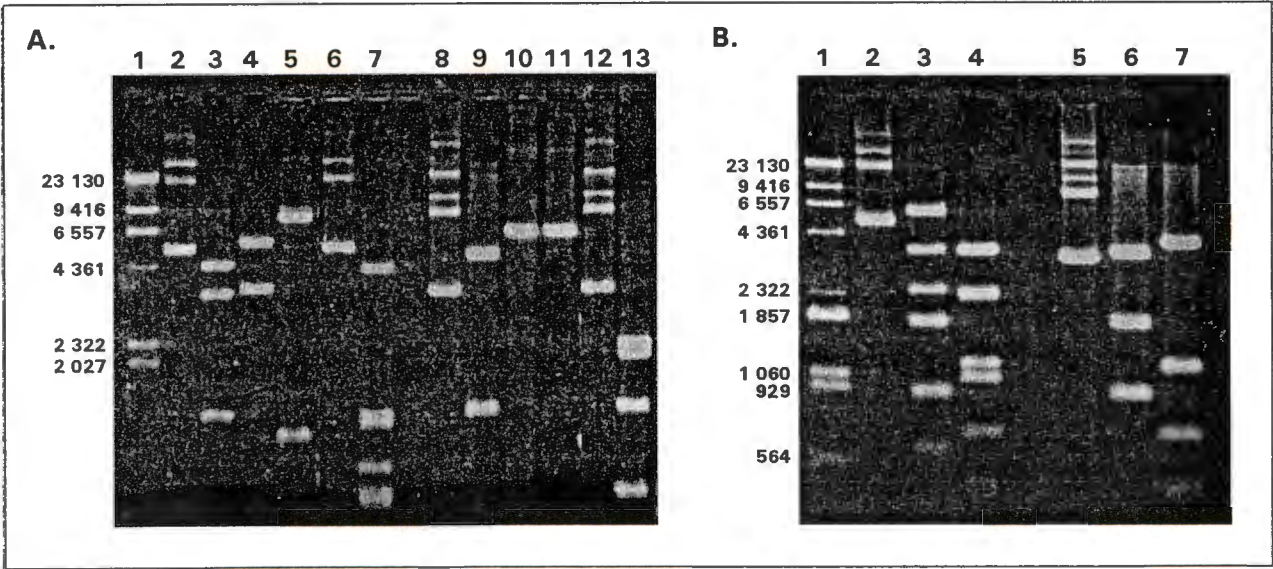
Daar is verwag dat verskille in die primêre volgordes van die genome in verskillende restriksiepatrone weerspieël sal word. Nadat hierdie vermoede deur restriksie-analises met behulp van 'n sagtewarepakket bevestig is (MicroGenie, V5.0, 1988), is 'n paar restriksie-ensieme gekies wat gebruik kan word om die verskillende HBV-subtypes maklik te kan onderskei. Met die keuse van restriksie-ensieme vir hierdie doel, is daar gepoog om ensieme wat 'n eenvoudige restriksie-patroon sou gee, te identifiseer. Daar is met ander woorde na ensieme gesoek wat die genoom nie meer as 3 tot 4 keer sny nie, sodat die subtypes maklik op grond van hul restriksiepatrone in 'n 1% agarosegel onderskei kan word. Restriksie-ensieme wat aan hierdie vereistes voldoen het, is geïdentifiseer en word in Tabel 4.2 gegee.

Tabel 4.2. Opsomming van die belangrikste restriksie-ensieme waarmee daar tussen die verskillende subtypes van HBV onderskei kan word.

Ensiem	HBV-subtype					Kloneringsvektor	
	adw ₂	adw	adr	ayr	ayw	pBR325	pSP64
Bal I	3	2	4	4	2	2	0
BamH I	2	2	1	1	3	1	1
Dra I	2	2	2	1	2	5	3
Dra III	1	1	0	1	1	0	0
EcoR I	1	1	1	0	1	1	1
EcoR V	1	1	0	0	0	1	0
Pst I	1	1	0	0	0	1	1
Ssp I	3	1	1	1	2	2	1
Sty I	6	5	6	7	5	2	0
Xho I	0	0	1	1	1	0	0

Die aantal restriksiepunte van die verskillende ensieme in die onderskeie subtypes, asook die kloneringsvektore, word aangetoon.

Deur verdere restriksiekartering van die twee plasmiede, pHBV3200 en pSP-HBV, is daar dan ook gepoog om die sub tipe van die gekloneerde genoom te bepaal. Restriksie-ensiembehandelings is volgens die standaardprotokol uitgevoer en die fragmente is hierna in 'n 1% agarosegel geskei. Vir die eerste groep behandelings is ensieme wat baie algemeen gebruik word en waarmee in die algemeen min probleme ondervind word, uit Tabel 4.2 gekies, om die basiese reaksietoestande mee te standaardiseer. Met hierdie groep ensieme, BamH I, EcoR V, Pst I, Xho I en Dra I, sou dit moontlik wees om tussen al die subtipes, behalwe adw en adw₂, te kan onderskei. Die resultate wat hieruit verkry is, soos dit in Figuur 4.4(A) en in Tabel 4.3(A) opgesom word, dui duidelik daarop dat die gekloneerde genoom sub tipe adw of adw₂ moet wees. Dit was nie altyd moontlik om ál die fragmente in die agarosegel te sien nie, soos byvoorbeeld die 0.1kb fragmente wat gevorm word wanneer pSP-HBV met BamH I en Pst I behandel word. In hierdie gevalle kon die fragmente egter vir beide ensieme in pHBV 3200 bevestig word.



Figuur 4.4. Restriksiekartering van die gekloneerde HBV-genoom om die sub tipe daarvan te bepaal. (A) Eerste stap restriksie-analises op pHBV3200 (Bane 2-7) en pSP-HBV (Bane 8-13) om te onderskei tussen die vyf hoofsubtipes van HBV. Bane: (1) λ /Hind III groottestandaard (2/8) onbehandeld; (3/9) BamH I; (4/10) EcoR V; (5/11) Pst I; (6/12) Xho I; (7/13) Dra I. (B) Tweede stap restriksie-analises om te onderskei tussen subtipes adw en adw₂. Bane: (1) λ /Hind III plus pBR322/BstN I groottestandaard, pHBV3200 in bane (2-4) en pSP-HBV in bane (5-7) is soos volg behandel: (2/5) onbehandeld; (3/6) Bal I; (4/7) Sty I. Die resultate van hierdie gel en die sub tipe waarop dit dui word in Tabel 4.3 saamgevat.

Tabel 4.3. Opsomming van die fragmente wat verkry is na die restriksie-analises wat daarop gemik was om die sub tipe van die HBV-genoom te bepaal.

Bane *	Ensiem	Aantal fragmente#		Voorspelde sub tipe	
		pHBV3200	pSP-HBV	pHBV3200	pSP-HBV
A.					
2 en 8	Geen	-	-	-	-
3 en 9	BamH I	3	2(3)	adw/adw ₂	adw/adw ₂
4 en 10	EcoR V	2	1	adw/adw ₂	adw/adw ₂
5 en 11	Pst I	2	1(2)	adw/adw ₂	adw/adw ₂
6 en 12	Xho I	Ongesny	Ongesny	adw/adw ₂	adw/adw ₂
7 en 13	Dra I	6	4	adw/adw ₂	adw/adw ₂
B.					
2 en 5	Geen	-	-	-	-
3 en 6	Bal I	5	3	adw ₂	adw ₂
4 en 7	Sty I	6(8)	4(6)	adw ₂	adw ₂

* Bane in Figuur 4.4.
 # Die aantal fragmente wat na elke behandeling in 'n 1% gel geïdentifiseer kon word, word gegee. Getalle in hakies verteenwoordig die aantal fragmente wat teoreties verwag word, maar wat nie almal in die gel gesien kon word nie, omdat hulle te klein was of omdat twee of meer fragmente met dieselfde grootte as een band waargeneem is.

Aangesien daar nie uit die resultate wat met hierdie groep ensieme verkry is, onderskei kon word tussen sub tipes adw en adw₂ nie, was 'n tweede karakteriseringstap met ander restriksie-ensieme nodig vir die finale onderskeid. Hiervoor is Bal I en Sty I ingespan en weer eens was dit moontlik om te kon onderskei tussen die twee sub tipes, soos bevestig is deur die resultate in Figuur 4.4(B) en Tabel 4.3(B). Met behulp van hierdie reeks restriksie-analises is die gekloneerde HBV-genoom se sub tipe as adw₂ bevestig.

Uit hierdie resultate blyk dit moontlik te wees om die sub tipe van 'n gekloneerde HBV-genoom met behulp van restriksie-ensiemanalises te bepaal. Die groottes van die fragmente wat verwag word, indien sub tipe adw₂ en adw met sekere restriksie-

ensieme behandel sou word, is bereken om die resultate te verifieer en word in Tabel 4.4 gegee. Hieruit kon duidelik gesien word hoeveel klein fragmente (kleiner as 500bp) gevorm word, wat moeilik in 'n 1 % gel gevisualiseer kan word. Dit het ook fragmente wat min of meer dieselfde groottes het en wat dus in 'n agarosegel sal oorvleuel, uitgewys. Deur die groottes van die fragmente te bepaal kan die resultate dus bevestig word indien onduidelikhede voorkom.

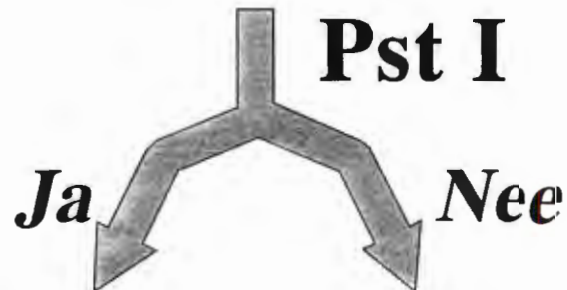
Tabel 4.4. Verwagte groottes van die restriksiefragmente van die gekloneerde HBV-genoom na ensiembehandeling indien dit sub tipe adw₂ of adw is.

Ensiem	Groottes van die fragmente			
A.	pHBV-3200		pSP-HBV	
BamH I	5.6, 2.2 en 1.4kb		4.7, 1.4 en 0.1kb	
Dra I	4.3, 1.8, 1.4, 0.7x2 en 0.3kb		2.3, 1.9, 1.3 en 0.7kb	
EcoR V	6.9 en 2.3kb		6.2kb	
Pst I	6.8 en 2.4kb		6.1 en 0.1kb	
Xho I	Sny nie		Sny nie	
B.	adw	adw ₂	adw	adw ₂
Bal I	3.6, 2.7, 1.7 en 1.2kb	3.6, 1.8, 1.6, 1.3 en 0.9kb	3.5 en 2.7kb	3.5, 1.8 en 0.9kb
Sty I	3.7, 2.1, 1.2, 1.1, 0.6, 0.3 en 0.2kb	3.7, 1.5, 1.2, 1.1, 0.6x2, 0.3 en 0.2kb	3.9, 1.2, 0.6, 0.3 en 0.2kb	3.3, 1.2, 0.6x2, 0.3 en 0.2kb

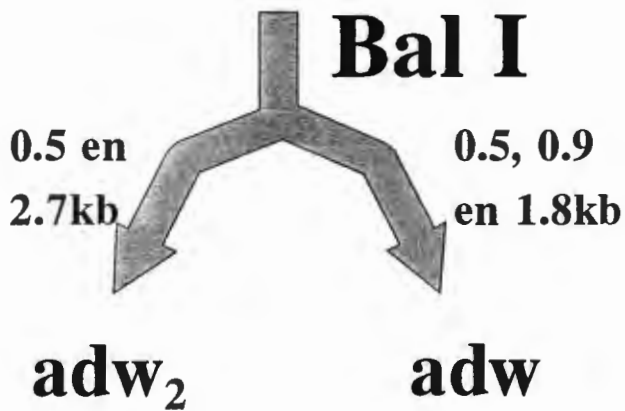
(A) Groottes van die fragmente wat verwag word ná restriksie-ensiembehandeling indien die gekloneerde HBV-genoom sub tipe adw of adw₂ is. (B) Groottes van die verwagte fragmente vir die onderskeid tussen sub tipe adw en adw₂. Vergelyk met die resultate in Figuur 4.4.

Die gevolgtrekking wat na afloop van hierdie restriksie-analises op die gekloneerde HBV-genoom gemaak kon word, naamlik dat dit sub tipe adw₂ is, stem ooreen met die volgordedata wat Valenzuela *et al.* (1979) vir hierdie HBV-genoom bepaal het. Uit hierdie resultate was dit moontlik om 'n vloeidiagram vir die sub tipebepaling van 'n HBV-genoom daar te stel, waar daar met die minimum aantal reaksies tussen al die verskillende subtypes onderskei kan word (Figuur 4.5).

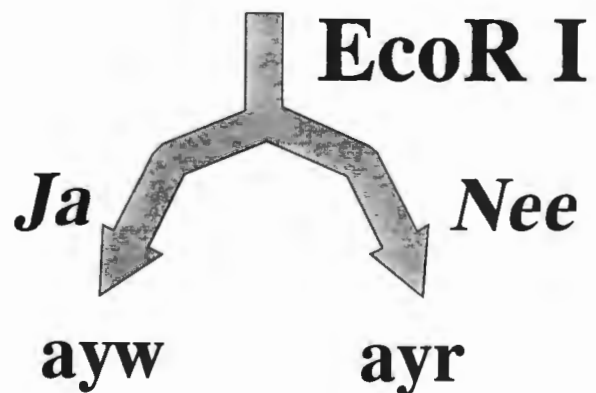
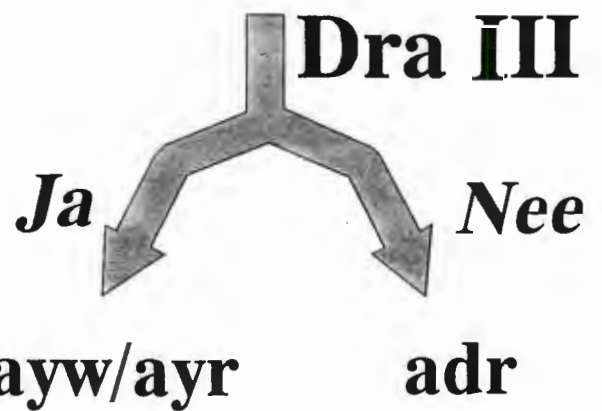
adw₂ /adw/ayw/ayr/adr



adw₂ /adw



ayw/ayr/adr



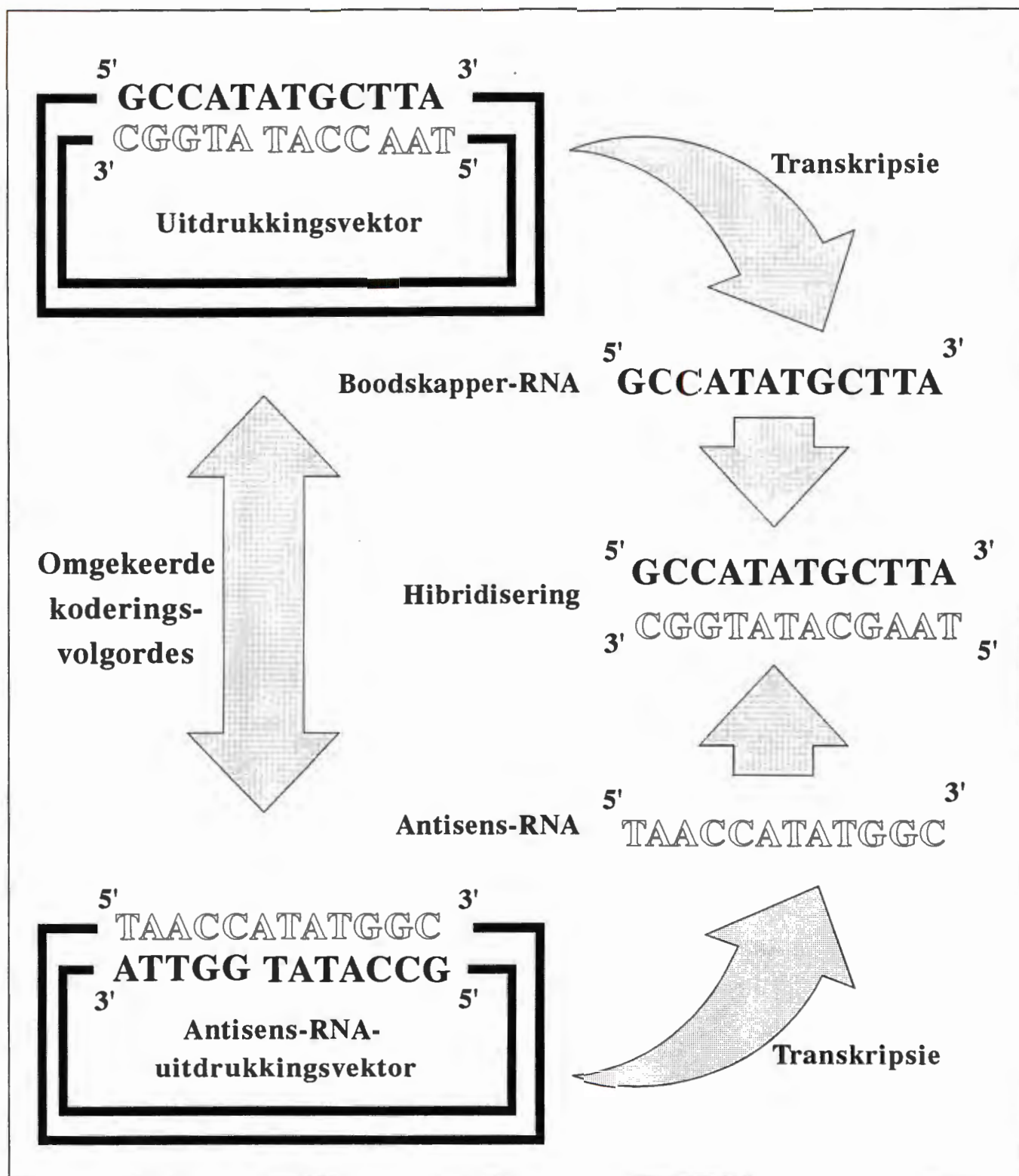
Figuur 4.5. HBV-subtypebepaling met behulp van restriksie-analise. Hierdie vloeidiagram stel 'n reeks opeenvolgende restriksie-analises voor waarmee daar onderskei kan word tussen die verskillende HBV-subtypes.

4.3. KONSTRUKSIE EN KARAKTERISERING VAN 'N ANTISENS-RNA-UITDRUKKINGSVEKTOR

Alhoewel die klem van hierdie studie op die werking van antisens-oligonukleotiede geval het, is daar ook een antisens-RNA-uitdrukingsvektor met die S-geen in die antisens-oriëntasie daarin, gekonstrueer. Hepatosellulêre sellyne wat die HBsAg uitdruk is met hierdie vektor getransfekteer om die invloed daarvan op die uitdrukking van HBsAg te bepaal. Antisens-RNA's se werking berus op presies dieselfde beginsels as dié van antisens-oligonukleotiede, naamlik die selektiewe hibridisering daarvan aan 'n spesifieke mRNA-spesie. Die voordeel van antisens-RNA bo antisens-oligonukleotiede is dat dit kontinu vanaf 'n antisens-geen, binne-in die sel gesintetiseer word (Weintraub, 1990 en Hill, 1993). Dit beteken dus dat die teikengeen permanent *in vivo* onderdruk kan word sonder dat enige verdere insette nodig is.

Aangesien 'n spesifieke antisens-RNA die komplementêre volgorde van 'n spesifieke mRNA-spesie het, beteken dit dat antisens-RNA-uitdrukingsvektore gekonstrueer kan word deur 'n geen, of 'n gedeelte daarvan, slegs in die omgekeerde oriëntasie in 'n uitdrukingsvektor te kloner (Figuur 4.6). Hierdeur word bewerkstellig dat die geen se nie-koderende string wel die koderende string vir die antisens-RNA word. Na die stabiele transfeksie van selle met 'n antisens-RNA-uitdrukingsvektor, sal hierdie antisens-geen getranskribeer word as antisens-RNA-volgordes, wat geenuitdrukking spesifiek sal inhibeer. In hierdie afdeling word die konstruksie en karakterisering van so 'n antisens-RNA-uitdrukingsvektor bespreek.

Aangesien al die antisens-oligonukleotiedanalises op die inhibisie van HBsAg-uitdrukking gemik was, om reces wat volledig in Hoofstuk 5 bespreek word, is besluit om dieselfde geen met behulp van antisens-RNA te inhibeer. Die volledige S-geen, pre-S1, pre-S2 en die S-geen, wat vir die grootproteïen in die HBV-mantel kodeer, is in die omgekeerde oriëntasie in die pMAMneo uitdrukingsvektor

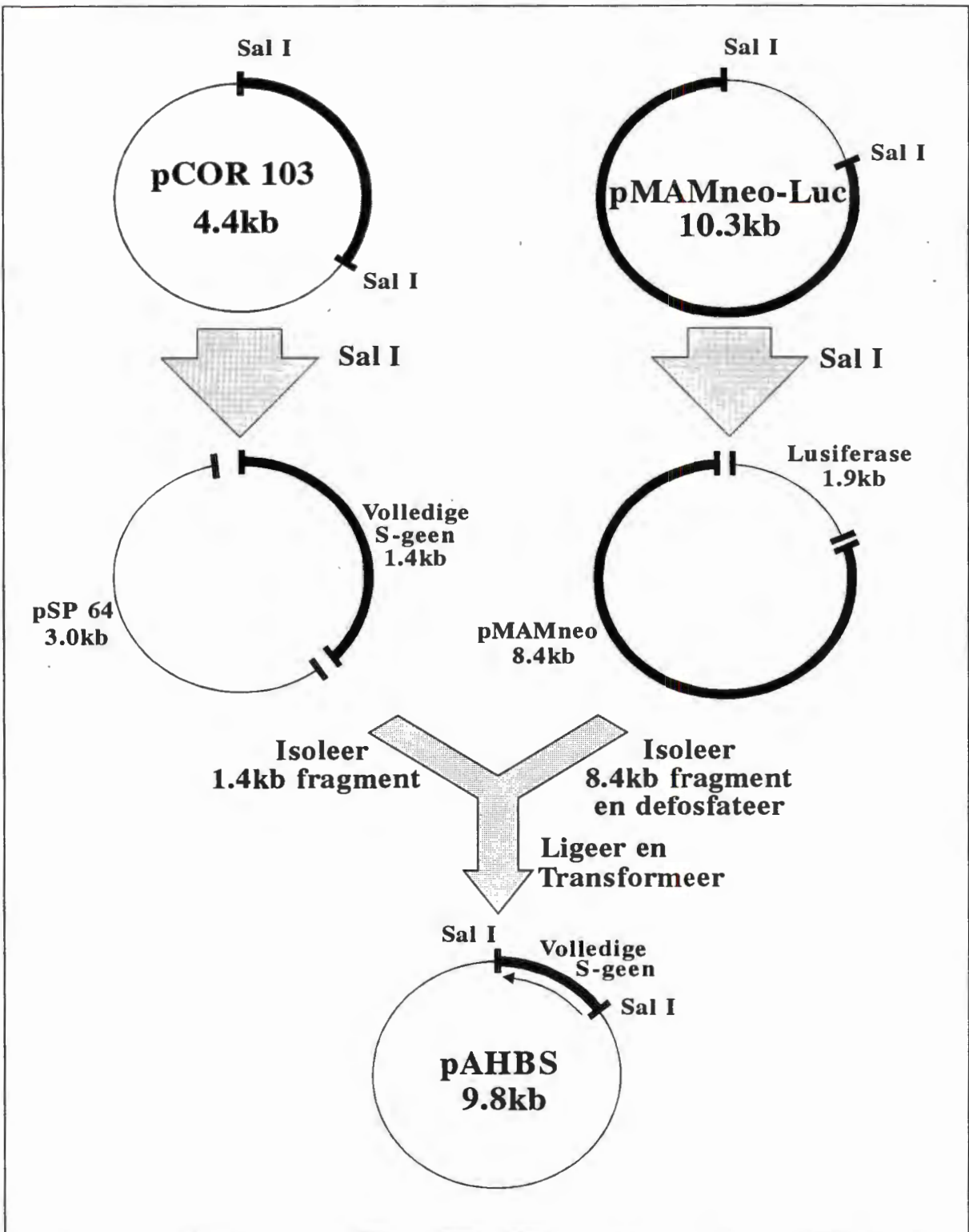


Figuur 4.6. Skematiese voorstelling van die konstruksie van 'n antisens-RNA-uitdrukkingvector.

gekloneer. Hierdeur is die antisens-RNA-uitdrukingsvektor, pAHBS, daargestel. Alle kloneringsmetodes en -tegnieke is uitgevoer soos wat dit in Afdeling 4.2 beskryf is.

pMAMneo is 'n uitdrukingsvektor wat vir die hoëvlak-uitdrukking van eukariotiese gene in soogdierselle ontwerp is (Lee *et al.*, 1981) en dit is as uitdrukingsvektor gekies vir die antisens-RNA-sisteem omdat dit oor die volgende eienskappe en kenmerke beskik wat dit 'n ideale uitdrukingsvektor maak:

- Dit beskik oor twee gene wat kodeer vir ampicillien- (Amp) en neomisien- (*neo*) weerstandbiedendheid. Die *E.coli neo*-geen, onder regulering van die SV40 vroeë promotor, maak die seleksie van getransfekteerde soogdierselle in die teenwoordigheid van die antibiotikum G418 (Genetisien; Boehringer Mannheim) moontlik. Die Amp-geen, daarenteen, maak die seleksie van getransformeerde *E.coli*-klone tydens die klonering en voorbereiding van die vektor moontlik.
- 'n Oorsprong vir replisering in bakterieë, die pBR322-*ori*, en in soogdierselle, SV40-*ori*, is teenwoordig.
- Dit beskik oor 'n handige multi-ensiem kloneringsgebied net ná die promotor en aktiveringsvolgordes. Gene wat uitgedruk moet word kan dus redelik maklik in enige van verskeie restriksiepunte ingevoeg word.
- 'n SV40-splytlaas- en poli-adenileringsseine net ná die multi-ensiem kloneringsgebied, waar die gene ingevoeg word, verseker korrekte RNA-prosessering in soogdierselle.
- 'n Tandem promotor- en aktiveringsvolgordekonstruk bestaande uit die *Rous-sarkoom*viruspromotor (RSV) en die muisuiertumorvirus se lang terminale herhalingsgebied (MMTV-LTR) wat 'n aktiveringsvolgorde bevat, verseker hoë uitdrukking van gekloneerde gene. Die MMTV-LTR word verder deur die hormoon deksametasoon geïnduseer wat beteken dat geenuitdrukking na wense aan- en afgeskakel kan word.



Figuur 4.7. 'n Skematiese voorstelling van die konstruksie van die antisens-RNA-uitdrukkingsvektor, pAHBS.

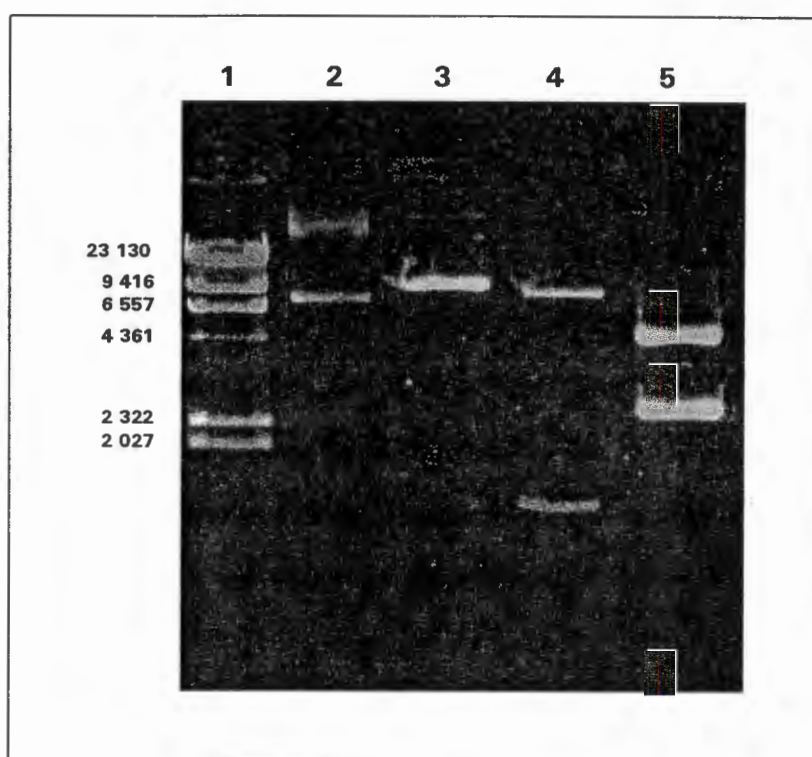
Die pMAMneo-Luc vektor is voorberei deur die verwydering van die lusiferase-geen uit die plasmied met behulp van die restriksie-ensiem Sal I. Hierna is die twee fragmente van mekaar in 'n 1% agarosegel geskei en die vektorfragment (8.4kb) is geëlueer en gedefosfateer. Vir die voorbereiding van die volledige S-geen, is die plasmied pCor103 (Figuur 4.7.) ook met Sal I behandel. Die fragmente is in 'n gel geskei en die 1.4kb S-geenfragment is geëlueer. Ligerings van die vektor- en S-geenfragmente en die transformering van die ligeringsmengsel, is volgens die standaardprotokolle gedoen en ampisillienweerstandbiedende klone is gekarakteriseer soos hierbo beskryf is.

In hierdie geval was dit baie belangrik om klone te identifiseer waar die S-geenfragment beslis in die omgekeerde oriëntasie ingevoeg het. Die restriksie-ensiem EcoR I is gebruik om tussen klone met invoegings in die verskillende oriëntasies te onderskei. Indien die S-geen in die verlangde omgekeerde oriëntasie ingevoeg het, sou 'n EcoR I-behandeling fragmente van onderskeidelik 4.7, 2.6 en 2.5kb gelewer het. Vir die kloksgewyse oriëntasie kon fragmente van onderskeidelik 5.3, 2.6, en 1.9kb verwag word. Uit die karakteriseringsresultate soos wat dit in Figuur 4.8 en Tabel 4.5 gegee word, was dit in die eerste plek duidelik dat die 1.4kb S-geenfragment beslis ingevoeg het en dat die Sal I-kloneringspunte herstel het. Verder blyk dit ook uit die EcoR I-behandeling dat die S-geen in hierdie spesifieke kloon, in die omgekeerde oriëntasie ingevoeg het. Die antisens-uitdrukkingsvektor, pAHBS (Figuur 4.9), vir die spesifieke inhibisie van HBsAg-uitdrukking is dus suksesvol gekonstrueer.

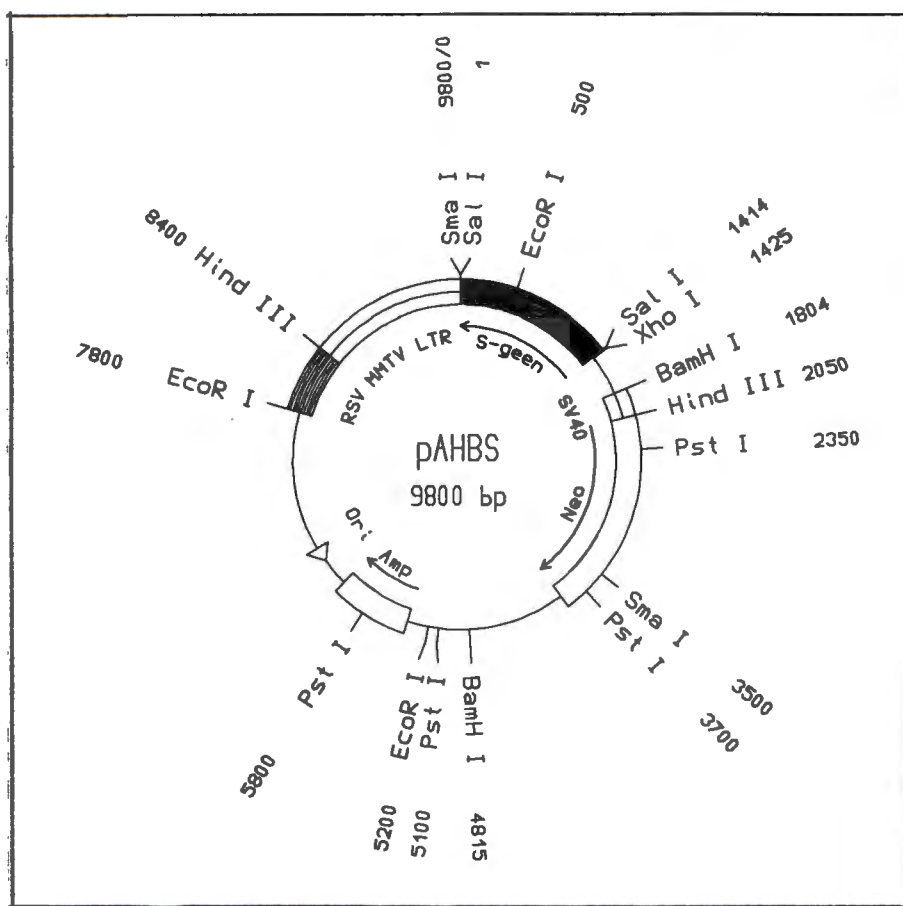
Tabel 4.5. Groottes van die fragmente wat tydens die restriksiekarakterisering van pAHBS verwag is.

Baan*	Ensiem	Groottes van fragmente
2	Ongesny	-
3	Xho I	10.0kb
4	Sal I	9.6 en 1.4kb
5	EcoR I	4.7, 2.6 en 2.5kb

* Bane van die gel in Figuur 4.8.



Figuur 4.8. Restriksie-karakterisering van die antisens-RNA-uitdrukingsvektor pAHBS. Bane : (1) λ /Hind III groottestandaard; (2) Onbehandelde plasmied; (3) Xho I; (4) Sal I; (5) EcoR I. Die verwagte fragmentgroottes word in Tabel 4.5 gegee.



Figuur 4.9. 'n Volledige restriksie-ensiemkaart van die antisens-RNA-uitdrukkingsvektor pAHBS.

4.4. GEVOLGTREKKING

Die volledige HBV-genoom is gesubkloneer en is daarna vir verdere gebruik volledig gekarakteriseer. Twee afsonderlike plasmiede met die volledige HBV-genoom daarin gekloneer, is dus nou beskikbaar vir die vermeerdering en isolering van ander HBV-fragmente. pHBV3200 (Figuur 4.2) is 'n 9.2kb plasmied met die 3.2kb HBV-genoom in die EcoR I-kloneringspunt van pBR325 gekloneer. pSP-HBV (Figuur 4.2)

is 'n 6.2kb plasmied waar die HBV-genoom in die EcoR I-kloneringspunt van pSP64 gekloneer is. Met behulp van restriksie-analises van hierdie twee plasmiede, is die sub tipe van die gekloneerde HBV-genoom as **adw₂** bevestig, wat ooreenstem met die volgordes wat deur Valenzuela *et al.* (1979) vir hierdie genoom bepaal is.

'n Antisens-RNA-uitdrukkingsvektor, pAHBS, wat vir die antisens-RNA van die volledige mantelproteïengeen (HBsAg) van HBV kodeer, is ook suksesvol gekonstrueer. Dit is bewerkstellig deur die volledige S-geen (pre-S1/pre-S2/S) van 1.4kb in die omgekeerde oriëntasie in die Sal I-kloneringspunt van die uitdrukkingsvektor pMAMneo, te kloneer.

HOOFSTUK 5

KARAKTERISERING VAN DRIE HEPATOSELLULÊRE KARSINOOMSELLYNE

5.1. INLEIDING EN DOELSTELLING

Gedetailleerde studies van HBV-geenuitdrukking tydens replisering is tot dusver gekortwiek deur die afwesigheid van geskikte sisteme waarin HBV *in vitro* vermenigvuldig kan word. Kennis ten opsigte van die regulering en uitdrukking van die virale proteïene is as gevolg hiervan redelik beperk (Aspinal, 1987). Mens-HBV is verder ook baie gasheerspesifiek wat beteken dat *in vivo*-replisering en geenuitdrukking slegs in geïnfecteerde sjimpansees en menslike pasiënte nagevors kon word (Ganem, 1984). Geleenthede vir sulke studies is egter baie beperk en hulle is ook tydrowend, duur en riskant aangesien daar met lewendige, infektiewe virus gewerk word. Daar bestaan dus 'n dringende behoefte aan alternatiewe, hanteerbare toetssisteme waarin HBV-geenuitdrukking nagevors kan word. Deur van naverwante virusse soos byvoorbeeld Virginiese marmot- (Summers *et al.*, 1978), grondeekhoring- (Marion *et al.*, 1980b), reier- (Sprengel *et al.*, 1988) en eend-Hepatitis-virusse (Mason *et al.*, 1980) gebruik te maak, kan van hierdie probleme oorkom word. Soos wat reeds in Hoofstuk 3 aangetoon is, bestaan daar egter groot verskille in die genetiese samestelling en gevolglik patogenisiteit van hierdie virusse, wat dus hul bruikbaarheid baie beperk.

'n Alternatiewe benaderingswyse vir die bestudering van *in vitro*-geenuitdrukking, is om die uitdrukking van so 'n geen in selkulture te bestudeer. Selkulture is makliker hanteerbaar en goedkoper om te onderhou as lewende diersisteme en geenprodukte word in baie gevalle uitgeskei en kan dus maklik uit die medium geïsoleer word. In gevalle waar gene, soos byvoorbeeld dié van virusse, wat nie op sigself as selkulture onderhou kan word nie, nagevors moet word, kan die relevante gene afsonderlik gekloneer en in 'n geskikte sellyn getransfekteer word. Dit lei tot selfs nog groter plooibaarheid van hierdie benaderingswyse, aangesien daar vir spesifieke eienskappe en behoeftes geselekteer kan word. So kan 'n spesifieke geenproduk byvoorbeeld met behulp van 'n seinpeptied geteiken word vir uitskeiding. Genome van riskante of gevaarlike organismes soos byvoorbeeld dié van HBV, kan ook opgedeel word sodat daar met slegs 'n enkele geenproduk, wat wanneer dit geïsoleer is, onskadelik is, gewerk kan word.

'n Verdere motivering vir die gebruik van selkulture vir die studie van HBV-geenuitdrukking, spruit uit die feit dat HBV spesifiek in die genoom van die gasheer se hepatosiete integreer (Blum *et al.*, 1984). Daar behoort dus 'n hele verskeidenheid "natuurlike" hepatiese sellyne, afkomstig van HBV-geïnfekteerde pasiënte, met verskillende eienskappe beskikbaar te wees. Dít beteken dat dit slegs nodig is om 'n geskikte sellyn, wat aan al die vereistes van 'n toetssisteem sal voldoen, te identifiseer.

Behoeftes en vereistes waaraan 'n toetssisteem vir hierdie studie en vir die antisens-tegnologie in die algemeen moet voldoen, kan soos volg opgesom word:

- Dit moet so na as moontlik aan die uiteindelijke teikensisteem wees. In hierdie geval sal die teiken uiteindelik HBV-geïnfekteerde hepatosiete in die gasheer wees waar HBV repliseer.
- In 'n geval soos hierdie waar daar met 'n patogene virus gewerk word, moet die sisteem aan baie streng veiligheidsmatreëls voldoen. Geen volledige, infektiewe virusdeeltjies of patogeniese produkte mag gevorm word nie.

- Die sisteem moet so eenvoudig as moontlik wees en so goedkoop as moontlik onderhou kan word.
- Die proteïen wat geteiken word, moet in kwantifiseerbare hoeveelhede uitgedruk word en verkieslik in die medium uitgeskei word.
- Hierdie geenproduk moet dan ook so eenvoudig, akkuraat en goedkoop as moontlik gekwantifiseer kan word.

Selkulture hou dus groot belofte vir hierdie studie in, aangesien dit aan al die vereistes en behoeftes van 'n toetssisteem vir die antisens-tegnologie kan voldoen. In hierdie hoofstuk word die karakterisering van drie hepatosellulêre karsinoomsellyne (HSK-sellyne), met die oog op die keuse van 'n geskikte sellyn wat gebruik kan word om die inhibisie van HBV-geenuitdrukking met behulp van antisens-oligonukleotiede te demonstreer, beskryf.

5.2. SELEKSIE VAN DRIE HEPATOSELLULÊRE KARSINOOMSELLYNE

Ten spyte van die probleme wat met die daarstelling van HSK-sellyne ondervind word, is verskeie lewensvatbare sellyne reeds suksesvol uit lewertumore ontwikkel (Tabel 5.1). In die algemeen word meer as 60% van alle HSK-sellyne met HBV geassosieer en indien virale DNA in HSK-sellyne teenwoordig is, is dit in die gasheer se chromosomale DNA geïntegreer (Aspinal, 1987). Soos wat reeds in voorafgaande hoofstukke genoem is, is daar vier ooplesrame in die HBV-genoom geïdentifiseer. Hiervan word slegs die S-geen konsekwent in mens HSK-sellyne uitgedruk, selfs al is die volledige koderingsvolgordes vir sommige van die ander gene in sekere sellyne teenwoordig (Dejean, *et al.*, 1984 en Koshy *et al.*, 1983).

Die aantal identifiseerbare geïntegreerde HBV DNA-volgordes in die genome van verskillende HSK-sellyne, varieer tussen 1 en 8 en verskillende navorsers het verskillende resultate verkry vir dieselfde sellyn (Twist *et al.*, 1981 en Cao *et al.*,

1986). So byvoorbeeld het Hind III-behandelde PLC/PRF/5 genomiese DNA drie (3) (Marion *et al.*, 1980b), vyf (5) (Brecht *et al.*, 1982) en ses (6) (Edman *et al.*, 1980) HBV-bevattende fragmente in die hande van die verskillende navorsers gelewer.

Tabel 5.1. HSK-sellyne en HBV.

HSK-sellyn	Geïntegreerde HBV-DNA	HBsAg- sintese	Verwysing
Bel 7402	-	-	Koshy <i>et al.</i> , 1981
Bel 7404	-	-	Koshy <i>et al.</i> , 1981
Bel 7405	-	-	Koshy <i>et al.</i> , 1981
CZHC/8571	+	+	Cao <i>et al.</i> , 1986
Delsh-5	nb	+	Das <i>et al.</i> , 1980
Focus	+	-	He <i>et al.</i> , 1984
HA 22T/VGH	+	-	Aspinal, 1987
HA 47T/VGH	+	-	Aspinal, 1987
Hep 3B	+	+	Twist <i>et al.</i> , 1981
HCC-M	nb	-	Watanabe <i>et al.</i> , 1983
HuH-1	+	+	Koike <i>et al.</i> , 1983
HuH-2	+	-	Yaginuma <i>et al.</i> , 1985
HuH-4	nb	+	HuH and Utakoji, 1981
HuH-7	nb	-	Nakabayashi, 1982
KG 55T	+	-	Koike <i>et al.</i> , 1983
Mahlavu	-	-	Koshy <i>et al.</i> , 1981
"	+	-	Shouval <i>et al.</i> , 1984
Mz-Hep-1	nb	-	Dippold <i>et al.</i> , 1985
NTUh-3	+	nb	Liu <i>et al.</i> , 1981
PLC/PRF/5	+	+	Marion <i>et al.</i> , 1980
TONG/PHC	+	+	Lin <i>et al.</i> , 1984

- : nie teenwoordig + : wel teenwoordig nb : nie bepaal nie

Verder het Twist en sy medewerkers (1986) waargeneem dat die patroon van integrering vir drie Hep 3B-afgeleide klone verskil en op soortgelyke wyse is aangetoon dat die hibridiseringspatroon van 'n spesifieke sellyn verander het namate die selle verouder het (Liu *et al.*, 1986).

Al hierdie resultate dui dus op die onstabiele integrering van HBV-DNA-volgordes in die gasheer se genoom. Alhoewel al die beskikbare HSK-sellyne reeds volledig in die literatuur gekarakteriseer en beskryf is (Tabel 5.1), sal dit dus steeds nodig wees om die eienskappe van die spesifieke sellyne waarmee daar gewerk gaan word, te bevestig.

Uit al die beskikbare HBV-geassosieerde HSK-sellyne is drie kandidate gekies wat moontlik aan die vereistes van 'n toetssisteem sou voldoen. Die belangrikste van hierdie vereistes was hul vermoë, of juis onvermoë in die geval van kontroles, om die HBsAg uit te druk. Hep 3B en PLC/PRF/5-selle is as moontlike HBsAg-positiewe sisteme en Mahlavu-selle as 'n negatiewe kontrole geïdentifiseer (Tabel 5.2). Hierdie sellyne moes dus eerstens volledig ten opsigte van hul HBV-genotipiese en -fenotipiese eienskappe gekarakteriseer word.

Tabel 5.2. Drie HSK-sellyne wat in hierdie studie gebruik is.

Sellyn	Beskryf deur	HBV DNA	HBsAg
Mahlavu	Prozesky <i>et al.</i> , 1973	-	-
Hep3B	Aden <i>et al.</i> , 1979	+	+
PLC/PRF/5	Alexander <i>et al.</i> , 1976	+	+

Al drie hierdie sellyne is vanaf 'n kommersiële verskaffer (Highveld Biologicals) verkry en volgens die aanbevole, standaardmetodes as monolaagkulture gekweek (Tabel 5.3). Dulbecco se gemodifiseerde essensiële medium (DMEM), (Highveld Biologicals) waarby 10% hitte-geïnaktiveerde fetale kalfserum (Highveld Biologicals)

en 25mM HEPES (N-2-hidroksietielpiperasien-N'-2-etaansulfoonsuur) (pH7.5) (Sigma) gevoeg is, is vir al drie die sellyne gebruik. Die selkulture is in 25 en 75cm² plastiese weefselkultuurflesse (Sterilin) by 37°C onder 5% CO₂ en 80% humiditeit geïnkubeer. Sodra die flesse meer as 80% vol was, is die selle getripsineer en volgens standaardmetodes in die subkultuurverhoudings wat in Tabel 5.3 aangedui is, verdeel.

Tabel 5.3 Die drie HSK-sellyne wat in hierdie studie gebruik is.

Sellyn	Verskaffer en katalogusnommer	Voorgeskrewe groeimedium	Subkultuur-verhouding
Mahlavu	HB : 0089	DMEM, 10% IFKS	1:6
Hep3B	HB : 0087	DMEM, 10% IFKS	1:4
PLC/PRF/5	HB : 0011	DMEM, 10% IFKS	1:8

HB : Highveld Biologicals. DMEM : Dulbecco se gemodifiseerde essensiële medium.
 IFKS : Geïnaktiveerde fetale kalfserum.

5.3 KARAKTERISERING VAN DIE HSK-SELLYNE

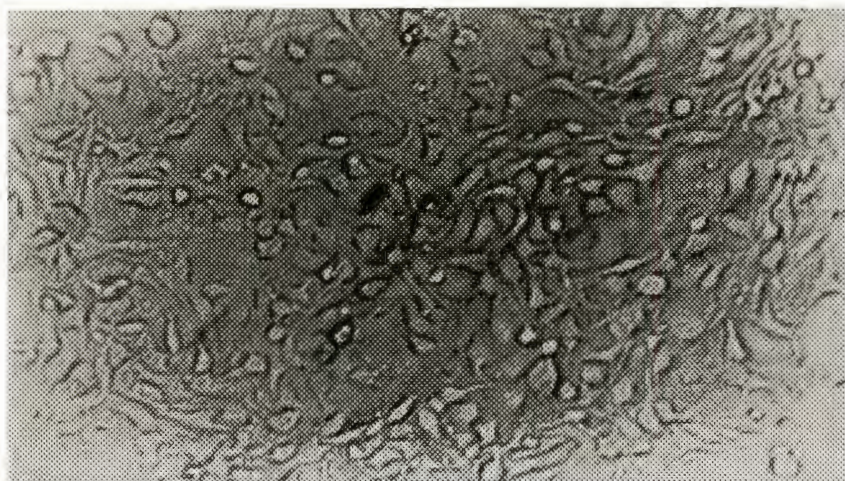
Die HSK-sellyne is volgens hul algemene morfologiese, genotipiese en fenotipiese eienskappe ten opsigte van HBV gekarakteriseer. Om die algemene morfologie van die selle te bestudeer, is hulle onder normale weefselkultuurtoestande en na kleuring onder 'n fasekontrasmikroskoop gefotografeer. HBV-nukleïensuurvolgordes in die selle is met behulp van Southern- en kolkladanalises, vir onderskeidelik die DNA en RNA, gekarakteriseer. Die teenwoordigheid en intrasellulêre verspreiding van die HBsAg in die HSK-sellyne, is deur middel van immunogoudkleuring en elektronmikroskopie bepaal. Laastens is die HBsAg-konsentrasie in die media met behulp van ensiemgekoppelde immuno-adsorpsie analyses (ELISA's) bepaal.

5.3.1. FASEKONTRAS- EN LIGMIKROSKOPIE

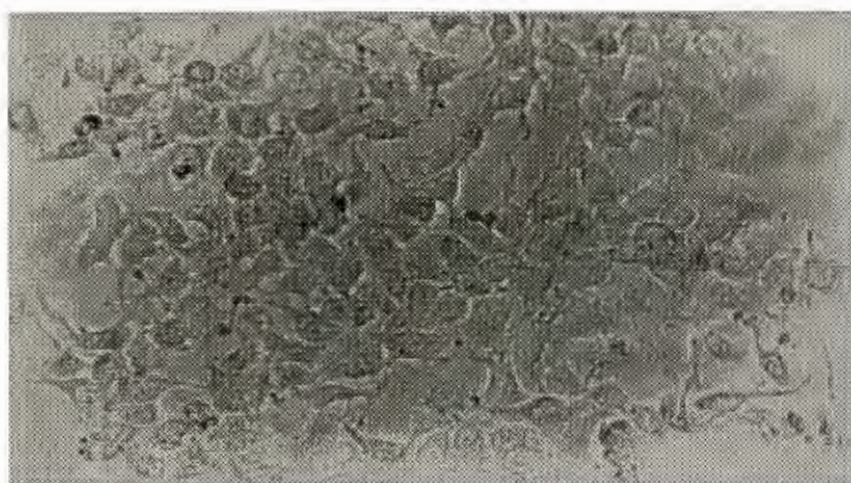
Om vas te stel of die algemene morfologie van die verskillende sellyne met dít wat in die literatuur beskryf word, ooreengestem het, is die selle in die flesse onder normale weefselkultuurtoestande met behulp van 'n fasekontrasmikroskoop gefotografeer. Mahlavu-selle kon geklassifiseer word as verlengde hepatosiete wat verskeie lang uitstulpings vorm sodra hulle aan die fles vasheg (Figuur 5.1.A). Hep 3B-selle is tipiese hepatosiete met min uitsonderlike kenmerke en is geneig om foki met baie klein individuele selle onder normale weefselkultuurtoestande te vorm (Figuur 5.1.B). PLC/PRF/5-selle is ook tipiese, poligonale hepatosiete met duidelike kerne en membrane. PLC/PRF/5-selle is in die algemeen groter as Hep 3B-selle en groei as 'n monolaag (Figuur 5.1.C).

Selle is ook op dekglasies gekweek, gefikseer en gekleur vir fotografering onder 'n ligmikroskoop. Dekglasies is gesteriliseer deur middel van outoklafering en een-een in die 9.6cm²-putte van 'n 6-put-selkultuurplaat geplaas. Die selle in 'n 25cm²- fles wat tussen 80 en 100% vol was, is getripsineer en in 20ml volledige medium opgeskud. Drie milliliter van die selsuspensie is in elke put bo-op die dekglasies geplaas en vir 24 uur geïnkubeer. Nadat die selle 'n kans gehad het om aan die dekglasies vas te heg, is hulle verwyder en twee maal in 1x PBS-buffer (0.8% (m/v) NaCl, 0.02% (m/v) KCl, 0.09% (m/v) Na₂HPO₄ en 0.01% (m/v) MgCl₂) gespoel. Hierna is die selle vir 30 minute in 'n petribakkie met Bouins-fikseermiddel (25% (v/v) formalien, 74.5% (v/v) versadigde waterige-pikriensuur [$\sim$ 6.6g pikriensuur in 500ml water] en 0.5% ysasynsuur) gefikseer en weer twee maal met 1x PBS-buffer afgespoel. Die selle is gekleur deur dit soos volg in die verskillende oplossings by kamertemperatuur te inkubeer: 3.5 minute in hematoksien, 1 minuut in water, 20 sekondes in eosien en 30 sekondes in water terwyl dit versigtig geroer word. Hierna is die selle gedehidreer deur dit vir 30 sekondes elk in 70%etanol, 90%etanol, twee maal in 100% etanol en laastens in bensol te spoel. Vir die bewaring van die selle, is dit met behulp van 'n druppel hars op 'n voorwerpglasie vasgesit waarna die hars toegelaat is om oornag by 70°C te polimeriseer.

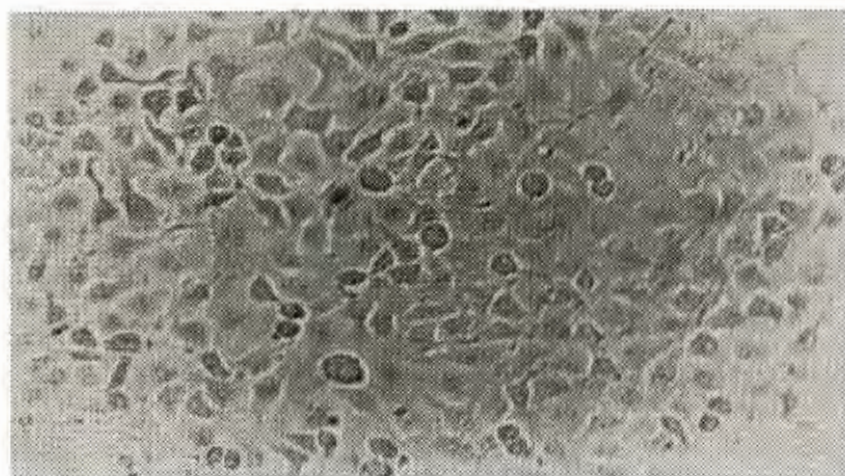
A.



B.



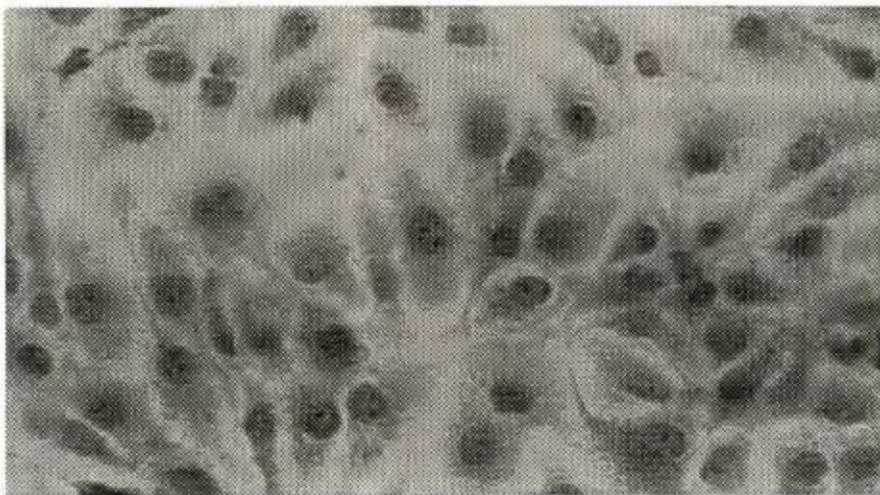
C.



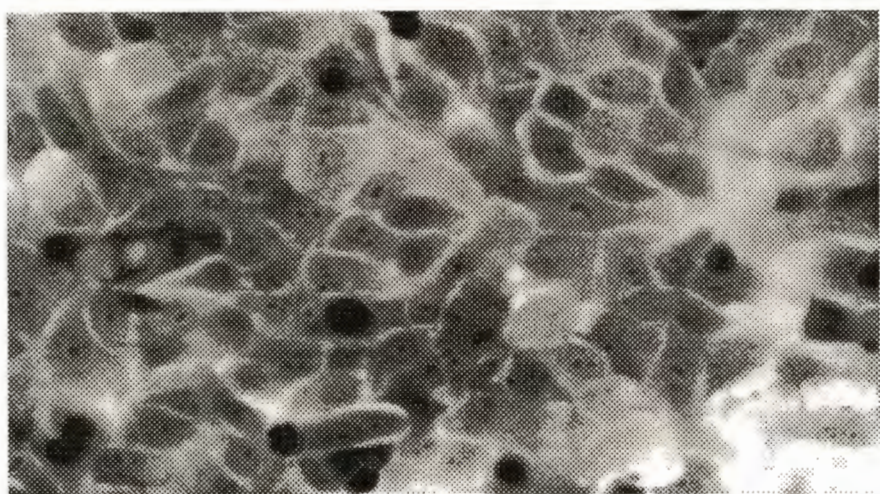
200x-vergroting

Figuur 5.1. Fasekontrasmikrograwe van die drie HSK-sellyne wat gekarakteriseer is. A. Mahlavu-selle. B. Hep 3B-selle. C. PLC/PRF/5-selle.

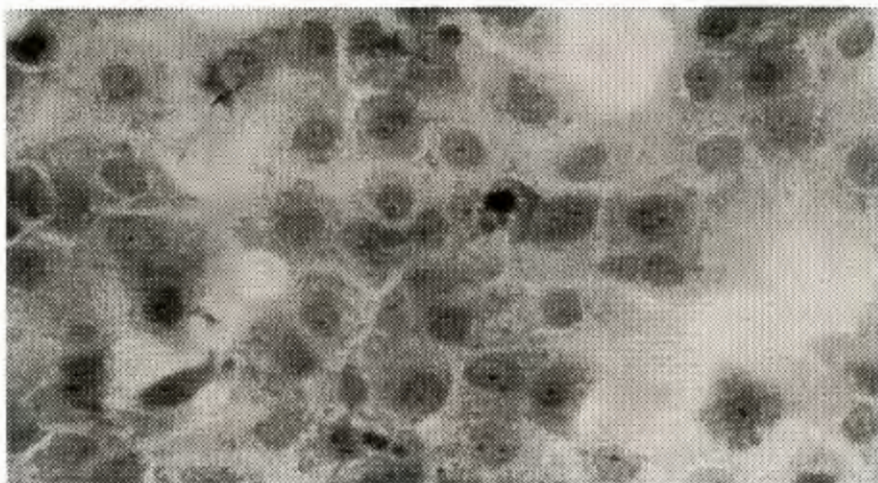
A.



B.



C.



400x-vergroting

Figuur 5.2. Ligmikrograwe van die gefikseerde en gekleurde HSK-selle. A. Mahlavu-selle. B. Hep 3B-selle. C. PLC/PRF/5-selle.

Aangesien hierdie in essensie 'n herhaling van die fasekontrasmikroskopie op die lewende selle was, was die resultate wat verkry is dieselfde as wat hierbo beskryf is. Dit beteken dus dat die fiksering en kleuring van die selle wat op dekglasies gekweek is, geslaagd was en die gekleurde membrane en kerne is selfs beter gedefinieer as in die fasekontrasfoto's (Figuur 5.2). Die voordeel van hierdie tegniek is dat die gefikseerde selle vir 'n onbeperkte tyd gestoor kan word vir latere verwysing.

5.3.2. SOUTHERN-OORDRAGANALISES

Die teenwoordigheid, al dan nie, van geïntegreerde HBV-DNA-volgordes in die genome van die onderskeie sellyne, is met behulp van Southern-oordraganalises bepaal. Genomiese DNA (gDNA) is, met die uitsondering van 'n enkele wysiging, volgens die standaardmetode soos deur Vergeer beskryf is (1988), uit die selle van sewe 75cm²-flesse geïsoleer. Die wysiging wat aan die protokol aangebring is, behels die etanolpresipiteringstap. Na die chloroform:isoarnielalkohol-ekstraksie, is vrieskoue (-20°C) 100% etanol versigtig by die DNA-oplossing in 'n 100ml glasbeker gevoeg, sonder dat die twee fases meng. gDNA wat op die interfase gepresipiteer het, is daarna op 'n steriele glasstafie gedraai, gedroog en in Roberts-buffer opgelos. Hierdie metode verseker dat slegs gDNA met 'n hoë molekulêre massa herwin word. Laastens is die konsentrasie en suiwerheid van die DNA spektrofotometries bepaal.

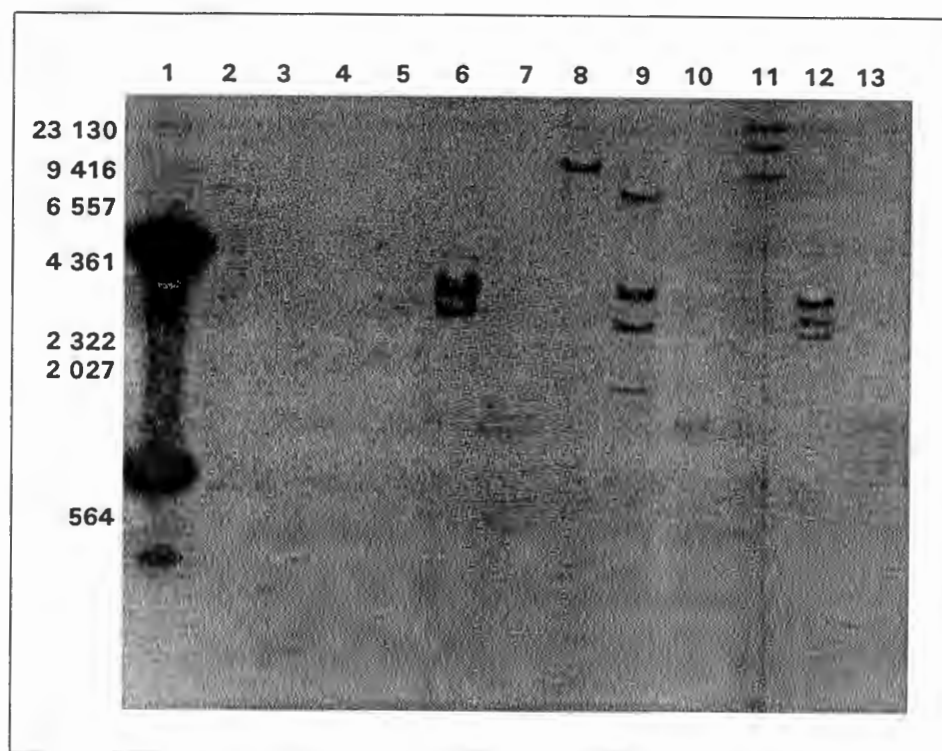
Southern-oordraganalises is volgens die metode van Southern (1975), met klein veranderinge soos wat deur Möhr (1989) beskryf is, uitgevoer. Die gDNA vir die Southern-oordragte is onderskeidelik met die restriksie-ensieme Hind III, Xba I en Xba I/Dra I behandel. Hierdie spesifieke ensieme is gekies, omdat Hind III nie in die geval van subtipo adw₂, in die HBV-genoom sny nie, Xba I die genoom 93bp stoom af van die S-geen inisiasiekodon sny en omdat 'n Xba I/Dra I-dubbelbehandeling 'n spesifieke fragment van 695bp behoort te lewer. Tien mikrogram gDNA van elk van

die HSK-sellyne asook van 'n muis-fibroblastsellyn, C127, wat as 'n negatiewe kontrole gebruik is, is elk met die onderskeie restriksie-ensieme behandel. Nadat die volledigheid van die snitte getoets is, is die behandelde gDNA en 10ng Acc I-behandelde pSP-HBV-plasmied-DNA as positiewe kontrole, oornag in 'n 0.8% agarosegel teen 20V geëlektroforeer. Hierna is die DNA in die gel gedenatureer, geneutraliseer en na 'n nitrosellulose membraan (Schleicher en Schuell, BA 85) oorgedra. Die DNA is onomkeerbaar aan die membraan gebind deur dit vir 2 uur onder vakuum by 78°C te bak. Die membraan is onder vakuum by kamertemperatuur geberg tot net voor gebruik.

Voor peiling, is die membraan vir 4 uur by 42°C in 10ml prehybridiseringsmengsel (5x SSC, 50% (v/v) formamied, 0.1% (m/v) SDS, 200µg/ml gesoniseerde salmsperm-DNA, 10% (m/v) dekstraansulfaat en 4x Denhardt se reagens) geprehybridiseer, waarna dit by 42°C vir 16 uur met die volledige HBV-genoom gepeil is. Die 3200bp HBV-peiler is na EcoR I-behandeling uit pSP-HBV geïsoleer en is met behulp van 'n vervangingsmerking-protokol (Maniatis *et al.*, 1982) met α -³²P-dATP tot 'n spesifieke aktiwiteit van groter as 10⁸t.p.m./µg gemerk. Vir hibridisering is die peiler tot 'n finale konsentrasie van 10ng/ml in die hibridiseringsmengsel gevoeg. Na hibridisering is die membraan vier maal met 2x SSC en 0.1% SDS by kamertemperatuur, twee maal met 2x SSC en 0.1% SDS by 60°C, een maal met 1x SSC en 0.1% SDS by 60°C en een maal met 0.5x SSC en 0.1% SDS by 60°C gewas en daarna op die bank gedroog. Al die hibridisering- en wasstappe is in 'n Hybaid hibridiseringsoond uitgevoer. Vir die visualisering van die hibridiseringspatroon, is die membraan vir 1 tot 2 dae aan Cronex-4 X-straalfilm by -70°C blootgestel en daarna is die X-straal ontwikkel.

Die Southern-oordraganalise se resultaat word in Figuur 5.3 gegee. In die eerste plek is dit duidelik dat spesifieke hibridisering wel plaasgevind het. Die positiewe kontrole, pSP-HBV, wat met die restriksie-ensiem Acc I behandel is, toon die verwagte fragmente van 5.12, 0.86 en 0.25kb. Terselfdertyd is daar geen hibridisering by enige van die behandelinge van die negatiewe kontrole waargeneem

nie. Vir die Mahlavu-selle is, teen die verwagting in, 'n positiewe resultaat vir die Xba I-behandeling verkry met twee fragmente van onderskeidelik 3.9 en 3.2kb. Beide die Hind III- en Xba I/Dra I-behandelinge het geen hibridisering getoon nie. Hep 3B-DNA het 'n enkele fragment van 12.3kb na die Hind III-behandeling, 4 fragmente van onderskeidelik 8.4, 3.6, 2.9 en 1.7kb na die Xba I-behandeling en een fragment na die Xba I/Dra I-behandeling by 1.0kb gelever. Vier fragmente van onderskeidelik 21.4, 16.2, 10.9 en 7.4kb is na die Hind III-behandeling van die PLC/PRF/5-gDNA verkry, terwyl die Xba I-behandeling 3 fragmente van 3.6, 3.1 en 2.7kb en die Xba I/Dra I-behandeling 'n ligte smeer rondom 1.0kb gegee het.



Figuur 5.3. Southern-oordraganalise van drie HSK-sellyne. Bane : (1) pSP-HBV/Acc I (Positiewe kontrole), (2) C127/Hind III, (3) C127/Xba I, (4) C127/Xba I/Dra I, (5) Mahlavu/Hind III, (6) Mahlavu/Xba I, (7) Mahlavu/Xba I/Dra I, (8) Hep 3B/Hind III, (9) Hep 3B/Xba I, (10) Hep 3B/Xba I/Dra I, (11) PLC/PRF/5/Hind III, (12) PLC/PRF/5/Xba I, (13) PLC/PRF/5/Xba I/Dra I.

Alhoewel HBV-DNA-volgordes nie in die Mahlavu-selle verwag is nie, is positiewe resultate voorheen ook deur Shouval *et al.* verkry (1984). Kontaminasie kan waarskynlik buite rekening gelaat word, aangesien die nodige voorsorg daarteen getref is tydens die uitvoering van die eksperiment. 'n Kontaminasieprobleem sou ook na die C127-negatiewe kontrole of die ander behandelinge van die Mahlavu-DNA oorgedra geword het. Die doel van hierdie eksperiment is dus bereik deur te bewys dat HBV-DNA-volgordes wel in die HSK-sellyne teenwoordig was.

5.3.3. RNA-KOLKLADANALISES

Soos wat in Hoofstuk 2 genoem is, kodeer die HBV-genoom vir twee groepe transkripte wat albei die S-geenkoderingsgebied bevat (Afdeling 2.3.2). Dieselfde is nie noodwendig waar vir HSK-sellyne waar die HBV-genoom in die gasheersel se genoom geïntegreer het nie. Indien die HBV-genoom tydens die integreringsproses herorganiseer, mag transkripsie, met ander woorde geenuitdrukking, nadelig geraak word. Die HBV-genoom kan dus in die gasheersel se genoom teenwoordig wees sonder dat transkripsie kan plaasvind. Om hierdie rede is RNA-kolkladanalises gedoen om die teenwoordigheid, al dan nie, van HBV S-geentranskripte in die verskillende sellyne te bevestig.

Totale RNA is volgens die standaardprotokol (Vergeer, 1988) uit die HSK-selle geïsoleer en by -70°C gestoor tot net voor gebruik. Poli-(A)-mRNA is verder deur affiniteitschromatografie met behulp van Hybond-mAPTM poli-(dU)-affiniteitsmembrane (Amersham) uit die totale RNA geïsoleer volgens die protokol wat deur die vervaardigers aanbeveel word. 'n Verdunningsreeks is vir die totale RNA sowel as die mRNA van elke sellyn saamgestel en op 'n nitrosellulosemembraan (Schleicher en Schuell, BA 85) aangebring vir 'n hibridiseringseksperiment. Vir die totale RNA het die verdunningsreeks vanaf 3.33 tot $0.208\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en vir die mRNA vanaf 1.00 tot $0.063\mu\text{g}/\mu\text{l}$ gestrek. 'n Ruitenet met een vierkante sentimeter blokkies is op die nitrosellulosemembraan geteken waarna

dié membraan vir 8 uur in 10xSSC geweek is en daarna gelugdroog is. Drie mikroliter van elke verdunning in die verdunningsreeks van elke RNA-spesie is drupsgewys op die membraan binne-in 'n spesifieke blokkie aangebring. Dit beteken dus dat 10.0, 5.0, 2.5, 1.25 en 0.625 μ g totale RNA en 3.0, 1.5, 0.75, 0.375 en 0.188 μ g mRNA vir elke RNA-spesie op die membraan aangebring is. Totale RNA en mRNA van HeLa-selle is ook op dieselfde wyse op die membraan aangebring om as 'n negatiewe kontrole te dien. Nadat die membraan toegelaat is om lugdroog te word, is die RNA aan die membraan gebind deur dit vir 2 uur onder vakuum by 78°C te bak. Prehibridisering is vir 4 uur by 42°C in dieselfde buffer as vir die Southern-oordraganalises gedoen. Die volledige S-geen, 'n 1.4kb fragment wat die pre-S1-gebied, pre-S2-gebied en S-geen bevat het, is as peiler vir hibridisering gebruik. Hibridisering is vir ongeveer 48 uur by 42°C in 'n hibridiseringsoond uitgevoer. Na hibridisering is die membraan twee maal in 2x SSC en 0.1% SDS by kamertemperatuur vir 15 minute, een maal met 2x SSC en 0.1% SDS by 60°C vir 10 minute, een maal met 1x SSC en 0.1% SDS by 60°C vir 10 minute, een maal met 0.5x SSC en 0.1% SDS by 60°C vir 10 minute en een maal met 0.2x SSC en 0.1% SDS by 60°C vir 10 minute gewas en gedroog. Vir die visualisering van die hibridiseringspatroon, is die membraan vir 24 uur aan X-straalfilm by -70°C blootgestel en daarna ontwikkel (Figuur 5.4).

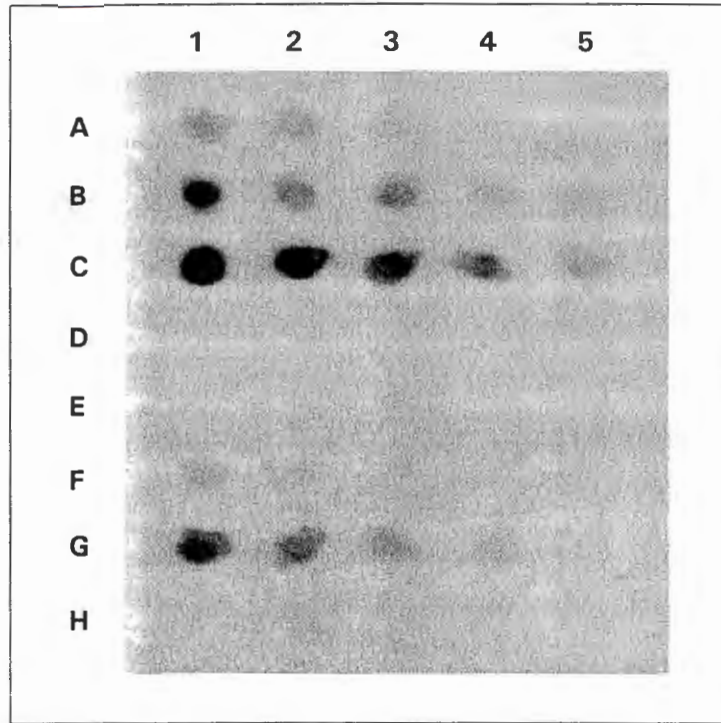
Om die hibridisering van die S-geenpeiler aan die RNA te kwantifiseer, is die beeld van die kolkadanalise (Figuur 5.4) met behulp van 'n densitometriese funksie van die sagtewarepakket WINCAM™ (CYBERTECH, 1993) geanaliseer. Hierdie sagteware kwantifiseer die hoeveelheid peiler wat gebind het in terme van die oppervlak en intensiteit van die kolle wat verkry is. Die data is verwerk en word in Figuur 5.5 gegee.

Die kolkadanalisedata dui op die teenwoordigheid van S-geentranskripte in PLC/PRF/5- en in 'n mindere mate in Hep 3B-selle, maar glad nie in Mahlavu-selle nie.

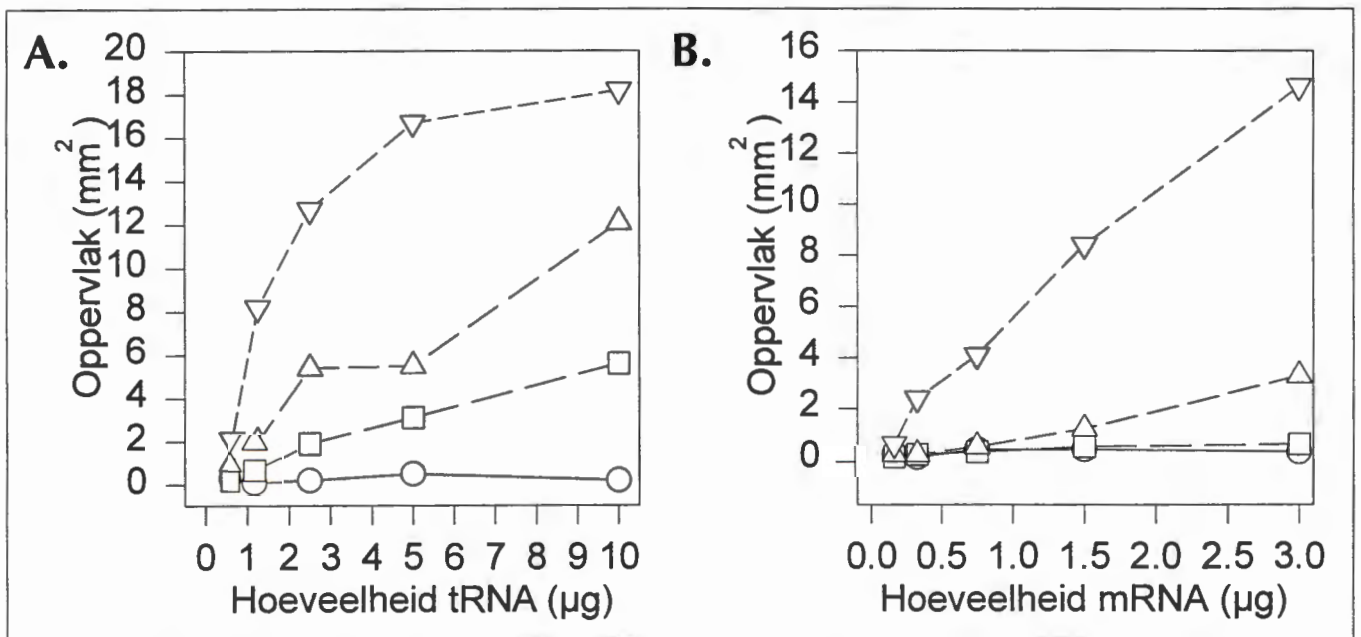
5.3.4. IMMUNOGOUDKLEURING EN ELEKTRONMIKROSKOPIE

Immunogoudkleuring en elektronmikroskopie is gebruik om te bepaal of HBsAg wel in die verskillende HSK-sellyne uitgedruk word en om die intrasellulêre verspreiding van die gesintetiseerde HBsAg te monitor. Selle is in 25cm²-flesse gekweek totdat die flesse net meer as 80% vol was, waarna dit getripsineer en in 5% geïnaktiveerde fetale kalfserum in PBS-buffer opgeskud is. Die selle is deur sentrifugering vir 10 minute teen 1000 o.p.m. gepresipiteer. Hierna is die supernatant gedekanteer en is die selle versigtig in fikseermiddel (0.1M NaH₂PO₄ en 4.5% (v/v) glutaaraldehyd met 1M NaOH bygevoeg tot 'n pH van 7.3) gesuspendeer en vir 4 uur by 4°C geïnkubeer. Na die fikseringstap is die selle weer gepresipiteer en twee maal vir 10 minute met 5 ml wasbuffer (0.1M NaH₂PO₄ en 0.2M sukrose, pH 7.3) gewas. Dehidrering van die selle is bewerkstellig deur dit opeenvolgend een maal vir 5 minute in 60%, 70%, 80%, 90% en twee maal in 100% alkohol te was. Hierdie selle is in hars ingebed deur dit vir 15 minute in propileenoksied te suspendeer en daarna oornag in 'n 1:1 propileenoksied:hars mengsel te laat. Na ongeveer 16 uur is die selle weer gesedimenteer en daarna op filtreerpapier drooggeklad. Die selle is hierna in 'n gietvorm geplaas en met hars bedek wat oornag by 60°C gepolimeriseer het.

Vir immunogoudkleuring, is die gefikseerde selle in die hars met behulp van 'n mikrotroom in skyfies met 'n dikte van 0.1µm gesny en op transmissie-elektronmikroskooproostertjies gemonteer. Tydens kleuring is druppels van die verskillende reagense, behalwe die wasbuffers, op steriele wasplate gedrup en die roostertjies met die selle is dan in dié druppels geïnkubeer. Die wasplate is binne-in 'n humiditeitshouer by 100% humiditeit en die verlangde temperatuur geplaas. Niespesifieke bindingspunte is eerstens geblokkeer deur die roostertjie vir 30 minute by kamertemperatuur in 'n 5% vetvrye melksuspensie te inkubeer. Hierna is die roostertjies vir 5 minute in 5ml PBS-buffer gewas voordat dit aan die primêre teenliggaam blootgestel is. Die selle is vir 60 minute by 37°C in 'n 50 µg/ml oplossing van die primêre teenliggaam (muis anti-HBsAg, IgG) in 3% BSA, wat in

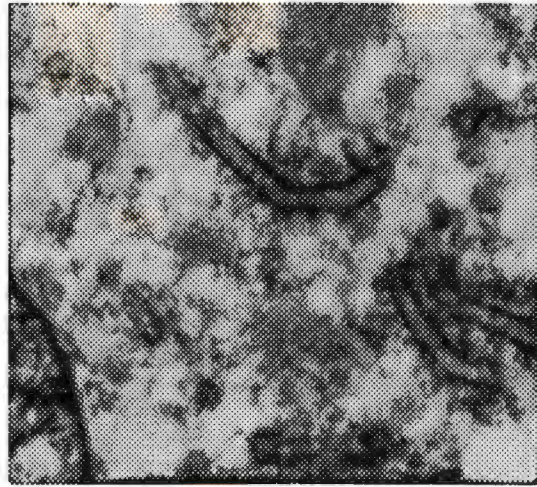


Figuur 5.4. Kolkcladanalise van die totale en poli-A-RNA van die HSK-sellyne ten opsigte van S-geentranskripte. Die verdunningsreeks van elke RNA-oplossing is soos volg in kolomme van links na regs aangebring: (1) 1x, (2) 2x, (3) 4x, (4) 8x en (5) 16x verdunde RNA. RNA-oplossings van die verskillende sellinne is in rye van bo na onder aangebring: (A) Mahlavu-totale RNA, (B) Hep 3B-totale RNA, (C) PLC/PRF/5-totale RNA, (D) HeLa-totale RNA, (E) Mahlavu-mRNA, (F) Hep 3B-mRNA, (G) PLC/PRF/5-mRNA, (H) HeLa-mRNA.

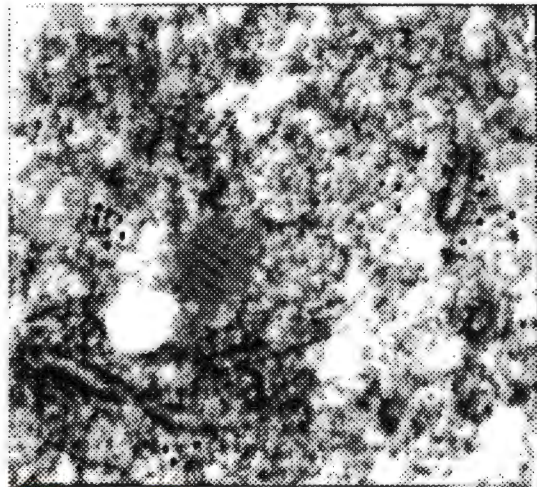


Figuur 5.5. Kwantitatiewe bepaling van moontlike S-geentranskripte in drie HSK-sellyne en in HeLa-selle. Hierdie grafieke toon die relatiewe hoeveelheid S-geenpeiler wat aan (A) totale RNA en (B) poli-A-RNA uit HeLa- (O), Mahlavu- (□), Hep 3B- (Δ) en PLC/PRF/5-selle (▽), gebind het.

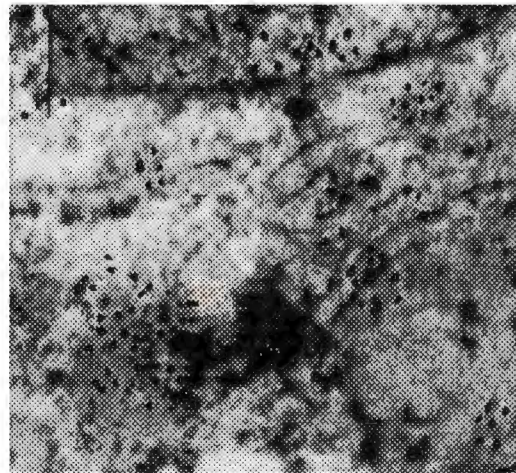
A.



B.



C.



Figuur 5.6. Transmissie-elektronmikrograwe van die verskillende HSK-sellyne wat die intrasellulêre binding van anti-HBsAg deur middel van goudgemarkte sekondêre teenliggame aantoon. (A) Mahlavu-selle, (B) Hep 3B-selle en (C) PLC/PRF/5-selle almal teen 'n 52,000x-vergroting gefotografeer.

PBS opgemaak is, geïnkubeer. Na die inkubasiestap is die selle weer met PBS gewas en daarna vir 60 minute in 'n 1:25 verdunning van die sekondêre teenliggaam, anti-muis IgG waaraan die goudpartikels gebind is, by 37°C geïnkubeer. Na nog 'n wasstap is die roostertjies op filtreerpapier gedroog en by kamertemperatuur geberg tot voordat die binding van die sekondêre teenliggaam met behulp van 'n transmissie-elektronmikroskoop ondersoek is (Figuur 5.6).

In die transmissie-elektromikrograwe in Figuur 5.6 kan gesien word dat anti-HBsAg-teenliggame wel aan PLC/PRF/5-selle en tot 'n mindere mate aan Hep 3B-selle bind, maar glad nie aan Mahlavu-selle nie.

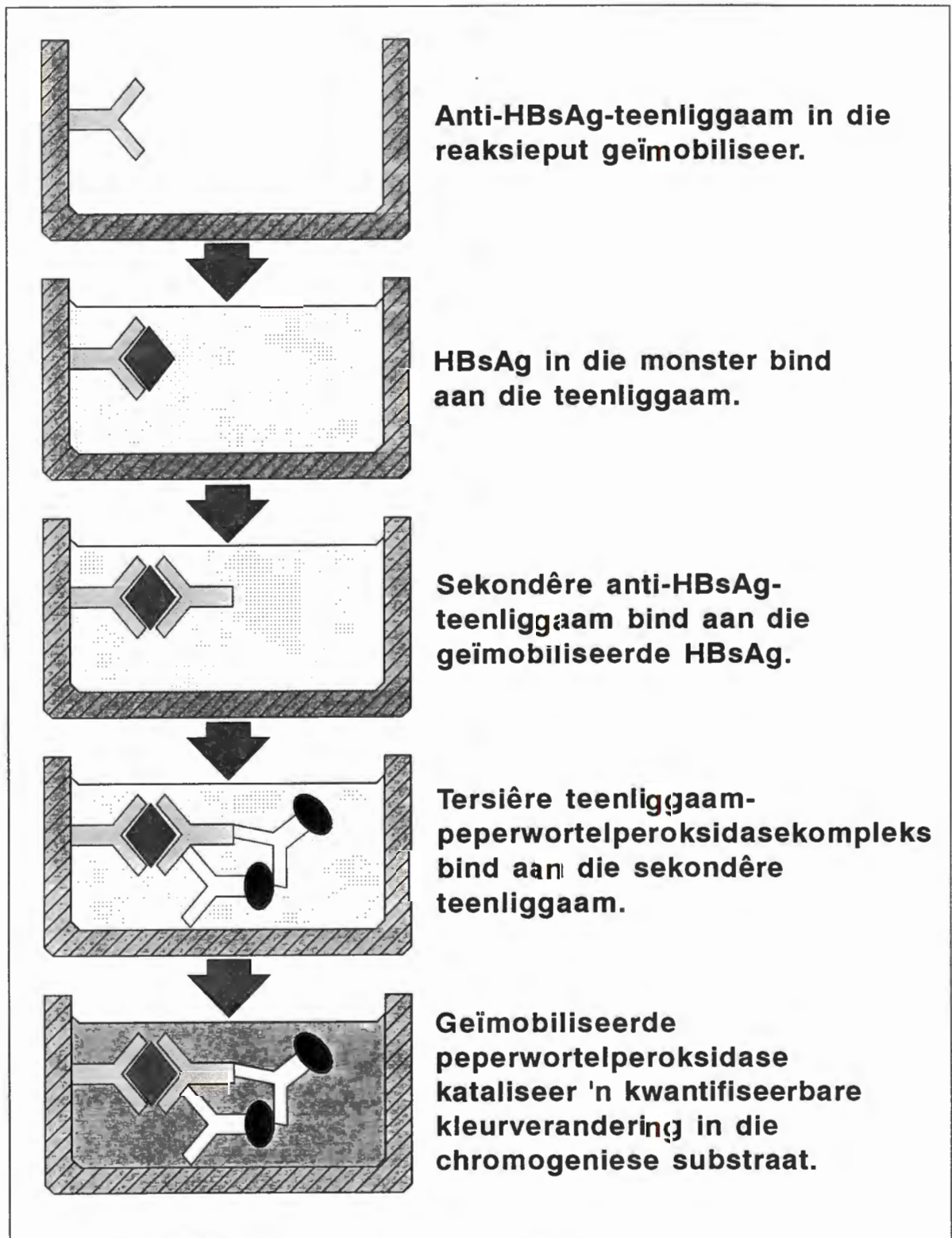
5.3.5. KWANTIFISERING VAN HBsAG-UITDRUKKING MET BEHULP VAN ENSIEMGEKOPPELDE IMMUNO-ADSORPSIE ANALISES (ELISA's)

Indien die invloed van 'n eksterne faktor op 'n lewende sisteem nagegaan moet word, is dit belangrik dat die sisteem gemonitor moet word sonder om die sisteem self te beïnvloed. Daarom moet die proteïen waarvan die uitdrukking deur antisens-oligonukleotiede in 'n selsisteem geteiken word, verkieslik in die medium uitgeskei word. Monsters kan dan maklik verkry word sonder om die selle nadelig te beïnvloed. Verder is dit ook belangrik dat die betrokke geenproduk akkuraat en ekonomies gekwantifiseer kan word. Die doel van hierdie afdeling is om te bepaal of die drie HSK-sellyne wel HBsAg in die medium uitskei en indien wel, of dit akkuraat gekwantifiseer kan word.

Ensiemgekoppelde immuno-adsorpsie analyses of ELISAs, is een van die beste metodes wat gebruik word om die teenwoordigheid van 'n spesifieke proteïen te bevestig en te kwantifiseer. Die beginsels waarop 'n ELISA berus, kan soos volg

saamgevat word. Teenliggame teen die proteïen wat gekwantifiseer moet word, anti-HBsAg in hierdie geval, word op 'n vaste matriks binne-in 'n reaksiesel geïmobiliseer. Die monster word nou toegelaat om met die geïmobiliseerde teenliggaam in die sel te reageer. Indien daar dus van die spesifieke antigeen in die monster teenwoordig is, sal dit aan die teenliggaam bind en sodoende ook geïmobiliseer word. 'n Sekondêre teenliggaam, ook spesifiek vir die proteïen, byvoorbeeld muis anti-HBsAg (IgG), word dan toegelaat om met die geïmobiliseerde proteïen te reageer om sodoende 'n teenliggaam-“toebroodjie” te vorm. In die derde plek word 'n ensiemgekoppelde tersiêre teenliggaam teen die sekondêre teenliggaam, byvoorbeeld bok anti-muis IgG, ook toegelaat om met die gebonde sekondêre teenliggaam te reageer. 'n Voorbeeld van 'n ensiem wat aan die tersiêre teenliggaam gekoppel kan wees, is peperwortelperoksidase. Indien die reaksiesel deeglik uitgespoel word na elke reaksiestap, beteken dit dat daar slegs peroksidase-aktiwiteit in die reaksiesel teenwoordig sal wees in die teenwoordigheid van die antigeen. Peroksidase-aktiwiteit kan dan kwantitatief met behulp van 'n chromogeniese substraat-produk-omskakelingsreaksie spektrofotometries bepaal word (Figuur 5.7). Voordele van die gebruik van kommersiële ELISAs, sluit onder andere die volgende in; hoë spesifisiteit, akkurate kwantifisering, herhaalbaarheid, 'n groot aantal monsters kan gelyktydig hanteer word, vinnig, ongekompliseerd en ekonomies.

ELISA-pakette vir die kwantifisering van HBsAg is van die Natalse Immunologiese Instituut (NII) verkry. HBsAg-uitdrukking is slegs aan die hand van dít wat in die medium uitgeskei is, gekwantifiseer. Die verskillende sellyne is in 25cm²-selkultuurflesse gekweek totdat hulle ongeveer 70% vol was. Flesse met ongeveer dieselfde hoeveelheid selle is met die aanvang van 'n eksperiment twee maal met HBS-buffer gewas en daarna is 5ml vars medium bygevoeg. Eenhonderd mikroliter medium is direk hierna onttrek as die monster wat tyd nul verteenwoordig (= 0) het. Daarna is 100μl medium elke 12 uur onttrek en met vars medium vervang tot en met 108 uur. Alle mediummonsters is by -70°C gestoor tot net voordat die ELISAs uitgevoer was.



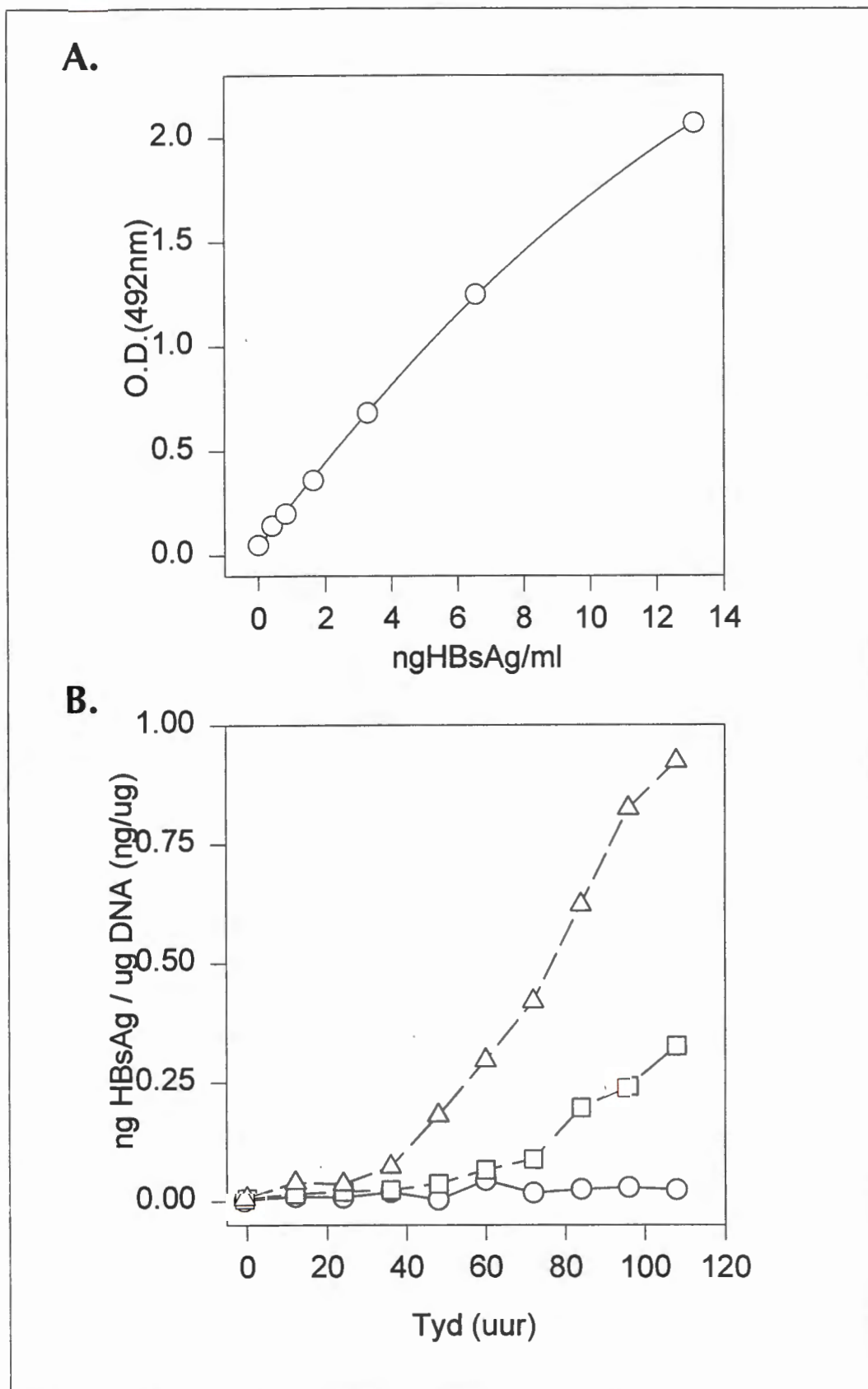
Figuur 5.7. Skematiese voorstelling van die beginsels waarop ELISA's berus.

Na afloop van 'n eksperiment, is die DNA van die selle in elke fles, volgens die protokol wat deur Möhr (1989) beskryf is, geïsoleer en met behulp van 'n difenielamienprotokol gekwantifiseer (Hutchinson en Munro, 1961). Die volume van die medium is ook na die 108 uur vir elke fles bereken, om te kontroleer dat die volume konstant gebly het vir al die flette. Vir die kwantifisering van HBsAg, is die ELISA-protokol presies soos aanbeveel word deur die verskaffers, uitgevoer. 'n Standaard HBsAg-konsentrasiereeks is saam met elke analise opgestel om sodoende die absorbansiewaarde van die chromogeniese produk by 492nm, as die hoeveelheid HBsAg in nanogram uit te druk (Figuur 5.8).

Resultate wat vir die kolkladanalises en immunogoudkleuring verkry is, is deur die ELISA-resultate bevestig, naamlik dat die HBsAg in hoë vlakke deur PLC/PRF/5-selle en in 'n mindere mate deur Hep 3B-selle uitgedruk en in die media uitgeskei word. Geen HBsAg word deur Mahlavu-selle uitgedruk nie.

5.4. GEVOLGTREKKING

Drie HSK-sellyne is ten opsigte van hul HBV-eienskappe gekarakteriseer. Geïntegreerde HBV-DNA-volgordes is in al drie die sellyne se gDNA gevind, maar die S-geen word slegs in die Hep 3B- en PLC/PRF/5-selle op RNA- sowel as proteïenvlak uitgedruk. Aangesien die doel van die karakterisering van hierdie HSK-sellyne die identifisering van 'n geskikte toetsstelsel was, was die uitdrukking van die HBsAg veral van belang. Hep 3B-selle het die HBsAg in te lae vlakke uitgedruk om inhibisietendense presies te kwantifiseer en daar is ook waargeneem dat geen HBsAg in ou Hep 3B-selle uitgedruk word nie. PLC/PRF/5-selle is daarom geïdentifiseer as 'n geskikte toetsstelsel waarin antisens-oligonukleotied gemedieerde inhibisie van HBsAg-uitdrukking bestudeer kan word.



Figuur 5.8. Kwantifisering van HBsAg-uitdrukking met behulp van 'n ELISA. (A) Standaardkromme vir HBsAg-konsentrasiebepaling en (B) HBsAg-uitdrukking in Mahlavu- (-o-), Hep 3B- (-□-) en PLC/PRF/5-selle (-Δ-).

HOOFSTUK 6

INHIBISIE VAN HBsAg-UITDRUKKING IN PLC/PRF/5-SELLE MET BEHULP VAN ANTISENS-OLIGONUKLEOTIEDE

6.1. INLEIDING EN DOELSTELLING

In die voorafgaande hoofstukke is die potensiaal van die antisens-tegnologie, die epidemiologiese omvang van HBV, die identifisering van geskikte teikenvolgordes in die HBV-genoom vir antisens-oligonukleotiede en die keuse van 'n bruikbare toets-sisteem breedvoerig bespreek. In hierdie hoofstuk word al hierdie inligting saamgevoeg om die toepasbaarheid van die antisens-tegnologie, met betrekking tot HBV-geenuitdrukking, te bepaal.

Die omvang van hierdie antisens-oligonukleotiedstudie is beperk tot die volgende veranderlikes:

- Een teiken- of toetssisteem, naamlik PLC/PRF/5-selkulture.
- Een teikengeen, die HBV-mantelproteïengeen (S-geen), wat verantwoordelik is vir die kodering van die HBsAg.
- Twee verskillende teikengebiede in die S-geen.
- Oligonukleotiede met natuurlike fosfodiëster-internukleotiedbindings.
- Drie oligonukleotiede met verskillende lengtes vir elke teikenvolgorde.
- Ses verskillende oligonukleotiedkonsentrasies.
- Vyf verskillende oligonukleotiedtoedieningsmetodes.

Alhoewel dit aanvanklik nie een van die doelstellings van hierdie projek was nie, is die effektiwiteit van 'n antisens-RNA-uitdrukkingsvektor, gerig teen HBsAg-uitdrukking, ook bepaal.

6.2. ONTWERP, SINTESE EN VOORBEREIDING VAN DIE ANTISENS-OLIGONUKLEOTIEDE

Die keuse van die S-geen as teiken vir antisens-inhibisie word volledig in die vorige hoofstukke bespreek en gemotiveer. Data uit Hoofstuk 3 is gebruik tydens die identifisering van moontlike teikenvolgordes in die S-geen. Daar is in die eerste plek besluit om twee verskillende teikengebiede in die S-geen te identifiseer en hul onderskeie effektiwiteite te vergelyk na aanleiding van gegewens uit die literatuur. Aangesien teikengebiede wat oorvleuel met die inisiasiekodon van 'n geen in die algemeen meer effektief is as teikengebiede in die koderingsvolgorde self (Blake *et al.*, 1985b; Sumikawa en Miledi, 1988; Goodchild *et al.*, 1988b en Letsinger *et al.*, 1989), is die eerste teikengebied só gekies dat dit met die S-geen se inisiasiekodon oorvleuel. Terselfdertyd is die teikenvolgorde só geposisioneer dat dit met die mees gekonserveerde gebied rondom die inisiasiekodon ooreenstem. Die belangrikste vereistes vir die tweede teikengebied was dat dit 100% gekonserveer moes wees tussen al die HBV-subtypes en dat dit ongeveer in die middel van die S-geen se koderingsgebied geleë moes wees. Die identifisering van gekonserveerde teikengebiede is belangrik, omdat dit verseker dat 'n enkele antisens-oligonukleotied effektief sal wees teen alle HBV-volgordes. HBV-genome wat wel mutasies in hierdie gebiede ondergaan, sal nie oorleef nie en sal dus nooit 'n teiken vir antisens-volgordes wees nie (vergelyk met die bespreking in Hoofstuk 3 en met Bylae 1 en 2).

Die volgende twee gedeeltes in die S-geen is as teikengebiede geïdentifiseer: Teikenvolgorde #1 strek vanaf basepaar -4 tot en met 17 en oorvleuel dus met die ATG-kodon en teikenvolgorde #2 is tussen basepaar 304 en 324 geleë. Vir elke

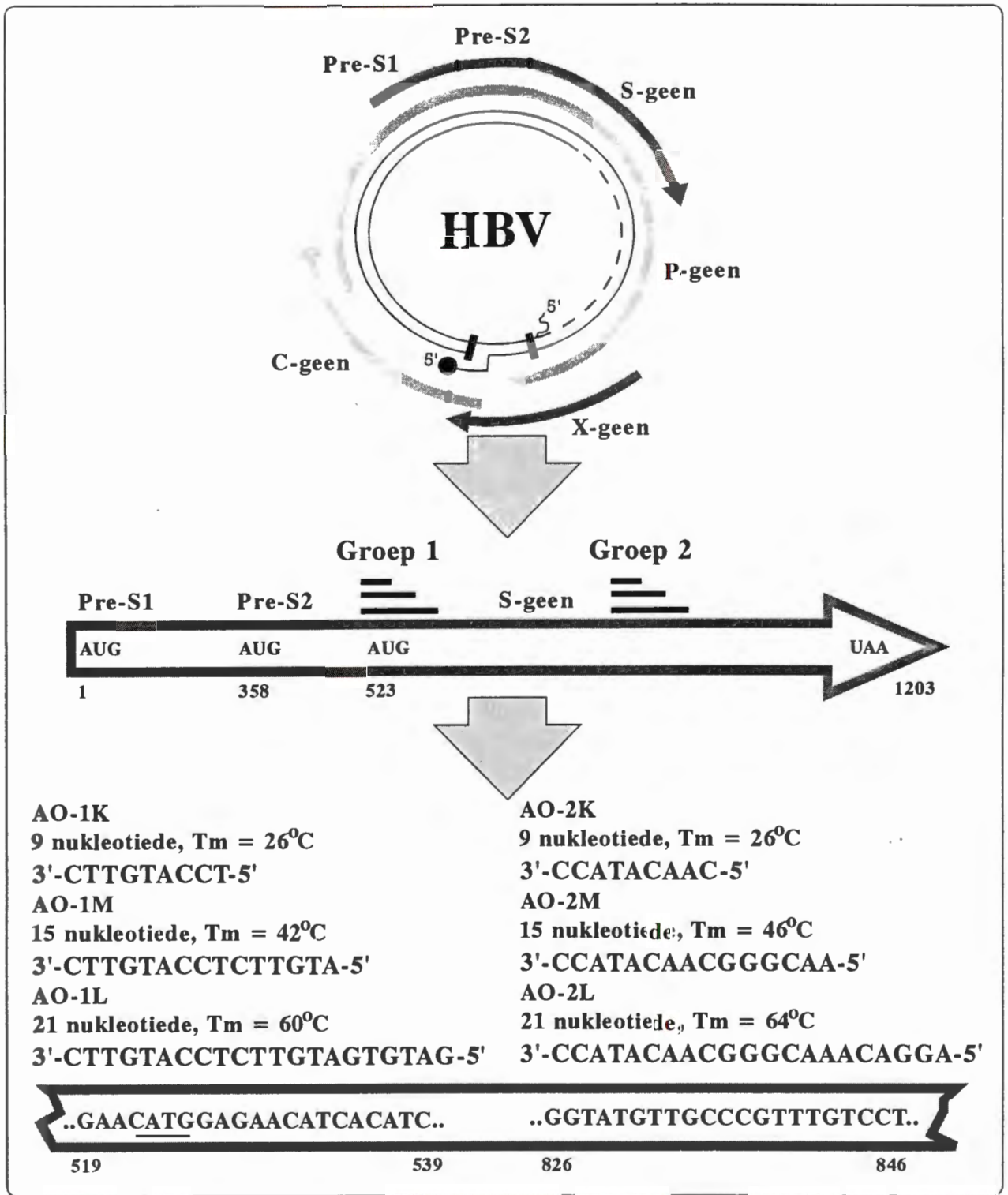
teikengebied is 'n groep van drie antisens-oligonukleotiede met verskillende lengtes, naamlik 9 (**K**ort), 15 (**M**iddelslag) en 21 (**L**ank) nukleotiede onderskeidelik, ontwerp. Vir die drie verskillende oligonukleotiede was die 5'-kant van elke teikenvolgorde vas, met ander woorde die 3'-volgorde van elke groep van drie oligonukleotiede was identies. Die teikengebiede van die verskillende oligonukleotiede word skematies in Figuur 6.1 voorgestel en die res van hul eienskappe word in Tabel 6.1 saamgevat.

Tabel 6.1. Eienskappe van die ses antisens-oligonukleotiede wat ontwerp is om HBsAg-uitdrukking te inhibeer.

Naam*	Lengte	Teikengebied [#]	Mol.mass	%(G + C)	T _m -waarde ^{&}
Groep 1					
AO -1K	9nt	-4 tot 5	2717g	44.4%	26°C
AO-1M	15nt	-4 tot 11	4555g	40.0%	42°C
AO-1L	21nt	-4 tot 17	6460g	42.9%	60°C
Groep 2					
AO-2K	9nt	304 tot 312	2703g	44.4%	26°C
AO-2M	15nt	304 tot 218	4602g	53.3%	46°C
AO-2L	21nt	304 tot 224	6484g	52.4%	64°C

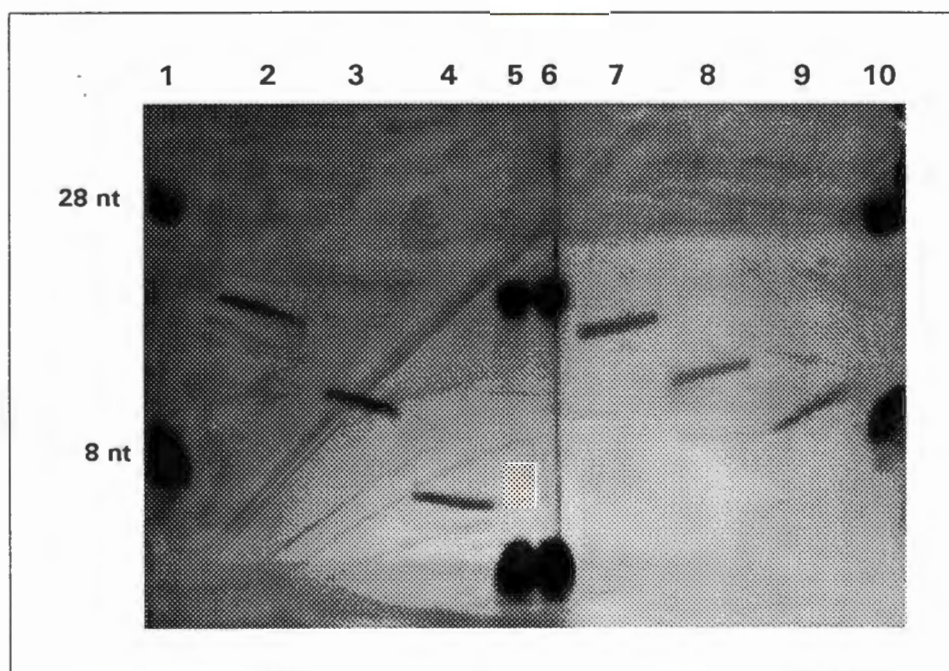
* In die antisens-oligonukleotied (AO) se naam dui die syfer die teikengebied aan en die laaste letter verwys na die oligonukleotied se lengte, soos dit in die teks beskryf is.
[#] Die koördinate van die teikengebied word ten opsigte van die S-geen se inisiasiekodon aangedui .
[&] T_m ≈ 2(A + T) + 4(G + C), (Wallace *et al.*, 1979).

Al die oligonukleotiede is volgens die standaardfosforamidiedmetode met behulp van 'n Beckman System 200A DNA-sintetiseerder gesintetiseer (Caruthers *et al.*, 1987). Elke stap in die sinteseproses is noukeurig gemonitor om seker te maak dat so min as moontlik onvolledige oligonukleotiede gevorm word. Na sintese is die finale dimetoksitritielgroep (DMT-groep) verwyder en is die oligonukleotiede volgens standaardmetodes gesuiwer (Caruthers *et al.*, 1987 en Horvath *et al.*, 1987).



Figuur 6.1. Skematiese voorstelling wat die teikengebiede van die ses antisens-oligonukleotide, wat ontwerp is om HBsAg-uitdrukking te inhibeer, in die HBV-genoom aandui.

Nadat die onderskeie oligonukleotiede se konsentrasies spektrofotometries bepaal is, is $2\mu\text{g}$ van elk in 'n 20% denaturerende poliakrielamiedgel geskei om hul groottes en integriteit te bevestig. 'n Bromofenolblou-xileensianolmengsel is saam met die oligonukleotiede in die gel geskei om sodoende te dien as 'n groottestandaard. Bromofenolblou migreer teen dieselfde tempo as 'n 8-meer in 'n 20% denaturerende poliakrielamiedgel, terwyl xileensianol se migrasie-eienskappe met dié van 'n 28-meer ooreenstem (Sambrook *et al.*, 1989). Die oligonukleotiedbande is met behulp van 'n UV-skadutegniek gevisualiseer (Sambrook *et al.*, 1989) en gefotografeer (Figuur 6.2).



Figuur 6.2. Analise van die ses antisens-oligonukleotiede in 'n 20% poliakrielamiedgel om hul integriteit en groottes te bevestig. Bane: (1, 5, 6 en 10) Bromofenolblou-xileensianolmengsel, (2) AO-1L, (3) AO-1M, (4) AO-1K, (7) AO-2L, (8) AO-2M en (9) AO-2K.

Hierna is die oligonukleotiede oornag by -20°C in die teenwoordigheid van 0.3M NaCl gepresipiteer met twee en 'n half volumes 100% etanol. Na sentrifugering is die oligonukleotiede twee maal met vrieskoue (-20°C) 70% etanol gewas en daarna onder vakuum gedroog. Die gedroogde oligonukleotiede is onder stikstof verseël en

by -20°C geberg tot net voor gebruik. Voor gebruik is die oligonukleotiede in Roberts-buffer gesuspendeer tot 'n finale konsentrasie van 2.5mM. Tydens 'n inhibisie-eksperiment is die oligonukleotiede net so, teen 'n spesifieke konsentrasie, by die medium bo-op die selle gevoeg.

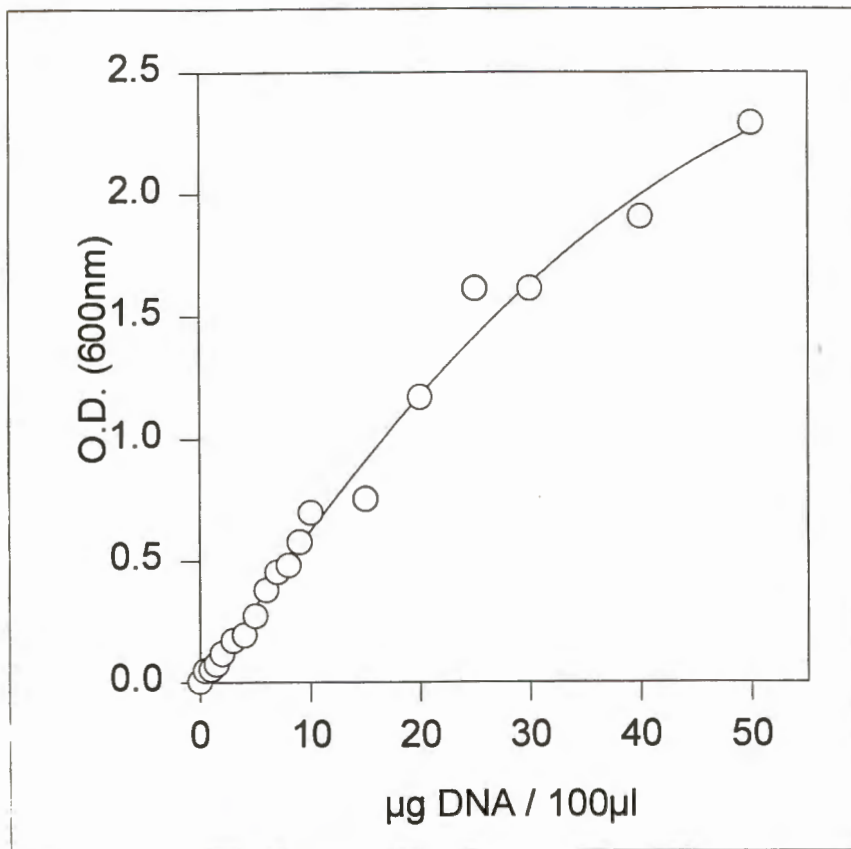
6.3. INHIBISIE VAN HBsAg-UITDRUKKING MET BEHULP VAN ANTISENS-OLIGONUKLEOTIEDE

Al die verskillende fasette van die inhibisie-eksperimente wat tydens hierdie studie gedoen is, kon in drie gedeeltes verdeel word, naamlik; (1) die voorbereiding van die selkulture, (2) die byvoeging van die antisens-oligonukleotiede en die kontrolering van die sisteem en laastens (3) die kwantifisering van die sellulêre DNA en die HBsAg wat in die medium uitgeskei is.

1. PLC/PRF/5-selle is in 25cm²-flesse gekweek totdat hulle tussen 80 en 90% volgroei was. Hierna is die selle soos gewoonlik getripsineer en in 13ml medium gesuspendeer. Twee milliliter van hierdie selsuspensie is daarna in elke put van 'n 6-put weefselkultuurplaat, met oppervlakte van 9.6cm² per put, geplaas. 'n Inkuberingstap van ten minste 24 uur, maar nie langer as 36 uur nie, onder normale weefselkultuurtoestande het die selle die geleentheid gebied om aan die plastiek vas te heg. Na hierdie tydperk is die selle in elke put deeglik onder 'n ligmikroskoop bestudeer om seker te maak dat hulle vasgeheg het, dat hulle gesond was en dat daar ongeveer dieselfde hoeveelheid selle in elke put was. Indien die selle nie binne-in 'n spesifieke put of tussen die verskillende putte homogeen voorgekom het nie, is die plaat nie vir 'n antisens-inhibisie-eksperiment gebruik nie.
2. 'n Inhibisie-eksperiment is begin deur die selle in die putte twee maal met 1x HBS-buffer by kamertemperatuur te was. Hierna is presies 3ml vars medium by

die selle in elke put gevoeg en die antisens-oligonukleotied is bygevoeg tot die verlangde konsentrasie. In die meeste van die inhibisie-eksperimente is die antisens-oligonukleotiede direk by die medium gevoeg en daarna deeglik gemeng. Daar is dus op aktiewe absorpsie en internalisering van die oligonukleotiede staatgemaak (Jayaraman *et al.*, 1981; Wickstrom *et al.*; 1988 en Goodchild, 1989). Die eerste monster van die medium, wat as die monster vir tyd nul ($t = 0$) gedien het, is dadelik onttrek en daarna is 'n monster elke 12 uur geneem oor 'n tydperk van 108 uur. Die HBsAg-konsentrasie is na afloop van die eksperiment in hierdie mediummonsters bepaal. 'n Monster van $100\mu\text{l}$ is elke keer verwyder en is dadelik weer met vars medium vervang om te verseker dat die volume van die medium konstant bly. Alle mediummonsters is dadelik by -80°C geberg en is direk voordat die ELISA's gedoen is, ontdooi. Tydens die 108 uur inkuberingstydperk is voorsorg getref om te verseker dat die selle by 'n humiditeit van ongeveer 100% geïnkubeer word, om te voorkom dat die medium nie verdamp nie.

3. Om die ses verskillende putte in elke eksperiment aan mekaar gelyk te kon stel, was dit nodig om die HBsAg, wat in elke put gesintetiseer is, te kwantifiseer ten opsigte van 'n interne standaard. Beide die totale hoeveelheid proteïen in die mediummonsters asook die hoeveelheid DNA wat uit die selle in elke put geïsoleer kon word, is as moontlike interne standaarde geëvalueer. Hieruit het dit geblyk dat die DNA-bepaling die meer herhaalbare tegniek was, wat dan ook gelei het tot die besluit om die HBsAg-konsentrasie in elke put ten opsigte van die totale hoeveelheid DNA uit te druk. Na afloop van die 108 uur inkuberingstydperk, is die DNA afsonderlik uit die selle in elke put geïsoleer en met behulp van 'n aangepaste difenielamienmetode gekwantifiseer (Hutchinson en Munro, 1961).



Figuur 6.3. 'n DNA-standaardkonsentrasiekromme soos wat dit met behulp van 'n difenielamienreaksie bepaal is. Die r-waarde vir die kromme wat op die datapunte gepas is, was 0.995.

Die selle is in die eerste plek twee maal met 1x PBS-buffer gewas en daarna in die teenwoordigheid van 0.8ml 1% SDS vir 10 minute by kamertemperatuur geïnkubeer. Die sellisaat is na 'n 1.5ml-sentrifugeerbuis oorgedra, waarna die putte elk nog 'n keer met 0.2ml 1% SDS uitgespoel is. Hierdie SDS-oplossing is ook by die res van die lisaat in die buise gevoeg. Tweehonderd mikroliter 50% trichloorasynsuur (TCA) is by die lisaat gevoeg, deeglik gemeng en daarna is dit vir 30 minute op ys geïnkubeer. Nadat die lisaat vir 10 minute teen 12000 o.p.m. by 4°C gesentrifugeer is, is 100µl van die supernatant onttrek en gebruik om die DNA-konsentrasie te bepaal. By die 100µl DNA-oplossing is 200µl difenielamienreagens (0.5g difenielamien is in 25ml ysasynsuur opgelos, waarna 1.4ml gekonsentreerde swaelsuur by die oplossing gevoeg is. Die volume is met ysasynsuur tot 50ml aangevul) gevoeg en is daarna vir 15 minute in 'n kokende waterbad geïnkubeer. Nadat die reaksiemengsels tot by kamertemperatuur afgekoel het, is die optiese digtheid daarvan by 600nm bepaal. Saam met elke DNA-konsentrasiebepaling is 'n standaardkonsentrasiereeks met gesoniseerde

salmperm-DNA saamgestel wat presies dieselfde behandel is. Hierdie standaardreeks is gebruik om die onbekende DNA-konsentrasies mee te bepaal (Figuur 6.3). Vir die bepaling van die HBsAg-konsentrasie, is die mediummonsters toegelaat om ten volle te ontdooi waarna dit aan ELISA's onderwerp is, presies soos wat dit in Afdeling 5.3.5 beskryf word.

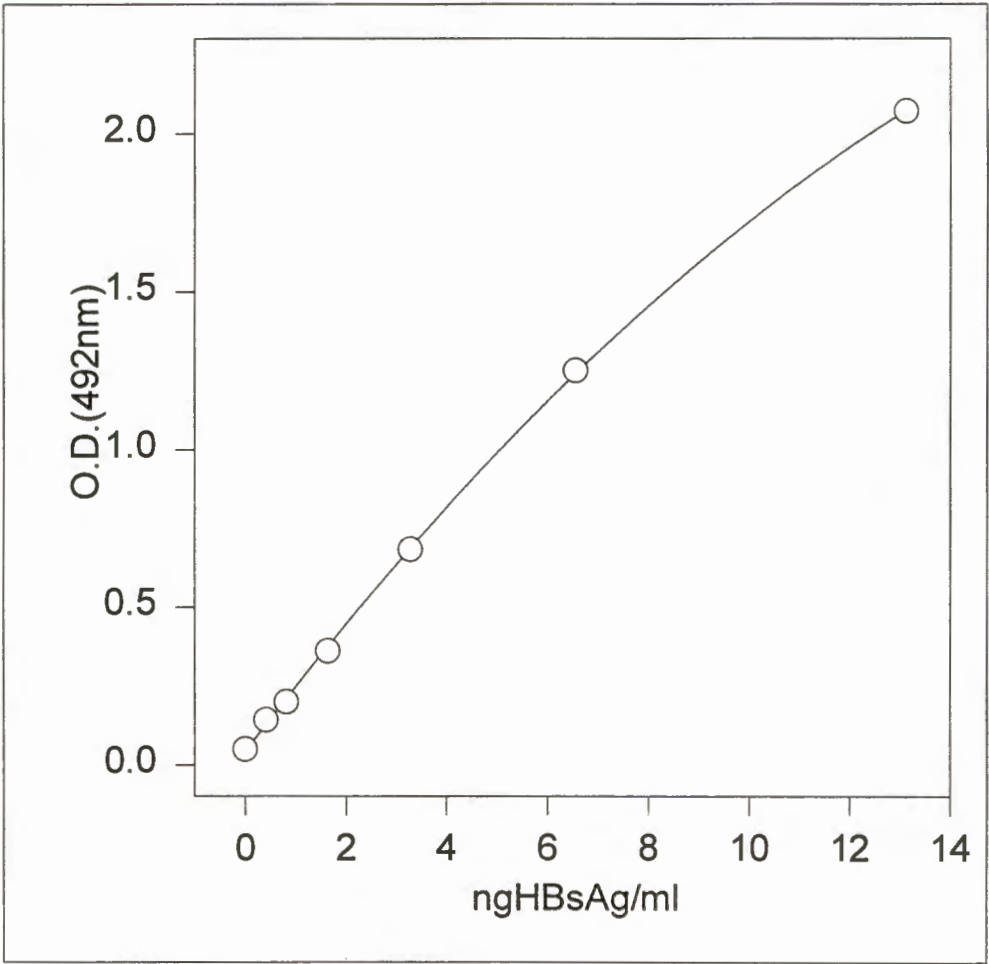
6.3.1. EFFEKTIWITEIT VAN SES ANTISENS-OLIGONUKLEOTIEDE WAT TEEN TWEE VERSKILLENDTE TEIKENVOLGORDES IN DIE S-GEEN GERIG WAS

In die eerste reeks inhibisie-eksperimente is die effektiwiteit van die ses verskillende antisens-oligonukleotiede, elk by ses verskillende konsentrasies, bepaal. Elke antisens-oligonukleotied is tot 'n finale konsentrasie van onderskeidelik 0, 4, 8, 12, 16 en 20 μ M by die medium in die ses putte gevoeg en vir 108 uur geïnkubeer soos wat hierbo beskryf is. Die inhibisiedata van hierdie reeks eksperimente word volledig in Tabela 6.1 tot 6.8 en Figure 6.4 tot 6.17 gegee. Rou data wat uit hierdie eksperimente verkry is, soos die HBsAg- en DNA- standaardkonsentrasiekrommes, die optiese digtheidswaardes by 492nm van die HBsAg-bepalings vir elke monster en die hoeveelheid DNA wat uit elke put geïsoleer is, is verwerk om die resultaat van elke behandeling as 'n kromme, wat die verandering in die hoeveelheid HBsAg per μ g DNA (ng HBsAg/ μ g DNA) teenoor tyd, weer te gee. Hierdie data is op hul beurt weer verwerk om die mate van inhibisie wat elke antisens-oligonukleotied tot gevolg gehad het, weer te gee. Al die rou data van die AO-1M-behandeling word gegee as voorbeeld van hoe hierdie bewerkings gedoen is, maar vir die res van die eksperimente word slegs die verwerkte data gegee. Alle data wat gegee word, is die gemiddeld van twee afsonderlike bepalinge en die standaardafwyking van hierdie waardes, soos wat dit vir AO-1M bepaal is, word ook in Tabel 6.2 vervat, om 'n aanduiding van die herhaalbaarheid van die resultate te gee.

Tabel 6.1. 'n Voorbeeld van 'n HBsAg-standaardkonsentrasiereeks wat met behulp van 'n ELISA gekwantifiseer is.

ng/ml HBsAg	O.D. (492nm)	ng/ml HBsAg	O.D. (492nm)	ng/ml HBsAg	O.D. (492nm)	ng/ml HBsAg	O.D. (492nm)	ng/ml HBsAg	O.D. (492nm)
0.00	0.050	0.82	0.200	3.28	0.684	13.1	2.072	52.5	2.333
0.41	0.143	1.64	0.361	6.56	1.250	26.3	2.231	105	2.357

Hierdie data word as 'n standaardkromme in Figuur 6.4 gegee.



Figuur 6.4. 'n HBsAg-standaardkonsentrasiekromme soos wat dit met behulp van 'n ELISA bepaal is. Die data van hierdie kromme word in Tabel 6.1 gegee en die r-waarde vir die kromme wat op die datapunte gepas is, was 0.999.

Tabel 6.2. Rou data van die AO-1M inhibisie-eksperiment.

yd ur)	O.D.* (492nm)	HBsAg (ng/ml)	ngHBsAg/ μgDNA	S.A.#	Tyd (uur)	O.D.* (492nm)	HBsAg (ng/ml)	ngHBsAg /μg DNA	S.A.#
μM					4μM				
0	0.0490	0.0916	0.0065	0.0013	0	0.0420	0.0623	0.0038	0.0014
2	0.1540	0.5431	0.0384	0.0061	12	0.1680	0.6052	0.0375	0.0067
24	0.1450	0.5034	0.0356	0.0012	24	0.2410	0.9357	0.0579	0.0013
36	0.2600	1.0237	0.0723	0.0179	36	0.2330	0.8989	0.0557	0.0196
48	0.5650	2.5454	0.1799	0.0091	48	0.5630	2.5347	0.1570	0.0100
60	0.8550	4.1833	0.2956	0.0287	60	0.7720	3.6955	0.2288	0.0315
72	1.1330	5.9283	0.4190	0.0275	72	0.6730	3.1336	0.1940	0.0412
84	1.5410	8.7992	0.6219	0.0412	84	1.0050	5.1036	0.3160	0.0452
96	1.9030	11.6551	0.8237	0.0764	96	1.3500	7.4093	0.4588	0.0838
108	2.0700	13.0704	0.9237	0.0970	108	1.7620	10.5082	0.6507	0.0877
μM					12μM				
0	0.0410	0.0582	0.0034	0.0055	0	0.0400	0.0540	0.0037	0.0006
12	0.1250	0.4160	0.0248	0.0053	12	0.0690	0.1757	0.0122	0.0059
24	0.1340	0.4552	0.0271	0.0092	24	0.1280	0.4290	0.0297	0.0095
36	0.2090	0.7894	0.0470	0.0079	36	0.1680	0.6052	0.0419	0.0087
48	0.3800	1.5978	0.0951	0.0224	48	0.4090	1.7414	0.1205	0.0248
60	0.4790	2.0955	0.1247	0.0180	60	0.6200	2.8417	0.1967	0.0362
72	0.6070	2.7711	0.1649	0.0274	72	0.8750	4.3031	0.2978	0.0307
84	0.9950	5.0407	0.3000	0.0452	84	1.4240	7.9382	0.5494	0.0499
96	1.0810	5.5889	0.3327	0.0652	96	1.5720	9.0324	0.6251	0.0861
108	1.3110	7.1355	0.4247	0.0920	108	1.7430	10.3570	0.7167	0.1028

Tabel 6.2. (vervolg).

Tyd (uur)	O.D.* (492nm)	HBsAg (ng/ml)	ngHBsAg/ μgDNA	S.A.#	Tyd (uur)	O.D.* (492nm)	HBsAg (ng/ml)	ngHBsAg /μg DNA	S.A.#
16μM					20μM				
0	0.0490	0.0916	0.0050	0.0006	0	0.0510	0.0999	0.0074	0.0006
12	0.1550	0.5475	0.0304	0.0034	12	0.0600	0.1377	0.0102	0.0045
24	0.1710	0.6185	0.0344	0.0032	24	0.0880	0.2564	0.0190	0.0085
36	0.2970	1.1973	0.0665	0.0067	36	0.2120	0.8030	0.0596	0.0082
48	0.4280	1.8364	0.1020	0.0189	48	0.2470	0.9634	0.0715	0.0232
60	0.6340	2.9182	0.1621	0.0275	60	0.3400	1.4029	0.1042	0.0338
72	0.9340	4.6618	0.2590	0.0479	72	0.5470	2.4499	0.1819	0.0376
84	1.3560	7.4517	0.4140	0.0380	84	0.4670	2.0340	0.1510	0.0466
96	1.5710	9.0248	0.5014	0.0552	96	0.8830	4.3513	0.3230	0.0486
108	1.6790	9.8537	0.5474	0.0783	108	1.0140	5.1604	0.3831	0.0964

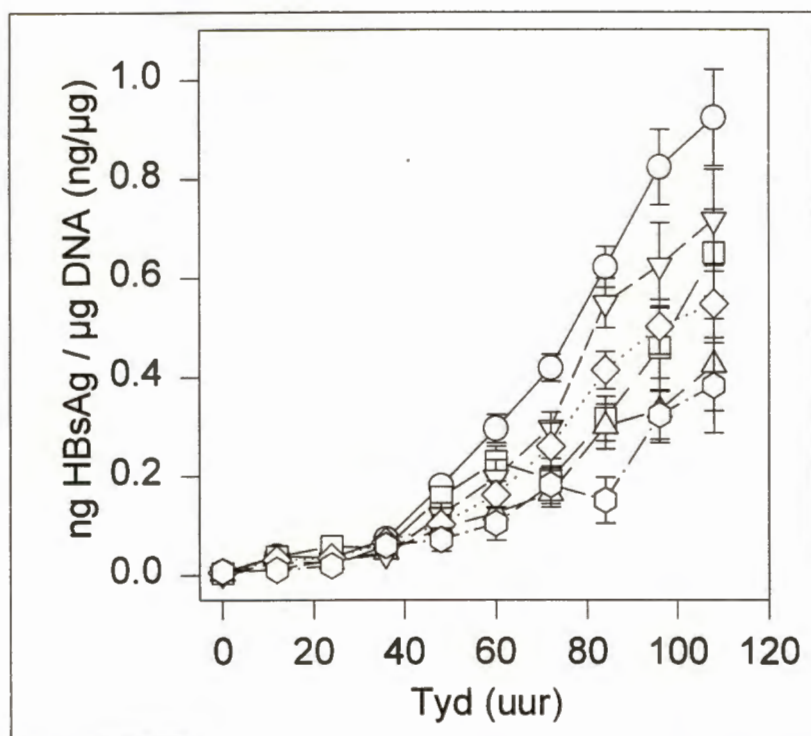
* Optiese digtheid by 492nm vir die HBsAg-bepaling wat met behulp van 'n ELISA gedoen is.

Standaardafwyking.

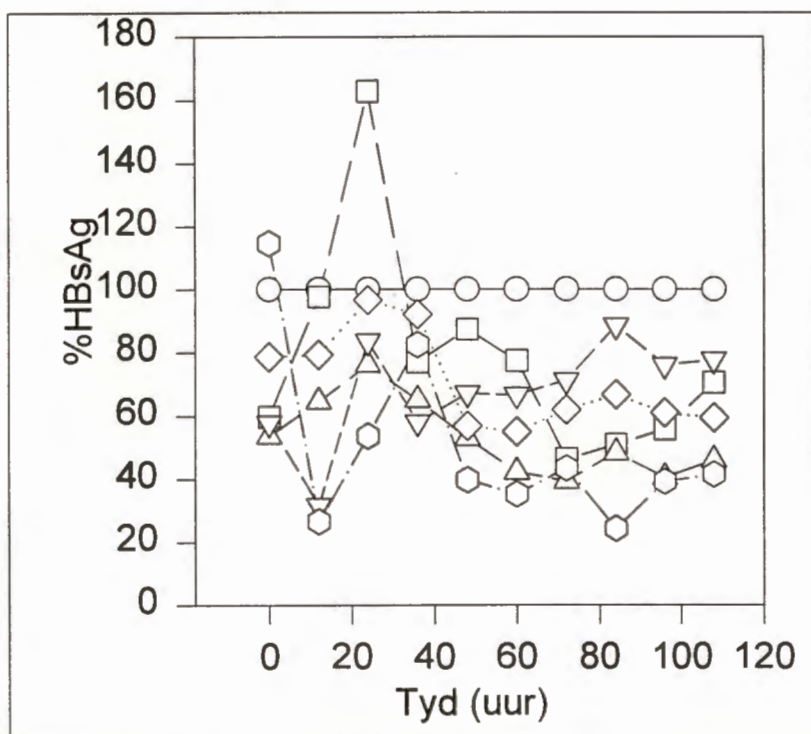
Die totale hoeveelheid DNA wat uit die selle in die onderskeie putte geïsoleer is, is soos volg met behulp van difenielamienreaksies vasgestel:

0μM: 42.45μg, 4μM: 48.45μg, 8μM: 50.40μg, 12μM: 43.35μg, 16μM: 54.00μg en 20μM: 40.41μg.

Verwerkte data word in in Figure 6.5 tot 6.11 grafies voorgestel.



Figuur 6.5. Verandering in HBsAg-uitdrukking in PLC/PRF/5-selle in die teenwoordigheid van AO-1M. AO-1M is tot 'n finale konsentrasie van 0 (-○-), 4 (-□-), 8 (-△-), 12 (-▽-), 16 (-◇-) en 20µM (-○-) by die medium gevoeg. Al die data en die bewerkings daarvan word in Tabel 6.2 gegee.



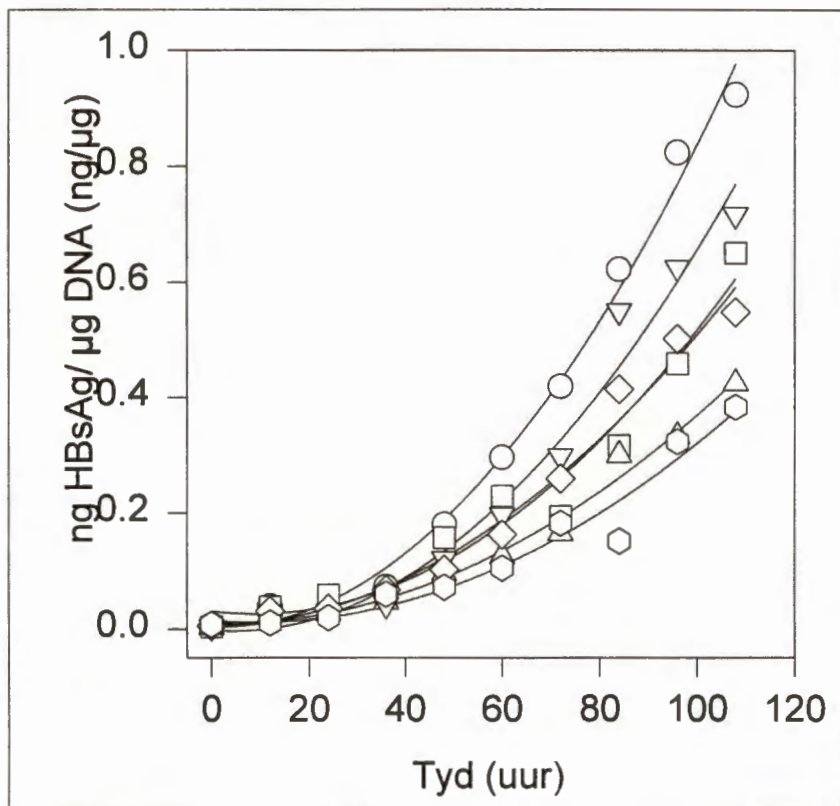
Figuur 6.6. Afname in HBsAg-uitdrukking in PLC/PRF/5-selle in die teenwoordigheid van AO-1M. HBsAg-uitdrukking vir al die behandelinge, 0 (-○-), 4 (-□-), 8 (-△-), 12 (-▽-), 16 (-◇-) en 20µM (-○-), word as 'n persentasie van die negatiewe kontrole (0µM) by elke datapunt uitgedruk.

Uit die resultaat in Figuur 6.6 is dit duidelik dat die individuele datapunte van die verskillende antisens-oligonukleotiedbehandelinge op 'n spesifieke tyd nie direk vergelyk kan word, om HBsAg-uitdrukking as 'n persentasie van die kontrole uit te druk nie. Tussen 0 en ongeveer 36 uur, was die absorbansiewaardes so laag dat dit nie 'n betroubare weergawe van die HBsAg-konsentrasie kon gee nie en reële klein verskille in die bepaalde HBsAg-konsentrasie as onrealistiese verhoudings ten opsigte van die negatiewe kontrole kon manifesteer. Vergelyk byvoorbeeld die 4 μ M-behandeling wat by 0 uur 59.6% en by 24 uur 162.8% van die kontrole was. Dieselfde was ook in 'n mindere mate waar vir die res van die datapunte, 48 tot 108 uur, aangesien 'n enkele uitskietwaarde 'n redelike groot invloed op bogenoemde verhouding kon hê. Om al die verskillende behandelinge op 'n gelyke voet oor al die datapunte te kon vergelyk, is die data op drie maniere statisties verwerk en geïnterpreteer (Mosteller en Tukey, 1977; Parker, 1979; Scheffler, 1980; Lee en Lee, 1982 en Van den Ende en Van Laere, 1995). Hierdie statistiese verwerkings of normalisering van die resultate het verseker dat uitskietwaardes minder gewig in die vergelykings gedra het, met die gevolg dat 'n meer akkurate vergelyking van die algehele tendense gemaak kon word.

- In die eerste plek is krommepassings met behulp van die sagtewarepakket SIGMAPLOT™ (R1.02 vir WINDOWS™, 1993) op elke datastel, wat die verandering in HBsAg-konsentrasie teenoor tyd vir elke oligonukleotiedkonsentrasie aangedui het, gedoen om 'n funksie daarvoor te verkry. Die tweede-ordefunksie, $y = a + bx + cx^2$, is geïdentifiseer as die vergelyking waarin al die datapunte die beste bevredig word, aangesien al die korrelasiekoëffisiënte (r) vir hierdie passings baie na aan een was. Die korrelasiekoëffisiënt (r) van 'n kromme deur 'n stel datapunte kan 'n waarde van -1 tot 1 hê en gee 'n aanduiding van die akkuraatheid waarmee die stel datapunte die funksie bevredig (Scheffler, 1980; Lee en Lee, 1982 en SIGMAPLOT™-sagteware). Dit dui met ander woorde die mate van assosiasie tussen die twee veranderlikes, HBsAg-konsentrasie en tyd in hierdie geval, aan.

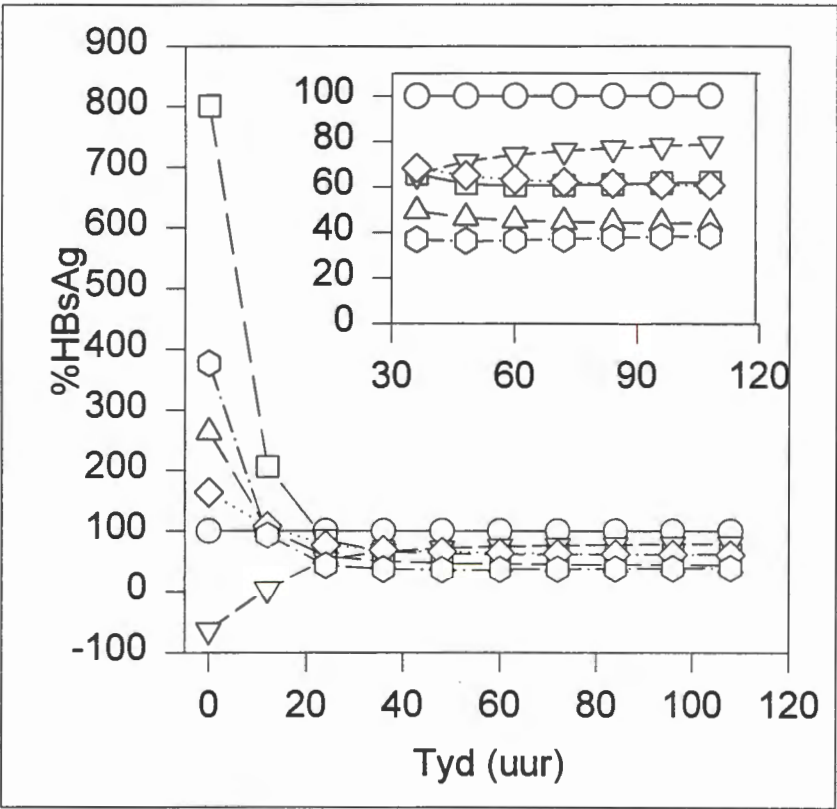
'n Perfekte passing word deur r-waardes van 1 of -1 aangedui terwyl die totale gebrek aan assosiasie deur 'n r-waarde van 0 weergegee word.

Indien die verskillende datastelle deur hul onderskeie funksies vervang word en die waardes van hierdie funksie, die Y-aswaardes, word op 'n spesifieke tydstip, die X-aswaarde, met mekaar vergelyk, word 'n baie stabiele inhibisie-tendens na 36 uur waargeneem (Figuur 6.7). Die variasie voor 36 uur kan toegeskryf word aan die feit dat die funksies nie gedwing is om deur die nulpunt (0,0) te gaan nie, maar sodoende is 'n meer akkurate passing vir die datapunte na 36 uur, vanwaar die HBsAg-konsentrasie liniêr toeneem, verkry.



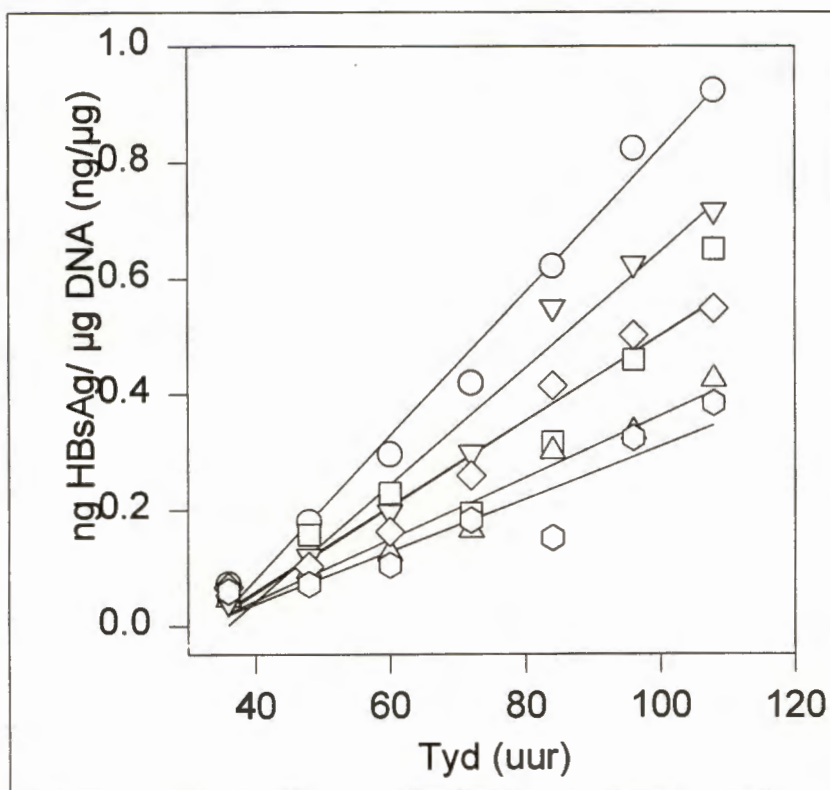
Figuur 6.7. Verandering in HBsAg-uitdrukking in PLC/PRF/5-selle in die teenwoordigheid van AO-1M. AO-1M-konsentrasies in die medium was onderskeidelik: 0 (-○-), 4 (-□-), 8 (-△-), 12 (-▽-), 16 (-◇-) en 20 μM (-○-). Die kromme vir die tweede-ordefunksie, $y = a + bx + cx^2$, waarin die onderskeie datastelle die beste bevredig is, is deur die datapunte getrek en die korrelasiekoëffisiënte vir hierdie passings was soos volg: 0 μM: 0.996, 4 μM: 0.982, 8 μM: 0.993, 12 μM: 0.989, 16 μM: 0.991 en 20 μM: 0.978.

Die akkuraatheid waarmee die datapunte die funksies oplos, aangedui deur korrelasiekoëffisiënte baie na aan een, en die stabiliteit van die verhoudings tussen die verskillende funksies ten opsigte van die kontrole, dui daarop dat die gemiddelde waarde van hierdie verskille geïnterpreteer kan word as die inhibisiewaardes van die antisens-oligonukleotied by die verskillende konsentrasies (Figuur 6.8).

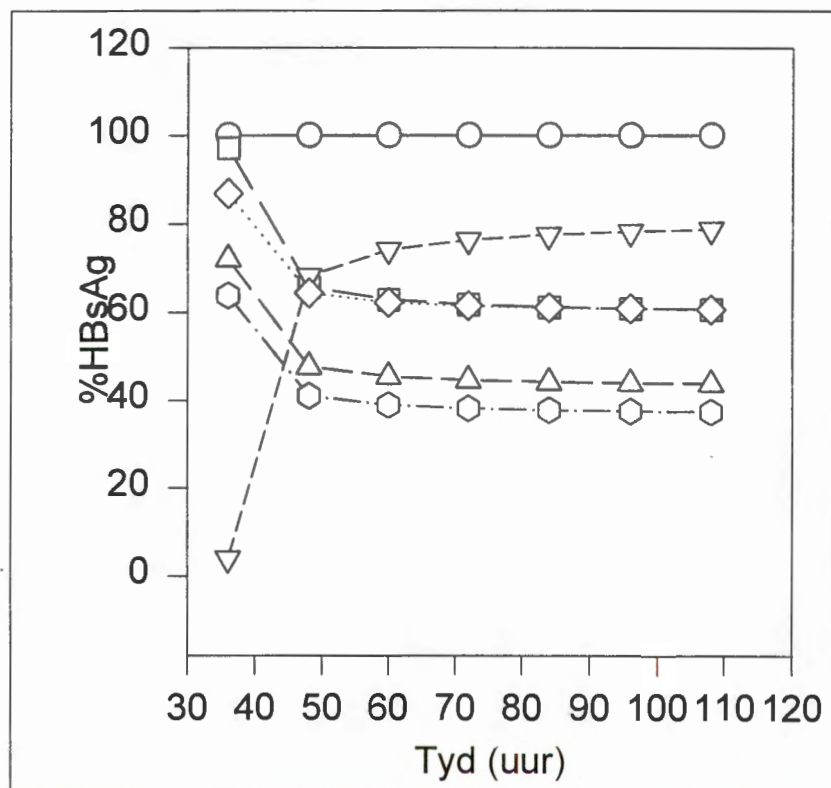


Figuur 6.8. Afname in HBsAg-uitdrukking in PLC/PRF/5-selle in die teenwoordigheid van AO-1M. Funksiewaardes vir $y = a + bx + cx^2$, van die datastelle vir al die behandelinge, 0 (-○-), 4 (-□-), 8 (-△-), 12 (-▽-), 16 (-◇-) en 20 μM (-○-), word as 'n persentasie van die negatiewe kontrole (0 μM) se funksiewaarde uitgedruk.

- Al die HBsAg-uitdrukingsdata kan in twee fases verdeel word naamlik, 'n stasionêre fase waar die HBsAg-konsentrasie minimaal toegeneem het, 0 tot ongeveer 36 uur, en 'n liniêre fase waar die HBsAg-konsentrasie liniêr toegeneem het. Die inhibisie-data kan dus op 'n tweede manier geïnterpreteer word deur die eerste-ordefunksie, $y = a + bx$, op die datapunte in die liniêre fase te pas. Die funksies wat hieruit verkry word kan presies op dieselfde manier, soos wat dit beskryf is vir die tweede-ordefunksies, geïnterpreteer word. Uit Figure 6.9 en 6.10 is dit duidelik dat soortgelyke resultate verkry is.



Figuur 6.9. Verandering in HBsAg-uitdrukking in PLC/PRF/5-selle in die teenwoordigheid van AO-1M. AO-1M-konsentrasies in die medium was onderskeidelik: 0 (-○-), 4 (-□-), 8 (-△-), 12 (-▽-) en 20 μM (-⬡-). Die kromme vir die eerste-ordefunksie, $y = a + bx$, waarin die onderskeie liniêre gedeeltes van die datastelle die beste bevredig is, is deur die datapunte getrek en die korrelasiekoëffisiënte vir hierdie passings was soos volg: 0 μM: 0.993, 4 μM: 0.946, 8 μM: 0.980, 12 μM: 0.985, 16 μM: 0.985 en 20 μM: 0.934.



Figuur 6.10. Afname in HBsAg-uitdrukking in PLC/PRF/5-selle in die teenwoordigheid van AO-1M. Funksiewaardes, vir $y = a + bx$, van die liniêre gedeelte van die datastelle vir al die behandelinge, 0 (-○-), 4 (-□-), 8 (-△-), 12 (-▽-), 16 (-◇-) en 20 μM (-◊-), word as 'n persentasie van die negatiewe kontrole (0 μM) se funksiewaarde uitgedruk.

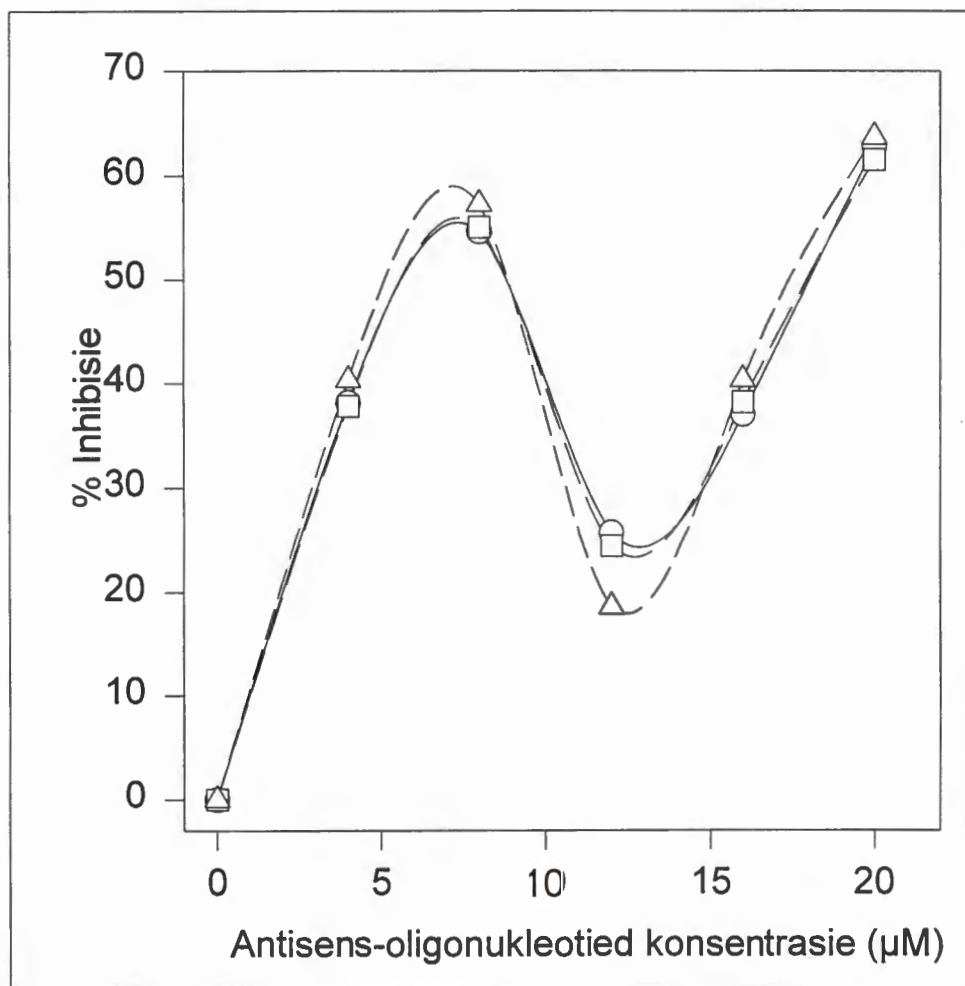
- Aangesien die hellings van die liniêre funksies, die konstante b , in die funksie $y = a + bx$, 'n direkte weerspieëling van die korrelasie tussen HBsAg-konsentrasie en tyd was, kon dit gebruik word om 'n aanduiding te gee van hoe die HBsAg-konsentrasie in die teenwoordigheid van 'n antisens-oligonukleotied beïnvloed was. Deur die hellings van die verskillende krommes dus as 'n persentasie van die negatiewe kontrole se helling uit te druk, kon 'n enkele inhibisiesyfer vir elke datastel verkry word, wat die interpretasie van die data baie vergemaklik het. Uit die resultate wat in Tabel 6.3 en Figuur 6.11 saamgevat is, is dit duidelik dat hierdie inhibisiesyfer baie goed ooreengestem het met die resultate wat uit die vorige twee vergelykings verkry is.

Tabel 6.3. Hellingdata vir die AO-1M inhibisie-eksperiment indien die funksie $y = a + bx$ op die liniêre gedeelte van die data gepas word.

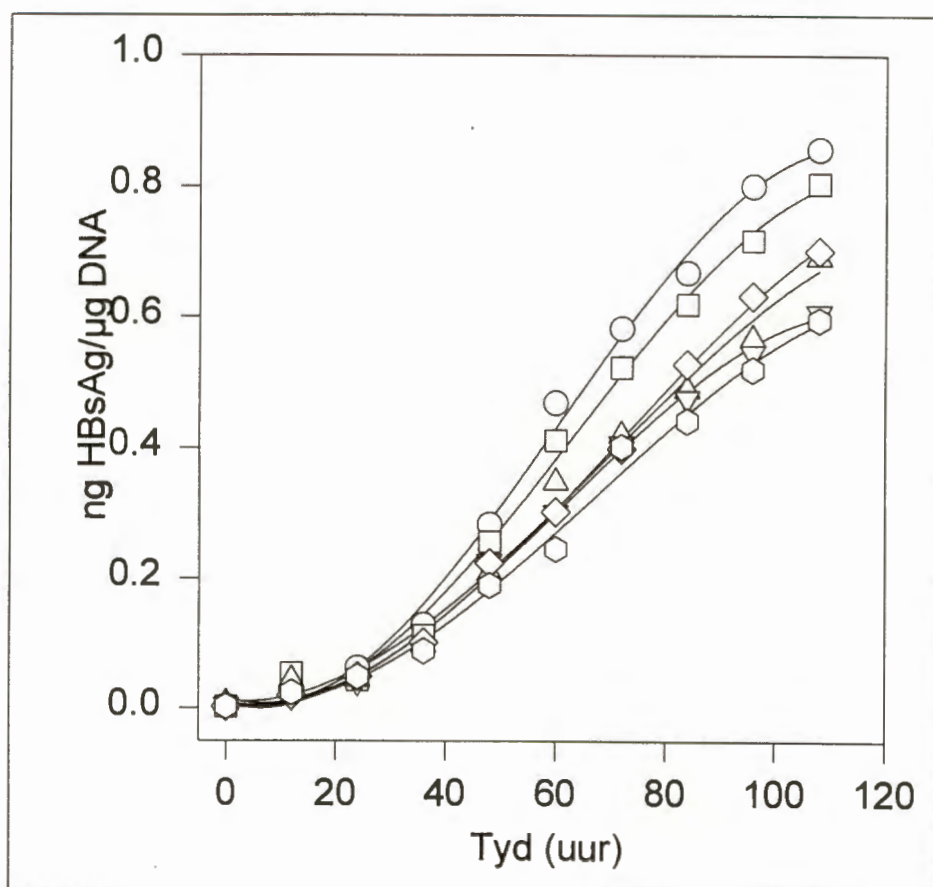
AO-1M konsentrasie (μ M)	Helling van $y = a + bx$ (ng/ μ g/uur)	% Van negatiewe kontrole	% Inhibisie t.o.v. kontrole
0	0.0124	100.0	0.0
4	0.0074	59.7	40.3
8	0.0053	42.7	57.3
12	0.0101	81.4	18.6
16	0.0073	58.9	41.1
20	0.0045	36.3	63.7

Korrelasiekoëffisiënte vir hierdie passings is soos in Figuur 6.9.

Op grond van die resultate wat vir AO-1M verkry is, is besluit om die inhibisiewaardes vir die res van die eksperimente met behulp van die hellings, wat verkry is deur die funksie $y = a + bx$ op die liniêre gedeelte van die inhibisiedata te pas, te bepaal. Inhibisie-eksperimente is op presies dieselfde wyse vir die ander vyf antisens-oligonukleotiede uitgevoer en die verwerkte resultate word in Figure 6.12 tot 6.17 en in Tabelle 6.4 tot 6.8 gegee.



Figuur 6.11. Inhibisie van HBsAg-uitdrukking in PLC/PRF/5-selle met behulp van AO-1M. Inhibisiewaardes is verkry deur die gemiddelde inhibisiewaarde vir die funksies, $y = a + bx + cx^2$ (-O-) en $y = a + bx$ (-□-), na 36 uur en die hellings vir die funksie, $y = a + bx$ (-Δ-), vir die verskillende antisens-oligonukleotiedkonsentrasies te bereken.

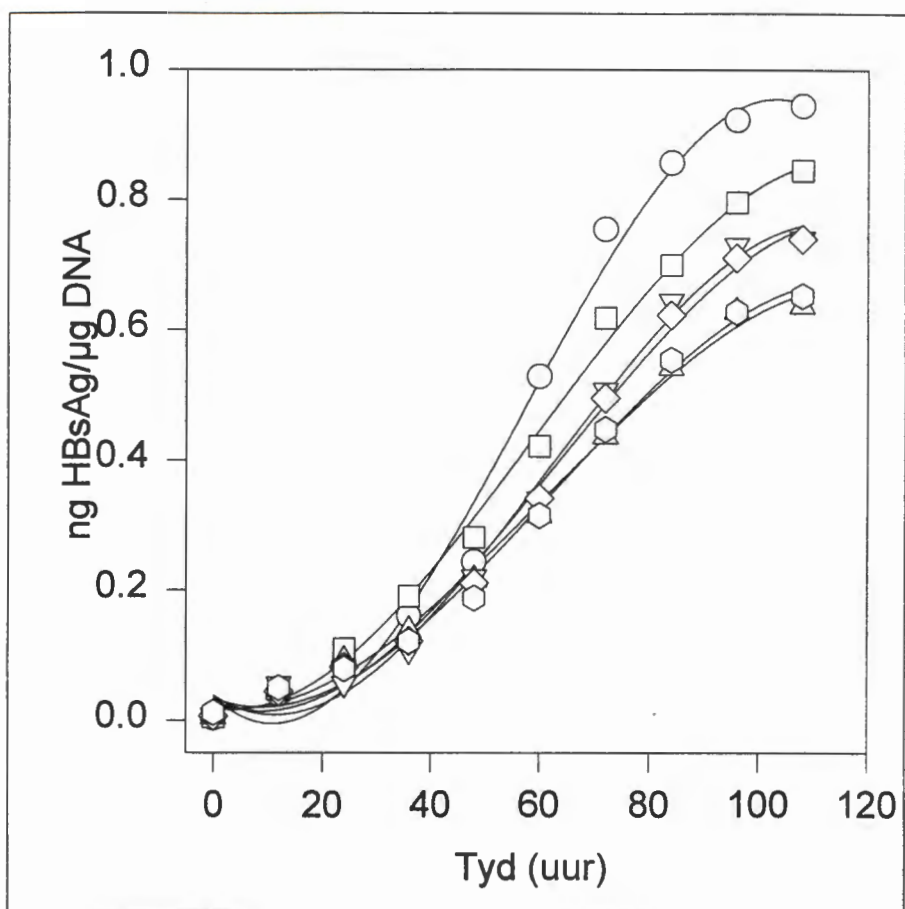


Figuur 6.12. Verandering in HBsAg-uitdrukking in PLC/PRF/5-selle in die teenwoordigheid van AO-1K. Die finale konsentrasies van AO-1K in die medium was soos volg: 0 (-○-), 4 (-□-), 8 (-Δ-), 12 (-▽-), 16 (-◇-) en 20μM (-○-).

Tabel 6.4. Hellingdata vir die AO-1K inhibisie-eksperiment.

AO-1K konsentrasie (μM)	Helling van $y = a + bx$ (ng/μg/uur)	% Van negatiewe kontrolle	% Inhibisie
0	0.0101	100	0
4	0.0095	94.3	5.7
8	0.0078	77.6	22.4
12	0.0069	69.1	30.9
16	0.0084	83.5	16.5
20	0.0070	69.9	30.1

Korrelasiekoëffisiënte vir die eerste-orde funksies, $y = a + bx$ wat op die datapunte na 36 uur gepas is, was soos volg: 0μM: 0.989, 4μM: 0.994, 8μM: 0.993, 12μM: 0.993, 16μM: 0.998 en 20μM: 0.992.

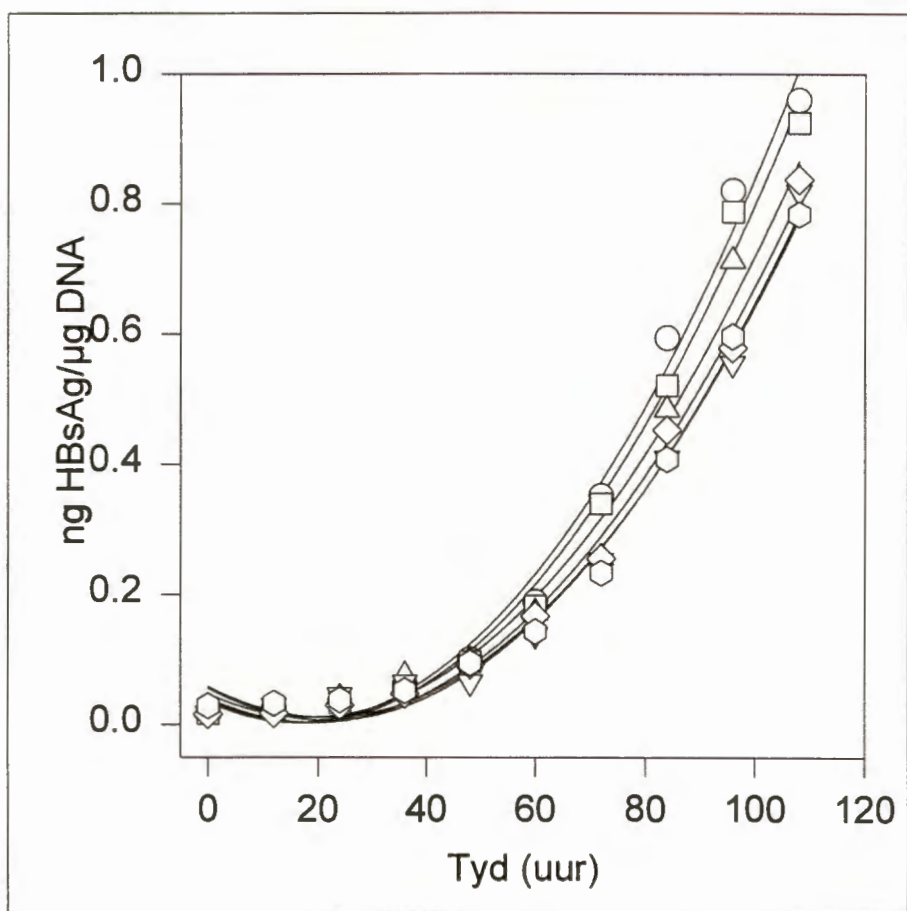


Figuur 6.13. Verandering in HBsAg-uitdrukking in PLC/PRF/5-selle in die teenwoordigheid van AO-1L. Die finale konsentrasies van AO-1L in die medium was soos volg: 0 (-○-), 4 (-□-), 8 (-Δ-), 12 (-▽-), 16 (-◇-) en 20μM (-○-)

Tabel 6.5. Hellingdata vir die AO-1L inhibisie-eksperiment.

AO-1L konsentrasie (μM)	Helling van $y = a + bx$ (ng/μg/uur)	% Van negatiewe kontrole	% Inhibisie
0	0.0132	100	0
4	0.0102	77.3	22.7
8	0.0078	59.1	40.9
12	0.0100	75.8	24.2
16	0.0094	71.2	28.8
20	0.0082	62.5	37.5

Korrelasiekoëffisiënte vir die eerste-orde funksies, $y = a + bx$ wat op die datapunte na 36 uur gepas is, was soos volg: 0μM: 0.980, 4μM: 0.992, 8μM: 0.994, 12μM: 0.993, 16μM: 0.990 en 20μM: 0.990.

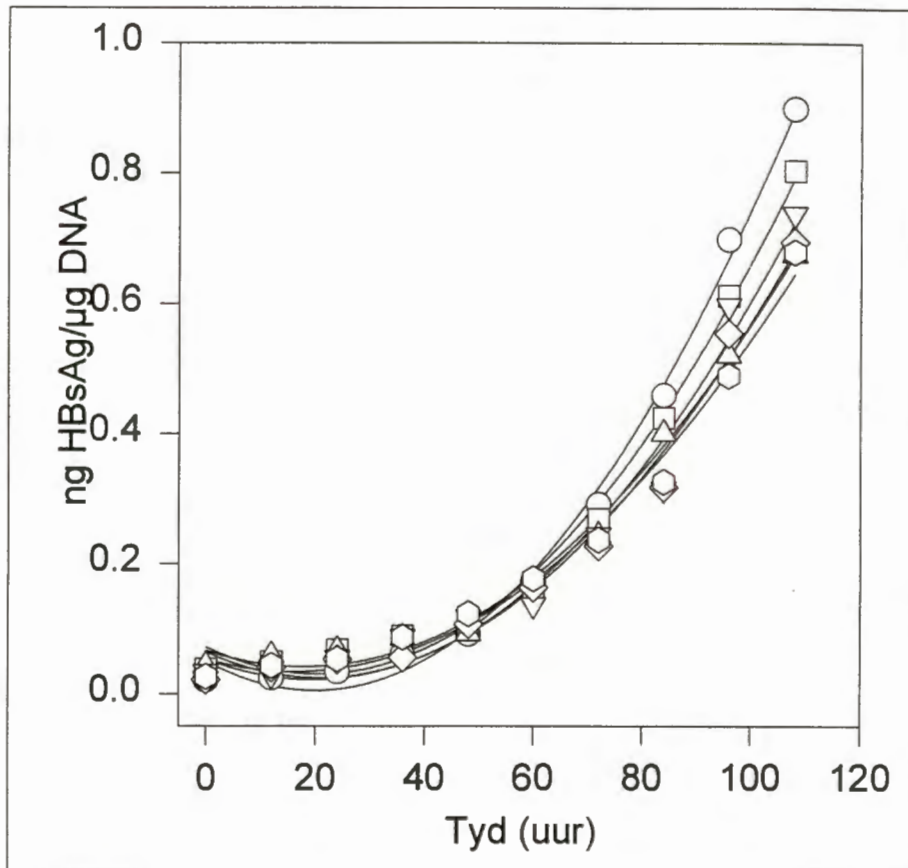


Figuur 6.14. Verandering in HBsAg-uitdrukking in PLC/PRF/5-selle in die teenwoordigheid van AO-2K. Die finale konsentrasies van AO-2K in die medium was soos volg: 0 (-○-), 4 (-□-), 8 (-△-), 12 (-▽-), 16 (-◇-) en 20μM (-○-).

Tabel 6.6. Hellingdata vir die AO-2K inhibisie-eksperiment.

AO-2K konsentrasie (μM)	Helling van $y = a + bx$ (ng/μg/uur)	% Van negatiewe kontrole	% Inhibisie
0	0.0167	100	0
4	0.0161	96.4	3.6
8	0.0149	89.2	10.8
12	0.0138	82.7	17.3
16	0.0137	82.1	17.9
20	0.0136	81.4	18.6

Korrelasiekoëffisiënte vir die eerste-orde funksies, $y = a + bx$ wat op die datapunte na 36 uur gepas is, was soos volg: 0μM: 0.996, 4μM: 0.994, 8μM: 0.989, 12μM: 0.987, 16μM: 0.987 en 20μM: 0.992.

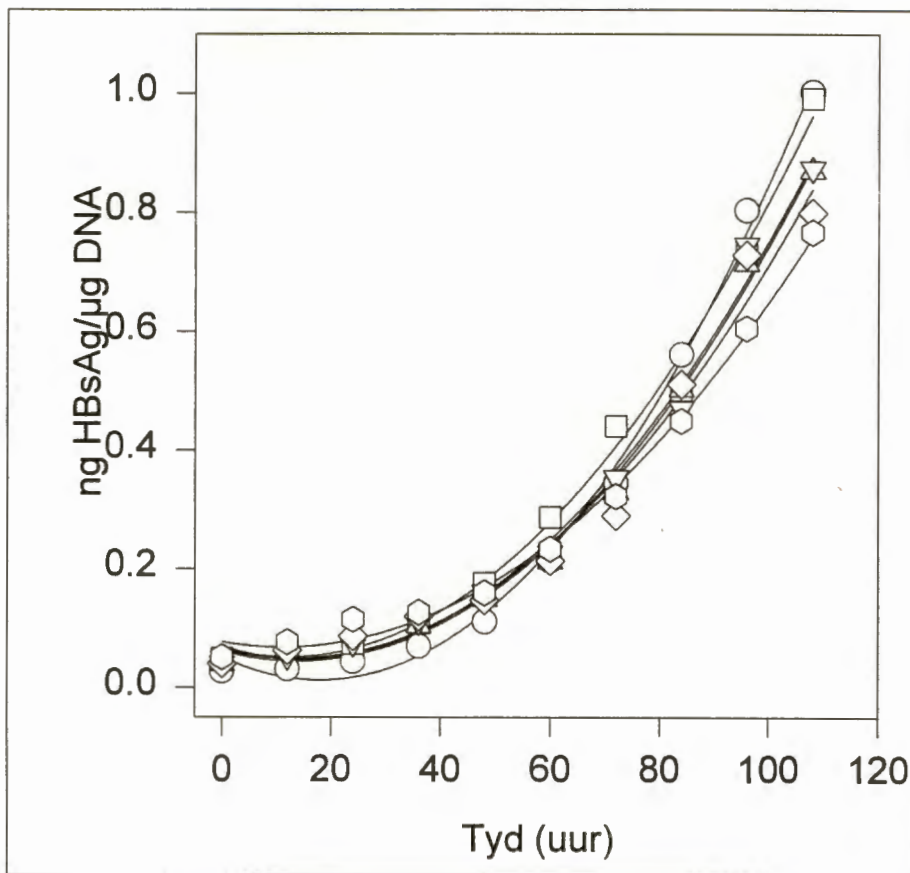


Figuur 6.15. Verandering in HBsAg-uitdrukking in PLC/PRF/5-selle in die teenwoordigheid van AO-2M. Die finale konsentrasies van AO-2M in die medium was soos volg: 0 (-○-), 4 (-□-), 8 (-Δ-), 12 (-▽-), 16 (-◇-) en 20μM (-○-).

Tabel 6.7. Hellingdata vir die AO-2M inhibisie-eksperiment.

AO-2M konsentrasie (μM)	Helling van $y = a + bx$ (ng/μg/uur)	% Van negatiewe kontrole	% Inhibisie
0	0.0155	100	0
4	0.0136	87.7	12.3
8	0.0107	69.1	30.9
12	0.0130	83.8	16.2
16	0.0116	74.8	25.2
20	0.0105	67.7	32.3

Korrelasiekoëffisiënte vir die eerste-orde funksies, $y = a + bx$ wat op die datapunte na 36 uur gepas is, was soos volg: 0μM: 0.992, 4μM: 0.994, 8μM: 0.993, 12μM: 0.977, 16μM: 0.975, en 20μM: 0.975.

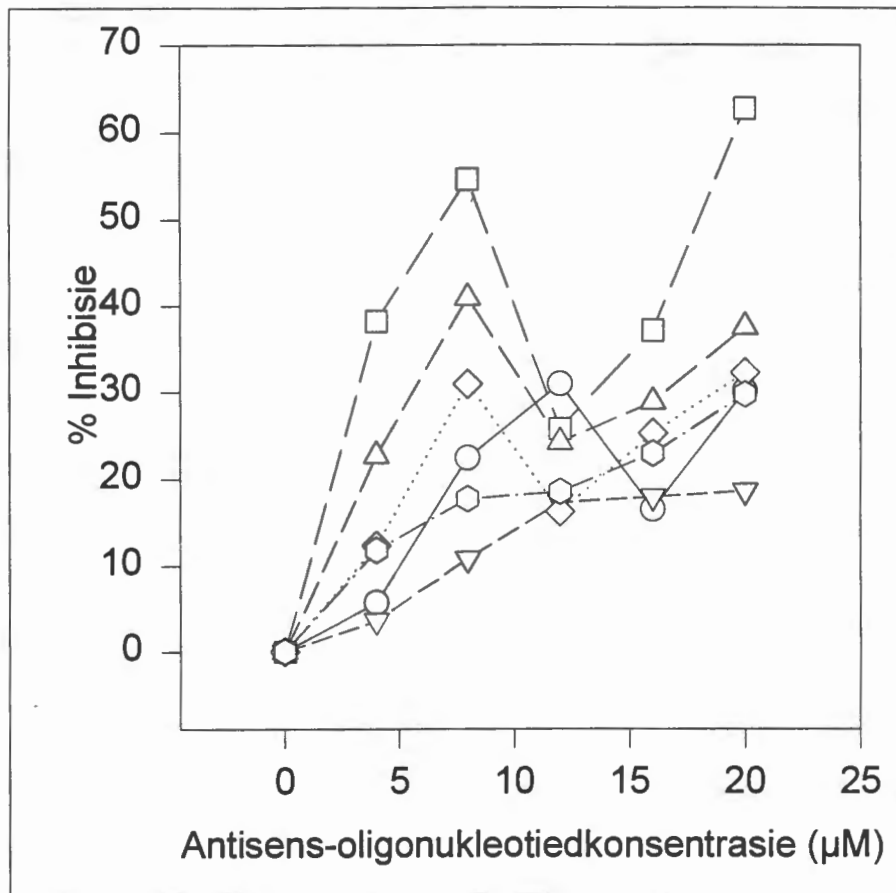


Figuur 6.16. Verandering in HBsAg-uitdrukking in PLC/PRF/5-selle in die teenwoordigheid van AO-2L. Die finale konsentrasies van AO-2L in die medium was soos volg: 0 (-o-), 4 (-□-), 8 (-Δ-), 12 (-▽-), 16 (-◇-) en 20μM (-○-).

Tabel 6.8. Hellingdata vir die AO-2L inhibisie-eksperiment.

AO-2L konsentrasie (μM)	Helling van $y = a + bx$ (ng/μg/uur)	% Van negatiewe kontrole	% Inhibisie
0	0.0135	100	0
4	0.0119	88.2	11.8
8	0.0111	82.3	17.7
12	0.0110	81.5	18.5
16	0.0104	77.1	22.9
20	0.0095	70.3	29.7

Korrelasiekoëffisiënte vir die eerste-orde funksies, $y = a + bx$ wat op die datapunte na 36 uur gepas is, was soos volg: 0μM: 0.976, 4μM: 0.977, 8μM: 0.975, 12μM: 0.971, 16μM: 0.965 en 20μM: 0.977.



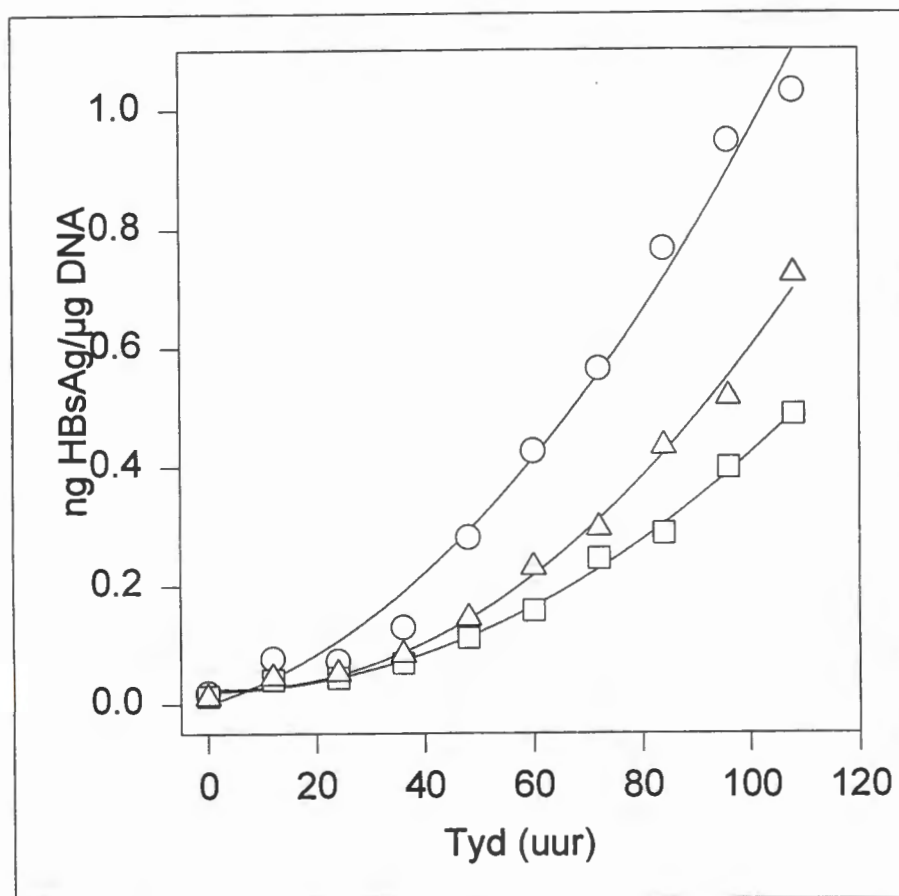
Figuur 6.17. Inhibisie van HBsAg-uitdrukking in PLC/PRF/5-selle met behulp van ses verskillende antisens-oligonukleotide. AO-1K (-○-), AO-1M (-□-), AO-1L (-Δ-), AO-2K (-▽-), AO-2M (-◇-) en AO-3L (-○-).

Uit hierdie resultate is dit duidelik dat HBsAg-uitdrukking in 'n groot mate deur die antisens-oligonukleotide geïnhibeer is. Soos wat verwag kon word, het die effektiwiteit van inhibisie tussen verskillende teikengebiede en vir die verskillende oligonukleotiedlengtes gevarieer. Antisens-oligonukleotied-1M was die mees effektiewe volgorde en het HBsAg-uitdrukking met ongeveer 63% by 'n konsentrasie van 20μM geïnhibeer. Daarenteen was antisens-oligonukleotied 2K, die minste effektief. 'n Opvallende tendens wat opgemerk is by al die antisens-oligonukleotide wat HBsAg-uitdrukking tot 'n sekere mate geïnhibeer het, is dat inhibisie op 'n stadium afgeneem en daarna weer toegeneem het (Figuur 6.17).

6.3.2. EFFEK VAN DIE DOSIS EN VERSKILLEND TRANSFEKSIETEGNIEKE OP DIE EFFEKTIVITEIT VAN AO- 1M

In die reeks inhibisie-eksperimente wat hierbo beskryf is, is die antisens-oligonukleotiede net so by die medium gevoeg en is daar op aktiewe opname staatgemaak vir die internalisering van die oligonukleotiede (Jayaraman *et al.*, 1981; Wickstrom *et al.*, 1988; Loke *et al.*, 1989 en Goodchild, 1989). Die effektiwiteit waarmee antisens-oligonukleotiede opgeneem word sal vanselfsprekend een van die mees kritiese faktore wees wat die mate van inhibisie sal bepaal (Vergelyk met Afdeling 2.2.4.5.). Om hierdie rede is die invloed van verskeie antisens-oligonukleotiedtoedieningsmetodes ook bestudeer. In die eerste plek is die invloed van die dosis waarteen die antisens-oligonukleotied toegedien word, nagegaan. Twee identiese toetssisteme soos wat hierbo beskryf word, is opgestel, maar in een van die sisteme is die totale hoeveelheid oligonukleotied oor die verloop van 84 uur toegedien en nie alles soos voorheen in een dosis met die aanvang van die eksperiment bygevoeg nie. In die tweede plek is die effektiwiteit van twee transfeksietegnieke, naamlik kalsiumfosfaatpresipitering en liposoomverpakking, ook vergelyk.

Om te onderskei tussen die belang van die dosis waarteen antisens-oligonukleotiede toegedien word en die totale hoeveelheid oligonukleotied wat in die sisteem teenwoordig was, is die volgende eksperiment gedoen. Drie identiese toetssisteme is volgens die standaardmetodes met PLC/PRF/5-selle opgestel. In die eerste sisteem is 8 μ M van AO-1M op tyd nul by die medium gevoeg en daarna is die sisteem presies soos wat in Afdeling 6.2 beskryf is, gemonitor. In die tweede sisteem is dieselfde hoeveelheid van die oligonukleotied in 8 toedienings van 1 μ M elk, elke 12 uur oor die verloop van 84 uur, by die medium gevoeg. Geen antisens-oligonukleotied is by die derde sisteem gevoeg nie en dit het as die negatiewe kontrole vir inhibisie gedien. Monsters is ook elke 12 uur versamel en dit is dadelik



Figuur 6.18. Invloed van die toedieningsdosis op die effektiwiteit van antisens-inhibisie van HBsAg-uitdrukking in PLC/PRF/5-selle. AO-1M is in hierdie eksperiment gebruik en in dosisse van 0 μM: (-○-), 1x8 μM: (-□-) en 8x1 μM: (-Δ-) toegedien.

Tabel 6.9. Inhibisie data vir AO-1M wat in verskillende dosisse toegedien is.

AO-1M toedieningsdosis	Gradiënt vir $y = a + bx$ (ng/μg/uur)	% Van negatiewe kontrole	% Inhibisie
0 μM	0.0130	100	0
1x8 μM	0.0057	43.8	56.2
8x1 μM	0.0085	65.4	34.6

Korrelasiekoëffisiënte vir die eerste-orde funksies, $y = a + bx$ wat op die datapunte na 36 uur gepas is, was soos volg: 0 μM: 0.997, 1x8 μM: 0.987 en 8x1 μM: 0.981.

met vars medium vervang. Die resultate van hierdie eksperimente is soos dié in Afdeling 6.3.1 geanaliseer en die verwerkte resultate word in Figuur 6.18 en Tabel 6.9 gegee.

Die resultate wat vir hierdie eksperiment verkry is, toon dat antisens-oligonukleotiede meer effektief is indien dit in 'n enkele groot dosis, eerder as verskeie klein dosisse, toegedien word. Hierdie waarneming stem ooreen met soortgelyke waarnemings wat in die literatuur beskryf is (Goodarzi *et al.*, 1990), en hou waarskynlik met die degradering van oligonukleotiede deur nukleases verband.

Om te bepaal of die antisens-oligonukleotiede met groter effektiwiteit oor die sellulêre membraan vervoer kon word, is twee tegnieke gebruik om die oligonukleotiede oor die selmembrane te dra. Kalsiumfosfaatpresipitering en liposoomverpakking van die groep een antisens-oligonukleotiede, naamlik AO-1K, -1M en -1L, is by drie verskillende oligonukleotiedkonsentrasies, naamlik 0, 4 en 20 μM , met aktiewe absorpsie by dieselfde konsentrasies vergelyk. Die PLC/PRF/5-selle is volgens die standaardmetodes vir hierdie inhibisie-eksperimente voorberei.

In die eerste plek is die antisens-oligonukleotiede volgens die standaardmetodes met behulp van kalsiumfosfaat gepresipiteer en bo-op die selle gedrup (Chen en Okayama, 1988 en Ausubel *et al.*, 1990). Die verlangde hoeveelheid oligonukleotied is tot 'n finale volume van 250 μl met 1x PBS-buffer aangevul. Hierna is 2M CaCl_2 stadig tot 'n finale konsentrasie van 125mM hierby gedrup en die suspensie is vir 30 minute by kamertemperatuur geïnkubeer. Intussen is die selle met 1x HBS-buffer gewas en 1ml vars serum-vrye medium is bygevoeg. Na die 30 minute inkuberingstap, is die selle blootgelê deur die selkultuurflesse skuins te hou en die oligonukleotiedpresipitaat is eweredig, direk bo-op die selle gedrup waarna die medium toegelaat is om stadig terug te spoel. Die selle is so vir 4 uur onder normale toestande geïnkubeer. Medium, met die verlangde konsentrasie serum, is hierna tot 'n finale volume van 3ml by die selle gevoeg en die mediummonster vir tyd nul is

geneem. Die negatiewe kontrole vir inhibisie is presies dieselfde behandel met die uitsondering dat geen oligonukleotied gebruik is nie. Die res van die eksperiment is uitgevoer soos wat dit in Afdeling 6.3.1 bespreek word.

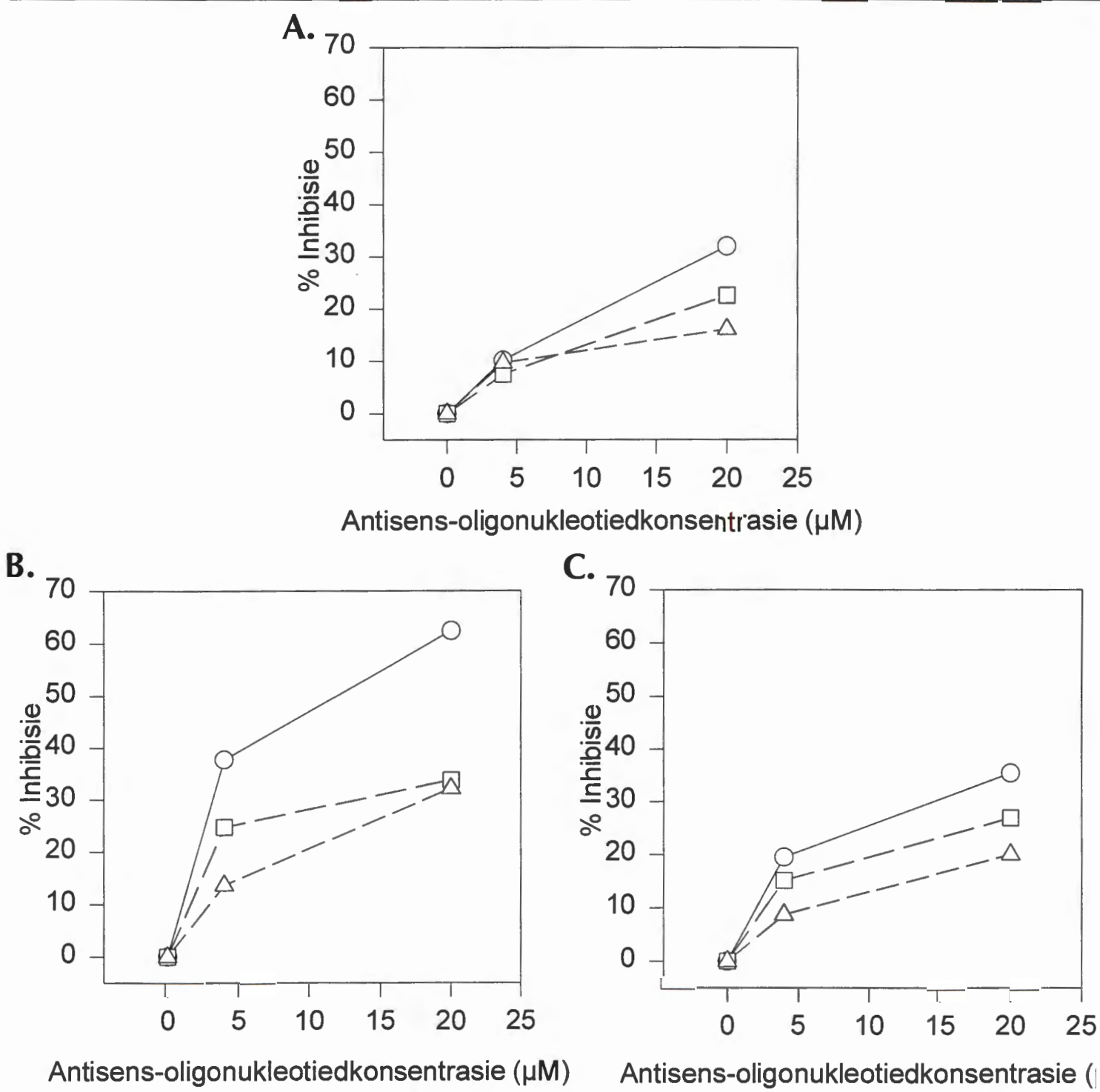
Liposoomverpakking van die antisens-oligonukleotiede en die transfeksie van die selle is bewerkstellig met behulp van die LIPOFECTIN™-mengsel van GIBCO. LIPOFECTIN™ is 'n 1:1 liposoomformulering van die kationiese lipied N-[1-(2,3-dioleïeloksi)-propiel]-n,n,n-trimetielammoniumchloried (DOTMA) en dioleïelfosfatidietanolamien (DOPE) in water. Die standaardmetode, wat deur die vervaardiger aanbeveel is, is gevolg (die tegniek word volledig in Afdeling 6.5 bespreek). Na verpakking is die oligonukleotiede op dieselfde wyse as vir die kalsiumfosfaattegniek bo-op die selle gedrup en die eksperiment is soos gewoonlik gemonitor. Die verwerkte resultate van hierdie eksperimente word in Figuur 6.19 en Tabel 6.10 gegee.

In vergelyking met die aktiewe absorpsie-eksperimente is die inhibisie-effektiwiteit negatief beïnvloed deur die transfeksietegnieke. Die resultate van die transfeksie-eksperimente het ook daarop gedui dat die selle tydens die transfeksieproses benadeel is, aangesien HBsAg-uitgedruk in die negatiewe kontroles afgeneem het (Tabel 6.10).

Tabel 6.10. Inhibisie-data vir die getransfekteerde antisens-oligonukleotiede.

AO-1M toedieningsdosis		Gradiënt vir $y = a + bx$ (ng/ μ g/uur)	% Van negatiewe kontrole	% Inhibisie
AO-1K				
AO	0 μ M	0.0128	100.0	0.0
	4 μ M	0.0115	89.8	10.2
	20 μ M	0.0087	68.0	32.0
KP	0 μ M	0.0106	100.0	0.0
	4 μ M	0.0098	92.5	7.5
	20 μ M	0.0082	77.4	22.6
L	0 μ M	0.0093	100.0	0.0
	4 μ M	0.0084	90.3	9.7
	20 μ M	0.0078	83.9	16.1
AO-1M				
AO	0 μ M	0.0117	100.0	0.0
	4 μ M	0.0073	62.3	37.7
	20 μ M	0.0044	37.6	62.4
KP	0 μ M	0.0089	100.0	0.0
	4 μ M	0.0067	75.3	24.7
	20 μ M	0.0059	66.3	33.7
L	0 μ M	0.0081	100.0	0.0
	4 μ M	0.0070	86.4	13.6
	20 μ M	0.0055	67.9	32.1
AO-1L				
AO	0 μ M	0.0113	100.0	0.0
	4 μ M	0.0091	80.5	19.5
	20 μ M	0.0073	64.6	35.4
KP	0 μ M	0.0093	100.0	0.0
	4 μ M	0.0079	84.9	15.1
	20 μ M	0.0068	73.1	26.9
L	0 μ M	0.0080	100.0	0.0
	4 μ M	0.0073	91.3	8.7
	20 μ M	0.0064	80.0	20.0

Korrelasiekoëffisiënte vir die eerste-orde funksie, $y = a + bx$ wat op die datapunte na 36 uur gepas is, was soos volg: Aktiewe absorpsie - 0 μ M: 0.995, 4 μ M: 0.997 en 20 μ M: 0.994. Kalsiumfosfaatpresipitering - 0 μ M: 0.989, 4 μ M: 0.992 en 20 μ M: 0.990. Liposoomverpakking - 0 μ M: 0.982, 4 μ M: 0.977 en 20 μ M: 0.978.



Figuur 6.19. Bepaling van die invloed van verskillende transfeksietegnieke op die effektiwiteit van antisens-oligonukleotiede. Antisens-oligonukleotiede 1K (A.), 1M (B.) en 1L (C.) is elk in 'n finale konsentrasie van 0, 4 en 20 μM net so by die selle gevoeg vir die aktiewe absorpsie-eksperiment (-o-), of is na kalsiumfosfaatpresipitering (-□-) of liposoomverpakking (-Δ-) op die selle neergelê.

6.4. EFFEKTIEWITEIT VAN 'n ANTISENS-RNA-UITDRUKKINGSVEKTOR, GERIG TEEN DIE UITDRUKKING VAN HBsAg, IN GETRANSFEKTEERDE PLC/PRF/5-SELLE.

In Afdeling 4.3 is die konstruksie van 'n antisens-RNA-uitdrukkinsvektor, wat teen die uitdrukking van HBsAg gerig is, volledig bespreek. Hier word die transfeksie van PLC/PRF/5-selle met hierdie vektor, die seleksie van getransfekteerde klone en die verandering in HBsAg-uitdrukking in hierdie klone beskryf.

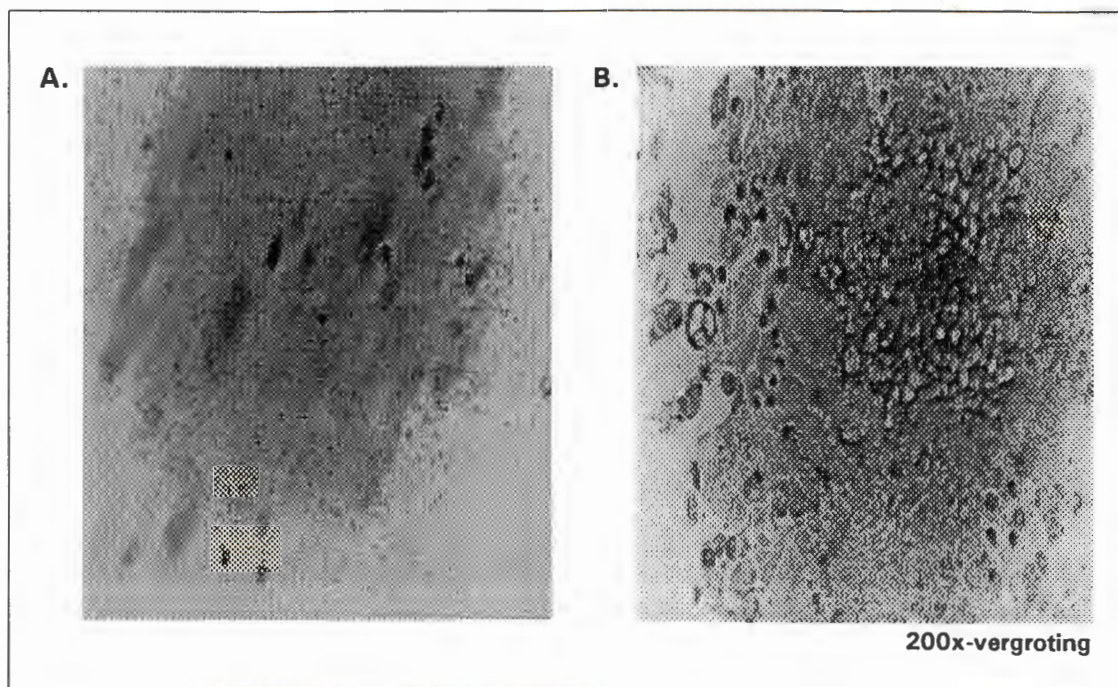
Aangesien daar met liposoomgemedieerde transfeksies in die algemeen 'n hoër transfeksie-effektiewiteit en 'n groter mate van herhaalbaarheid verkry word, is daar besluit om van dié tegniek gebruik te maak (Felgner et al., 1987 en Greeff, 1993). Liposoomverpakking van DNA wat in selle getransfekteer moet word, behels die interaksie tussen die negatief gelaaide fosfaatgroepe in DNA en kationiese lipiede. 'n Residuele positiewe lading medieer dan die binding van die kompleks aan die negatief gelaaide sialiensuurresidue op die seloppervlak (Felgner et al., 1987), vanwaar die DNA deur endositose in die sel vrygestel word (Whitt et al., 1991). LIPOFECTIN™ (GIBCO), 'n 1:1 liposoomformulering van die kationiese lipied N-[1-(2,3-dioleïeloksi)-propiel]-n,n,n-trimetielammoniumchloried (DOTMA) en dioleïelfosfatidietanolamien (DOPE) in water, is vir transfeksie gebruik.

Vyf mikrogram plasmied-DNA, pAHBS, is met serumvrye medium tot 100µl verdun en 15µl van die LIPOFECTIN™-suspensie is met 85µl serumvrye medium vermeng. Hierdie twee suspensies is bymekaar gevoeg, versigtig vermeng en vir 15 minute by kamertemperatuur geïnkubeer. Intussen is 25cm²-flesse met PLC/PRF/5-selle wat tussen 40 en 60% volgegroeï was, twee maal met serumvrye medium gewas. Nog 3ml serumvrye medium is by die liposoom-DNA-suspensie gevoeg waarna die mengsel oor die selle gegiet is. Hierdie transfeksie-reaksie is vir 5 uur onder normale toestande geïnkubeer en daarna is die liposoom-DNA-suspensie met volledige groeimedium vervang. Die getransfekteerde selle is vir 'n verdere 48 uur so

geïnkubeer waarna hulle in 'n 1:1 verhouding verdeel is. Seleksiemedium is 24 uur later vir die eerste keer by die selle gevoeg en dit is volgehou totdat foki gevorm het. 'n Negatiewe transfeksiekontrolle, wat dieselfde behandeling sonder enige DNA ontvang het, is saam met elke transfeksie-eksperiment gedoen om die seleksieproses te verifieer.

Soos wat in Afdeling 4.3 bespreek is, is getransfekteerde selle op grond van neomisienweerstandbiedendheid geselekteer. Die getransfekteerde selle is vir ongeveer 14 dae aan tussen 100 en 800 µg/ml genetisien (G418) in die groeimedium blootgestel. Genetisien is 'n aminoglikosied met 'n struktuur wat baie ooreenstem met dié van neomisien, wat proteïensintese inhibeer deur met die ribosomale funksies in te meng. Die geenproduk van die bakteriële neomisienweerstandbiedendheidsgeen kan genetisien egter detoksifiseer (Kingston, 1987). Tydens die seleksieproses wat hierbo beskryf is, sou slegs selle wat 'n neomisienweerstandbiedendheidsgeen besit het, met ander woorde getransfekteerde selle, oorleef het. Hierdie enkele getransfekteerde selle sou aanhou groei en verdeel soos gewoonlik terwyl al die ongetransfekteerde selle sou afsterf. Dit het die vorming van selkolonies of foki, bestaande uit 'n enkele kloon, tot gevolg gehad wat maklik geïsoleer kon word na seleksie (Figuur 6.20).

'n Enkele fokus is geïsoleer met behulp van 'n steriele selskraper wat vir 5 minute by kamertemperatuur in 200 µl Dispase™ (Boehringer Mannheim) geïnkubeer is om die selle van die skraper en van mekaar af los te maak. Nadat die skraper verwyder is, is die selle vir 'n verdere 5 minute by 37°C geïnkubeer, waarna 1 ml 1x PBS-buffer by die selsuspensie gevoeg is. Die selle is vir 5 minute by 4000 o.p.m. in 'n sentrifugeerder gepresipiteer en is, nadat die supernatant gedekanteer is, in 1 ml volledige groeimedium gesuspendeer. 'n Verdere 2 ml medium is by die selsuspensie gevoeg, die selle is na 'n 25 cm²-fles oorgedra en is daarna volgens die standaardmetodes gekweek.



Figuur 6.20. (A) Ongetransfekteerde selle en (B) foki van getransfekteerde PLC/PRF/5-selle na genetisienseleksie.

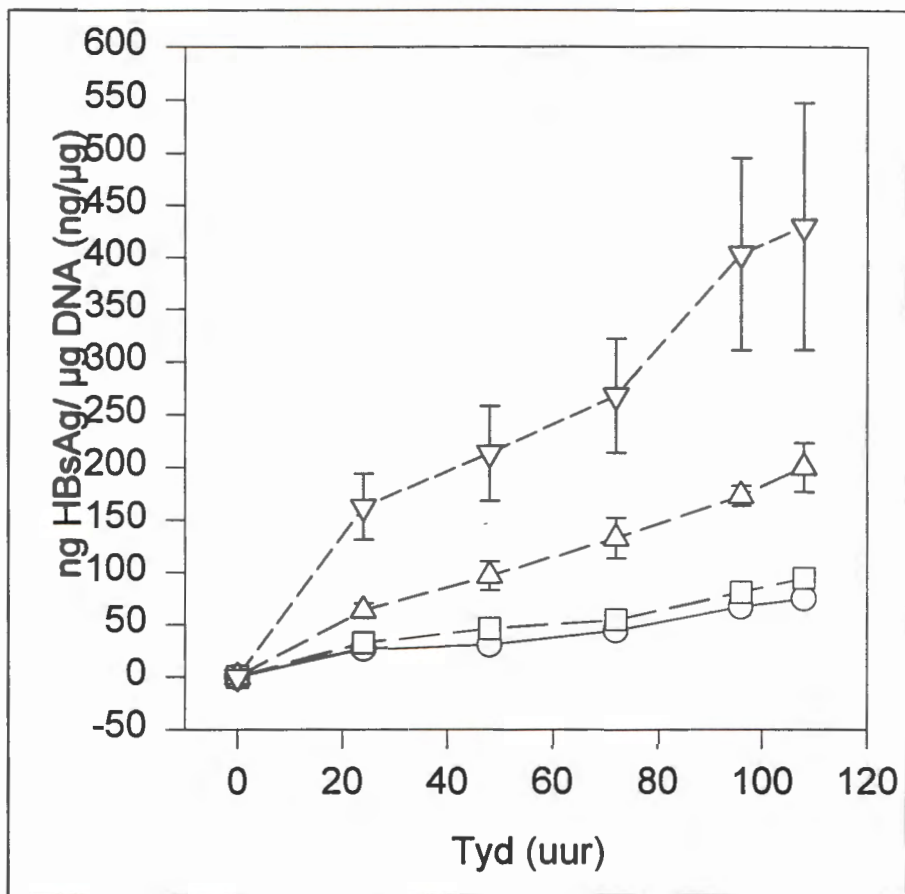
Nadat voldoende hoeveelhede van die getransfekteerde selle gekweek is, is HBsAg-uitdrukking in hierdie selle met dié van PLC/PRF/5-selle vergelyk. In die eerste plek is die getransfekteerde selle in twee 25cm²-flesse wat ongeveer 90% vol gegroei was, getripsineer, bymekaar gevoeg om 'n homogene mengsel te verkry en weer tussen vier 25cm²-flesse verdeel. Terselfdertyd is twee flesse PLC/PRF/5-selle op dieselfde wyse as kontroles voorberei. Na 'n 24 uur inkuberingstydperk is twee van die flesse met die getransfekteerde selle en een van die PLC/PRF/5-flesse met deksametasoon behandel.

Soos wat in Afdeling 4.3 bespreek is, word geenuitdrukking in pMAMneo-afgeleide uitdrukkingsvektore onder andere deur die MMTV-LTR aktiveringsvolgorde gereguleer. Lee en medewerkers het in 1981 bewys dat daar in die MMTV-LTR, volgordes is wat die glukokortikoïedregulering van geenuitdrukking moontlik maak. Deksametasoon is 'n glukokortikoïedhormoon wat aan die promotorvolgorde in die MMTV-LTR bind en sodoende die affiniteit van die reguleringsvolgorde vir transkripsiefaktore verhoog. Daar is bevind dat 'n tienvoudige verhoging in die konsentrasie van die transgeniese produk in die teenwoordigheid van deksametasoon gesintetiseer kan word (Lee *et al.*, 1981).

Deksametasoonbehandeling het in hierdie geval beteken dat die groeimedium van die selle vir 'n 72 uur-tydperk met 500ng/ml deksametasoon aangevul is. Na hierdie behandeling is vars volledige medium by al die selle, insluitende die kontroles wat nie met deksametasoon behandel is nie, gevoeg en die mediummonster vir tyd nul is onttrek. Soos in die geval van die antisens-oligonukleotiede, is die selle vir 'n 108 uur-tydperk geïnkubeer en mediummonsters is elke 12 uur onttrek. Na verloop van die 108 uur-tydperk, is die totale hoeveelheid DNA in elke fles en die HBsAg-konsentrasies in die mediummonsters, soos voorheen beskryf is, bepaal. Die resultate van hierdie analyses word in Figuur 6.21 gegee.

'n Opvallende probleem wat ondervind is tydens die uitvoering van hierdie eksperiment, was dat getransfekteerde selle wat met deksametasoon geaktiveer is, nie lank oorleef het nie. PLC/PRF/5-selle wat darenteën as 'n kontrole met deksametasoon behandel is, het geen sigbare nuwe-effekte getoon nie en ongeaktiveerde getransfekteerde selle het ook normaal gegroei. Getransfekteerde selle is egter met moeite aan die lewe gehou vir die 108 uur-tydperk na aktivering en uiteindelik het al die selle gesterf.

Uit die resultate wat vir hierdie antisens-RNA-eksperiment verkry is, was dit duidelik dat presies die teenoorgestelde effek as wat verwag was, verkry is.



Figuur 6.21. Verandering in HBsAg-uitdrukking in getransfekteerde PLC/PRF/5-selle. HBsAg-uitdrukking is in ongetransfekteerde PLC/PRF/5-selle sonder (-O-) en met (-□-) deksametasoonbehandeling en in getransfekteerde PLC/PRF/5-selle sonder (-Δ-) en met (-▽-) deksametasoonbehandeling nagegaan.

6.5. GEVOLGTREKKING

Al ses die antisens-oligonukleotiede wat by die groeimedium van die PLC/PRF/5-selle gevoeg is, het 'n invloed op HBsAg-uitdrukking gehad. Die mate van inhibisie was verskillend vir elke oligonukleotied en het ook met die verandering in oligonukleotiedkonsentrasie verander. Soos wat uit die literatuur voorspel kon word, was die oligonukleotiede wat teen die inisiasiegebied van die S-geen gerig was, in

die algemeen die effektiefste (Afdeling 2.2.5). Wat lengte aanbetref, was die 15-meer nukleotiede die effektiefste in elk van die twee groepe en die 9-mere die minste effektief (Figuur 6.17). 'n Opvallende waarneming wat gemaak is, was dat die mate van inhibisie nie eweredig met die antisens-oligonukleotiedkonsentrasie toegeneem het nie. In die meeste gevalle het inhibisie toegeneem tot by 'n sekere oligonukleotiedkonsentrasie waarna dit eers afgeneem het voordat dit weer toegeneem het. Vir al die inhibisie-eksperimente, behalwe die van AO-2K, is ook waargeneem dat die kleur van die groeimedium vinniger vergeel oor die 108 uur-tydperk in die teenwoordigheid van die antisens-oligonukleotiede. Hierdie uitputting van die medium kon met inhibisiewaardes van meer as ongeveer 30% in verband gebring word.

Daar is ook bevind dat die antisens-oligonukleotiede meer effektief is indien dit in 'n enkele groot dosis, in plaas van verskeie klein dosisse, toegedien word. Die twee transfeksietegnieke wat gebruik is om die antisens-oligonukleotiede oor die selmembraan te help vervoer, het 'n negatiewe effek op die inhibisie-effek gehad. Dit was duidelik dat hierdie twee tegnieke, soos hulle hier uitgevoer is, die selle te veel skade berokken tydens die transfeksiestap, wat beteken het dat daar nie onafhanklik na HBsAg-uitdrukking in die sisteem gekyk kon word nie. Die antisens-RNA-uitdruktingsvektor waarmee PLC/PRF/5-selle getransfekteer is het ook 'n verrassende resultaat gelewer, deurdat selfs meer HBsAg in die getransfekteerde selle gesintetiseer is.

Die resultate wat vir die antisens-oligonukleotied inhibisie-eksperimente verkry is dui daarop dat die inhibisie-effek direk verband hou met die konsentrasie en die spesifieke teikenvolgorde van die antisens-oligonukleotiede. Die doel van hierdie afdeling is dus bereik deur te bewys dat antisens-oligonukleotiede wel HBsAg-uitdrukking in selkulture spesifiek kan inhibeer.

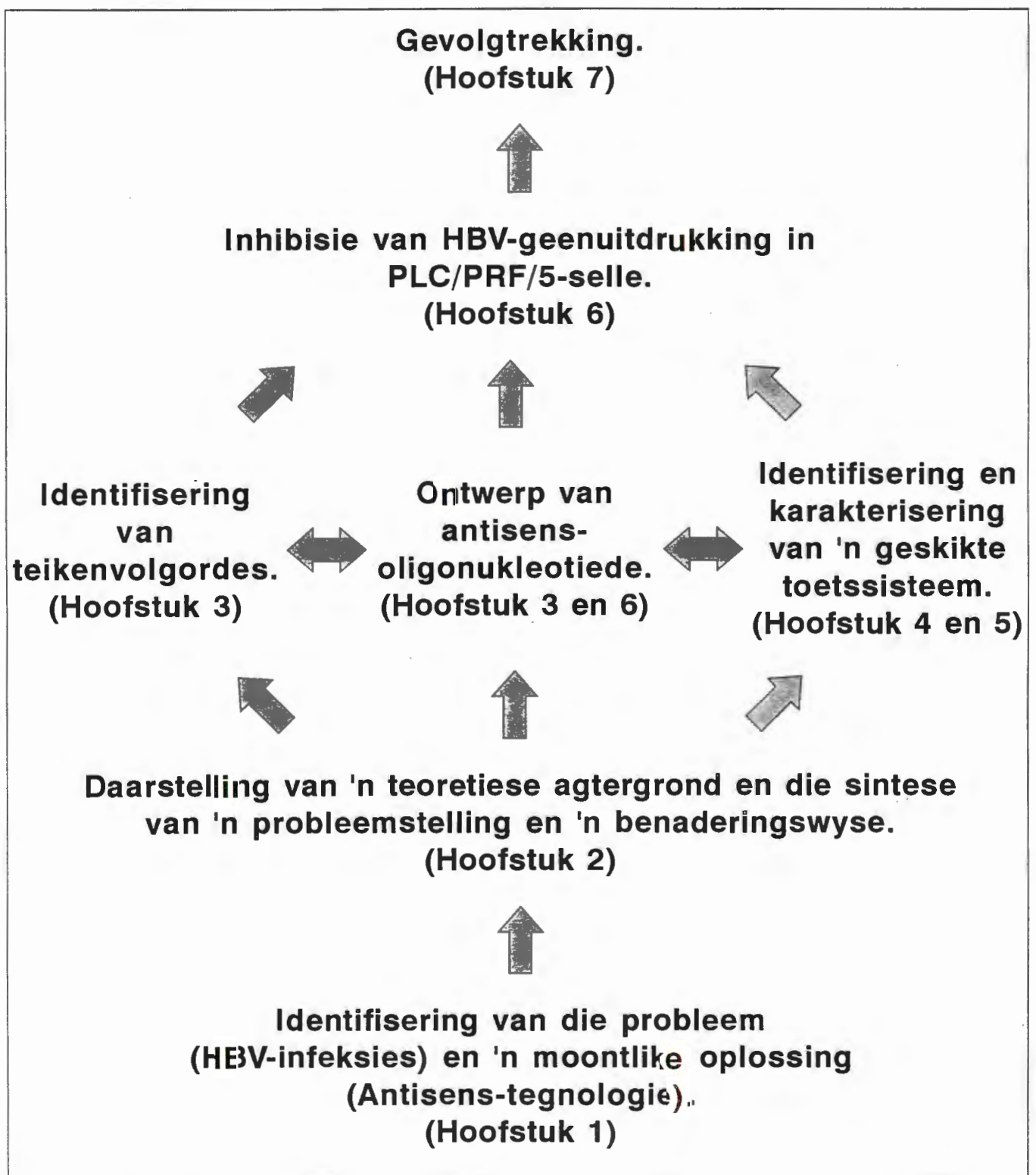
HOOFSTUK 7

BESPREKING

7.1. INLEIDING

Antisens-oligonukleotiede is reeds met groot sukses in 'n verskeidenheid van *in vitro*-sisteme gebruik om geenuitdrukking spesifiek te onderdruk. So is die replisering van verskeie virusse ook reeds met behulp van antisens-volgordes geïnhibeer (Tabel 2.4). Gebaseer op die potensiaal van die antisens-tegnologie en die wêreldwye gesondheidsprobleem wat deur HBV-infeksies geskep word, was die doel van hierdie studie om die potensiaal van antisens-oligonukleotiede as inhibeerders van HBV-geenuitdrukking te evalueer. Uit die voorafgaande hoofstukke is dit duidelik dat die studie in verskeie opeenvolgende fases beplan en volvoer is. Om die onderlinge verwantskappe van hierdie verskillende dele aan te toon, word die verloop van die studie skematies in Figuur 7.1 voorgestel.

'n Omvattende literatuurstudie is in die eerste plek gedoen, waarin veral klem op die werking van antisens-oligonukleotiede en die eienskappe van HBV wat 'n invloed hierop mag hê, gelê is (Hoofstuk 2). Van die belangrikste parameters van hierdie studie wat eerste vasgestel moes word, was die keuse van 'n geskikte HBV-teikengeen en 'n bruikbare toetssisteem. Na die kritiese evaluering van die relevante gegewens in die literatuur, is daar besluit om die uitdrukking van die HBV-mantelproteïengeen (die S-geen)(Figuur 2.12) in selkulture te inhibeer. Hierdie besluit was hoofsaaklik gebaseer op praktiese en veiligheidsvereistes soos wat in Hoofstuk 5 uiteengesit is.



Figuur 7.1. Skematiese voorstelling van die verloop en die onderlinge verwantskappe tussen die onderafdelings van hierdie studie.

Deur al die beskikbare HBV-DNA-volgordes in twee internasionale databasisse te vergelyk, is geskikte teikenvolgordes in die S-geen geïdentifiseer en ses verskillende antisens-oligonukleotiede is daarvolgens ontwerp (Hoofstuk 3). Aangesien HBV-DNA-volgordes vir verskeie fasette van hierdie en verwante projekte nodig was, is die volledige HBV-genoom in 'n geskikte vektor gesubkloneer en daarna volledig gekarakteriseer (Hoofstuk 4). Drie HSK-sellyne is volledig ten opsigte van hul HBV-eienskappe gekarakteriseer en PLC/PRF/5-selle is gevolglik as 'n geskikte sisteem waarin die uitdrukking van die HBsAg nagevors kon word, geïdentifiseer (Hoofstuk 5). Die laaste fase van hierdie studie het die inhibisie van HBsAg-uitdrukking in PLC/PRF/5-selle behels (Hoofstuk 6). Die effektiwiteit waarmee die verskillende antisens-oligonukleotiede die uitdrukking van HBsAg geïnhibeer het, is onder verskeie omstandighede bepaal. Reaksie-omstandighede wat verander is, sluit onder andere die volgende in; verskillende oligonukleotiedkonsentrasies, -lengtes, en -toedieningsdosisse asook die gebruik van verskillende transfeksietegnieke. Laastens is die effektiwiteit van 'n antisens-RNA-uitdrukkingsektor, wat teen HBsAg-uitdrukking gerig was, ook bepaal.

In hierdie hoofstuk word die resultate wat verkry is, opgesom en meer breedvoerig bespreek met die klem op gevolgtrekkings en afleidings wat tot 'n finale slotsom aangaande die sukses van die studie gelei het.

7.2. VERGELYKENDE GENETIESE STUDIE VAN HBV EN VERWANTE *HEPADNAVIRIDAE*

'n Nukleotiedvervangings tempo van tussen 1.4×10^{-5} en 3.2×10^{-5} in 'n spesifieke posisie per jaar, is vir die HBV-genoom bepaal (Okamoto et al., 1987). Die belang van sulke mutasies tydens die ontwikkeling van volgordespesifieke toepassings, soos byvoorbeeld die antisens-tegnologie, is vanselfsprekend. Om hierdie rede is 'n omvangryke vergelyking van al die beskikbare HBV-DNA-volgordes in twee internasionale databasisse getref om geskikte teikenvolgordes vir antisens-

oligonukleotiede te identifiseer. Afgesien van die feit dat gekonserveerde teikengebiede in sekere gene geïdentifiseer kon word, kon die mate waarin die spesifieke gene as 'n geheel gekonserveer gebly het, ook bepaal word. Hierdie inligting is van belang indien in ag geneem word dat hoogs gekonserveerde gene juis gekonserveer is, as gevolg van funksionele en/of strukturele beperkinge om die aminosuurvolgorde van die proteïen behoue te laat bly. 'n Hoë mate van konservering kan op die kritiese belang van die betrokke geen in die lewenssiklus van die virus dui, wat dit dus as 'n geskikte antisens-teiken kan kwalifiseer. Die resultate van hierdie vergelykings kan in twee dele verdeel word, naamlik:

- *Vergelykings tussen die verskillende HBV-subtypes.* Vergelykings tussen die HBV-subtypes het getoon dat behalwe vir stilmutasies, daar ook aminosuurvervangings en soms groot delesies voorkom. Nukleotiedvervangings kom egter nie ewekansig regdeur die genoom of in 'n spesifieke ooplesraam voor nie (vergelyk met Bylaag 1 en 2). Dit dui op strukturele en funksionele beperkinge wat op elke proteïen of selfs domeine daarvan van pas is, om die aminosuurvolgorde te konserveer. Die eenvoudigste voorbeeld hiervan is dat al die inisiasie- en terminasiekodons van die verskillende ooplesrame behoue gebly het. Hierdie gevolgtrekking word verder bevestig deur die waarneming dat die gedeeltes van die genoom waar twee uitfase leesrame oorvleuel, in die algemeen meer gekonserveer is as gevolg van die dubbele dosis beperkinge wat daarop geplaas word deur die twee proteïene. Nukleotiede is ook in al die delesies, wat in sommige subtypes voorkom, in veelvoude van drie weggelaat, wat dus beteken dat dit slegs 'n geringe effek op die leesraam sal hê.

Die gemiddelde genetiese afstand tussen die verskillende subtypes is op grond van nukleotied- en aminosuurverskille bepaal en is verwerk om die verwantskappe as driedimensionele filogenetiese bome voor te stel. Hierdie relatiewe filogenetiese verwantskappe bly dieselfde wanneer beide die nukleotiedvolgorde van die volledige genome asook die aminosuurvolgordes van die individuele gene met mekaar vergelyk word (vergelyk Figuur 3.5 byvoorbeeld

met Figuur 3.8). Subtypes adw_2 en adw asook $\bar{a}dr$ en ayr , is nader verwant aan mekaar as aan die ander subtypes en vorm saam met ayw drie groepe wat ongeveer ewe veel van mekaar verskil (Figuur 3.5). Uit die vergelykings blyk dit ook dat sub tipe adw_2 waarskynlik die oorspronklike volgorde is waaruit die ander subtypes ontwikkel het. Hierdie afleiding is hoofsaaklik gebaseer op die afwesigheid van delesies in die adw_2 -genoom en die feit dat dit die mees algemene en wyd verspreide sub tipe is (Figure 2.10 en 3.3).

'n Verdere gevolgtrekking wat uit hierdie vergelykings gemaak kon word, was dat daar met behulp van restriksie-analises tussen die verskillende subtypes onderskei kon word. Hierdie waarneming is later bevestig deur die karakterisering van 'n gekloneerde HBV-genoom (Hoofstuk 4).

Ter afsluiting kan die afleidings wat uit die vergelykings gemaak is en wat 'n rol mag speel tydens die beplanning van antisens-inhibisie-eksperimente, soos volg saamgevat word:

- Gekonserveerde teikengebiede kon in die HBV-genoom geïdentifiseer word. Dit sal verseker dat 'n enkele antisens-oligonukleotied, wat teen so 'n volgorde gerig is, teen al die subtypes effektief sal wees.
 - Die C-geen is geïdentifiseer as die geen wat die meeste gekonserveer is; slegs 13% van die nukleotiedveranderinge in die koderingsvolgorde kan as aminosuurveranderinge waargeneem word. Hierdie geen behoort dus 'n effektiewe teiken te wees wanneer virusreplisering geïnhibeer moet word.
- *Vergelykings tussen die verskillende Hepadnaviridae.* Vergelykings tussen die verskillende HBV-verwante *Hepadnaviridae* is getref om 'n meer volledige beeld van die ooreenkomste en verskille tussen die onderskeie virusse te verkry. Dit kan ook verder bydra tot die identifisering van 'n spesifieke geen wat 'n belangrike rol in die lewenssiklus van die virusse mag speel. Hierdie analises het ook daartoe bygedra dat hierdie vergelykings as 'n volledige, selfstandige studie by verskeie kongresse voorgedra kon word.

Die genetiese organisasie van die diervirusse stem baie ooreen met dié van HBV en die enigste uitsondering is die drie in plaas van vier ooplesrame in die twee voëlvirusse (Figuur 3.15). Die afwesigheid van 'n afsonderlike X-geen in die voëlvirusse kan die belang van die HBxAg se funksie in die ander virusse bevraagteken. Meer inligting aangaande die funksie van die HBxAg en die HBcxAg-fusieproteïen in voëls, is egter nodig voordat 'n finale gevolgtrekking gemaak kan word (Mandart *et al.*, 1984). Tussen die naverwante virusse, HBV en CHV, HHV en DHV en GHV en WHV, kom wel gekonserveerde volgordes voor, maar nie tussen die verskillende groepe nie. Onderling verskil die verwante diervirusse ook meer van mekaar as wat die HBV-subtypes van mekaar verskil (Figuur 3.21). Aangesien die verskillende groepe meer as 50% van mekaar verskil, kan geen waterdigte afleidings aangaande die belang van 'n spesifieke geen of die virusse se filogenetiese verwantskappe gemaak word nie.

Afgesien van die spesifieke afleidings en gevolgtrekkings wat hierbo uiteengesit is, is die belangrikste algemene gevolgtrekking wat uit hierdie analyses gemaak kon word, die feit dat die immunologies-getipeerde subtypes van HBV, nie 'n ware weerspieëling van die genotipiese variasie tussen die genome is nie. Hierdie gevolgtrekking is soortgelyk aan bevindings wat reeds in die literatuur beskryf is deur Okamoto en sy medewerkers (1986 en 1988). Vir spesifieke interaksies op molekulêre vlak, soos byvoorbeeld vir die antisens-inhibisie van geenuitdrukking, moet moontlike verskille in die nukleotiedvolgorde dus altyd in ag geneem word.

7.3. SUBKLONERING EN KARAKTERISERING VAN DIE HBV-DNA-VOLGORDES

HBV-DNA-volgordes is in verskeie fasette van hierdie en ander verwante studies gebruik en daarom was dit nodig om die volgordes vrylik in 'n veilige en gerieflike vorm beskikbaar te hê. Dít is bewerkstellig deur die volledige HBV-genoom in 'n plasmied te subkloneer, sodat dit in *E.coli* vermenigvuldig kon word. Fragmente van

die HBV-genoom is uit hierdie plasmied geïsoleer vir verdere subklonerings of vir gebruik as peilers in Southern-oordrag- en kolkcladanalises. Die manipulerings en karakterisering van die HBV-DNA-volgordes kan ook in twee dele verdeel word, naamlik:

- *Die subklonerings en karakterisering van die volledige HBV-genoom.* 'n Gekloneerde HBV-genoom van ongeveer 3200bp (Valenzuela, *et al.*, 1979), is in die kloneringsvektor pSP 64 gesubkloneer om die plasmied pSP-HBV daar te stel. Hierdie plasmied is gebruik om die HBV-DNA-volgordes op 'n veilige manier in *E.coli* te vermeerder vir verdere subklonerings en vir die voorbereiding van peilers. Die integriteit van die gekloneerde HBV-genoom is deur restriksieanalises bevestig en daarna is die sub tipe van die genoom ook bepaal (Afdeling 4.2). Dit is bewerkstellig deur middel van 'n reeks restriksie-ensiemanalises wat met behulp van die volgordevergelykings geïdentifiseer is (Tabel 4.2). Die resultate van hierdie analises het dit moontlik gemaak om die sub tipe van die gekloneerde genoom as adw_2 te bevestig, wat ooreenstem met die volgorde wat vir hierdie genoom deur Valenzuela en sy medewerkers bepaal is (1979).
- *Konstruksie van 'n antisens-RNA-uitdrukkingsvektor.* Die volledige S-geen, insluitende die preS1-, preS2- en S-koderingsgebiede, is in die omgekeerde oriëntasie in die soogdier uitdrukkingsvektor, pMAMneo, gekloneer om die antisens-RNA-uitdrukkingsvektor, pAHBS, daar te stel. Restriksie-ensiemanalises het die integriteit en die oriëntasie van die fragment bevestig (Afdeling 4.3).

Die resultate wat in hierdie afdeling verkry is, was dus van tweeërlei aard. Eerstens het die karakterisering van die gekloneerde HBV-genoom, die integriteit en sub tipe daarvan bevestig. Hiermee is bewys dat restriksie-ensiemanalises, soos wat uit die volgordevergelykings in Hoofstuk 3 voorgestel is, gebruik kan word vir die sub tipebepaling van gekloneerde HBV-genome. In die tweede plek is verskillende plasmiede met HBV-DNA-volgordes vir verdere gebruik gekonstrueer.

7.4. KARAKTERISERING VAN DRIE HSK-SELLYNE

Een van die belangrikste faktore wat die sukses van hierdie studie bepaal het, was die beskikbaarheid van 'n geskikte toetssisteem. In hierdie afdeling moes 'n geskikte toetssisteem geïdentifiseer en gekarakteriseer word. Die vereistes waaraan die toetssisteem moes voldoen, asook die redes waarom die keuse op selkulture geval het, word volledig in Hoofstuk 5 bespreek (Afdeling 5.1). 'n Verskeidenheid HSK-sellyne wat met HBV geassosieer word, is reeds uit pasiënte geïsoleer en in die literatuur beskryf. Aangesien slegs die S-geen konsekwent in HBV-geassosieerde HSK-sellyne uitgedruk word en die HBsAg 'n veilige proteïen is wat maklik en akkuraat gekwantifiseer kan word, is dit as die teikengeen gekies. 'n HSK-sellyn wat maklik hanteer en die HBsAg in hoë vlakke uitskei sodat die inhibisie van geenuitdrukking akkuraat gekwantifiseer kan word, moes geïdentifiseer word.

Alhoewel die beskikbare HSK-sellyne volledig in die literatuur beskryf is, is bevind dat die HBV-integrerings in die gasheergenoom onstabiel was (Afdeling 5.2). Dit het beteken dat sellyne wat moontlik as toetssisteme gebruik kon word, volledig gekarakteriseer moes word om te bevestig dat hulle aan al die behoeftes voldoen. Drie HSK-sellyne, naamlik Mahlavu-, Hep 3B- en PLC/PRF/5-selle is op grond van hul genotipiese en -fenotipiese eienskappe wat in die literatuur beskryf is, gekies.

In die algemeen het al drie die sellyne sonder enige probleme onder normale weefselkultuurtoestande gegroei. Hep 3B-selle was egter geneig om foki te vorm wat tot kontakinhibisie en vertraagde groei gelei het indien die selle nie gereeld verdeel is nie. Fasekontras- en ligmikroskopie-analises het getoon dat die sellyne in hul algemene morfologie van mekaar verskil, maar dat dit ooreenstem met wat in die literatuur beskryf word. Mahlavu-selle kon as verlengde hepatosiete, Hep 3B-selle as tipiese hepatosiete en PLC/PRF/5-selle as poligonale hepatosiete geklassifiseer word (Afdeling 5.3.1).

Die teenwoordigheid van geïntegreerde HBV-DNA-volgordes in die gDNA van die sellyne is met behulp van Southern-oordraganalises bepaal (Afdeling 5.3.2). Hierdie analises het bevestig dat die Hep 3B- en die PLC/PRF/5-selle wel HBV-DNA-volgordes bevat, maar 'n dubbelsinnige resultaat is vir die Mahlavu-selle verkry. Twee fragmente van onderskeidelik 3.9 en 3.2kb is vir die Xba I-behandelde Mahlavu-DNA verkry, terwyl albei die ander behandelinge 'n negatiewe resultaat gegee het. Alhoewel die afwesigheid van fragmente by veral die Hind III-behandelde DNA 'n rede tot twyfel kon wees, het al die kontroles en die hibridiseringspatrone in die ander bane daarop gedui dat die fragmente in die Xba I-baan eg moes wees. Aangesien die agtergrond baie skoon was en die negatiewe kontrole geen nie-spesifieke hibridisering getoon het nie (spesifiek nie in die Xba I-baan nie), moes aanvaar word dat hierdie HBV-spesifieke fragmente was. Shouval en sy medewerkers (1984) het ook voorheen aangetoon dat daar HBV-DNA-volgordes in Mahlavu-selle teenwoordig is. Die verwagte hibridiseringspatrone is verder in die algemeen waargeneem; die Hind III-, Xba I- en Xba I/Dra I-behandelings het onderskeidelik groot, middelslag en klein fragmente gelewer. Die algemene fragmentlengte van die Xba I/Dra I-behandeling was egter kleiner as wat verwag was en het daarom nie baie duidelike resultate gelewer nie.

Die volgende stap was om die teenwoordigheid van HBV-transkripte in die HSK-sellyne met behulp van kolkadanalises na te gaan (Afdeling 5.3.3). Hierdie resultate het die verwagtinge bevestig en getoon dat slegs Hep 3B- en PLC/PRF/5-selle HBV-transkripte bevat het. Kwantifisering van hierdie transkripte het ook getoon dat die PLC/PRF/5-selle meer HBV-transkripte as die Hep 3B-selle bevat het. Hierna moes bevestig word dat hierdie transkripte wel tot die HBsAg getransleer word. Dit is in die eerste plek gedoen deur *in situ*-immunogoudkleuring en elektronmikroskopie om die intrasellulêre teenwoordigheid en verspreiding van die HBsAg te bevestig (Afdeling 5.3.4). Hierdie resultate het die kolkadanalise se resultate bevestig deurdat 'n negatiewe resultaat vir die Mahlavu-selle verkry is, terwyl PLC/PRF/5-selle en in 'n mindere mate Hep 3B-selle 'n positiewe resultaat gelewer het. Geen bepaalde lokalisering van die HBsAg kon binne-in die selle waargeneem word nie,

behalwe vir 'n geringe assosiasie met die endoplasmiese retikulum in sekere gevalle. In sommige van die PLC/PRF/5-preparate is klein sfere buite die selmembrane opgemerk wat ook by voorkeur met die anti-HBsAg-teenliggaam gereageer het.

Laastens is die hoeveelheid HBsAg wat deur die selle in die media uitgeskei is, presies met behulp van ELISA's gekwantifiseer (Afdeling 5.4.5). Hierdie resultate het bevestig dat Mahlavu-selle nie HBsAg uitskei nie en dat dit slegs in klein hoeveelhede deur Hep 3B-selle uitgeskei word. Later is egter gevind dat sommige van die Hep 3B-selle wat vir 'n lang tydperk aan weefselkultuurtoestande blootgestel was, nie meer die HBsAg uitgeskei het nie. Die belangrikste bevinding was egter dat die HBsAg in voldoende konsentrasies deur die PLC/PRF/5-selle uitgeskei is om die invloed van antisens-oligonukleotiede op HBsAg-sintese direk in die media te kon bepaal.

Die doelwit van hierdie afdeling is dus bereik deur die identifisering van PLC/PRF/5-selle as 'n geskikte toetsstelsel, waarin die invloed van antisens-oligonukleotiede op HBsAg-uitdrukking bepaal kon word.

7.5. ANTISENS-INHIBISIE VAN HBsAg-UITDRUKKING IN PLC/PRF/5-SELLE

In baie opsigte was hierdie analyses die hoogtepunt van die studie, omdat al die gegewens en resultate uit die vorige afdelings saamgevoeg en gebruik is om die invloed van antisens-oligonukleotiede op HBsAg-uitdrukking in PLC/PRF/5-selle te bepaal (Hoofstuk 6). Ses verskillende antisens-oligonukleotiede wat teen twee gebiede in die S-geen geteiken was, is ontwerp. Die eerste teikengebied het met die S-geen se inisiasiekodon oorvleuel en die tweede met 'n gebied ongeveer in die middel van die koderingsvolgorde (Tabel 6.1). Drie oligonukleotiede met verskillende lengtes, naamlik 'n 9-, 15- en 21-meer onderskeidelik, waarvan die 3'-volgordes identies was, is vir elke teikengebied ontwerp. Nadat die integriteit van die

oligonukleotiede met behulp van elektroforese in 'n poliakrielamiedgel bevestig is, is die aktiwiteit daarvan onder verskeie toestande in weefselkulture bepaal. Die inhibisie-eksperimente kan in die volgende onderafdelings verdeel word:

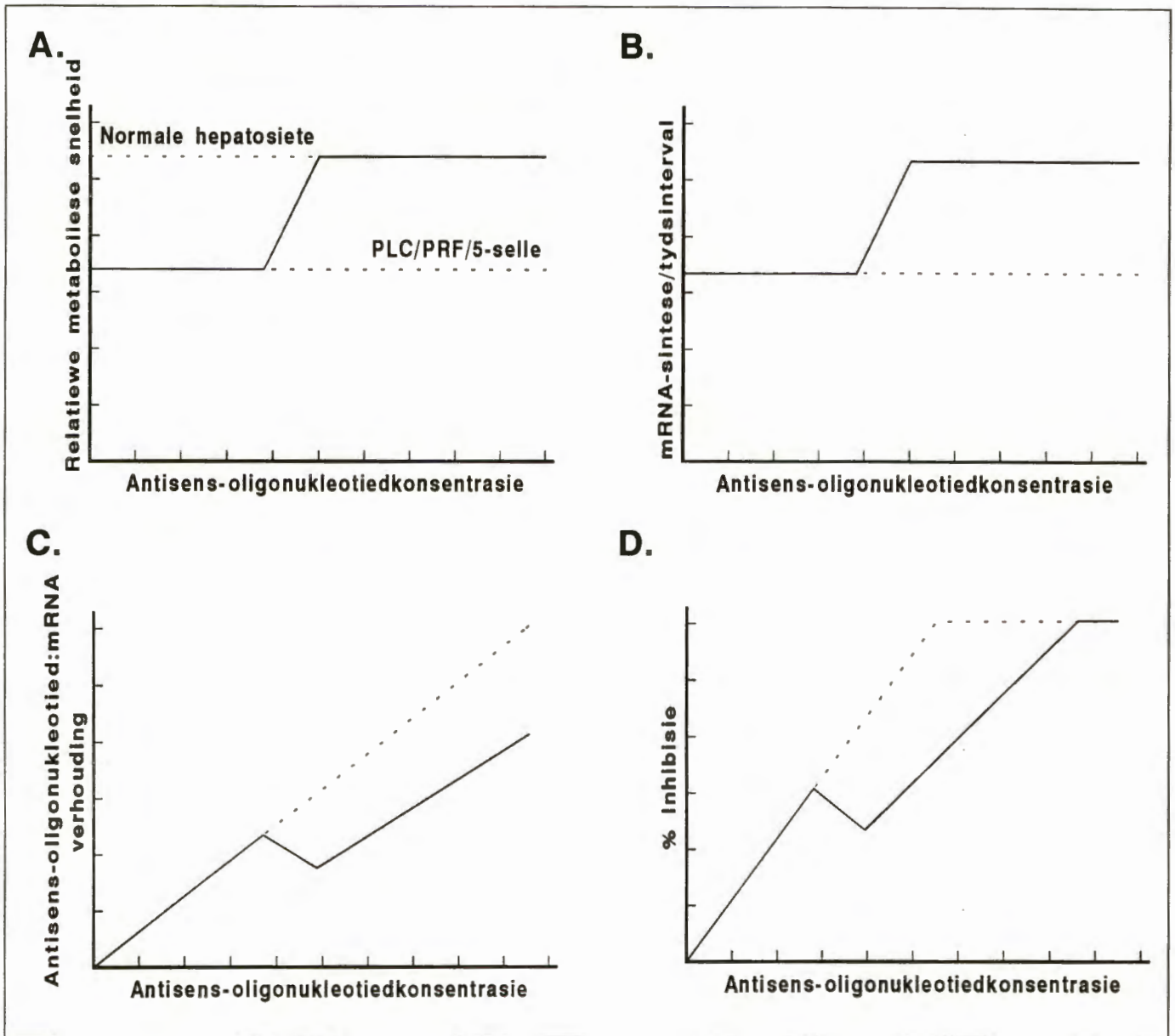
- *Bepaling van die effektiwiteit van ses antisens-oligonukleotiede wat teen HBsAg-uitdrukking in PLC/PRF/5-selle gerig was.* In die eerste reeks inhibisie-eksperimente is die verskillende antisens-oligonukleotiede in ses verskillende konsentrasies by die medium bo-op die selle gevoeg (Afdeling 6.3.1). In hierdie eksperimente is daar op die aktiewe absorpsie van die oligonukleotiede deur die selle staatgemaak. Die akkumulering van HBsAg in die medium is vir elke behandeling en vir 'n negatiewe kontrole oor 'n tydperk van 108 uur gemonitor. Om 'n aanduiding van die relatiewe inhibisie-effek op HBsAg-uitdrukking te verkry, is die HBsAg-konsentrasie in die medium van elke behandeling as 'n persentasie van die HBsAg-konsentrasie in die medium van die negatiewe kontrole uitgedruk. Hierdie resultate het met die eerste oogopslag duidelik getoon dat die toevoeging van antisens-oligonukleotiede tot die medium waarin die selle gegroei het, 'n definitiewe negatiewe invloed op die uitdrukking van HBsAg gehad het (Figuur 6.5 tot Figuur 6.17).

'n Interessante waarneming wat by byna al die inhibisie-eksperimente gemaak is, is dat die mate van inhibisie van HBsAg-uitdrukking nie eweredig met die oligonukleotiedkonsentrasie, in die reeks van 0 tot $20\mu\text{M}$, toeneem het nie. HBsAg-uitdrukking is in die meeste gevalle toenemend geïnhibeer deur toenemende antisens-oligonukleotiedkonsentrasies vanaf $0\mu\text{M}$. Die inhibisie-effek het egter net tot op 'n sekere punt toeneem, waarna dit weer afgeneem het met die toevoeging van meer oligonukleotied. Hierdie afname in die inhibisie-effek is later egter weer in 'n toename omskep met die toevoeging van nog meer oligonukleotied. Om op te som kan dus gesê word dat daar in die algemeen eers 'n positiewe, dan 'n negatiewe en daarna weer 'n positiewe verband tussen die inhibisie-effek en die antisens-oligonukleotiedkonsentrasie bestaan het. Hierdie

verskynsel is vir al die antisens-oligonukleotiede wat HBsAg-uitdrukking met meer as ongeveer 30% onderdruk het, waargeneem.

Nog 'n waarneming wat hand aan hand hiermee gegaan het, was dat die groeimedium van die selle waar HBsAg-uitdrukking wel geïnhibeer was, vinniger uitgeput geraak het as dié van die kontroles. Selle waarin HBsAg-uitdrukking met meer as ongeveer 30% onderdruk was, se medium het gouer vergeel as die medium in die negatiewe kontroles en in gevalle waar slegs geringe inhibisie van HBsAg-uitdrukking plaasgevind het, soos byvoorbeeld vir AO-2K. Hierdie waarneming het aanleiding gegee tot die voorstel dat die verandering in die inhibisiepatroon waarskynlik aan die hand van die selle se metaboliese snelheid verklaar kon word. Indien in ag geneem word dat die HBsAg nie 'n endogene geen in die oorspronklike hepatosiete was nie, kon verwag word dat die uitdrukking van hierdie vreemde geen 'n ekstra las op die sellulêre prosesse sou plaas. Die hoë konsentrasies waarin die HBsAg in PLC/PRF/5-selle uitgedruk was, sou druk op die beskikbaarheid van metaboliete in die selle geplaas het en sodoende die metaboliese snelheid van die selle negatief beïnvloed het. Indien hierdie las op die metabolisme verwyder sou word, behoort die metaboliese snelheid van die selle dus weer na die oorspronklike vlak te herstel.

In 'n antisens-inhibisie-eksperiment sal die antisens-oligonukleotied:teiken-mRNA verhouding groter word met 'n toename in die oligonukleotiedkonsentrasie, wat dus 'n al groter inhibisie-effek tot gevolg sal hê. Indien die metabolisme van die selle sou versnel omdat die metaboliese las in die proses verwyder is, sal hierdie verhouding egter negatief beïnvloed word. Die teiken-mRNA-konsentrasie sal nou ook toeneem aangesien die S-geen se uitdrukking nie onafhanklik van die algemene metabolisme is nie. In só 'n geval, sal die antisens-oligonukleotied:teiken-mRNA-verhouding verklein indien die toename in die teiken-mRNA-konsentrasie groter as die toename in die oligonukleotiedkonsentrasie is. Op proteïenvlak sal dit dus as 'n kleiner



Figuur 7.2. Skematiese voorstelling van die voorgestelde invloed van antisens-oligonukleotiede op die metaboliese snelheid van PLC/PRF/5-selle. 'n Toename in die relatiewe metaboliese snelheid (A.) van die PLC/PRF/5-selle lei tot verhoogde mRNA-vlakke (B.). Dit beteken dat die antisens-oligonukleotied:teiken-mRNA verhouding sal afneem totdat hierdie verandering in die mRNA-vlakke teëgewerk is, voordat dit weer sal toeneem (C.), hierdie verhouding tussen die antisens-oligonukleotied en teiken-mRNA sal in die inhibisietendens gereflekteer word (D.).

inhibisie-effek waargeneem word. Die beginsel van hierdie voorstel word skematies in Figuur 7.2 voorgestel. Daar moet egter klem gelê word op die feit dat daar nie voorgestel word dat die antisens-oligonukleotiede die metaboliese snelheid van die PLC/PRF/5-selle direk verhoog nie. Die oligonukleotiede verwyder slegs die ekstra las van HBsAg-sintese en stel sodoende meer metaboliete vir die kritiese sellulêre prosesse beskikbaar, wat lei tot versnelde selaktiwiteit en seldeling.

In die algemeen was dit ook uit hierdie reeks inhibisie-eksperimente duidelik dat die antisens-oligonukleotiede wat teen teikenvolgorde een gerig was, meer effektief was as dié in groep twee. Hierdie waarneming stem ooreen met die gegewens in die literatuur, wat toon dat teikengebiede wat met die inisiasiekodon oorvleuel, in die algemeen meer effektief is as teikengebiede in die koderingsvolgordes (Afdeling 2.2.5). Verder blyk dit ook dat ten opsigte van die lengte van die oligonukleotiede, die 15-mere die mees effektiewe volgordes was, terwyl die 9-mere die minste effektief was. Na aanleiding van die gegewens in die literatuur, vorm die 9-meer oligonukleotiede waarskynlik minder stabiele hibriede met die teiken-mRNA en die 21-meer oligonukleotiede word minder effektief deur die selle geabsorbeer as gevolg van hul groottes. In die geval van die 15-meer antisens-oligonukleotiede, word die effektiwiteit van opname en die stabiliteit van die hibriede dus die beste gebalanseer, om sodoende die mees effektiewe antisens-oligonukleotiede daar te stel. Die relatiewe effektiwiteite van die verskillende oligonukleotiede kan soos volg saamgevat word:

AO-1M > AO-1L > AO-1K > AO-2M > AO-2L > AO-2K.

- *Bepaling van die invloed van die dosis waarin 'n antisens-oligonukleotied toegedien word.* In hierdie eksperiment is AO-1M op twee maniere in die medium bo-op die selle toegedien. Eerstens is die antisens-oligonukleotied as 'n enkele dosis van 8 μ M met die aanvang van die eksperiment by die medium gevoeg en in 'n tweede eksperiment is die oligonukleotied in 8 dosisse van 1 μ M elk, elke 12 uur vir 84 uur, bygevoeg. HBsAg-uitdrukking is vir beide

eksperimente oor 'n 108 uur-tydperk gekwantifiseer en met 'n negatiewe kontrole vergelyk. Resultate wat uit hierdie eksperiment verkry is, het getoon dat HBsAg-uitdrukking, oor die 108 uur-tydperk, tot 'n groter mate geïnhibeer word indien die antisens-oligonukleotied in 'n enkele groot dosis met die aanvang van die eksperiment toegedien word (Figuur 6.18). Hierdie bevinding stem ooreen met die resultate van Goodarzi en sy medewerkers (1990).

Vir die interpretering van hierdie resultaat was dit egter belangrik om te onthou dat die inhibisiedata van hierdie eksperimente uit krommes, wat die akkumulering van HBsAg teenoor tyd aangedui het, verkry is. As gevolg hiervan kon daar byvoorbeeld nie gesê word tot watter mate geenuitdrukking in 'n sekere eksperiment op 'n spesifieke tydstip geïnhibeer is nie. Indien die akkumulering van HBsAg in die teenwoordigheid van 'n antisens-oligonukleotied met dié in 'n negatiewe kontrole vergelyk word, word slegs 'n aanduiding van die algemene inhibisietendens oor 'n sekere tydperk verkry. Vir hierdie eksperiment het dit beteken dat HBsAg-uitdrukking oor 'n 108 uur-tydperk tot 'n groter mate negatief beïnvloed is deur 'n eenmalige, groot dosis. Dieselfde was egter nie noodwendig waar óp 108 uur nie, aangesien die meeste van die oligonukleotied op hierdie stadium waarskynlik reeds gedegradêer was. In teenstelling hiermee behoort die antisens-oligonukleotiedkonsentrasie en daarom die mate van inhibisie in die ander eksperiment redelik konstant gebly het, aangesien die oligonukleotied elke 12 uur aangevul is. Oor 'n kort termyn het hierdie invloed egter kleiner gebly as dié van 'n enkele, groot dosis met die aanvang van die eksperiment. Uit hierdie eksperiment kon daar dus tot die gevolgtrekking gekom word dat antisens-oligonukleotiede meer effektief is oor 'n kort termyn van 108 uur, indien dit in 'n enkele groot dosis toegedien word.

- *Transfeksie van die selle met antisens-oligonukleotiede.* Daar is met behulp van twee transfeksietegnieke, CaPO_4 -presipitering en liposoomverpakking, gepoog om die antisens-oligonukleotiede met groter effektiwiteit oor die sellulêre membraan te vervoer. Beide die tegnieke het egter teleurstellende resultate

gelewer en het die inhibisie van HBsAg-uitdrukking negatief beïnvloed in vergelyking met eksperimente waarin aktiewe absorpsie van die oligonukleotiede plaasgevind het. 'n Belangrike feit wat aan die lig gekom het, is dat beide die tegnieke self 'n negatiewe invloed op HBsAg-uitdrukking gehad het. Selle wat as negatiewe kontroles aan die reaksietoestande van die transfeksietegnieke in die afwesigheid van enige oligonukleotiede blootgestel was, het minder HBsAg in vergelyking met die kontroles van die aktiewe-absorpsie eksperimente gesintetiseer (Tabel 6.10). Dit dui dus daarop dat hierdie transfeksietegnieke, soos wat hulle hier uitgevoer is, nie bruikbaar vir die vervoer van antisens-oligonukleotiede was nie, aangesien die metabolisme van die selle self daardeur beïnvloed is. Die transfeksietegnieke moet dus sodanig aangepas word dat die selle onder minder spanning geplaas word tydens die uitvoering van die eksperiment. Daar moet ook verseker word dat die antisens-oligonukleotiede nie tot so 'n mate deur die ander verbindings gekomplekseer word dat hulle nie deur die selle opgeneem kan word nie.

- *Bepaling van die effektiwiteit van 'n antisens-RNA-uitdruktingsvektor.* In hierdie afdeling is PLC/PRF/5-selle met 'n antisens-RNA-uitdruktingsvektor, wat teen HBsAg-uitdrukking gerig was, getransfekteer. Nadat 'n getransfekteerde sellyn geïsoleer is, is die promotor in die uitdruktingsvektor met behulp van deksametasoon geaktiveer en hierna is HBsAg-uitdrukking in die getransfekteerde selle met dié in PLC/PRF/5-selle vergelyk. 'n Verrassende resultaat is verkry deurdat HBsAg-uitdrukking eerder gestimmuleer is (Figuur 6.21). Selfs in die getransfekteerde selle wat nie met deksametasoon geaktiveer was nie, was HBsAg-uitdrukking drie maal hoër as in PLC/PRF/5-selle. In die geaktiveerde selle was uitdrukking tot agt maal hoër as in PLC/PRF/5-selle. Aangesien daar geen twyfel oor die oriëntasie van die S-geen in die antisens-uitdruktingsvektor is nie (Figuur 4.8), kan hierdie resultaat slegs aan die hand van abnormale heroriëntasiegebeure tydens die integreringsproses verduidelik word. Aangesien hierdie resultaat geen invloed op die primêre doel van hierdie studie gehad het nie, is die probleem nie verder ondersoek nie en slegs hierdie

een transgeniese kloon is bestudeer. Die antisens-RNA-tegnologie verdien egter baie meer aandag, veral in die lig van die positiewe resultate wat met die antisens-oligonukleotiede verkry is.

’n Positiewe resultaat wat hieruit verkry is, was dat die invloed van HBsAg-uitdrukking op die selle duidelik aangetoon is. HBsAg is in sulke hoë konsentrasies in die geaktiveerde selle uitgedruk, dat hulle slegs vir ’n paar dae oorleef het voordat hulle begin afsterf het. Hierdie waarneming het ooreengestem met die voorstel dat die ekstra las van HBsAg-sintese ’n stremmende invloed op die sellulêre prosesse en gevolglik die sel se metabolisme gehad het (Figuur 7.2).

7.6. SLOTSOM

Die doel van hierdie studie was om die toepasbaarheid van die antisens-tegnologie op HBV-geenuitdrukking te evalueer en om sodoende ’n infrastruktuur vir verdere werk in hierdie rigting daar te stel. Met inagneming van al die resultate wat verkry is, kan ten slotte bevestig word dat antisens-oligonukleotiede effektiewe inhibeerders van die uitdrukking van HBV-mantelproteïengeen (S-geen) in selkulture was. Verder is ’n basis vir meer gedetailleerde ondersoeke wat uiteindelik mag lei tot die onderdrukking van virusreplisering, daargestel. Leemtes wat tydens hierdie studie uitgewys is en wat in toekomstige ondersoeke bestudeer en verbeter kan word, sluit onder andere die volgende in:

- Die gebruik van ’n meer akkurate interne standaard waarvolgens HBsAg-uitdrukking gekwantifiseer kan word, sal verseker dat veranderinge in die reaksietoestande tussen verskillende behandelinge, meer akkuraat verantwoord kan word. ’n Endogene proteïen wat ook met behulp van ELISA’s gekwantifiseer kan word, behoort ideaal te wees.

- Die spesifisiteit en sitotoksisiteit van die fosfodiëster-oligonukleotiede kan in meer besonderhede nagegaan word.
- Die effektiwiteit van gemodifiseerde en gederivatiseerde oligonukleotiede kan met hierdie resultate vergelyk word.
- Transfeksietegnieke kan ook verder ondersoek word. Minder ingrypende tegnieke wat nie die selle nadelig sal beïnvloed nie, moet ontwikkel word. Veral die gebruik van liposome wat met behulp van teenliggame gerig kan word teen 'n spesifieke weefseltipe hou belofte in.
- Die invloed van antisens-oligonukleotiede op die metaboliese snelheid van PLC/PRF/5-selle kan bevestig en gekwantifiseer word.
- Die antisens-RNA-tegnologie kan ten opsigte van HBV-geenuitdrukking geëvalueer word. Hierdie tegniek hou waarskynlik die meeste belofte in vir die uiteindelijke *in vivo*-inhibisie van virusreplisering en behoort dus met baie meer aandag bestudeer te word.

BYLAES

3ylaag 1. Nukleotiedvolgordevergelijking van die genome van die verskillende HBV-subtypes.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
dw ₂ :	AATTCCACTG	CCTTCCACCA	AACTCTGCAG	GATCCCAGAG	TCAGGGGTCT	GTATCTTCCT	GCTGGTGGCT	CCAGTTCAGG	AACAGTAAAC	CCTGCTCCGA
dw :	-----	---G---	-G-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BV-1 :	--C---CA	-T-----	-----T-A	-----	-----C-	---CT---	-----	-----	-----G-	-----A--
BV-2 :	--C---CA	-T-----	-----T-A	---G---	-----CC-	---CT---	-----	-----	-----G-G-	-----A--
BV-3 :	--C---CA	-G-----	-----T-A	-----	-----C-	---CT---	-----	-----	-----	---T--A--
yw-1 :	-----AA	-----	-----A	-----	-G-A-C-	---T-C-	-----	-----	-----	---T--T--
yw-2 :	-----AA	-----	-----A	-----	-G-A-C-	---T-C-	-----	-----	-----	---T--T--
dr-1 :	-----AA	-A-----	-G-----TA	-----	-G-C-	A--T---	-----	-C-	-----	---T--T--
dr-2 :	-----AA	-A-----	-G-----TA	-----	-G-C-	A--T---	-----	-C-	-----	---T--T--
dr-m :	-----CA	-A--T---	-GTC---	TA-----	-G-C-	A--T---	C-----	-C-	-----	---T--T--
dr-k :	-----AA	-A-----	-G-----TA	--C---	-G-C-	A--CT---	-----	-C-	-----	---T--T--
yr :	-----AA	-A-----	-G-----TA	-----	-G-C-	A--T---	-----	-C-	-----	---T--T--
dyw :	-----AA	-----	-----A	-----	-G-A-C-	---T-C-	-----	G-----	-----	---T--T--
yw S :	-----	-----	-----	-----	-G-A-C-	---T-C-	-----	-----	-----	---T--T--
dwPS :	-----	-----	-G-----	-----A-	-----	---T-	-----	-----	-----	---T--T--
S-geen begin										
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
dw ₂ :	ATATTGCCTC	TCACATCTCG	TCAATCTCCG	CGAGGACTGG	GGACCCTGTG	ACGAACATGG	AGAACATCAC	ATCAGGATTC	CTAGGACCCC	TGCTCGTGTT
dw :	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BV-1 :	--C--T--	AGC--A--	-----TAT	--A-	-----	C-----	-----G-	-----C-	-----	-----
BV-2 :	--C--T--	-GC--A--	-----TAT	--A-	-----A	C-----	-----G-	-----C-	-----	-----
BV-3 :	-C-C--T--	-TC--A--	-----TAT	--C-	-----	C-----	-----G-	-----C-	-----	-----
yw-1 :	C-C--T--	-C-T-A--	-----T-T	-----T--	-----C-	CT-----	-----	-----	-----	-T-----
yw-2 :	C-C--T--	-C--A--	-----T-T	-----T--	-----C-	CT-----	-----	-----	-----	-----
dr-1 :	C-C--T--	A-C--A--	-----T-T	-----	-----CA	C-----	-----CA-	-----	-----	-----
dr-2 :	C-C--T--	A-C--A--	-----T-T	-----	-----CA	C-----	--G--CA-	-----	-----	-----
dr-m :	C-C--T--	A-C--A--	-----T	-----	-----CA	C-----	--G--CA-	-----	-----	-----
dr-k :	C-C--T--	A-C--A--	-----T	-----	-----CA	C-----	--G--CA-	-----	-----	-----
yr :	C-C--T--	A-C--A--	-----T-T	-----	-----CA	C-----	--G--CA-	-----	-----	-----
dyw :	C-C-A--	-C--A--	-----T-T	-----T--	-----C-	CT-----	-----	-----	-----	-----
yw S :	C-C--T--	-C--A--	-----T-T	-----T--	-----C-	CT-----	-----	-----	-----	-----
dwPS :	-----	-----	-----	-----	-----	-----T	-----	-----	-----	-----
adwr1 :	-----	-----G--CA-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
adwr2 :	-----	-----G--CA-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
adyr1 :	-----	-----CA-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
adyr2 :	-----	-----CA-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
sAg 1 :	-----	-----CA-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
sAg 2 :	-----	-----CA-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
sAg 3 :	-----	-----CA-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
sAg 4 :	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
sAg 5 :	-----	-----CA-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-C--
sAg 6 :	-----	-----T-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
dw ₂ :	ACAGGCGGGG	TTTTTCTTGT	TGACAAGAAT	CCTCACAATA	CCGCAGAGTC	TAGACTCGTG	GTGGACTTCT	CTCAATTTTC	TAGGGGGATC	TCCCGTGTGT
dw :	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BV-1 :	-----	-----	-----	-A-	-----A-	-----	-----	-----	-----A-	A-----
BV-2 :	-----	-----	-----	-A-	-----A-	-----	-----	-----	-----A-	A-----
BV-3 :	-----	-----C-	-----A-	-----	-----T-T	-----	-----	-----	-----A-A	A-----
yw-1 :	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----A-	A-----
yw-2 :	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----A-	A-----
dr-1 :	-----	-----	-----	-----	-----A-	-----	-----	-----	-----G-	A--AC--
dr-2 :	-----	-----	-----	-----	-----A-	-----	-----	-----	-----G-	A--AC--
dr-m :	-----	-----	-----	-----	-----A-	-----	-----	-----	-----G-	A--AC--
dr-k :	-----	-----	-----	-----	-----A-	-----	-----	-----	-----G-	A--AC--
yr :	-----	-----	-----	-----	-----A-	-----	-----	-----	-----G-	A--AC--
dyw :	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----A-	A-----
yw S :	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----A-	A-----
dwr1 :	-----	-----	-----	-----	-----A-	-----	-----	-----	-----G-	A--AC--
dwr2 :	-----	-----	-----	-----	-----A-	-----	-----	-----	-----G-	A--AC--
dyr1 :	-----T-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----A-G	A--C--
dyr2 :	-----T-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----A-G	A--C--
Ag 1 :	-----	-----	-----	-----	-----A-	-----	-----	-----	-----G-	A--AC--C
Ag 2 :	-----	-----	-----	-----	-----A-	-----	-----	-----	-----A-	A--AC--
Ag 3 :	-----	-----	-----	-----	-----A-	-----	-----	-----	-----A-	A--AC--
Ag 4 :	-----	-----	-----	-----	-----A-	-----	-----	-----	-----G-	A--AC--
Ag 5 :	-----	-----	-----	-----C-	-----A-	-----	-----	-----	-----G-	A--AC--
Ag 6 :	-----	-----	-----	-----	-----A-	-----	-----	-----	-----A-	A--AC--

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
adw ₂ :	CTTGGCCAAA	ATTGCGAGTC	CCCAACCTCC	AATCACTCAC	CAACCTCCTG	TCCTCCAATT	TGTCCTGGTT	ATCGCTGGAT	GTGTCTGCGG	CGTTTATCA
adw :	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
HBV-1 :	-----	-----	-A-T-	-G-	-----GT-	-----	-----	-----	-----	-----
HBV-2 :	-----	-----	-A-T-	-G-	-----GT-	-----	-----	-----	-----	-----
HBV-3 :	-----	-----	-A-T-	-G-	-----T-GT-	-----G-	-----	-----	-----	-----
ayw-1 :	-----	-----	-----	-----	-----T-	-----C-	-----	-----	-----	-----
ayw-2 :	-----	-----	-----	-----	-----	-----C-	-----	-----	-----	-----
adr-1 :	-C-	-----	-----	-----	-----T-	-----	-----C-	-----	-----	-----
adr-2 :	-C-	-----	-----	-----	-----T-	-----	-----	-----	-----	-----
adr-m :	-C-	-----	-----	-----	-----	-----	-----C-	-----	-----	-----
adr-k :	-C-	-----	-----	-----	-----T-	-----	-----C-	-----	-----	-----
ayr :	-C-	-----	-----	-----	-----T-	-----C-	-----C-	-----	-----	-----
adyw :	-----	-----	-----T-	-----	-----	-----C-	-----	-----	-----	-----
ayw S :	-----	-----	-----	-----	-----	-----C-	-----	-----	-----	-----
adwr1 :	-----	-----	-----	-----	-----T-	-----	-----C-	-----	-----	-----
adwr2 :	-C-	-----	-----	-----	-----T-	-----	-----C-	-----	-----	-----
adyr1 :	-C-	-----	-----	-----	-----T-	-----	-----	-----	-----	-----
adyr2 :	-C-	-----	-----	-----	-----T-	-----	-----	-----	-----	-----
sAg 1 :	-C-	-----	-----	-----	-----T-	-----	-----C-	-----	-----	-----
sAg 2 :	-C-	-----	-----	-----	-----T-	-----	-----C-	-----T-	-----	-----
sAg 3 :	TC-	-----	-----	-----	-----T-	-----	-----C-	-----T-	-----	-----
sAg 4 :	-----	-----	-----	-----	-----T-	A-	-----A-	-C-	-----	-----
sAg 5 :	-C-	-----	-----	-----	-----T-	-----	-----C-	-----	-----	-----
sAg 6 :	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
adw ₂ :	TATTCTCTT	CATCCTGCTG	CTATGCCTCA	TCTTCTTATT	GGTTCTTCTG	GATTATCAAG	GTATGTTGCC	CGTTTGTCTT	CTAATTCCAG	GATCAACAAC
adw :	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
HBV-1 :	-C-----G	-----	-----	-----G-	-----	-----C-	-----	-----	-----	-----T-
HBV-2 :	-C-----G	-----	-----	-----G-	-----	-----C-	-----	-----	-----	-----T-
HBV-3 :	-C-----G	-----	-----	-----G-	-----	-----C-	-----	-----	-----	-----T-
ayw-1 :	-C-----	-----	-----	-----G-	-----	-----C-	-----	-----	-----	-----CT-
ayw-2 :	-C-----	-----	-----	-----G-	-----	-----C-	-----	-----	-----	-----TT-
adr-1 :	-----	-----	-----	-----G-	-----	-----C-C-	-----	-----	-----C-	-----A-T-
adr-2 :	-----	-----	-----	-----G-	-----	-----C-C-	-----	-----	-----C-	-----A-T-
adr-m :	-----	-----	-----	-----G-	-----	-----C-C-	-----	-----	-----C-	-----A-T-
adr-k :	-----	-----	-----	-----G-	-----	-----C-C-	-----	-----	-----C-	-----A-T-
ayr :	-----	-----	-----	-----G-	-----	-----C-	-----	-----	-----	-----A-T-
adyw :	-C-----	-----	-----	-----G-	-----	-----C-	-----	-----	-----	-----T-
ayw S :	-C-----	-----	-----	-----G-	-----	-----C-	-----	-----	-----	-----TT-
adwr1 :	-C-----	-----	-----	-----G-	-----	-----C-	-----	-----	-----	-----A-T-
adwr2 :	-----	-----	-----	-----G-	-----	-----C-C-	-----	-----	-----C-	-----A-T-
adyr1 :	-C-----	-----	-----	-----G-	-----	-----C-	-----	-----	-----C-	-----A-T-
adyr2 :	-C-----	-----	-----	-----G-	-----	-----C-	-----	-----	-----C-	-----A-T-
sAg 1 :	-----	-----	-----	-----G-	-----	-----C-C-	-----	-----	-----C-	-----A-T-
sAg 2 :	-----	-----	-----	-----G-	-----	-----C-C-	-----	-----	-----C-	-----A-T-
sAg 3 :	-----	-----	-----	-----G-	-----	-----C-C-	-----	-----	-----C-	-----A-T-
sAg 4 :	-----	-----	-----	-----G-	-----	-----C-C-	-----	-----	-----C-	-----A-T-
sAg 5 :	-----	-----	-----	-----G-	-----	-----C-C-	-----	-----	-----C-	-----A-T-
sAg 6 :	-----	-----	-----	-----	-----	-----C-	-----	-----	-----	-----C-

	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
adw ₂ :	AACCACTACG	GGACCATGCA	AAACCTGCAC	GACTCCTGCT	CAAGGCAACT	CTATGTTTCC	CTCATGTTGC	TGTACAAAAC	CTACGGATGG	AAATTGCACC
adw :	-----	-----	-----	-----	-----	-----A-	-----	-----	-----	-----
HBV-1 :	C-----C-	-----	-G-	A-	-----A-C-	-----	-----	-----	-----T-	-----C-
HBV-2 :	-----C-C	-----	-----	A-	-----A-C-	-----	-----	-----	-----	-----C-
HBV-3 :	C-----C-A	-----	-----	-----	-----A-C-	-----	-----	-----	-----C-	-----C-
ayw-1 :	-----C-	-----C	GG-----T	-----A-	-----A-C-	-----A-	-----C-	-----C-	-----T-	-----C-
ayw-2 :	T-----C-	-----	G-----	-----	-----A-C-	-----A-	-----C-	-----C-	-----T-	-----C-
adr-1 :	C-----C-	-G-	-G-----	-T-	-----A-C-	-----	-T-	-----	-T-----C-	-----C-----T
adr-2 :	T-----C-	-----	-G-----	-T-	-----A-C-	-----A-	-T-	-----	-T-----C-	-----C-----T
adr-m :	C-----C-	-----	-G-----	-T-	-----A-C-	-----A-	-T-	-----	-T-----C-	-----C-----T
adr-k :	T-----C-	-----	-G-----	-T-	-----A-C-	-----	-T-	-----	-T-----C-	-----C-----T
ayr :	T-----C-	-----	G-----	-T-	-----A-C-	-----	-T-	-----	-T-----C-	-----C-----T
adyw :	C-----C-	-----T-C-	G-----	-----	-----A-T-	-----A-	-----C-	-----	-T-----C-	-----C-----
ayw S :	T-----C-	-----	G-----	-----	-----A-C-	-----A-	-----C-	-----	-T-----C-	-----C-----
adwr1 :	T-----C-	-----	-G-	-T-	-----A-C-	-----	-T-	-----	-T-----C-	-----C-----T
adwr2 :	T-----C-	-----	GG-----	-T-	-----A-C-	-----	-T-	-----	-T-----C-	-----C-----T
adyr1 :	T-----C-	-----T-	-G-----	-T-	-----A-C-	-----	-C-	-----	-T-----C-	-----C-----
adyr2 :	T-----C-	-----T-	-G-----	-T-	-----A-C-	-----	-C-	-----	-T-----C-	-----C-----
sAg 1 :	T-----G-C-	-----	-G-----	-T-	-----A-C-	-----	-T-	-----	-T-----C-	-----C-----T
sAg 2 :	T-----G-C-	-----	GG-----	-T-	-----A-C-	-----	-T-	-----	-T-----C-	-----C-----T
sAg 3 :	T-----G-C-	-----	GG-----	-T-	-----A-C-	-----	-T-	-----	-T-----C-	-----C-----T
sAg 4 :	T-----G-C-	-----	-G-----	-T-	-----A-C-	-----	-T-	-----	-T-----C-	-----C-----T
sAg 5 :	T-----C-	-----	-G-----	-T-	-----A-C-	-----	-T-	-----	-T-----C-	-----C-----T
sAg 6 :	-----	-----C-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
iw ₂ :	TGTATTCCCA	TCCCATCGTC	CTGGGCTTTT	GCAAAATACC	TATGGGAGTG	GGCCTCAGTC	CGTTTCTCTT	GGCTCAGTTT	ACTAGTGCCA	TTTGTTT _{AGT}
iw :	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3V-1 :	-----	-A-	T-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3V-2 :	-----	-A-	T-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3V-3 :	-----	-A-	T-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
rw-1 :	-----	-A-	-G--T-	-----	-----	-C-	-C-	-----	-----	-----
rw-2 :	-----	-A-	-G--T-	-----	-----	-C-	-C-	-----	-----	-----
lr-1 :	-----	-A-	-G--T-	-----	-----	-----	-C-	-----	-----	-----
lr-2 :	-----	-A-	-G--T-	-----	-----	-----	-C-	-----	-----	-----
lr-m :	-----	-A-	-G--T-	-----	-G-	-----	-C-	-----	-----	-----
lr-k :	-----	-A-	-G--T-	-----	-G-	-----	-C-	-----	-----	-----
r :	-----	-A-	-G--T-	-----	-----	-C-	-----	-----	-----	-----
lyw :	-----	-A-	-G--T-	-----	-----	-C-	-----	-----	-----	-----
rw S :	-----	-A-	-G--T-	-----	-----	-C-	-C-	-----	-----	-----
lwr1 :	-----	-A-	-G--T-	-----	-----	-----	-C-	-----	-----	-----
lwr2 :	-----	-A-	-G--T-	-----	-----	-----	-C-	-----	-----	-----
lyr1 :	-----	-A-	-G--T-	-----	-----	-----	-C-	-----	-C-	-----
lyr2 :	-----	-A-	-T--T-	-----	-----	-----	-C-	-----	-C-	-----
lg 1 :	-----	-A-	-G--T-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
lg 2 :	-----	-A-	-G--T-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
lg 3 :	-----	-A-	-G--T-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
lg 4 :	-----	-A-	-G--T-	-----	-G-	-C-	-C-	A-	-----	-----
lg 5 :	-----	-A-	-C--G-	-G--T-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
lg 6 :	-----	-A-	T-----	-----	-----	-G-	-----	-----	-----	-----

	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
iw ₂ :	GGTTCGTAGG	GCTTTCCCCC	ACTGTTTGGC	TTTCAGCTAT	ATGGATGATG	TGGTATTGGG	GGCCAAGTCT	GTACAGCATC	GTGAGTCCCT	TTATACCGCT
iw :	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3V-1 :	-----	-----	-C-	-T-	-----	-----	-A-	T-	-----	-G-
3V-2 :	-----	-----	-C-	-T-	-----	-T-	-A-	T-	-----	-G-
3V-3 :	-----	-----	-C-	-T-	-----	-T-	-A-	T-	-----	-G-
rw-1 :	-----	-----	-----	-T-	-----	-----	-----	T-	-----	-T-
rw-2 :	-----	-----	-----	-T-	-----	-----	-----	T-	-----	-T-
lr-1 :	-----	-----	-----	-T-	-----	-----	-A-	T-	-----	-T--T-
lr-2 :	-C-	-----	-----	-T-	-----	-----	-A-	T-	-----	-T--T-
lr-m :	-----	-----	-----	-T-	-----	-----	-A-	T-	-----	-T--T-
lr-k :	-----	-----	-----	-T-	-----	-----	-A-	T-	-----	-T--T-
r :	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-A-	T-	-----	-T--T-
lyw :	-----	-T-	-----	-T-	-----	-----	-----	T-	-----	-T-
rw S :	-----	-----	-----	-T-	-----	-----	-----	T-	-----	-T-
lwr1 :	-C-	-----	-----	-T-	-----	-----	-A-	T-	-----	-T--T-
lwr2 :	-----	-----	-----	-T-	-----	-----	-A-	T-	-----	-T--T-
lyr1 :	-----	-----	-----	-T-	-----	-----	-A-	T-	-----	-T--T-
lyr2 :	-----	-----	-----	-T-	-----	-----	-A-	T-	-----	-T-
lg 1 :	-CG-	-----	-----	-T-	-G-	-----	-----	-A-	-A-	-T--T-
lg 2 :	-C-	-----	-----	-T-	-----	-C-	-----	-A--C-	T-	-T--T-
lg 3 :	-G-	-----	-----	-T-	-----	-G-	-----	-A-	T-	-T--T-
lg 4 :	-C-	-----	-----	-T-	-----	-G-	-----	-----	T-	-T-G--T-G
lg 5 :	-CG-	-----	-----	-T-	-----	-C-	-----	-A-	T-	-T--T-
lg 6 :	-----	-----	-----	-T-	-----	-----	-A-	-A-	T-	-----

	S-geen eindig									
	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
iw ₂ :	GTTACCAATT	TTCTTTTGTC	TCTGGGTATA	CATTTAAACC	CTAACAAAAC	AAAAAGATGG	GGTTATTCCC	TAAACTTCAT	GGGCTACATA	ATTGGAAGTT
iw :	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3V-1 :	-----	-----	-T-	-----	-----	-----	-A-	-T-	-A--TG-	-G-
3V-2 :	-----	-----	-T-	-----	-C-	-----	-A-	-T-	-A--TG-	-G--C-
3V-3 :	-----	-----	-T-	-----	-C-G-	-----	-C--C-	-T-	-G--TG-	-----
rw-1 :	-----	-----	-T-	-----	-----	-G-	-C--T-	-T--T-	-T--TG-C	-T-
rw-2 :	-----	-C-	-T-	-----	-----	-----	-C--T-	-C--T-	-TG-C	-T-
lr-1 :	A-	-----	-T-	-T-	-----	C--C-T-	-C--C-	-T-	-A--TG-	-----
lr-2 :	A-	-----	-T-	-G-	-T-	C--C-T-	-C--C-	-T-	-A--TG-	-----
lr-m :	A-	-----	-T-	-G-	-T-	C--C-T-	-C--C-	-T-	-A--TG-	-C-
lr-k :	A-	-----	-T-	-----	-T-	C--C-T-	-C--C-	-T-	-A--TG-	-T-
r :	A-	-----	-T-	-G-	-T-	C--C-T-	-C--C-	-T-	-A--TG-	-----
lyw :	-----	-T--C-	-----	-----	-----	-----	-T-	-T-	-TG-C	-T-
rw S :	-----	-C-	-T-	-----	-----	-G-	-----	-----	-----	-----
lwr1 :	A-	-----	-T-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
lwr2 :	A-	-----	-T-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
lyr1 :	A-	-----	-T-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
lyr2 :	A-	-----	-T-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Ag 1 :	A-	-----	-T-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Ag 2 :	A-	-C--C-	-T-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Ag 3 :	A-	-----	-C-	-T-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Ag 4 :	A-	-----	-C-	-T-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Ag 5 :	A-	-----	-T-	-----	-G-	-----	-----	-----	-----	-----
Ag 6 :	-----	-----	-T-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
adw ₂	: GGGGAAC	TTT GCCACAGGAT	CATATTGTAC	AAAAGATCAA	ACACTGTTTT	AGAAAACTTC	CTGTTAACAG	GCCTATTGAT	TGGAAAGTAT	GTCAAAGAAT
adw	:									
HBV-1	:	---C--A-G	-----	---CT---	--TA--	-----	---A----	-----	-----T-	-----C----
HBV-2	:	---C--A-	-----A	-----A-	-ATG--G-	---G----	---A----	-----	-----	-----C----
HBV-3	:	---G--C--	A--C--A--A	-----GT	TG--A----	---G----	---A----	-----	-----	-----C----
ayw-1	:	AT--GT-C-	-----A--A	-C--CA--	---A--	-G-A--	-----	-----	-----	-----C----
ayw-2	:	AT--GT-A-	-----A--	-C--CA--	-G-A--	-G-A--C-	-----	-----	-----C-	-----C-T--
adr-1	:	---T-----	A--G-----A	-----T-	---AC---	G--A-----	C-----T-G-	---A--T-	C-----	-----
adr-2	:	---T-----	A-----A	-----T	---AC---	G--A-----	C-----G-	---A--T-	A-----	-----
adr-m	:	---T-----	A--G--A--A	-----T-	---A-----	G--A-----	C--G-----G-	---A--T-	A-----C	-----
adr-k	:	---T-----	A--G--A--A	-----T-	---A-----	G--A-----	C-----G-	---A--T-	A-----	-----G--C-
ayr	:	---T-----	A--G-----A	-----	---AC---	G--A-----	C-----T-G-	---A--T-	A-----	-----
adyw	:	---T-A--	-----A--	--C--CA--	-C--A----	-G-A----	-----C-	---C----	A-----	-----G----

	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
adw ₂	: TGTGGGCTCT	TTGGGCTTTG	CTGCTCCATT	TACACAATGT	GGATATCCTG	CCTTAATGCC	TTTGTTATGCA	TGTATACAAG	CTAAACAGGC	TTTCACTTTTC
adw	:									
HBV-1	:	-----G-	---C--T-	---G----	-----	-T-----	---A----	-----	-A-----	---T-----
HBV-2	:	-----G-	-C--C--T-	C--G----	-----	-T-----	---A----	-----	-A-----	---T-----
HBV-3	:	-----A-	-----T-	C-----	-----	-T-----	---A----	-----	-----	---T-----T
ayw-1	:	-----T-	---C--T-	-----	-T-	-G-G----	-----	---T--T-	---G----	-----
ayw-2	:	-----T-	---C--T-	-----	-T-	-T-----	-----	---T--GT	-G--G----	---T-----
adr-1	:	-----	---C--T-	-----C	-C-	---G----	---A----	-----T-	---G----	-----
adr-2	:	-----	---C--T-	-----	-C-	---G----	-----	-----T	---G----	-----
adr-m	:	-----	---C--T-	-----	-C-	-----	---A----	-----T	---G----	-----
adr-k	:	-----	---C--T-	-----	-C-	-----	---A----	-----T	---G----	-----
ayr	:	-----	---C--T-	-----	-C-	---G----	---A----	-----T	---G----	-----
adyw	:	-----C-	---C--T-	C-----	-T-	-T-----	C-----	---T--T-	---G----	-----T

	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
adw ₂	: TCGCCAAC	TT ACAAGGCCTT	TCTAAGTAAA	CAGTACATGA	ACCTTTACCC	CGTTGCTCGG	CAACGGCCTG	GTCTGTGCCA	AGTGTTTGCT	GACGCAACCC
adw	:									
HBV-1	:	-----	---C-----	---T----	C-----	-----	-----	-----	-----	-----
HBV-2	:	-----	---C-----	---TC---	-----	-----	---A----	-----	-----	-----
HBV-3	:	---G-	-T-----	---AC---	-A--TC-	-----	---A----	-----	-----	-----
ayw-1	:	-----	---GT---	-A--C-	-----	---C---	---A----	-----	-----	-----
ayw-2	:	-----	---GT---	-A--C-	-----	---C---	---A----	-----	-----	-----
adr-1	:	---T-----	---GT---	-A--TC-	-----	---C---	---T-A-	---C----	-----	-----
adr-2	:	---T-----	---GT--C-	-A--C-	-----	---C---	---T-A-	---C----	-----	-----
adr-m	:	-----	---GT---	---TC-	-----	---C---	///--AA-G-	C--C----	---A----	-----
adr-k	:	-----	---GT---	-A--TC-	-----	---C---	---T-A-	---C----	-----	-----
ayr	:	-----	---GT---	-A--TC-	-----	---C---	---T-A-	---C----	-----	-----
adyw	:	-----	---GT---	-A--C-	-----	---CGA-	---A----	-----	-----	---T-----

	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
adw ₂	: CCACTGGCTG	GGGCTTGGCC	ATAGGCCATC	AGCGCATGCG	TGGAACCTTT	GTGGCTCCTC	TGCCGATCCA	TACTGCGGAA	CTCCTAGCCG	CTTGTTTTGC
adw	:	-----A--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
HBV-1	:	---T-----	-----	-----	-----	---T-----	-----	-----	-----	-----
HBV-2	:	---T-----	-----	-----	-----	---T-----	-----	-----	-----	-----
HBV-3	:	-----	-----	-----	---G----	---T-----	-----	---T----	-----A-	-----
ayw-1	:	-----T-	--G-----	-----	-----	TC-----	-----	-----	-----	-----
ayw-2	:	-----T-	--G-----	-----	-----	C--G----	-----	-----	-----	-----
adr-1	:	---A-----	-----	G-----	-----	-----	-----	-----	---A----	-----
adr-2	:	---A-----	-----	G-----	-----	---T-----	-----	-----	---A----	-----
adr-m	:	---A-----	-----	G-----	-----	-----	-----	-----	---A----	-----
adr-k	:	---A-----	---T	--C-----A	GC-----	C--/-	-----	-----	---A----	-----
ayr	:	---G--T-	-----	-----G-	-----	-----	-----	-----	---A----	-----
adyw	:	-----T-	--G-----	-----	-----	C-----	-----	-----	-----	-----

	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	<i>X-geen begin</i>		1380	1390	1400
adw ₂	: TCGCAGCCGG	TCTGGAGCAA	AGCTCATCGG	AACTGACAAT	TCTGTCGTCC	TCTCGCGGAA	ATATACATCG	TTTCCATGGC	TGCTAGGCTG	TACTGCCAAC		
adw	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----A	-----	-----	-----		
HBV-1	:	---A-----	-C-----	G--C----	-----A-	---C--C-	G-----	-----	-----	---G----		
HBV-2	:	---G-----	-A-----	G-----	---G----	---C--C-	G-----A	-----	-----	---G----		
HBV-3	:	---A-----	-A--T-	G-----	-----	-T--C--C-	-----	-----	-----	---G----		
ayw-1	:	---A-----	-CA-T-	G---T-C	---T----	-A--C--C-	-----	-----	-----	---G----		
ayw-2	:	---A-----	-CA-TC-	G--G--T-C	---T--T-	---C--C-	-----	-A-----	-----	---G----		
adr-1	:	-----G-	-A--T-	--C--C-	-----T-	---T-----	---C--C--C-	-----	-----G-	---G----		
adr-2	:	---GA-A-	-A--T-	G-----C	---G--T-	---T-----	---C--C--C-	---C-----	---C--G-	---G----		
adr-m	:	---A-----	-A-----	G-----C	---G--T--T-	---T-----	---C--C--A	-C-----	---C--G-	---G----		
adr-k	:	---G-----	-A--T-	C--C--C-	-----T-	---T-----	---C--C--C-	-----	---G-	---G----		
ayr	:	-----G-	-A--T-	--C--C-	---A--T-	---T-----	---C--C--C-	-----	-----	---G----		
adyw	:	---A-----	-CA-TC-	-----C	-----T-	---C--C-	-----	-----	////////	////////	////////	

[illegible]

	<i>P-geen eindig</i>						<i>P-geen beginnig</i>				
	1610	1620	1630	1640	1650		1660	1670	1680	1690	1700
w ₂ :	<u>GCAC</u> CGTTGCA	TGGAGACCAC	CGTGAACGCC	CATCAGATCC	TGCCCAAGGT		CTTACATAAG	AGGACTCTTG	GACTCCCAGC	AATGTCAACG	ACCGACCTTG
w :	-----	-C-----	-----	-----	-----		-----	-----	-----	-----	-----
V-1 :	-----C-----	-----	-----	-C-G-A-----	-----		-G-----	-----	TT-----	-----	-----
V-2 :	-----C-----	-----	-----	-CGG-A-----	-----		-G-----	-----	TT-----	-----	-----
V-3 :	-----C-----	-----	-----	-G-A-----	-----		-G-----	-----	TT-----	-----	-----
w-1 :	-----C-----	-----	-----	-C-A-AT-----	-----		-----	-----	T-----	-----	-----
w-2 :	-----C-----	-----	-A-----	-A-CAT-T-----	-----		-----	-----	T-T-T-----	-----	-----
r-1 :	-----C-----	-----	-----	-C-G-T-----	-----		-----	-----	T-T-----	C-----	-----
r-2 :	-----C-----	-----	-G-----	-C-G-T-----	-C-----		-----	-----	T-----	-----A-----	-----
r-m :	-----C-----	-----	G-----	-G-T-----	-----		-----	-----	T-----	-----	T-----
r-k :	-----C-----	-----	-----	-C-G-T-----	-----		-----	-----	T-----	G-----	-----
r :	-----A-----	-----	-----	-C-G-T-----	-----		-C-----	-----	T-----	-----	-----
yw :	////////	////////	////////	////////	////////		////////	////////	////////	////////	////////

	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800
W ₂ :	AGGCCCTACTT	CAAAGACTGT	GTGTTTAAGG	ACTGGGAGGA	GCTGGGGGAG	GAGATTAGGT	TAAAGGTCCT	TGTATTAGGA	GGCTGTAGGC	ACAAATTGGT
W :	-----	-----	-----	-----	-T-----	-----	--T-A--	-----	-----	-T-----
V-1 :	---A---	-----	-----T-	-G-----	-----	-----	-----	---C---	-----	-T-----
V-2 :	---A---	-----	-----T-	-G-----	-T-----	-G-----	-----	---C---	-----	-T-----
V-3 :	---AC---	-----	-----CT-	-G-----	-T-----	---C---	-----	---C---	-----	-T-----
w-1 :	---A---	---A---	T-----	---A---	-T-----	-----	-----	---C---	-----	-T-----
w-2 :	---A---	-----	T-----	---A---	-T-----	---A---	-----	-----	-----	-T-----
Ir-1 :	---A---	-----	-----A-	-----	-T-----	-----	-----	---C---	-----	-T////////
Ir-2 :	---A---	-----	T-----	---A---	-T-----	-----	-----	---C---	-----	-T-----
Ir-m :	---A---	-----C	T-----	---A---	CT-----	-----	--T-A--	---C---	-----	-T-----
Ir-k :	---A---	-----	T-----	-----	-T-----	-----	-----	---C---	-----	-T-----
r :	---A---	-----	T-----	---A---	-T-----	-----	-----	---C---	-----	-T-----
yw :	////////	////////	////////	////////	-----//	////////	////////	////////	////////	////////

	DR1									
	Pre-C begin					X-geen eindig				
	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900
w ₂ :	CTGCGCACCA	GCACCATGCA	AC TTTTTCAC	CTCTGCTAA	TCATCTCTTG	TACATGTCCC	ACTGTTCAG	CCTCCAAGCT	GTGCCTTGGG	TGGCTTTGGG
lw :	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
IV-1 :	---TT---	-----	-----	-----	---G---	-T-----T	-----	-----	-----	-----
IV-2 :	G---TT---	-----	-----	-----	---A---	-T-----T	-----	-----	-----	-----
IV-3 :	---TT---	-----	-----	-----	---A---	-T-----T	-----	-----	-----	-----
w-1 :	-----	-----	-----	-----	-----	-T-----T	-----	-----	-----	-----
w-2 :	-----	-----	-----	-----	-----	-T-----T	-----	-----	-----	-----
lr-1 :	/////////	/////////-	-----	-----	---A---	-T-----T	-----	-----	-----	-----
lr-2 :	---TT---	-----	-----	-----	---A---	-T-----T	-----	-----	-----	-----
lr-m :	---TT---	-----	-T-----	-----	---A---	-T-----T	-C-----	-----	-----	-----
lr-k :	---TT---	-----	-----	-----	---A---	-T-----T	-----	-----	-----	-----
cr :	---TT---	-----	-----	-C-----	---A---	-T-----T	-----	-----	-----	-----
lvw :	/////////	/////////-	-----	-----	-----	-T-----T	-----	-----	-----	---A---

C-geen begin										
	1910	1920	1930	1940	1950	1960	1970	1980	1990	2000
adw ₁	GCATGGACAT	TGACCCCTAT	AAAGAAATTG	GAGCTACTGT	GGAGTTACTC	TCGTTTTTGC	CTTCTGACTT	CTTTCCTTCC	GTCAGAGATC	TCCTAGACAC
adw	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	--AC-	-----
HBV-1	-----	-----C-	-----	-----	-----	--T-----	-----	-----G-G	--GC-G--C-	-----T--
HBV-2	-----	-----G-	-----	-----T-	-----	--T-----	-----	-----G-G	--GC-----	-----C--
HBV-3	-----	-----G-	-----	-----T-	-----	--T-----	-----	-----T	A-TC-----	-T--C----
ayw-1	-----	C-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----A	--AC-----	-T-----T-
ayw-2	-----	-T-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----A	--AC-----	-T-----T-A
adr-1	-----	-----G-	-----	-----AT-	-----	--T-----	-----	-----G-T	A-TC-----	-----T--
adr-2	-----	-----G-	-----	-----T-	-----	--T-----	-----	-----T	A-TC-----	-----C--
adr-m	-----	-----G-	-----	-----T-	-----	--T-----	-----T-	-----	A-TC-----	-----C--
adr-k	-----	-----G-	-----	-----T-	-----	--T-----	-----	-----	A-TC-----	-----C--
ayr	-----	-----G-	-----	-----T-	-----	--T-----	-----	-----T	A-TC-----	-----C--
adyw	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	--AC-----	-T-----T-
	2010	2020	2030	2040	2050	2060	2070	2080	2090	2100
adw ₁	CGCCTCAGCT	CTGTATCGAG	AAGCCTTAGA	GTCTCCTGAG	CATTGCTCAC	CTCACCATAC	TGCACCTCAGG	CAAGCCATTCC	TCTGCTGGGG	GGAATTGATG
adw	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
HBV-1	--T--T--	-----G-	-----A-	A-----	-----	-----C-	A-----	-----T-	-G-----	-----A--
HBV-2	-----T--	T-----G-	-G-----	-----G-A	-----T-	-----	G-----	-----T-	-G--T-----	T--G--A--
HBV-3	-----T--	-----G-	-G-----	-----G-A	-----T-	-----	G-----	-----T-	-G--T-----	T--G--A--
ayw-1	-----	-----G-	-----	-----	-----T-	-----	-----	-----A	-T-----	-----C-A--
ayw-2	-----	-----G-	-----	-----	-----T-	-----	-----	-----A-A	-G-----	-----C-A--
adr-1	-----T--	-----G-	-G-----	-----G-A	-----T-	-----	A-----	-----T-	-G--T-----	T--G--A--
adr-2	-----T--	-----G-	-G-----	-----G-A	-----T-	-----	A-----	-----T-	-G--T-----	T--G--A--
adr-m	-----T--	-----A-G-	-G-----	-----G-A	-----T-	-----T--	A-----	-----T-	-G--T-----	T--G--A--
adr-k	-----	-A-----G-	-G-----	-----G-A	-----T-T-	-----T--	A-----	-----T-	-G--T-----	T--G--A--
ayr	-----T--	-----G-	-G-----	-----G-A	-----T-	-----	T-----	-----T-	-G--T-----	T--G--A--
adyw	---G----	-----G-	-T-----	-----	-----T-	-----	-----	-----A	-T-----	A-C-A--
	2110	2120	2130	2140	2150	2160	2170	2180	2190	2200
adw ₁	ACTCTAGCTA	CCTGGGTGGG	TAATAATTTG	GAAGATCCAG	CATCTAGGGA	TCTTGTAGTA	AATTATGTTA	ATACTAACGT	GGGTTTAAAG	ATCAGGCAAC
adw	-----	-----	-----	C-----	-----C-A-	---A---C	-----	-----A-	-----	-----
HBV-1	-----	-----	-----	-----	-----CC-	---A---C	-----	-----A-	---CC----	-----
HBV-2	-A-----C-	-----	A-G-----	-----G-	-----C-	AT-A---C	-GC---C-	-CGT--TA-	---CC---A	---A---
HBV-3	-A-----C-	-----	A-G-----	-----C-	-C-CC----	AT-A---C	-G-----C-	-GT--TA-	---CC---G	---A---
ayw-1	-----	-----	-GT-----	-----	-G-----A-	C-A---C	-G-----C-	-C---TA-	---CC----	T-----
ayw-2	-----	-----	-GG-----	-----A	T---C-----	C-A---C	-G-----C-	-C---TA-	---CC---A	T-----
adr-1	-A--G--C-	-----	A-G-----	-----C-	-----C-	AT-A---C	-GC---C-	-GT--TA-	---CC---A	---A---
adr-2	-A-T-G--C-	-----	A-G-----	-----C-	-----C-	AT-A---C	-GC---C-	-GT--TA-	---CC---A	---A---
adr-m	-A--G--C-	-----	A-G-----	-----C-	-----C-	A-A---C	-GC---C-	-GT--TA-	---CC---A	---A---
adr-k	-A--G--C-	-----	A-G-----	-----C-	-----C-	AT-A---C	-GC---C-	-GT--TA-	---CC---A	---A---
ayr	-A--G--C-	-----	A-G-----	-----C-	-----C-	AT-A---C	-GC---C-	-GT--TA-	---CC---A	-T--A---
adyw	-----	-----	-C-----A	-----	-----	C-A---C	-G-----C-	-C---T-	---CC----	T--A--T
	2210	2220	2230	2240	2250	2260	2270	2280	2290	2300
adw ₁	TATTGTGGIT	TCATATATCT	TGCCITACTT	TTGGAAGAGA	GACTGTACTT	GAATATTTGG	TCTCTTTCGG	AGTGTGGATT	CGCACTCCTC	CAGCCTATAG
adw	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
HBV-1	--G-----	--C--T--C	-T-----	-----	A-----T--G	-----	-A-----T-	-----	-----	-T-----C-
HBV-2	-----	--C--T--C	-T-----	-----G-	A-----T--	-----	-G-----T-	-----	-----	-T--A---
HBV-3	-----	--C--T--C	-T-----G-	-----	A-----T--	-----	-G-----T-	-----	-A-----	-A-----
ayw-1	-C-----	--C--T--	-T--C----	-----	A-A--TA-A	-G-----	-G-----	-----	-----	-T-----
ayw-2	-----	--C--T--	-T--C----	-----	A-A--TA-A	-G-----	-G-----	-----	-----	-T-----
adr-1	-----	--C--T--C	-----	-----	A-----TT-G	-G-----	-A-----T-	-----	-----	-C--T--C-
adr-2	-----	--T--C-	-T-----	-----	A-----T--	-G-----	-G-----T-	-----	-----	-C--T--C-
adr-m	-----	--C--T--C	-----	-----	A-----T-G	-G-----	-A-----T-	-----	-----	-C--T--C-
adr-k	--C-----	--C--T--C	-T-----	-----	A-----T--	-G-----	-G-----T-	-----	-----	-T--T--C-
ayr	-----	--C--T--C	-----	-----	A-----C--	-G-----	-G-----T-	-----	-----	-C--T--C-
adyw	-----	--C--T--	-T--C----	-----	A-G--T--A	-G-----	-G-----T-	-----	-----	-----T-
P-geen begin										
	2310	2320	2330	2340	2350	2360	2370	2380	2390	2400
adw ₁	ACCACCAAAAT	GCCCCATATCT	TATCAACACT	TCCGGAAACT	ACTGTTGTTA	GACGACGGGA	CCGAGGCAGG	TCCCCTAGAA	GAAGAACTCC	CTCGCCTCGC
adw	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
HBV-1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
HBV-2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
HBV-3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ayw-1	-----	-----G-	-----	-----G-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ayw-2	-----	-----	-----	-----G-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
adr-1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
adr-2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
adr-m	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
adr-k	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ayr	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
adyw	-----	-----C	-----G-	-----G-	-----	-----	-----	-----	-----	-----

C- geen eindig										
	2410	2420	2430	2440	2450	2460	2470	2480	2490	2500
dw ₂ :	AGACGCAGAT	CTCCATCGCC	GCGTCGCAGA	AGATCTCAAT	CTCGGGAATC	TCAATGTTAG	TATTCCTTGG	ACTCATAAGG	TGGGAAACTT	TACGGGGCCTT
dw :		-A-----							-C-----	
BV-1 :	----A-G-	--A--A-				C-----	--C-----			
BV-2 :	----A-G-	-A-----						-A-----		
BV-3 :	----A-G-	-A-----								
yw-1 :	----A-G-	-A-----							--G-----	--T-----
yw-2 :	----A-G-	-A-----								
dr-1 :	----A-G-	-A-----								
dr-2 :	----A-G-	-A-----								
dr-m :	----A-	-GA-----								
dr-k :	----A-G-	-A-----								
yr :	----A-G-	-A-----								
dyw :	----A-----	--A-----							-----T-	--T-----
	2510	2520	2530	2540	2550	2560	2570	2580	2590	2600
dw ₂ :	TATTCCTCTA	CAGTACCTAT	CTTTAATCCT	GAATGGCAAA	CTCCTTCCTT	TCCTAAGATT	CATTTACAAG	AGGACATTAT	TAATAGGTGT	CAACAATTTG
dw :										
BV-1 :	----T-----	-----G-			-----T-	--AG-C--	-----G-	-----G-	-G--A--	A-G-----
BV-2 :	----T-----	-G----TG		A-----	-----T-	-G-C-----	-----G-G-	-----G-	-G--A--	A-G-----
BV-3 :	----T-----	-G-----G		C-----	-----A-	-G-C-----	-----G-G-	-----C-	-----A-	A-----
yw-1 :	----T-----	-T-----G-		C-T--A--	-A-A-T-	-----T-A	-----CC	-A-----	C-A-AA--	G---G----
yw-2 :	----T-----	-T-----G-	-----C-	C-T--A--	-A-C-T-	-----T-A	-----CC	-A-----	C-A-AA--	G-----
dr-1 :	----T-----	-T-----G-	-----G	-G-----	-----C-	-----C-C-	-----G-		-----A-	-----A-
dr-2 :	----T-----	-T-----G-	-C-----	-G-CC--	-----C-	-----C-	-----G-		-----A-	-----A-
dr-m :	----T-----	-T-----G-		-G-----	-----C-	-----C-C-	-----G-		-----A-	-----A-
dr-k :	----T-----	-T-----G-		-G-----	-----C-	-----C-C-	-----G-		-----A-	-----A-
yr :	----T-----	-T-----G-		-T--A--	-----C-	-----C-C-	-----G-		-----A-	-----A-
dyw :	----T-----	-T-----G-	-----C--	C-T--A--C	-G-C-T-	-----T-A	-----CC	-A-T-----	C-A-AA--	G---G----
	2610	2620	2630	2640	2650	2660	2670	2680	2690	2700
dw ₂ :	TGGGCCCTCT	CACTGTAAAT	GAAAAGAGAA	GATTGAAATT	AATTATGCCT	GCTAGATTCT	ATCCTACCCA	CACTAAATAT	TTGCCCTTAG	ACAAAGGAAT
dw :										
BV-1 :	----A-C-	T-A-----	----C-G-	-C-A-----	--A-----	-----T-	---C-ATGT	T-C-----		-T-----T-
BV-2 :	----G-C-	T-A-----	----C-G-	-C-A-----	-----C	-----G-T-	---C-ATGT	T-----		-T-----G-
BV-3 :	----A-C-	T-A-G-	----A-G-	-C-A-----	G-----	-----G-	---C-ATGT	T-----		-T-----
yw-1 :	-A-----	-A-----	-G-A-----	-----C-	G-----	-C-G-T-	---A-AGGT	T-C-----	--A-A-G-	T-G--T-
yw-2 :	-A-----	-A-----	-G-A-----	-C-C-----	G-----A	---G-T-	---A-ATGT	T-C-----	---A-G-	T-G--T-
dr-1 :		T-G-T-	---A-G-	---A-----		-----G-	---A-T	T-----		-----C-
dr-2 :		T-A-T-	---A-G-	---A-----		-----G-	---A-T	T-C-----	-----G-	-T-----C-
dr-m :		T-A-T-	---A-G-	---A-----		---G-T-	---AA-T	T-C-----	-----G-	-T-----C-
dr-k :		T-A-T-	---A-G-	---A-----		-----G-	---A-T	T-C-----	---A-G-	-----C-
yr :		G-A-T-	---A-G-	---A-----		---G-	---A-T	T-C-----	-----G-	-----C-
dyw :	-A-G-G-	--A-C-	-G-A-----	-G-----	G-C-----	---G-T-	---ATT	T-C-----	-----G-	-T-G--T-
	2710	2720	2730	2740	2750	2760	2770	2780	2790	2800
dw ₂ :	TAAACCTTAT	TATCCAGATC	AGGTAGTTAA	TCATTACTTC	CAAACCAGAC	ATTATTTACA	TACTCTTTGG	AAGGCTGGTA	TTCTATATAA	GCGGGAAACC
dw :										-A-----
BV-1 :	C-----	-----G-	-T-----		---G-T---	-----G-		---G---	-CT-----	AA-A--GT-A
BV-2 :	C-----	-----GT	-T-----		---G-GC---	-----C-		---G-G-	-CT-----	AA-A--GT--
BV-3 :		-----G-	-T-----		---G-G---			---G---	-CT-----	AA-A--G-A
yw-1 :		-----A	-TC-----		---T---	-C-----	C-----	---G---	-AT-----	-A-A---A
yw-2 :		-----AT	-TT-----		---T---		C-----	---G---	-AT-----	-A-A---T
dr-1 :	-----G-	---T-A-	-T-C-----		A---T-G-		---G---	-----C-		-A-A---T
dr-2 :		---T-A-	-T-C-----		A---T-G-		---G---	-----C-		AA-A---T
dr-m :		---T-A-	-T-C-----		A---T-G-		---G---	---G-C-		-A-A---T
dr-k :	-----A-	---T-A-	-T-C-----		A---T-G-		---G---	---G-C-		-A-A---T
yr :	-----G-	---T-AT	-T-C-----		A---T-G-		---G---	-----C-		-A-A---T
dyw :		---A-	-TC-----		---T---	-C-----	C-----	---G--G-	-T-----	-A-A-T-T-A
Pre-S1 begin										
	2810	2820	2830	2840	2850	2860	2870	2880	2890	2900
dw ₂ :	ACACGTAGCG	CATCATTTTG	CGGGTCACCA	TATTCTTGGG	AACAAGAGCT	ACAGCATGGG	AGGTITGGTCA	TCAAAACCTC	GCAAAGGCAT	GGGGACGAAT
dw :										
BV-1 :	----A-----	-C-----	-----T		-----T-		-----T	-C-----	-A-----	-----A-
BV-2 :		-C-----	-----		-----T-		-----T	-C-----	-A-----	-----A-
BV-3 :		-C-----	-----		-----		-----C	-C-----	-AC-----	-----A-
yw-1 :	----A-----	-C-----	T-----		-----T-	-----/	//////////	//////////	////---/	////////---
yw-2 :	----A-----	-C-----	T-----			-----/	//////////	//////////	////---/	////////---
dr-1 :	-----C-	-C-----	T-----				-----T	-C-----	-AC-----	
dr-2 :	-----C-	-T-----	T-----			-G-----	-----T	-C-----	-AC-----	
dr-m :	-----C-	-C-----	T-----				-----T	-C-----	-AC-----	
dr-k :	-----C-T-	-C-----C-	T-----				-----T	-C-----	-AC-----	
yr :	-----C-	-C-----	T-----				-----T	-C-----	-AC-----	
dyw :	----A-----	-C-----	T-----			-----/	//////////	//////////	////---/	////////---

	2910	2920	2930	2940	2950	2960	2970	2980	2990	3000
adw ₂	: CTTTCTGTTC	CCAATCCTCT	GGGATTCTTT	CCCGATCATC	AGTTGGACCC	TGCATTGCGG	GCCAACTCAA	ACAATCCAGA	TTGGGACTTC	AACCCCGTCA
adw	: -----C-	-----C-	-----C-	-----C-	-----C-	-----AA-	-----G	CA-----	-----C-	-----A-
HBV-1	: -----C-	-----C-	-----C-	-----C-	-----C-	-----AA-	-----G	-A-----	-----C-	-----ACA-
HBV-2	: -----C-	-----C-	-----C-	-----C-	-----C-	-----AA-	-----G	-A-----	-----C-	-----GAA-
HBV-3	: -----C-	-----C-	-----C-	-----C-	-----C-	-----AA-	-----CG	-----C-	-----C-	-----ACA-
ayw-1	: -----CACCA	G-----	-----	-----C-C-	-----T-	A--C--A-	--A--A-CG	C-----	-----	--T--AA-
ayw-2	: -----CACCA	G-----	-----	-----C-C-	-----T-	A--C--A-	--A--A-CG	CA-----	-----	--T--AA-
adr-1	: -----	-----	-----	-----C-	-----	--G-----	-----	-----	-----	-----AA-
adr-2	: -----	-----	-----	-----C-	-----	--G-----	-----	-----	-----	-----AA-
adr-m	: -----	-----	-----	-----C-	-----	--G-----	-----	-----	-----	-----AA-
adr-k	: -----	-----	-----	-----C-	-----	--G-----	-----C-	-----C-	-----	-----AA-
ayr	: -----	-----	-----	-----C-	-----	--G-----	-----	-----	-----	-----AA-
adyw	: -----CACCA	G-----	-----	-----C-C-	-----T-	A--C--A-	--A--A-C-	-----	-----	--T--AA-

	3010	3020	3030	3040	3050	3060	3070	3080	3090	3100
adw ₂	: AGGACGACTG	GCCAGCAGCC	AACCAAGTAG	GAGTGGGAGC	ATTGCGGCCA	AGGCTCACCC	CTCCACACGG	CGGTATTTTG	GGGTGGAGCC	CTCAGGCTCA
adw	: -----C-	-----G-	-----G-	-----G-	-----G-	G--AT--	-----C--T-	G--AC-G--	-----	-----
HBV-1	: -----A-	--G-AC--	C--A-G--G-	-----	-----	G--T--	-----C--T-	G--AC-G--	-----	-----
HBV-2	: -----A-	--G-AC--	--A-G--G-	-----	-----	G--T--	-----C--T-	G--AC-G--	-----	-----
HBV-3	: -----A-	--G-AC--	--A-G--G-	-----	-----G	G--AT--	--T--A--C--T-	G--AC-G--	-----	-----A--
ayw-1	: -----AC-	-----AC-	-----A-G--	-----CT-	-----TG	G--TT--	--A--G--	A--CC--	-----	-----
ayw-2	: -----AC-	-----AC-	-----A-G--	-----CT-	-----TG	G--AT--	--A--	A--CC--	-----	-----
adr-1	: -----TC-A-	-----AG--A	--T--G--	-----C-	-----	G--T--	--A--	-----C-	-----	-----
adr-2	: -----TC-	-----AG--A	-TCA-G--	-----C--A	C-----	G--T--	--A--	-----C-	-----	-----
adr-m	: -----TC-T-	-----AG--A	--T--G--	-----C-	-----	G--TA-C-	--A--	-----C-	-----	-----
adr-k	: -----TC-T-	-----AG--A	--T--G--	-----C-	-----	G--T--	--A--	-----C-	-----	-----G-
ayr	: -----TC-	-----AG--A	--T--G--	-----C-	-----T--T-	G--T--	--A--	A--CC--	-----	-----
adyw	: -----AC-	-----AC-	--A-G--	-----CT-	-----T-	G--T--	--A--G--	A--CC--	-----	-----

	3110	3120	3130	3140	3150	3160	3170	3180	3190	3200
adw ₂	: GGGCATATTG	ACCACAGTGT	CAACAATTCC	TCCTCCTGCC	TCCACCAATC	GGCAGTCAGG	AAGGCAGCCT	ACTCCCATCT	CTCCACCTCT	AAGAGACAGT
adw	: -----C-C	--AT-T--C	--G--GC--	-----	-----	-----C-	-----	-----C-A-	-----	--G--C-
HBV-1	: -----C-C	--A--T--C	--G--GC--	-----	-----	-----C-	-----	-----T-A-	C-----	--G--C-
HBV-2	: -----C-C	--A--T--C	-----GC-	-----	-----	-----T--	-----A--	-----C-G-	-----	-----C-
HBV-3	: -----C-C	--A--T--C	-----GC-	-----	-----	-----C-	-----	-----C-G-	-----	-----C-
ayw-1	: -----C-A	CAA--TT--C	--G--A--	G-----	-----	-----C-	-----	-----C-GC-G-	-----T-	G--A--C-
ayw-2	: -----C-A	GAA--GT--C	--G--A--	G-----	--T-----	-----C-	-----	-----C-GC-G-	-----T-	G--A--C-
adr-1	: -----	--A-----C	--G--GCA-	-----	-----	-----	--A--	-----	-----	-----
adr-2	: -----	--A-----C	--G--GCG-	-----TT	-----	-----	--A--	-----	-----	-----
adr-m	: -----	--A--C--C	--G--GCA-	-----	-----	-----	--A--	-----	-----	-----
adr-k	: -----G-	--A--C--C	--GT-GCA-	-----	-----	-----	--A--	-----	-----	-----
ayr	: -----	--A--C--C	--G--GCA-	-----	-----	-----	--A--	-----	-----	-----
adyw	: -----A-	CAA--CT--C	--G--A--	G-----	--T-----	C-----	C-----	--C--GC-G-	-----	G--AC--C-

Pre-S2 begin

	3210	3220
adw ₂	: CATCCTCAGG	CCATGCAGTG G
adw	: -----	-----
HBV-1	: -----	-----
HBV-2	: -----	-----
HBV-3	: -----A-	-----
ayw-1	: -----	-----
ayw-2	: -----	-----
adr-1	: -----	-----
adr-2	: -----	-----
adr-m	: -----	-----
adr-k	: -----	-----
ayr	: -----	-----
adyw	: -----	-----C-

3yalaag 2. Vergelyking van die aminosuurvolgordes van die verskillende HBV-subtypes se pre-S- en S-koderingsgebiede.

Pre-S1 begin									
	10	20	30	40	50	60	70		
adw2:	MGGWSSKPRKGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPFVKDDWPAANQVGVGAFGPRLTPP								
adw :	--//////////	-----L-----		-----T-----	-----I-----	-----H-----	-----G-----		
IBV1:	-----	-----	-----K-----	-----E-----	-----L-----	-----H-----	-----N-----	-----D-----	-----K-----
IBV2:	-----	-----	-----K-----	-----E-----	-----L-----	-----N-----	-----N-----	-----D-----	-----K-----
IBV3:	-----	-----Q-----	-----	-----K-----	-----D-----	-----L-----	-----H-----	-----N-----	-----DS-----
ayw1:	--/////Q/N/LS-S/////	-----	-----R-----	-----TA-----	-----	-----N-----	-----T-----	-----D-----	-----K-----
ayw2:									
ayr :	-----Q-----	-----	-----	-----	-----	-----N-----	-----H-----	-----E-----	-----A-----
adr1:	-----Q-----	-----	-----	-----	-----	-----N-----	-----Q-----	-----E-----	-----A-----
adr2:	-----Q-----	-----	-----	-----	-----	-----N-----	-----H-----	-----E-----	-----IK-----
adrm:	-----Q-----	-----	-----	-----	-----	-----N-----	-----R-----	-----E-----	-----A-----
adrk:	-----Q-----	-----	-----	-----H-----	-----	-----N-----	-----H-----	-----E-----	-----A-----
Pre-S2 begin									
	80	90	100	110	120	130	140		
adw2:	HGGILGWSPQAQGILTTVSTIPPPASTNRQSGRNPTPISPLRDSHPQAMQWNSTAFHQTLQDPRVRGLY								
adw :	-----	-----	-----	-----	-----	-----L-----	-----A-----		
IBV1:	---L-----	---S-PAA---	-----	---L-----	---T-----	---T-----	---A---		
IBV2:	---L-----	---L---PAA---	-----	---L-----	---T-----	---T-----	---G-A---		
IBV3:	---L-----	---P-A---	---L-K---	---L-----	---T-----	---T-----	---A---		
ayw :	---L-----	---Q-LPAN---	-----	---L-----	---NT---	---T-----	-----		
ayw2:									
ayr :	---L-----	---LPAA---	-----	-----	-----	---T---	---A-L---		
adr :	---L-----	---PAA---	-----	-----	-----	---T---	---A-L---		
adr2:	---L-----	---PAA---	---V---	-----	-----	---T---	---A-L---		
adrm:	---L-----	---PAA---	-----	-----	-----	---T---	---V-L---		
adrk:	---L-----	---V---PVA---	-----	-----	-----	---T---	---A-L---		
S-geen begin									
	150	160	170	180	190	200	210		
adw2:	LPAGGSSSGTVNPAPNIASHISSISARTGDPVTNMENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWW								
adw :	-----	-----	-----	-----I-----	-----	-----	-----		
IBV1:	F-----	---S-Q-TV-A---	---LSK---	---P---	---A-L---	-----	---K-----		
IBV2:	F-----	---S-Q-TV-A---	---LSK---	---P---	---A-L---	-----	---K-----		
IBV3:	F-----	---VQ-T-S---	---LST---	---P---	---A-L---	-----	---S-K---	---L---	
ayw :	F-----	---VLTT---PL---	---FS-I---	---AP---	-----	-----	-----		
ayw2:									
ayr :	F-----	---V-TT---P---	---FS---	---AP---	---ST---	-----	-----		
adr1:	F-----	---V-TT---P---	---FS---	---AP---	---T---	-----	-----		
adr2:	F-----	---V-TTV-P---	---FS---	---AP---	---ST---	-----	-----		
adrm:	F-P-----	---V-TT---P---	---S---	---AP---	---ST---	-----	-----		
adrk:	F-----	---V-TT---P---	---S---	---AP---	---T---	-----	-----		

	220	230	240	250	260	270	280	
adw2	:TSLNFLGGSPVCLGQNSQSPTS	NHSP	TSCPPICPGYRWMCLRRFI	IIFL	FILL	LCLIFLLVLLDYQGM	LPV	
adw	:	-----						
HBV1	:	-----T-----	QI-S---	C-----	-----C-----			
HBV2	:	-----T-----	QI-S---	C-----	-----C-----			
HBV3	:	-----ET-----	QI-S---	C-----	-----C-----			
ayw	:	-----TT-----	-----T-----		-----			
ayw2	:	-----TT-----	-----T-----		-----			
ayr	:	-----A-T-P-----	-----T-----		-----			
adr1	:	-----A-T-P-----	-----					
adr2	:	-----A-T-P-----	-----					
adrm	:	-----A-T-P-----	-----					
adrk	:	-----A-T-P-----	-----					
	290	300	310	320	330	340	350	
adw2	:CPLIPGSTTTTSTGPCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNCTCIPSSWAF	AKYLWEWASVRFSWL	SLL					
adw	:	-----L-----		-----				
HBV1	:	-----S-----	-----T-----	M-----	-----			
HBV2	:	-----S-----	-----T-----	-----				
HBV3	:	-----S-----	-----T-----	-----Q-----	-----			
ayw	:	-----S-----	R--M-T--	T--Y-----	S-----	-----G-F-----	A-----	
ayw2	:	-----S-----	R-----	T--Y-----	S-----	-----G-F-----	A-----	
ayr	:	---L--TS-----	R--I--T-----	-----S-----		-----RF-----	-----	
adr	:	---L--TS-----	I--T-----	-----S-----		-----RF-----	-----	
adr2	:	---L--TS-----	I--T-----	-----S-----		-----RF-----	-----	
adrm	:	---L--TS-----	I--T-----	-----S-----		-----RF--G-----	-----	
adrk:	:	---L--TS-----	I--T-----	-----S-----		-----RF--G-----	-----	
	360	370	380	390	400			
adw2	:VPFVQWFVGLSPTVWLSAIWMMWYGPSLYSIVSPFIPLLPIFFCLWVYI							
adw	:	-----						
HBV1	:	-----V-----	-----N-L--M-----	-----				
HBV2	:	-----V--I-F-----	-----N-L--M-----	-----				
HBV3	:	-----V--F-----	-----N-L--M-----	-----				
ayw	:	-----V-----	-----L--L-----	-----				
ayw2	:	-----V-----	-----L--L-----	-----				
ayr	:	-----N-L--L-----		-----				
adr1	:	-----V-----	-----N-L--L-----	-----				
adr2	:	-----A-----	-----V-----	-----N-L--L-----	-----			
adrm	:	-----V-----	-----N-L--L-----	-----				
adrk:	:	-----V-----	-----N-L--L-----	-----				

In beide die bylae word vervangings ten opsigte van adw₂ in die ander volgordes, met die ooreenstemmende nukleotied of aminosuur se simbool aangedui. Indien daar geen vervanging was nie word dit met 'n "-" aangedui en delesies met 'n "/".

AFKORTINGSLYS

μg	: mikrogram
μl	: mikroliter
μM	: mikromolêr
A	: adenien
A	: alanien
aa	: aminosuur
AO	: antisens-oligonukleotied
ATP	: adenientrifosfaat
bp	: basepaar
BSA	: beesserumalbumien
C	: sitosien
C	: sisteïen
cAMP	: sikliese adenienmonofosfaat
CAP	: 5'-gemetileerde terminale nukleotied
CHV	: sjimpansee-Hepatitisvirus
CIP	: kalfderm alkaliese fosfatase
cm^2	: vierkantesentimeter
CNHV	: hond-Hepatitisvirus
D	: aspartiensuur
DEAE	: diëtielamino-etiel
DHV	: eend-Hepatitisvirus
DMEM	: Dulbecco se gemodifiseerde medium
DMT	: dimetoksitritiel
DNA	: deoksieribonukleïensuur
DOPE	: dioleïelfosfatidietanolamien
DOTMA	: N-[1-(2,3-dioleïeloksi)-propiel]-n,n,n-trimetielammoniumchloried
DR	: direkte herhalingsgebied
DTT	: dithiotritol
E	: glutamiensuur
<i>E.coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: etileendiamientetra-asynsuur
ELISA	: ensiemgekoppelde immuunadsorpsieanalise
F	: feniëalanien
g	: gram
G	: glisien
G	: guanien
G418	: genetisien
gDNA	: genomiese DNA
GSHV	: grondeekhoring-Hepatitisvirus
H	: histidien
HAV	: Hepatitis-A-virus
HB	: HEPES-buffer
HBcAg	: Hepatitis-B-virus C-antigeen

HBeAg	: Hepatitis-B-virus E-antigeen
HBS	: HEPES-gebufferde soutoplossing
HBsAg	: Hepatitis-B-virus S-antigeen
HBV	: Hepatitis-B-virus
HBxAg	: Hepatitis-B-virus X-antigeen
HEPES	: N-2-hidroksietielpiperasien-N'-2-etaansulfoonsuur
HHV	: reier-Hepatitisvirus
HIV	: mens-immuniteitsgebreksvirus
HSK	: heptosellulêre karsinoom
HSV	: Herpes simpleksvirus
IFKS	: geïnaktiveerde fetale kalfserum
I	: isoleusien
IgG	: immunoglobulien-G
IV	: Influensavirus
K	: lisien
kb	: kilobase
kDa	: kilodalton
kg	: kilogram
KMR	: kernmagnetieseresonans
L	: leusien
LB	: Luria-Bertini
M	: metionien
M	: molêr
mg	: milligram
MHV	: muis-Hepatitisvirus
ml	: milliliter
mM	: millimolêr
MMTV-LTR	: muisuier-tumorvirus se lang terminale herhalingsgebied
mRNA	: boodskapper-RNA
N	: asparagien
neo	: neomisien
ng	: nanogram
NII	: Natalse Immunologiese Instituut
nm	: nanometer
O.D.	: optiese digtheid
o.p.m.	: omwentelinge per minuut
ORF	: oopleesraam
ori	: oorsprong van replisering
P	: prolief
PBS	: fosfaatgebufferde fisiologiese soutoplossing
PCR	: polimerase ketting reaksie
Pi	: pirimidien
Pu	: purien
Q	: glutamien
R	: arginien
r	: korrelasiekofisiënt

RAPS	: vinnige plasmied isoleringsprotokol
RNA	: ribonukleïensuur
RSV	: Rous sarkoomvirus
S	: serien
SDS	: natriumdodekielsulfaat
snRNP	: klein kernribonukleïenproteïendeeltjie
T	: timien
T	: treonien
t.o.v.	: ten opsigte van
TCA	: trichloorasynsuur
TM	: handelsmerk
T _M	: smelttemperatuur
U	: Urasil
U	: ensiemenheid
UV	: ultraviolet
V	: valien
VSV	: Vaskulêre-stomatitisvirus
W	: triptofaan
Y	: tirosien

LITERATUURVERWYSINGS

Aden, D., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I. en Knowles, B. (1979). *Nature* **282**, 615.

Agrawal, S., Goodchild, J., Civeira, M. P., Thornton, A. T., Sarin, P. M. en Zamecnik, P. C. (1988). *National Academy of Science, Proceedings* **85**, 7079

Agrawal, S., Ikeuchi, T., Sun, D., Sonn, P. S., Konopka, A., Maizel, J. en Zamecnik, P. C. (1989). *National Academy of Science, Proceedings* **86**, 7790.

Alexander, J.J., Bey, E.M., Geddes, E.W. en Lécatsas, G. (1976). *S.A. Medical Journal* **50**, 2124.

Alexander, V., Kabanov, S. V., Vinogradov, A. V., Ovcharenko, A. V., Krivonas, N. S., Melik-Nubarov, V., Usevalod, I. K. en Eugenii, S. S. (1990). *FEBS Letters* **259**, 327.

Aspinal, S. (1987). Hepatitis B virus studies in cell model systems. Ph.D. study, Medical University of Southern Africa.

Asseline, U., Thuong, N. T., Hélène, C. en Seances, C. R. (1983). *National Academy of Science, Proceedings* **297**, 369.

Audet, R. G., Goodchild, J. en Richter, J. D. (1987). *Developmental Biology* **121**, 58.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. Struhl, K. (1990). *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, USA.

Bacon, T. A. en Wickstrom, E. (1991). *Oncogene Research* **6**, 21.

Bancroft, W. H., Mundon, F. K. en Russell, P. K. (1972). *Journal of Immunology* **109**, 842.

Barrett, G., Horiuchi, M., Paul, M., Pratt, R. E., Nakamura, N. en Dzau, V. J. (1992). *National Academy of Science, Proceedings* **89**, 885.

Baserga, R. en Denhardt, D.T. (1992). *Annals of the New York Academy of Sciences* **660**, 1.

- Bayard, B., Leserman, L. D., Bisbal, C. en Leblen, B. (1985). *European Journal of Biochemistry* **151**, 319.
- Beasley, R. P., Hwang, L-Y., Lin, C. C. en Chien, C. S. (1981). *The Lancet* **3**, 1129.
- Benjaro, E.R. en Lichtenstein, C.P. (1992). *Trends in Biotechnology* **10**, 383.
- Bishop, J. M. (1991). *Cell* **64**, 235.
- Black, D. L., Chabot, B. en Steitz, J. A. (1985). *Cell* **42**, 737.
- Blake, K. R., Murakami, A., Spitz, S. A., Glave, S. A., Reddy, M. P., Ts'O, P. O. P. en Miller, P. S. (1985a). *Biochemistry* **24**, 6139.
- Blake, K. R., Murakami, A. en Miller, A. (1985b). *Biochemistry* **24**, 6132.
- Bloch, E., Lavignon, M., Bertrand, J. R., Pognan, F., Morvan, F., Malvy, C., Rayner, B., Imbach, J. L. en Paoletti, C. (1988). *Gene* **72**, 349.
- Blum, H. E., Gerah, W. en Vijas, G. N. (1989). *Trends in Genetics* **5**, 434.
- Boidet-Forget, M., Chassignal, M., Takasugi, M., Thuong, N. T. en Hélène, C. (1988). *Gene* **72**, 361.
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heynecker, H.L. en Boyer, H.W. (1977). *Gene* **2**, 95.
- Bourque, J.E. (1995). *Plant Science* **105**, 125.
- Boutorin, A. S., Vlassov, N. V., Kazakov, S. A., Kutiavin, I. V. en Podyminoin, M. A. (1984). *FEBS Letters* **172**, 43.
- Boutorin, A. S., Guskova, L. V., Ivanova, E. M., Kobetz, N. D., Zagtova, V. F., Ryte, A. S., Yurdenko, L. V. en Vlassov, V. V. (1989). *FEBS Letters* **254**, 129.
- Bovre, K. en Szybalski, W. (1969). *Virology* **38**, 614.
- Bower, M., Summers, M. F., Powell, C., Shinozuka, K., Regan, J. B., Zon, G. en Wilson, W. D. (1987). *Nucleic Acids Research* **15**, 4915.
- Brechot, S.M., Pourcel, D., Hadchouel, M., Dejean, A., Louise, A., Scotto, J. en Tiollais, P. (1982). *Hepatology* **2**, 27S.
- Cao, Y.Z., Chen, Y.Q. en Gu, J.R. (1986). *Proceedings of the meeting on Molecular Biology of Hepatitis B virusses*. Cold Spring Harbor, New York, USA.

- Caruthers, M.H., Barone, A.D., Beaucage, S.L., Dodds, D.R., Fisher, E.F., McBride, L.J., Matteucci, M., Stabinsky, Z. en Tang, J.Y. (1985). *Methods in Enzymology* **154**, 287.
- Cazenave, C., Lorau, N., Toulmé, J. J. en Hélène, C. (1986). *Biochimie* **68**, 1063.
- Cazenave, C., Loreau, N., Thuong, N. T., Toulmé, J. J. en Hélène, C. (1987). *Nucleic Acids Research* **15**, 4717.
- Cazenave, C., Stein, C. A., Loreau, N., Thuong, N. T., Neckers, L. M., Subasinghe, C., Hélène, C. en Toulmé, J. J. (1989). *Nucleic Acids Research* **17**, 4255.
- Chen, C. en Okayama, H. (1988). *BioTechniques* **6**, 632.
- Chen, C. H. B. en Sigman, D. S. (1986). *National Academy of Science, Proceedings* **83**, 7147.
- Chen, C. H. B. en Sigman, D. S. (1988). *Journal of the American Chemical Society* **110**, 6570.
- Chollet, A. en Kawashima, E. (1988). *Nucleic Acids Research* **16**, 305.
- Cohen, J.S. (1991). *Pharmaceutical Therapy* **52**, 211.
- Cohen, J. S. (1992). *Trends in Biotechnology* **10**, 87.
- Coleman, J., Green, P. J. en Inouye, M. (1984). *Cell* **37**, 429.
- Coleman, A. (1989). *Proceedings of the Conference on Antisense RNA and DNA*, St. John's Collage, March 29-30, Cambridge, UK.
- Cooney, M., Czernaszewics, G., Pastil, E. H., Flint, S. J. en Hogan, M. E. (1988). *Science* **241**, 456.
- Corey, D. R., Pei, D. en Schultz, P. G. (1989). *Biochemistry* **28**, 8277.
- Courouc -Pauty, A. M., Plancon, A. en Souli r, J. P. (1983). *Vox Sang* **44**, 197.
- Courouc -Pauty, A. M., Holland, P. V. en Muller, J. Y. (1976). *Bibliography of Hematology* **42**, 158.
- Crooke, S. T. (1992). *Bio/technology* **10**, 882.
- Crooke, S. T. (1991). *Current Opinion in Biotechnology* **2**, 282.

Crum, C., Johnson, J. D., Nelson, A. en Rath, D. (1988). *Nucleic Acids Research* **16**, 4569.

Daaka, Y. en Wickstrom, E. (1990). *Oncogene Research* **5**, 267.

Dane, D. S., Cameron, C. H. en Briggs, M. (1970). *The Lancet* **1**, 695.

Das, P., Nayak, N., Tsiquaye, K. en Zuckerman, A. (1980). *Brittish Journal of Experimental Biology* **61**, 648.

Dejean, A., Sonigo, P., Wain-Holson, S. en Tiollais, P. (1984). *National Academy of Science, Proceedings* **81**, 5350.

Dippold, W.G., Dienes, H.P., Knuth, A., Sachsse, W., Prellwitz, W., Bitter-Suerman, D. en Meyer Zum Buschenfelde, K.H. (1985). *Hepatology* **5**, 1112.

Dreyer, G. B. en Dervan, P. B. (1985). *National Academy of Science, Proceedings* **82**, 968.

Dusheiko, G.M., Conradie, J.D., Brink, B.A., Marimuthu, T. en Sher, R. (1989). *S.A. Medical Journal* **75**, 473.

Ecker, J. R. en Davis, R. D. (1986). *National Academy of Science, Proceedings* **83**, 5372.

Edam, J.C., Gray, P., Valenzuela, P., Rall, L.B. en Rutter, W.J. (1980). *Nature* **286**, 535.

Faktor, O., De-Midiru, T. en Shaul, Y. (1988). *Virology* **162**, 362.

Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringol, G.M. en Danielson, M. (1987). *National Academy of Science, Proceedings* **84**, 7413.

Felsenfeld, G., Davies, D. R. en Rich, A. (1957). *Journal of the American Chemical Society* **79**, 2023.

Francois, J. C., Saison-Behmoaras, T. en Hélène, C. (1988). *Nucleic Acids Research* **16**, 11431.

Francois, J. C., Saison-Behmoaras, T., Thuong, N. T. en Hélène, C. (1989a). *Biochemistry* **28**, 9617.

Francois, J. C., Saison-Behmoaras, T., Barbier, C., Chassignal, M., Thuong, N. T. en Hélène, C. (1989b). *National Academy of Science, Proceedings* **86**, 9702.

Freier, S. M., Kierzek, R., Jaeger, J. A., Sugimoto, N., Caruthers, M. H., Neilson, T. en Turner, D. H. (1986). National Academy of Science, Proceedings **83**, 9373.

Gabizon, A. en Papahadjopoulos, D. (1988). National Academy of Science, Proceedings **85**, 6949.

Gagnor, C., Rayner, B., Léonetti, J. P., Imbach, I. L. en Leblen, B. (1989). Nucleic Acids Research **17**, 5107.

Ganem, D. (1984). Viral Hepatitis and Liver Disease. Grune and Stratton Publishers, Orlando, USA.

Ganem, D. en Varmus, H. E. (1987). Annual Review of Biochemistry **56**, 651.

Gewirtz, A. M. en Calabretta, B. (1988). Science **242**, 1303.

Gold, J. W. M., Shik, J. M. K., Purcell, R. H. en Gerin, J. L. (1976). Journal of Immunology **117**, 1404.

Goodarzi, G., Gross, S.C., Tewari, A. En Watabe, K. (1990). Journal of General Virology **71**, 3021.

Goodchild, J., Agrawal, S. en Civeira, M. P. (1988a). National Academy of Science, Proceedings **85**, 5507.

Goodchild, J., Letsinger, R. L., Sarin, P. S., Zamecnick, M. en Zamecnick, P. C. (1988b). Human retroviruses, Cancer and AIDS: Approaches to prevention and therapy. New York: Alan R. Liss, 423.

Goodchild, J., Agrawal, S., Civeira, M. P., Sarin, P. S., Sun, D. en Zamecnick, P. C. (1988c). National Academy of Science, Proceedings **85**, 5507.

Goodchild, J. (1989). Proceedings of the Conference on Antisense RNA and DNA, St. John's College, March 29-30, Cambridge, UK.

Goodchild, J., Carrol, E., III, and Greenberg, J. R. (1989). Archives of Biochemistry and Biophysics **263**, 401.

Greeff, S. (1993). Klonering en uitdrukking van die mensgene vir granulosiet-makrofaagkolonie-stimuleringsfaktor (GM-CSF) en granulosietkolonie-stimuleringsfaktor (G-CSF).

Green, P. J., Pines, O. en Inouye, M. (1986). Annual Review of Biochemistry **55**, 569.

Griffin, L. C. en Dervan, P. B. (1989). Science **245**, 967.

Gupta, K. C. (1987). *Journal of Biological Chemistry* **262**, 7492.

Hahn, B. H., Shaw, G. M., Taylor, M. E., Redfield, R. R., Markham, P. D., Salahuddin, S. Z., Wong-Staal, F., Gallo, R. C., Parks, E. S. en Parks, W. P. (1986). *Science* **232**, 1548.

Hanvey, J., Shimizu, M. en Wells, R. D. (1990). *Nucleic Acids Research* **18**, 157-161.

Haralambidis, J., Duncan, L., Angus, K. en Tregear, G. W. (1990). *Nucleic Acids Research* **18**, 493.

Harel-Bellan, A., Corral, E., III, and Greenberg, J. R. (1986). *Archives of Biochemistry and Biophysics* **263**, 401.

Harel-Bellan, A., Ferris, D. K., Vinocour, M., Holt, J. T. en Farrar, W. L. (1988). *Journal of Immunology* **140**, 2431.

Harel-Bellan, A., Brini, A., Ferris, D. F., Robin, P. en Farrow, W. L. (1989). *Nucleic Acids Research* **17**, 4077.

Häuptle, M. T., Frank, R. en Dobberstein, B. (1986). *Nucleic Acids Research* **14**, 1427.

He, L., Isselbacher, K., Wands, J., Goodman, H., Shih, C. en Quaroni, A. (1984). *In Vitro* **29**, 493.

Heikkila, R., Schwab, G., Wickstrom, E., Loong Loke, S., Pliznik, D. H., Watt, R. en Neckers, L. M. (1987). *Nature* **328**, 445.

Hélène, C. en Lancelot, G. (1982). *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **39**, 1.

Hélène, C., Montenay-Garestier, T., Saison, T., Tukasugi, M., Toulmé, J. J., Lancelot, G., Maurizot, J. C., Toulmé, F. en Thuong, N. T. (1985). *Biochimie* **67**, 777.

Hélène, C., Thuong, N. T., Saison-Bekmoaras, T. en François, J. C. (1989a). *Trends in Biotechnology* **7**, 310.

Hélène, C., Le Doan, T. en Thuong, N. T. (1989b). *Photochemical Probes in Biochemistry* (Nielsen, P.E. ed.) p. 219.

Hélène, C. en Toulmé, J. J. (1990). *Biochemica et Biophysica Acta* **1049**, 99.

- Heywood, S. M., Kennedy, D. S. en Bester, A. J. (1974). National Academy of Science, Proceedings **71**, 2428.
- Hill, C. (1993). Food Science and Technology **4**, 12.
- Ho, R. J. Y., Roux, B. T. en Huang, L. (1987). Journal of Biological Chemistry **262**, 13973.
- Hofgen, R., Streber, W.R. en Pohlenz, H.D. (1995). Pesticide Sciences **34**, 175.
- Holland, J., Spindler, K., Horodyski, F., Graban, E., Nichol, S. en Vanderpol, S. (1982). Science **215**, 1577.
- Holt, J.T., Redner, R.L. en Nienhus, A.W. (1988). Molecular Cell Biology **8**, 963.
- Horvath, S.J., Firca, J.R., Hunkapiller, T., Hunkapiller, M.W. en Hood, L. (1985). Methods in Enzymology **154**, 314.
- Huh, N. en Utakoji, T. (1981). Gannette **72**, 178.
- Inouye, H., Imura, A. en Ohtsuka, E. (1984). Nucleic Acids Research **12**, 7435.
- Inouye, H., Hayase, Y., Imura, A., Iwai, S., Miura, K. en Ohtsuka, E. (1987). Nucleic Acids Research **15**, 6131.
- Inouye, M. (1988). Gene **72**, 25.
- Jaskulski, D., de Riel, J. K., Mercer, W. E., Calabretta, B. en Baserga, R. (1988). Science **240**, 1544.
- Jayaraman, K., McParland, K., Miller, P. en Ts'O, P. O. P. (1981). National Academy of Science, Proceedings **78**, 1537.
- Kariko, K., Li, S. W., Sobol, R. W., Jr., Sukadolnik, R. J., Charubala, R. en Pfeiderer, W. (1987). Biochemistry **26**, 7136.
- Khochbin, S. en Lawrence, J. J. (1989). EMBO Journal **8**, 4107.
- Kimelman, D. en Kirchner, M. W. (1989). Cell **59**, 687.
- Kimura, M. (1982). The Neutral Theory of Molecular Evolution. Cambridge University Press, London, UK.
- Knorre, D. G. en Vlassov, V. V. (1985). Progress in Nucleic Acids Research and Molecular Biology **32**, 291.

Kodama, K., Ogasawara, N., Yoshikawa, H. en Murakami, S. (1985). *Journal of Virology* **56**, 978.

Koike, K., Kobayashi, M., Mizusawa, H., Yoshida, E., Yaginuma, K. en Taira, M. (1983). *Nucleic Acids Research* **11**, 5391.

Koshy, R., Maupas, P., Muller, R. en Hofschneider, P. (1981). *Journal of General Virology* **57**, 95.

Koshy, R., Koch, S., Von Loringhoven, A., Kahmann, R., Murry, K. en Hofschneider, P.H. (1983). *Cell* **34**, 215.

Krainer, A. R. en Maniatis, T. (1985). *Cell* **42**, 725.

Krämer, A., Kelbr, W., Appel, B. en Lührmann, R. (1984). *Cell* **38**, 299.

Krinke, L. en Wulff, D.L. (1987). *Genetical Development* **1**, 1005.

Lancelot, G., Asseline, A., Thuong, N. T. en Hélène, C. (1985). *Biochemistry* **24**, 2521.

Lawson, T. G., Ray, B. R., Dodds, J. T., Grifo, J. A., Abramson, R. D., Merrich, W. C., Betsch, D. F., Weith, H. L. en Tach, R. E. (1986). *Journal of Biological Chemistry* **261**, 13979.

Le Bouvier, G. L. (1971). *Journal of Infectious Diseases* **123**, 671.

Le Bouvier, G. L., Mccollum, R. W., Hierholzer, W. J., Irwin, G. R., Krugman, S. en Giles, J. P. (1972). *Journal of the American Medical Association* **222**, 928.

Le Doan, T., Perroualt, L., Hélène, C., Chassignal, M. en Thuong, N. T. (1986). *Biochemistry* **25**, 6736.

Le Doan, T., Perroualt, L., Chassignal, M., Thuong, N. T. en Hélène, C. (1987a). *Nucleic Acids Research* **15**, 8643.

Le Doan, T., Perroualt, L., Praseuth, D., Habhoubt, N., Decout, J., Thuong, N. T., Lhomme, J. en Hélène, C. (1987b). *Nucleic Acids Research* **19**, 7749.

Lee, J.D. en Lee, T.D. (1982) *Statistics and Numerical Methods in BASIC for Biologists*. Van Nostrand Reinhold Company, New York, USA.

Lee, F., Mulligan, R., Burg, P. en Ringold, G. (1981). *Nature* **294**, 228.

Lee, B. L., Blake, K. R. en Miller, P. S. (1988). *Nucleic Acids Research* **16**, 10681.

Lemaitre, M., Bayard, B. en Lebleu, B. (1987). National Academy of Science, Proceedings **84**, 648.

Leonetti, J. P., Rayner, B., Lemaitre, M., Gagnor, C., Milhaud, P. G., Imbach, J. L. en Lebleu, B. (1988). Gene **72**, 323.

Letai, A. G., Palladino, M. A., Fromm, E., Rizzo, V. en Fresco, J. R. (1988). Biochemistry **27**, 9108.

Letsinger, R. L., Groody, E. P. en Tanaka, T. (1982). Journal of the American Chemical Society **104**, 6805.

Letsinger, R. L., Singman, C. N., Histan, G. en Salunkhe, M. (1988). Journal of the American Chemical Society **110**, 4470.

Letsinger, R. L., Zhong, G., Sun, D., Ikenchi, T. en Sarin, P. S. (1989). National Academy of Science, Proceedings **86**, 6553.

Liebhaber, S. A., Cash, F. E. en Shakin, S. H. (1984). Journal of Biological Chemistry **259**, 15597.

Light, J. en Molin, S. (1983). EMBO Journal **2**, 93.

Lin, J.H., Tong, M. en Stevenson, D. (1984). Viral Hepatitis and Liver Disease. Grune and Stratton Publishers, Orlando, USA.

Liu, C.C., Yansura, D. en Levinson, A.D. (1981), DNA **1**, 213.

Loke, S. L., Stein, C. A., Zhang, X. H., Mori, K., Nakaniski, M., Subasinghe, C., Cohen, J. S. en Neckens, L. M. (1989). National Academy of Science, Proceedings **86**, 3474.

Lyamichev, V. I., Mirkin, S. M., Frank-Kameretski, M. D. en Cantor, C. R. (1988). Nucleic Acids Research **16**, 2165.

Maher, L. J., III, Wodd, B. en Dervan, P. B. (1989). Science **245**, 729.

Majumdar, C., Stein, C. A., Cohen, J. S., Broder, S. en Wilson, S. H. (1989). Biochemistry **28**, 1340.

Mandart, E., Kay, A. en Galibert, F. (1984). Journal of Virology **49**, 782.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. en Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning - A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

Marcus-Sekura, C. J. (1988). Analytical Biochemistry **172**, 289.

Marion, P. C., Salazar, F. H., Alexander, J. J. en Robinson, W. S. (1980a). *Journal of Virology* **33**, 795.

Marion, P. L., Oshira, L. S., Regnery, D. C., Scullard, G. H. en Robinson, W. S. (1980b). *National Academy of Science, Proceedings* **77**, 2941.

Mason, W. S., Seal, G. en Summers, J. (1980). *Journal of Virology* **36**, 829.

Mason, W. S., Aldrich, C., Summers, J. en Taylor, J. M. (1982). *National Academy of Science, Proceedings* **79**, 3997.

Matsukura, M., Shinokuza, K., Zon, G., Mitsuya, H., Reitz, M., Cohen, J. S. en Broder, S. (1987). *National Academy of Science, Proceedings* **84**, 7706.

McGarry, T. J. en Lindquist, S. (1986). *National Academy of Science, Proceedings* **83**, 399.

Miller, P. S. en Ts'O, P. O. P. (1987). *Anti Cancer Drug Design* **2**, 117.

Minshull, J. en Hunt, T. (1986). *Nucleic Acids Research* **14**, 6433.

Miroshnichenko, N. A., Karpova, O. V., Rodionova, S. Y. en Atsbekov, J. G. (1988). *FEBS Letters* **234**, 65.

Moeroey, T. (1986). *Nature* **324**, 276.

Möhr, I. (1989). Haplotipe-analise van die fenielhidroksilase-lokus in families met fenielketonurie. M.Sc.-verhandeling, P.U. vir C.H.O.

Mol, J.N.M., Van Blokland, R., De Lange, P., Stam, M. en Kooter, J.M. (1994). *Post-Transcriptional Inhibition of Gene Expression*.

Morch, M. D., Joshi, R. L. en Haenni, A. L. (1987). *Nucleic Acids Research* **15**, 4123.

Morvan, F., Rayner, B., Imbach, J. L., Chang, D. I. L. en Lown, J. W. (1986). *Nucleic Acids Research* **14**, 5019.

Morvan, F., Rayner, B., Imbach, J. L., Chang, D. K. en Lown, J. W. (1987). *Nucleic Acids Research* **15**, 4241.

Mosteller, F. en Tukey, J.W. (1977). *Data Analysis and Regression*. Addison-Wesley Publishing Company, Philippines.

Munroe, S. H. (1988). *EMBO J.* **7**, 2523.

- Murakuri, A., Blake, K. R. en Miller, P. S. (1985). *Biochemistry* **24**, 4041.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T. en Sato, J. (1982). *Cancer Research* **42**, 3858.
- Okamoto, K. en Freundlich, M. (1986). *National Academy of Science, Proceedings* **83**, 5000.
- Okamoto, H., Imai, M., Shimosaki, M., Hoshi, Y., Iizuka, H., Tsuda, F., Miyakawa, Y. en Mayumi, M. (1986). *Journal of General Virology* **67**, 2305.
- Okamoto, H., Imai, M., Kametani, M., Nakamura, T. en Mayumi, M. (1987). *Japanese Journal of Experimental Medicine* **57**, 231.
- Okamoto, H., Tsuda, F., Sakugawa, H., Sastrosoewignjo, R. I., Imai, M., Miyakawa, Y. en Mayumi, M. (1988). *Journal of General Virology* **69**, 2575.
- Pan, Z. Q. en Prives, C. (1988). *Science* **241**, 1328.
- Pan, Z. Q., Fu, X. Y., Manley, J. L. en Prives, C. (1989). *Nucleic Acids Research* **17**, 6553.
- Parker, R.E. (1979). *Introductory Statistics for Biology*. Edward Arnold Publishers, London, UK.
- Patterson, C. (1980). *Biologist* **27**, 234.
- Paterson, B. M., Robert, B. E. en Kuff, E. L. (1977). *National Academy of Science, Proceedings* **74**, 4370.
- Perroualt, L., Asseline, U., Rivalle, C., Thuong, N. T., Bisagni, E., Giovanangeli, C., Le Doan, T. en Hélène, C. (1990). *Nature* **344**, 358.
- Piette, J., Calberg-Bacq, C. M. en van de Vorst, A. (1977). *Photochemistry and Photobiology* **26**, 377.
- Povsic, T. J. en Dervan, P. B. (1989). *The Journal of the American Chemical Society* **111**, 3059.
- Praseuth, D., Perroualt, L., le Doan, T., Classignal, M., Thuong, N. T. en Hélène, C. (1988). *National Academy of Science, Proceedings* **85**, 1349.
- Prozesky, O., Brits, C. en Grabow, W. (1973). In *Liver*. S. Saunders; J. Terblance (eds.). London: Pitman medical books, p 358.
- Quartin, R. S. en Wetmur, J. G. (1989). *Biochemistry* **28**, 1040.

- Roossinch, M. J., Jameel, S., Loukin, S. H. en Siddiqui, A. (1986). *Molecular and Cellular Biology* **6**, 1393.
- Rajagopal, P. en Feigon, J. (1989). *Nature* **339**, 637.
- Saenger. (1984). *Principals of nucleic acid structure*. New York: Springer-Verlag.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. en Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Sanger, F., Nicklen, S. en Coulson, A. (1977). *National Academy of Science, Proceedings* **74**, 5463.
- Sarin, P. S., Agarwal, S., Civeira, M. P., Goodchild, J., Ikeuchi, T. en Zamecnik, P. C. (1988). *National Academy of Science, Proceedings* **85**, 7448.
- Scheffler, W.C. (1980). *Statistics for the Biological Sciences*. Addison-Wesley Publishing Company, Philippines.
- Schell, P. L. (1971). *Biochimica et Biophysica Acta* **240**, 472.
- Schell, P. L. (1974). *Biochimica et Biophysica Acta* **340**, 323.
- Schleif, R. (1988). *Science* **241**, 1182.
- Schoub, B.D. (1992). *S.A. Medical Journal* **81**, 63.
- Seeger, C., Ganem, D. en Varmus, H. E. (1987). *Science* **232**, 477.
- Seeger, C., Ganem, D. en Varmus, H.E. (1984). *Journal of Virology* **51**, 367.
- Shakin, S. H. en Liebhaber, S. A. (1986). *Journal of Biological Chemistry* **261**, 16018.
- Sherlock, S. (1990). *Vaccine* **8**, 56.
- Shih, J. W. K., Tan, P. L. en Gevin, J. L. (1978). *Journal of Immunology* **120**, 520.
- Shinagawa, M., Ishiyama, T., Kamada, M. en Sato, G. (1983). *Virology* **125**, 491.
- Shouval, D., Tur-Kaspa, R., Schuger, L., Livri, N. en Keshet, E. (1984). *AS.LD Abstracts*.
- Siddiqui, A., Sattler, F. en Robinson, W. S. (1979). *National Academy of Science, Proceedings* **76**, 4664.

- Simons, R. W. en Kleckner, N. (1983). *Cell* **34**, 683.
- Smith, C., Aurelian, L., Reddy, M. P., Miller, P. S. en Ts'O, P. O. P. (1986). *National Academy of Science, Proceedings* **83**, 2787.
- Smith, C. J. S., Watson, C. F., Ray, J., Bird, C. R., Morris, P. C., Schuch, W. en Grierson, D. (1988). *Nature* **334**, 216.
- Southern, E. (1975). *Journal of Molecular Biology* **98**, 503.
- Spaan, W., Delius, H., Skinner, M., Armstrong, J., Rottier, P., Smeekens, S., Van der Zeijst, B.A. en Siddell, S. (1983). *EMBO Journal* **2**, 1839.
- Sprengel, R., Kaleta, E. F. en Will, H. (1988). *Journal of Virology* **62**, 3832.
- Stein, C.A. en Cheng, Y.C. (1993). *Science* **261**, 1004.
- Stein, C. A., Mori, K., Loke, S. L., Subasinghe, C., Shinozuka, K., Cohen, J. S. en Neckers, L. M. (1988). *Gene* **72**, 333.
- Stephenson, M. L. en Zanecrik, P. C. (1978). *National Academy of Science, Proceedings* **72**, 4579.
- Sumikawa, K. en Miledi, R. (1988). *National Academy of Science, Proceedings* **85**, 1302.
- Summers, J., O'Connell, A. en Millman, I. (1975). *National Academy of Science, Proceedings* **72**, 4579.
- Summers, J., Smolec, J. M. en Snyder, R. (1978). *National Academy of Science, Proceedings* **75**, 4533.
- Summers, J. (1981). *Hepatology* **1**, 179.
- Summerton, J. en Bartlett, P. A. (1978). *Journal of Molecular Biology* **122**, 145.
- Sun, J. S., Francois, J. C., Montenay-Garestier, T., Saisan-Behmooras, T., Roig, V., Thuong, N. T. en Hélène, C. (1989). *National Academy of Science, Proceedings* **86**, 9198.
- Thomas, and Novick. (1984).
- Tidd, D. M., Howley, P., Warenius, H. M. en Gibson, I. (1988). *Anti-Cancer Drug Design* **3**, 117.
- Tiollais, P., Pourcel, C. en Dejean, A. (1985). *Nature* **317**, 489.

- Tiollais, P. en Buendia, M. A. (1991). *Scientific American* **264**, 48.
- Toulmé, J. J., Krisch, H. M., Loreau, N., Thuong, N. T. en Hélène, C. (1986). *National Academy of Science, Proceedings* **83**, 1227.
- Tur-Kaspa, R., Burk, R. A., Shaul, T. en Shafritz, D. A. (1986). *National Academy of Science, Proceedings* **83**, 1627.
- Twist, E., Clark, H., Aden, D., Knowles, B. en Plotkin, S. (1981). *Journal of Virology* **37**, 239.
- Uhlmann, E. en Peyman, A. (1990). *Chemical Reviews* **90**, 543.
- Urdea, M. S. en Horn, T. (1986). *Tetrahedron Letters* **27**, 2933.
- Valenzuela, P., Gray, P., Quiroga, M., Zaldivar, J., Goodman, H. M. en Rutter, W. J. (1979). *Nature* **280**, 815.
- Van den Ende, W. en Van Laere, A. (1995). *Physiologia Plantarum* **93**, 241.
- Vergeer, W.P. (1988). Transfeksie van soogdiersellyne vir die bestudering van transkripsionele reguleringsvolgordes in die mensgeen vir Pro- α 1(I)-kollageen. M.Sc.-verhandeling, P.U. vir C.H.O.
- Verspiieren, P., Cornelissen, A. W. C. A., Thuong, N. T., Hélène, C. en Toulmé, J. J. (1987). *Gene* **61**, 307.
- Vlassov, V. V., Zarytova, V. F., Kutiavin, I. V., Mamaev, S. V. en Podyminogin, M. A. (1978). *Journal of Molecular Biology* **122**, 4065.
- Vlassov, V. V., Gaidamakov, S. A., Zarytova, S. A., Knorre, D. G., Levina, A. S., Nikonova, A. A., Podust, L. M. en Fedorova, O. S. (1988). *Gene* **72**, 313.
- Walder, R. Y. en Walder, J. A. (1988). *National Academy of Science, Proceedings* **85**, 5011.
- Wallace, R. B., Shaffer, J., Murphy, R. F., Bonner, J. en Itakura, K. (1979). *Nucleic Acids Research* **6**, 3543.
- Watanabe, T., Morizane, T., Tsuchimoto, K., Inagaki, Y., Munakata, Y., Nakamura, T., Kumagai, N. en Tsuchiya, M. (1983). *International Journal of Cancer* **32**, 141.
- Watson, J. D. en Crick, F. H. C. (1953). *Nature* **171**, 737.
- Weintraub, H.M. (1990). *Scientific American* **263**, 34.

Werner, B. G., Smalec, J. M., Snyder, R. en Summers, J. (1980). *Journal of Virology* **32**, 314.

Whitt, M., Buenocore, L. en Rose, J.K. (1991). *Liposome-mediated Transfection*. In *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, USA.

Wickstrom, E. L., Bacon, T. A., Gonzales, A., Freeman, D. L., Lyman, G. H. en Wickstrom, E. (1988). *National Academy of Science, Proceedings* **85**, 1028.

Wickstrom, E. (1992). *Trends in Biotechnology* **10**, 287.

Wickstrom, E. (1986). *Journal of Biochemistry and Biophysical Methods* **13**, 97.

Will, H., Reiser, W., Weimer, T., Pfaff, E., Büscher, M., Sprengel, R., Cattaneo, R. en Schaller, H. (1987). *Journal of Virology* **61**, 904.

Winkler, M. E., Mullis, K., Barrett, J., Stroynowski, I. en Yanofsky, C. (1982). *National Academy of Science, Proceedings* **79**, 2181.

Woolf, T. M., Jennings, C. G. B., Rebagliati, M. en Melton, D. A. (1990). *Nucleic Acids Research* **18**, 1763.

Yaginuma, K., Kobayashi, M., Yoshida, E., en Koike, K. (1985). *National Academy of Science, Proceedings* **82**, 4458.

Yakubov, L.E., Deeva, E.A., Zarytova, V.F., Ivanova, E.M., Ryte, A.S., Yurchenko, L.V. en Vlassov, V.V. (1989). *National Academy of Science, Proceedings* **86**, 6454.

Zamecnik, P. C. en Stephenson, M. L. (1978). *National Academy of Science, Proceedings* **75**, 280.

Zamecnik, P. C., Goodchild, J., Taguchi, Y. en Sarin, P. S. (1986). *National Academy of Science, Proceedings* **83**, 4143.

Zerial, A., Thuong, N. T. en Hélène, C. (1987). *Nucleic Acids Research* **15**, 9909.

Zubay, G. (1983). *Biochemistry. USA: The Benjamin/ Cummings Publishing Company Inc.*, p 762.

Zuckermann, R. N., Corey, D. R. en Schultz, P. G. (1988). *Journal of the American Chemical Society* **110**, 1614.

Zuckermann, R. N. en Schultz, P. G. (1989). *National Academy of Science, Proceedings* **86**, 1766.

BEDANKINGS

Sonder die insette en ondersteuning van die volgende mense en instansies sou hierdie studie nie moontlik gewees het nie en daarom wil ek my opregte dank teenoor hulle uitspreek:

- Prof. Piet Pretorius vir sy volgehoue leiding, hulp en ondersteuning.
- Sarita Groenewald vir haar liefde, dreigemente, ondersteuning en hulp wat ver meer as net hierdie studie aanbetref.
- Prof. W.J. de Wet, Dr. A. van Aswegen, Dr. L. Tiedt, Dr. S. Aspinal en Dr. E. van Rensburg vir hulle hulp in verskeie fasette van die studie.
- Mev. W. Pretorius vir haar hulp met die elektronmikroskopie en haar ondersteuning.
- My gewese kollegas in die Departement Biochemie by die PUK vir hulle hulp en belangstelling.
- Mnr. H. Prins vir die taalkundige versorging van die verhandeling.
- Prof. F. Botha vir sy ondersteuning tydens die afhandeling van die verhandeling.
- My ouers en familie vir hulle tonne liefde, ondersteuning en aanmoediging.
- Die A.E.K. en die S.N.O. vir hul finansiële steun.
- Al my vriende wat my help dra het aan hierdie las.