

**DIE INHIBISIE VAN DIE HEPATITIS B-  
VIRUS OPPERVLAKANTIGEEN DEUR VAN  
ANTISIN TEGNOLOGIË GEBRUIK TE  
MAAK.**

deur

**Thomas Sephton Klerck**

**Skripsie voorgelê ter gedeeltelike voldoening aan die vereistes vir die graad  
Magister Scientiae in Biochemie met spesialisering in Biotegnologie in die  
Fakulteit Natuurwetenskappe aan die Potchefstroomse Universiteit vir  
Christelike Hoër Onderwys.**

**Studieleier: Prof. P.J. Pretorius**

**Medeleier: Dr. W.N. de Vries**

**Potchefstroom  
Mei 1997**

Aan my moeder, Mary Klerck, dankie vir al die inspirasie.

## INHOUDSOPGAWE

<b>Abstract</b>	1
<b>Opsomming</b>	3
<b>Hoofstuk 1: Inleiding</b>	5
<b>Hoofstuk 2: Literatuuroorsig</b>	7
2.1 Inleiding	7
2.2 Hepatitis B-virusinfeksie	7
2.3 Hepatitis B-virus	10
2.3.1 Die virusstruktuur	10
2.3.2 Die HBV-genoom	11
2.4 Die invloed van HBV-infeksies op vorming van HCC	14
2.5 Antisin oligonukleotiede	16
2.6 Sellyn en transfeksie	18
2.6.1 Lipofektiengemedieerde transfeksie	19
2.7 Doelstelling en benaderingswyse	20
<b>Hoofstuk 3: 'n Onderzoek na die gebruik van Antisin Oligonukleotiede vir die inhibisie van die hepatitis B virus S-oppervlakantigeen(HBsAg)</b>	22
3.1 Inleiding	22
3.2 Eksperimenteel	22
3.2.1 Kweking van selle	22
3.2.2 Liposoom-gemedieerde transfeksie	23
3.2.3 Analises	25
3.3 Resultate	29
3.4 Samevatting	33
<b>Hoofstuk 4: 'n Onderzoek na die gebruik van Antisin Uitdrukkingsvektor vir die inhibisie van die S-antigeen uitdrukking</b>	34
4.1 Inleiding	34
4.2 Die uitdrukkingsvektor	34
4.3 Eksperimenteel	36
4.3.1 Klonering van die S-geen	36
4.3.2 Transfeksie en seleksie van klone	39
4.4 Resultate	41
4.4.1 Konstruksie van die antisin RNA-produseerende uitdrukkingsvektor	41

4.4.2	Transfeksie van die PLC/PRF/5-sellyn met die antisin RNA produserende uitdrukingsvektor	42
4.5	Samevatting	46
<b>Hoofstuk 5: Bespreking</b>		<b>47</b>
5.1	Inleiding	47
5.2	Gebruik van antsin oligonukleotiede	47
5.3	Gebruik van antisin plasmied	50
5.4	Samevatting	53
<b>Bylae 1: Onverwerkte Resultate</b>		<b>55</b>
<b>Bylae 2: Plasmied en S-geen geenvolgordes</b>		<b>57</b>
<b>Afkortingslys</b>		<b>69</b>
<b>Literatuurverwysings</b>		<b>71</b>
<b>Bedankings</b>		<b>80</b>

## Abstract

The Hepadna virus family is a major annual cause of suffering and loss of life. The Hepatitis B virus is one of the most important causes of this phenomenon, since it is endemic in large parts of the world. This virus was only discovered late in the twentieth century, and its clinical impact was only discovered much later. Infection with the Hepatitis B virus is the cause of liver cirrhosis and recurring infections can lead to the formation of hepato cellular carcinoma. These reasons were the motivation for this study. Firstly the ability of an antisense oligonucleotide to inhibit the production of the major surface antigen (HBsAg) was investigated. This protein is viewed as one of the causes of liver cirrhosis and hepato cellular carcinoma. A 15 mer antisense oligonucleotide, complimentary to the initiation region of the viral S gene DNA, was used. The antisense oligonucleotide was transferred into a hepato cellular carcinomic cell line in different concentrations by means of an appropriate transfection technique. The expression of the S gene was inhibited to over 30% over a time span of five days by treating the cells with 20 $\mu$ M of the antisense oligonucleotide. The inhibition of this S-gene protein could however, not be achieved for time spans longer than five days. It was therefore decided to construct an expression vector to transfect the same cell line, in order to obtain inhibition of a more permanent nature. An appropriate expression vector was manipulated by using biotechnological techniques, in such a way that the Hepatitis B virus S gene was incorporated into the antisense orientation. The expression vector was transferred into the hepato cellular carcinomic cell line by using the same techniques as for the oligonucleotides. The levels of the S gene expression of the cell line was measured 49 days after transfection and levels of inhibition as high as 50,6% were obtained.

Parts of this study were presented at the following national scientific meetings:

M. BOTHA, T.S. KLERCK & W.J. DE WET (1995), Therapeutic use of antisense oligo(dN)s for the inhibition of the Hepatitis B virus surface antigen (HBsAg). (Paper delivered at the Thirteenth Congress of the South African Biochemical Society, University of the Orange Free State, Bloemfontein, South Africa).

M. BOTHA, T.S. KLERCK & W.J. DE WET (1994), Therapeutic use of antisense technology for the inhibition of the Hepatitis B virus surface antigen (HBsAg). (Paper delivered at the Eighth Biennial Congress of the South African Society for Microbiology Rhodes University, Grahamstown, South Africa).

R. PFAHL, M. BOTHA, T.S. KLERCK & W.J. DE WET (1994), Therapeutic oligodeoxynucleotides [Oligo(dN)] for specific inhibition of the Hepatitis B virus surface antigen. (Paper delivered at the Eighth Biennial Congress of the South African Society for Microbiology Rhodes University, Grahamstown, South Africa).

## Opsomming

Die Hepadnavirus-familie veroorsaak jaarliks groot lyding en lewensverlies. Die Hepatitis B-virus is een van die belangrikste oorsake hiervan, aangesien dit endemies aan groot dele van die wêreld is. Hierdie virusinfeksie is eers laat in die twintigste eeu ontdek en die kliniese omvang daarvan is nóg later ontdek. Vandag nog is Hepatitis B-virusinfeksie die oorsaak van lewersirroze en herhaalde infeksie met hierdie virus kan aanleiding gee tot die vorming van heptosellulêre karsinoom. Hierdie redes was die motivering vir hierdie studie. Eerstens is die vermoë van 'n antisin oligonukleotied getoets om die uitskeiding van die hoof oppervlakantigeen (HBsAg) te inhibeer. Hierdie proteïen word beskou as een van die oorsake van lewersirroze en heptosellulêre karsinoom. 'n 15-Meer antisin oligonukleotied, komplementêr tot die inisiasiegebied van die virale S-geen DNA, is vir hierdie doel verkry. Die antisin oligonukleotied is in verskillende konsentrasies met behulp van 'n geskikte oordrag tegniek na 'n heptosellulêre sellyn oorgedra. Die uitdrukking van die S-geen het oor 'n tydperk van vyf dae met tot 30% afgeneem deur die sellyn met die antisin oligonukleotied by 'n konsentrasie van 20 $\mu$ M te behandel. Die inhibering van die S-proteïenproduksie kon egter nie vir tydperke langer as vyf dae volgehou word nie. Daarom is besluit om 'n uitdruktingsvektor te konstrueer en na dieselfde sellyn oor te dra ten einde inhibisie van 'n meer blywende aard te verkry. 'n Geskikte uitdruktingsvektor is deur middel van biotegnologiese tegnieke gemanipuleer, sodat die S-geen van die Hepatitis B-virus in 'n antisinoriëntasie ingevoeg kon word. Die uitdruktingsvektor is met behulp van dieselfde oordragetegniese tegniek as vir die oligonukleotiede na die heptosellulêre sellyn oorgedra. Die vlakke van die S-

geenuitdrukking in die sellyn is 49 dae na transfeksie bepaal. Die vlakke van inhibisie was so hoog as 50,6%.

Gedeeltes van hierdie studie is soos volg by nasionale wetenskaplike byeenkomste aangebied:

M. BOTHA, T.S. KLERCK & W.J. DE WET (1995), Therapeutic use of antisense oligo(dN)s for the inhibition of the Hepatitis B virus surface antigen (HBsAg). (Paper delivered at the Thirteenth Congress of the South African Biochemical Society, University of the Orange Free State, Bloemfontein, South Africa).

M. BOTHA, T.S. KLERCK & W.J. DE WET (1994), Therapeutic use of antisense technology for the inhibition of the Hepatitis B virus surface antigen (HBsAg). (Paper delivered at the Eighth Biennial Congress of the South African Society for Microbiology Rhodes University, Grahamstown, South Africa).

R. PFAHL, M. BOTHA, T.S. KLERCK & W.J. DE WET (1994), Therapeutic oligodeoxynucleotides [Oligo(dN)] for specific inhibition of the Hepatitis B virus surface antigen. (Paper delivered at the Eighth Biennial Congress of the South African Society for Microbiology Rhodes University, Grahamstown, South Africa).

## HOOFSTUK 1

### INLEIDING

#### 1.1 Inleiding

Hepatitis B-infeksie kom al sedert die vroegste tye endemies onder sekere bevolkingsgroepe voor en eers in die laat 1960's is vordering gemaak met die identifikasie van die oorsaak van hierdie infeksie.

Navorsing oor hierdie virus het begin toe Blumberg en medewerkers in 1965 vreemde antigene in die bloed van 'n Australiese inboorling waargeneem het. Vyf jaar na dié ontdekking het Dane en medewerkers bewys dat die vreemde antigeen ooreenstem met filamentagtige virale partikels in die bloed van HBV-geïnfekteerde persone (Dane *et al.*, 1970).

In 1976 het Robinson en Lutwick die strukturele samestelling van die virus bepaal en daarna is voorgestel dat die virus tot die Hepadna-virusfamilie behoort (Robinson & Lutwick, 1976). Volgens Brown en medewerkers is hierdie virusinfeksie die mees beduidende van al die hepatotrofiese virusse in terme van die getal mense wat chronies geïnfekteer word en die felheid van die komplikasies van die infeksie (Brown *et al.*, 1990). Hierdie virus is verantwoordelik vir 'n groot getal noodlottige lewerinfeksies, veral onder laer sosio-ekonomiese gemeenskappe van Afrika en Oos-Asië.

Aangesien beskikbare entstowwe ontoereikend is, word daar wêreldwyd aandag geskenk aan die ontwikkeling van effektiewe, goedkoop entstowwe ten einde verdere verspreiding van die siekte te bekamp. Daar word ook aandag geskenk aan die behandeling van reeds

geïnfekteerde persone met nuwe tegnieke wat deur rekombinante DNA-tegnologie tot stand gekom het.

Vir die doel van hierdie studie is aandag gegee aan die toepassings van die kennis verkry uit die rekombinante DNA-tegnologie ten einde die manipulasie van HBV-geïnfekteerde soogdierselle met sintetiese en gekloneerde DNA te bewerkstellig. Tydens die behandeling van hepatosiete is gepoog om die vlakke van HBsAg-produksie in 'n heptosellulêre karsinomiese sellyn te inhibeer.

Die sellyn is *in vitro* behandel met antisin oligodeoksinukleotiede en die resultate van hierdie eksperimente word in Hoofstuk 3 weergegee. Voorts is dieselfde sellyn met 'n antisingeoriënteerde S-geen, insluitend die pre-S1- en pre-S2-gebiede, gekloneer in 'n episomaal-repliserende Ebstein-Barrvirus-afgeleide vektor, getransfekteer. Die getransfekteerde selle se vlakke van HBsAg-produksie is bepaal en die resultate hiervan word in Hoofstuk 4 weergegee. Die belang van hierdie resultate word in Hoofstuk 5 bespreek.

## HOOFSTUK 2

### LITERATUUROORSIG

#### **2.1 Inleiding**

Dit is bekend dat HBV-infeksie akute en chroniese hepatitis tot gevolg het (Beasley, 1982).

In die meeste gevalle sal pasiënte volkome herstel van akute infeksie, terwyl chroniese infeksie kan vererger en is dit algemeen bekend dat die infeksie later tot hepatosellulêre karsinoma mag ontwikkel (Goddard, 1988).

#### **2.2 Hepatitis B-virusinfeksie**

In 'n studie waarvan die resultate in 1990 gepubliseer is, het Toukan *et al.*, (1990) waargeneem dat die meeste infeksies in die Midde-Ooste en Noord-Afrika deur post natale oordrag en tydens die kinderjare plaasvind. Dié skrywers het verder waargeneem dat HBV-infeksie in groter getalle voorkom in stedelike woongebiede waar laer sosio-ekonomiese toestande heers. Verder dra die grootte van die families en die frekwensie van seksuele aktiwiteit en interfamiliekontak van die geïnfekteerde persone ook by tot die tempo waarteen die virus versprei. Die wêreldwye infeksietempo van HBV word in Tabel 2.1 opgesom. Volgens hierdie tabel kom die meeste infeksies voor by persone in die ouderdomsgroep 30 jaar en ouer, gevolg deur kinders onder die ouderdom van 4 jaar. Die persentasie geïnfekteerde persone wat kliniese simptome vertoon, kom ooreen met hierdie verskynsel. Die enigste uitsondering is egter dat daar heelwat meer kliniese hepatitis in die ouderdomsgroep 20 tot 29 jaar voorkom as by die ouderdomsgroep jonger as 4 jaar.

Volgens Goudeu *et al.*, (1990) is ongeveer 1% van Europa se bevolking draers van die HBsAg en is HBV oneweredig deur Europa versprei. Europa kan egter op grond van HBV-voorkoms in drie streke verdeel word, naamlik Noord-Europa, Wes-Europa en Suid- en Oos-Europa. In Tabel 2.2. word 'n opsomming van die epidemiologiese verspreidingspatrone van HBV-voorkoms in Europa gegee, waarin hierdie indeling gereflekteer word.

**Tabel 2.1 Samevatting van die stand van HBV-infeksies wêreldwyd**

Ouderdom by infeksie (jare)	Infeksie-tempo (%)	Kliniese hepatitis (%)	Draertempo (%)	Sterftes as gevolg van HBV (%)
Voor geboorte	1	0	0.9	0.27
0 - 4	12	1.2	3.4	0.98
5 - 9	8	0.8	1.3	0.36
10 - 19	9	0.9	0.6	0.20
20 - 29	9	1.3	0.2	0.12
30+	28	9.2	0.6	0.31
Totaal	67	13.4	6.9	2.24

Toukan A. *et al.*, (1990).

**Tabel 2.2. Opsomming van die epidemiologiese verspreiding van HBV in Europa**

Streek	HBsAg-draers (%)	Ander merkers <sup>1</sup> (%)	Oordrag vanaf HBsAg + moeders
Noord-Europa	<0.1	<5	Geen behalwe immigrante
Wes-Europa	0.1 - 0.5	>5	~1% van geboortes
Suid- en Oos-Europa	1 - 5	10 - 20	~3% van geboortes

Goudeu A *et al.*, (1990).

<sup>1</sup> Hierdie merkers sluit ander virale merkers in.

In 1995 het Crovari aangetoon dat die HBV voorkoms in Italië die hoogste onder jong volwassenes is waar een uit elke tien duisend persone sero-positief toets vir die HBsAg (Crovari 1995).

In die Midde-Ooste en Verre-Ooste (Taiwan, Phillipyne en Indië) is die epidemiologie nie veel anders nie. Toukan het in 1996 aangetoon dat post-natale, horisontale oordrag die vernaamste oorsaak van HBV inweksies in die Midde-Ooste is. Hy voer voorts hierdie rede aan vir die moontlike lae sukses van pogings om hierdie infeksie uit te wis (Toukan 1996).

Kiire (1996) het in 1996 gestel dat daar 50 miljoen chroniese draers vir HBV in Afrika is. Verder stel hy dat die draer tempo tussen 9% en 20% lê, en dat die infeksie hoofsaaklik in kinders voorkom.

Volgens Goddard (1988) is die situasie in Suid-Afrika baie dieselfde as in die res van die wêreld, waar blanke Suid-Afrikaners een van die laagste draersyfers in die wêreld het, met ongeveer 0,2% van hierdie bevolkingsgroep wat HBsAg-positief toets. Die rede wat Goddard (1988) hiervoor aanvoer, is dat daar betreklik min dwelmverslaafdes onder hierdie groep voorkom. Die syfers vir swart Suid-Afrikaners is egter heelwat hoër, naamlik 17 tot 18% van die swart bevolking, met swart mans wat meer geïnfekteer word as swart vroue, wat moontlik te wyte kan wees aan die swak sosio-ekonomiese toestande wat onder hierdie deel van die bevolking heers. Hierdie verskil word ook in die epidemiologiese data vir 1996, soos deur die departement van gesondheid uitgegee, weerspieël waar die blanke HBV infeksiesyfer maar slegs 13.5% van die swart infeksiesyfer is.

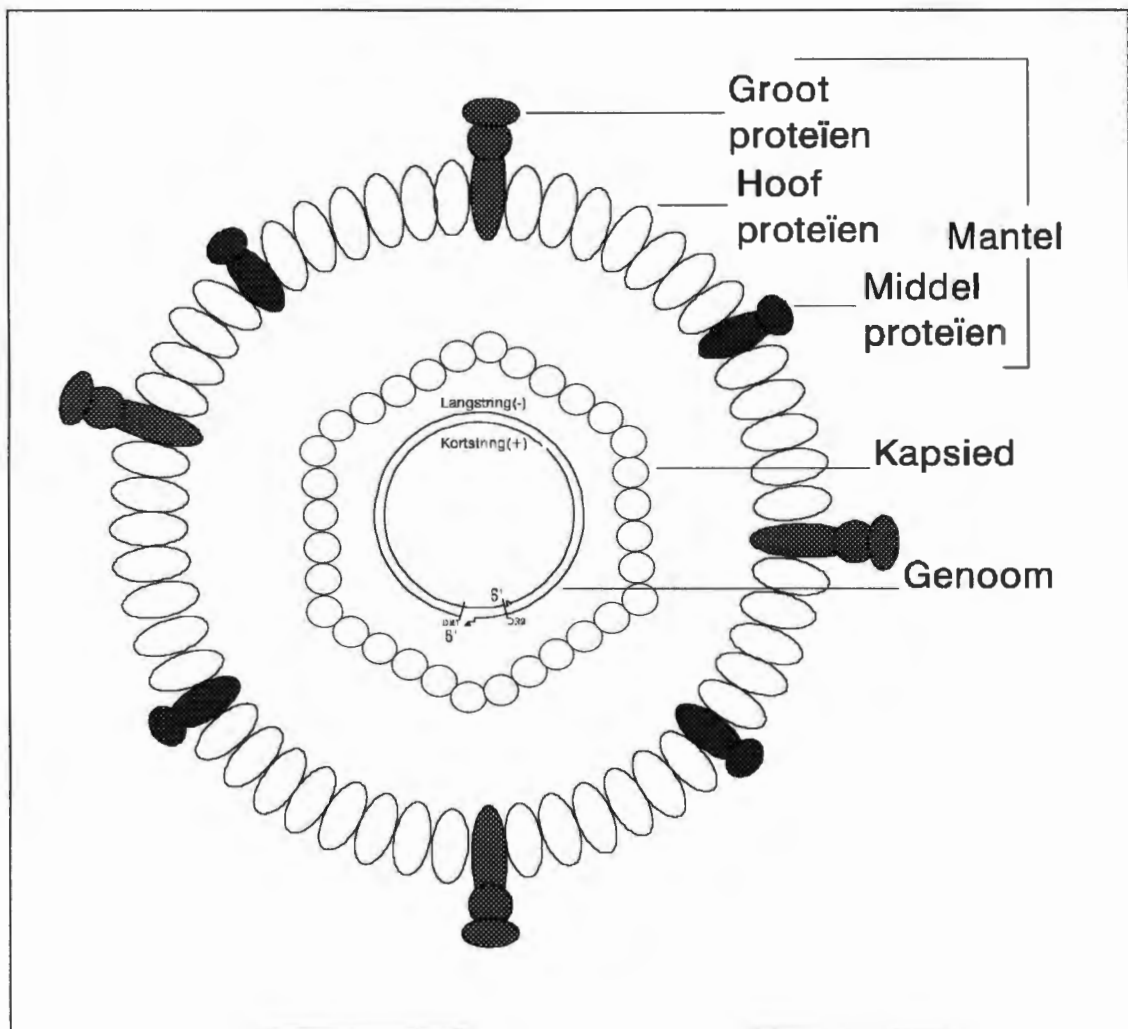
Schoub (1992) het vanaf 1986 tot 1990 'n studie onder swart skoolkinders en swart mynwerkers asook onder blankes wat bloed skenk, gedoen en daaruit toon die syfers dat 1,475 miljoen Suid-Afrikaners HBV-draers is.

## **2.3 Hepatitis B-virus:**

### **2.3.1 Die virusstruktuur**

Die Hepatitis B-viruspartikels bestaan uit 'n lipieddubbellaag met 'n deursnee van 22 nm met die lipiedmantel wat uit drie proteïene bestaan, naamlik die hoofmantelproteïen, die middelmantelproteïen en die grootmantelproteïen. Die hoofmantelproteïen is 'n polipeptied wat uit 226 aminosure saamgestel is en word deur die S-geen gekodeer. Die middelmantelproteïen is 281 aminosure groot en word deur die pre-S2 en S-geen gekodeer, terwyl die grootmantelproteïen tussen 389 en 400 aminosure groot is, afhangende van die sub tipe van die virus, en word deur die pre-S1, pre-S2 en die S-geen gekodeer (Tiollais *et al.*, 1985; Brown *et al.*, 1990).

'n Volledige virion sal tipies uit tussen drie- en vierhonderd hoofmantelproteïenmolekules en tussen veertig en tagtig middelmantelproteïenmolekules bestaan met 'n tipiese deursnee van 42 nm. Die kapsied omvou die sirkelvormige DNA-, DNA-polimerase-ensieme, proteïenkinase-aktiwiteit en 'n DNA-geassosieerde proteïen en is saamgestel uit identiese monomere (Tiollais *et al.*, 1985). Figuur 2.1 beeld die Hepatitis B-virus skematies uit.



**Figuur 2.1 Skematiese voorstelling van die volledige HBV-virion.** Die verskillende proteïene word in die skets uitgebeeld. Voorts kan die kapsied van die virus, met die genoom daarin vervat, binne-in die omringende mantel gesien word. Die 5' - en 3' -kante van die genoom word ook uitgebeeld op die korter (+)-string en langer (-)-stringe van die genoom. (Aangepas uit Tiollais P *et al.*, 1985).

### 2.3.2 Die HBV-genoom

Die virale genoom bestaan uit 'n sirkelvormige dubbelstring DNA waarvan die een string 'n lang minusstring en die ander 'n korter plusstring is. Die genoom is 3200 nukleotiede lank en is sodanig gerangskik dat die lang, negatiewe string vier oop leesrame (ORF's) bevat en die kort, positiewe string geen oop leesrame bevat nie (Brown *et al.*, 1990). Hierdie ORF's kodeer onder meer vir die oppervlakantigene (hoofmantel-, middelmantel- en grootmantelproteïene) HBsAg en die kapsiedantigene HBcAg. Soms word 'n ander

antigeen, HBeAg, in die bloed van HBV-pasiënte waargeneem (Brown *et al.*, 1990). Volgens Gerlich en Heermann (1990) ontstaan die HBeAg as 'n Hbe-geenprodukt en nie as gevolg van ontwinging en/of herrangskikking van die genoom nie. Omdat die virus so klein is, is die genoom kompak en oorvleuel die gene (Gerlich & Heermann, 1990; Brown *et al.*, 1990).

Die X-geen kodeer vir 'n polipeptied met 'n lengte van 145-154 aminosure, afhangende van die sub tipe van die virus. Die peptied is vermoedelik betrokke by die vorming van karsinoma van die lewer, aangesien dit 'n transaktiveringsaktiwiteit besit sodat uitdrukking van hierdie geen ook die uitdrukking van ander gene kan stimuleer (Chisari *et al.*, 1989; Brown *et al.*, 1990). Die P-geen oorvleuel met al die ander gene en kodeer vir 'n 832 aminosuureenheid. Deur vergelykende studies kon getoon word dat hierdie geenprodukt vir die virale polimerase-aktiwiteit verantwoordelik is (Tiollais *et al.*, 1985).

Tydens replisering van die virusgenoom word twee produkte gevorm, naamlik 'n 2.1 Kb en 'n 3.5 Kb RNA-transkrip. Hierdie twee transkripte word eers gevorm nadat die transkripsieproses 'n tweede keer gedeurloop is. Die 2.1 Kb RNA-transkrip kodeer dan vir die algemene virale proteïene, terwyl die 3.5 Kb-transkrip vir die mantelproteïene en waarskynlik ook vir die DNA-polimerase-aktiwiteit kodeer (Ganem & Varmus, 1987).

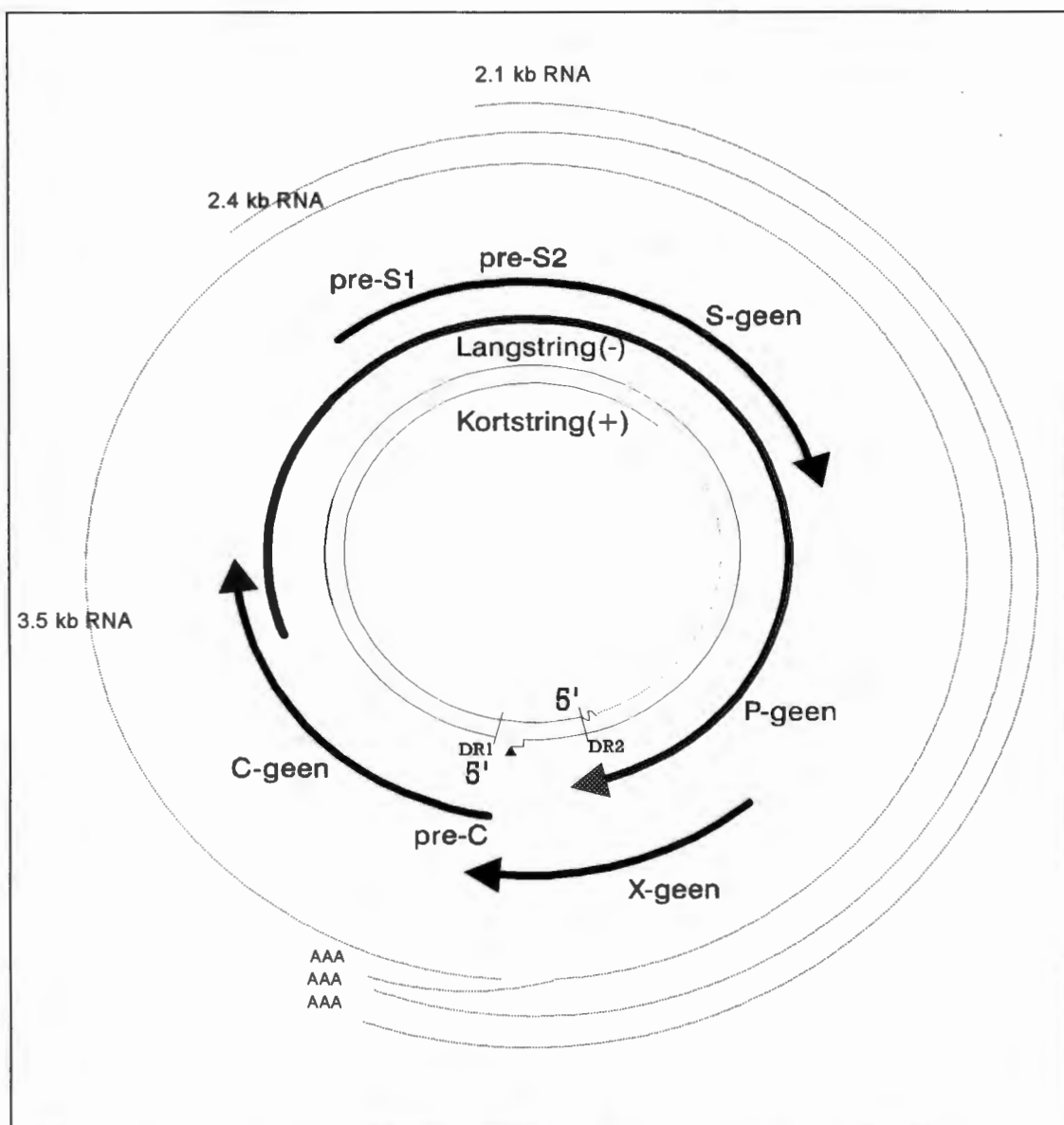
Volgens Ganem en Varmus (1987) kan die replisering van die Hepadna-virusse in vier fases verdeel word. Tydens die eerste fase vorm die virale DNA 'n kovalente, sirkelvormige superheliese (cccDNA) kompleks. Die vorming van hierdie superheliese DNA-kompleks word teweeggebring deur die gasheertranskripsieproteïene. Die bewys daarvoor is dat die

3.5 Kb-transkripsie se 5'-terminus in die preC-gebied geleë is, terwyl die 3'-terminus in die C-gebied gevind is.

Die tweede fase bestaan uit die sintese en groepering van die pregenomiese RNA vanaf die cccDNA met behulp van die gasheer polimerase II. Die derde fase is die sintese van die negatiewe string. Hierdie sintesestap begin op die 5'-terminus of op die 3'-terminus in die gebied waar die kort terminale herhalingsvolgordes in oormaat voorkom. In Figuur 2.2 word 'n skematiese voorstelling van 'n Hepadna-virus DNA- en RNA-produkte gegee.

Die oorsprong van die minusstring is in die direkte herhalingsgebied gemerk DR1 in Figuur 2.2 en die oorsprong van die plusstring is in die direkte herhalingsgebied gemerk DR2 in Figuur 2.2. Die stippellyn in die binneste sirkel van Figuur 2.2 kan deur die endogene DNA-polimerase-aktiwiteit opgevolg word om 'n volledige dubbelstring DNA-virus te vorm. Die swart pyle in Figuur 2.2 dui die virale oop leesraam aan in die rigting waarin transkripsie en translasie plaasvind. Die buitenste stippelstrepe in Figuur 2.2 dui op die virale getranskribeerde RNA met die ooreenstemmende groottes daarvan (Ganem & Varmus, 1987).

Die vierde en laaste fase is die sintese van 'n positiewe string wat vanaf die negatiewe templaar plaasvind en begin by die 3'-terminus waar 'n RNA-fragment, moontlik afkomstig van RNase H-vertering, aan die templaar gebonde bly en dan dien as voorvoerder vir die sintese. Die resultaat is dat, anders as wat verwag word, die 3'-kant van die negatiewe string nie aan die 5'-kant van die positiewe string heg nie. Die gevolg is dat die virus se positiewe string korter is as dié van ander hepadnavirusse.



**Figuur 2.2 'n Skematiese voorstelling van die Hepadna-virus-DNA en getranskribeerde RNA.** 'n Skematiese voorstelling van die HBV-genoom soos dit voorkom in viruspartikels. Die verskillende gene (—) en die onderskeie RNA's (····) word aangedui. DR1 en DR2 is direkte herhalingsvolgordes op die (-) string en (+) string onderskeidelik.

#### 2.4 Die invloed van HBV-infeksies op die vorming van HCC

Uit die literatuur is dit duidelik dat daar nie eenstemmigheid bestaan oor die metode waarop die Hepatitis B-virus tot die vorming van lewercancer kan lei nie. Die eerste publikasies wat na die verwantskap tussen HBV en HCC aangespreek het, het hoofsaaklik twee teorieë voorgestel wat algemeen deur navorsers aangehang word.

Die eerste teorie (Marion *et al.*, 1980) stel dat HCC vorm as gevolg van die plek in die gasheergenoom waar integrasie voorkom. Die tweede teorie (Yaginuma *et al.*, 1987) stel dat die HCC vorm as gevolg van die interaksie tussen die gasheergenoom en replikatiewe tussengangers. Die tweede teorie kan vorming van HCC as gevolg van verhoogde vlakke van HBsAg-uitdrukking verklaar. In 'n meer resente publikasies stel Milich ondermeer dat HCC vorming dalk die resultaat van 'n aantal sellulêre reaksies kan wees (Milich *et al.*, 1994).

Volgens Marion *et al.*, (1980) integreer die HBV-genoom met dié van die pasiënt. Die moontlike wyses waarop hierdie integrasie plaasvind asook die wyses waarvolgens die integrasie tot HCC kan lei, is in 1987 deur Yareginuma en medewerkers voorgestel (Yaginuma *et al.*, 1987). Volgens laasgenoemde outeurs is daar spesifieke bindingsgebiede op die virale genoom wat vir integrasie in die gasheergenoom verantwoordelik is. Een van hierdie virale bindingsgebiede is aan die 5'-kant van die virale minusstring geleë, terwyl die ander virale bindingsgebied varieer in 'n gebied wat strek vanaf die C-geen tot by die pre-S-geen. Milich *et al.* (1994) stel dat verskeie moontlike faktore 'n rol speel en gaan voort om hierdie faktore te lys. Eerstens stel Milich *et al.* dat die HBX antigeen 'n virale onkogeen is. Hierdie feit is reeds in 1992 deur Rogler en Chisari gestel. Volgens Rogler en Chisari (1992) kan die HBX-proteïen lei tot veranderde outokrine meganismes in selgroeibeheer. Laasgenoemde outeurs het voorts ook beweer dat die integrasie van HBV genoom meestal in Chromosome 11 en 17 plaasvind, en dat dit kan ly tot aberrasies wat in die verlies van tumor suppressor selle manifesteer. Voorts noem Milich *et al.* die ander faktore as: Chromosomale afwykings a.g.v. HBV integrasie; Aktivering van sellulêre proto-

onkogene; Inaktivering van sellulêre anti-onkogene; en Trans aktivering van sellulêre gene deur HBV produkte. Outeurs soos Hsia *et al.*(1992) en Twu *et al.*(1993) het ook die invloed van chroniese infeksie op die onderdrukking van tumor suppressor sel aktiwiteit veral in die p53 proteïen. en die invloed van HBX-proteïen op die c-Jun proto-onkogeën aangespreek.

Robinson (1994) voer aan dat die HBX-geen produk transkripsie transaktiveer wat gereguleer word deur cis-aktiveringsvolgordes. Hy stel voorts dat punt mutasies in die p53 geen en allele deleesies van p53 geen algemeen voorkom in HCC.

Alle outeurs in dit eens dat die presiese prosesse betrokke by die vorming van HCC in chronies geïnfekteerde HBV draers nog nie opgelos is nie. Die rede wat hiervoor aangevoer word is dat die proses baie gekompliseerd is en dat versille in die verkillend mens en dier modelle die ondersoek daarna bemoeilik.

## **2.5 Antisin oligonukleotiede**

Volgens Reinis *et al.*, (1993) is die inhibisie van HBsAg produksie moontlik deur oligodeoksinukleotiede te gebruik. Vanweë die interessante en soms ingewikkelde repliseringswyses van virusse soos die Hepadna-virusse, herpes-virusse en MIV, is die tegnieke wat aangewend kan word vir die inhibisie van die uitdrukking van hierdie virale genome baie beperk. Sedert die vroeë tagtiger jare word daar egter baie meer na die moontlikheid van komplementêre mRNA of antisinoligonukleotied (A.O.)-behandeling van viraal-geïnfekteerde pasiënte gekyk (Cohen, 1989).

In 1990 het Weintraub waargeneem dat antisen RNA sowel as DNA gebruik kan word om spesifieke gene te onderdruk. Weintraub (1990) stel verder dat die antisen volgorde afkomstig kan wees vanaf gesintetiseerde oligonukleotiede of vanaf 'n vektor wat die spesifieke geenvolgorde in die antisen volgorde bevat (Weintraub, 1990).

Verskeie navorsers het reeds die moontlikheid om die produksie van die HBV-oppevlakantigeen (HBsAg) met behulp van antisintegnologieë te inhibeer, ondersoek en is daar met rasse skrede vordering gemaak in die rigting van 'n geskikte behandeling vir HBV-infeksie. In 1990 het Goodarzi en medewerkers 'n artikel gepubliseer waarin inhibisie van so hoog as 96% van HBsAg-uitdrukking verkry is. Verder het die outeurs waargeneem dat die mees geskikte A.O.-lengte vir die inhibisie ongeveer 15 base is. Die inhibisie word as gevolg van hoogs spesifieke binding van gesintetiseerde A.O.-volgordes verkry (Goodarzi *et al.*, 1990). Wu en Wu het in 1992 aangetoon dat inhibisie van HBV-gene nog meer spesifiek kan wees indien die oordragetegniese verbeter word. Dit behels die gebruik van oppervlakreseptore op 'n geïnfecteerde lewersel ten einde verhoogde opname van die A.O. te verkry (Wu & Wu., 1992).

In die geval van Hepatitis B-virusinfeksies waar heptosellulêre karsinoma (HCC) reeds ontstaan het, sal antisenbehandeling (Offensperger *et al.*, 1995; Korba & Gerin, 1995), tesame met chirurgiese behandeling, die uitdrukking van die HBV proteiene kan onderdruk (Brown *et al.*, 1990).

Aangesien daar heelwat in die bestaande literatuur melding gemaak word van die potensiaal van hierdie tegniek is besluit om dit beter te ondersoek. Die besluit om van antisen oligonukleotied behandeling gebruik te maak as voorloper tot 'n antisen plasmied, is

gemaak ten einde die natuur van die infeksie *in vitro* te bestudeer sodanig dat die aard van die weefsel kultuur en moontlike manipulatie tegnieke vir die beplande prosesse in die laboratorium gestandariseer kon word alvorens met die antisin-plasmied studies begin sou word.

Die 15-meer antisinolonukleotied (A.O.) wat in hierdie eksperiment gebruik is (vergelyk afdeling 3.2.1), is komplementêr aan die inisiasiegebied van die S-geen (CTTGTACCTCTTGTA).

## 2.6 Sellyn en transfeksie

'n Geskikte sellyn, die PLC/PRF/5-selle, ook genoem Alexander-selle, is die eerste keer in 1976 deur Alexander en medewerkers beskryf en is afkomstig vanaf 'n 24-jarige Mosambiekse pasiënt. Dié betrokke pasiënt het reeds HCC ontwikkel as gevolg van herhaalde HBV-infeksie oor 'n lang tydperk (Alexander *et al.*, 1976). Volgens Aspinall bevat die sellyn 'n kopiegetal van 3.2 van die totale HBV-genoom en word 93,6 ng/ml HBsAg deur elke  $10^6$  selle per 24 uur uitgeskei. Die selle skei egter geen HBeAg en HBcAg uit nie (Aspinal & Alexander 1988).

Vir hierdie studie is gebruik gemaak van liposoomgemedieerde transfeksie om die oligonukleotiede en vektorvolgordes na die PLC/PRF/5-sellyn oor te dra (vergelyk afdeling 3.2.1). Die navorser het op hierdie tegniek besluit na 'n voorlopige vergelyking tussen bogenoemde transfeksietegnieke en onderskeidelik aktiewe absorpsie en kalsiumfosfaatko-presipitering as transfeksietegnieke. Weens die eenvoud en hoë effektiwiteit van lipofeksie (Gabizon *et al.*, 1987) is besluit om op hierdie tegniek te konsentreer.

### 2.6.1 Lipofektiengemedieerde transfeksie

Transfeksie met behulp van liposome is reeds in 1980 deur Frayley en medewerkers in 'n eksperiment as draer van DNA gebruik. Hulle het waargeneem dat tot 50% van die DNA in liposome vasgevang word. Volgens Frayley word honderdvoudig meer DNA in liposoomgemedieerde transfeksie oorgedra as deur aktiewe absorpsie. Dié faktor kan verdubbel as die selle aan poli-etileenglikool of gliserol blootgestel word (Frayley & Subramani, 1980).

Daar is verskeie faktore wat in ag geneem moet word tydens transfeksie waar lipofektien as DNA-draer gebruik word (Felgner *et al.*, 1987). Die faktore sluit in DNA-konsentrasie, lipiedkonsentrasie en die tydperk waartydens die selle aan die lipofektien-DNA-mengsel blootgestel word. Frayley en medewerkers (1980) het waargeneem dat die effektiwiteit van transfeksies waar RNA as vreemde genoom gebruik is, hoër was as die waar DNA in die liposome vasgevang is (Frayley & Subramani, 1980). Verder skryf Felgner en medewerkers die feit dat DNA, wat met behulp van liposome in transfeksie gebruik is, se effektiwiteit toe aan die opheffing van die netto negatiewe lading van die DNA deur die lipofektien sodat die DNA-lipiedmengsel baie beter met die selwand assosieer (Felgner *et al.*, 1987).

In 1982 het Schaefer-Ridder en medewerkers liposome as draers van DNA gebruik. Tydens die eksperiment is 'n vergelyking getref tussen sommige van die moontlike transfeksietegnieke. Hul resultate word in Tabel 2.3 weergegee.

Volgens Mannino en Gould-Forgerite is die liposome tussen 0,2 en 0,4 $\mu$ m groot en neem dit tussen 10% en 40% makromolekuulbevattende buffer op. Hierdie outeurs stel 'n aantal vereistes vir effektiewe geenoordrag met behulp van liposome. Dit kan soos volg opgesom word. Eerstens moet die geen onder beskouing as geheel opgeneem word sonder om funksioneel te verander. Tweedens moet daar binding wees tussen die liposoom en die teikensel sonder om nie-geteikende selle te beïnvloed. Derdens moet die vloeistofagtige inhoud van die liposoom met hoë effektiwiteit na die sitoplasma van die teikensel oorgedra word. Laastens moet die vreemde geen suksesvol tot uitdrukking kom in hierdie sel (Mannino & Gould-Forgerite 1988).

Tabel 2.3 'n Vergelyking tussen die effektiwiteit van verskillende transfeksietegnieke

Metodes	% Positiewe selle	Kolonies per 10 <sup>6</sup> selle
Liposome	10	200
Kalsiumfosfaat	3	500
DEAE-dekstraan	0.1 - 1	0
Mikro-inspuiting	50 - 100	200 - 1000

(Schaefer-Ridder *et al.*, 1982)

## 2.7. Doelstelling en benaderingswyse

Uit die literatuur is dit duidelik dat HCC die gevolg van herhaalde infeksie met HBV is (Koch *et al.*, 1989; Schlicht & Schaller, 1989). Tydens elke infeksie verhoog die pasiënt se kans om HCC te ontwikkel as gevolg van die ophoping van HBsAg in die hepatosiete. Hierdie probleem dien juis as 'n motivering vir hierdie studie, omdat 'n bydrae gemaak kan word om hierdie probleem te bowe te kom deur die aanwending van antisintegnologie.

Die doelstelling van hierdie studie is om te bepaal tot in watter mate inhibisie van HBsAg-uitdrukking deur die PLC/PRF/5 sellyn met behulp van antisintegnologie verkry kan word.

Die benaderingswyse wat geformuleer is, was om die PLC/PRF/5-sellyn met onderskeidelik die antisin oligonukleotiede en 'n Epstein-Barrvirus-afgeleide episomale uitdrukkingsvektor, waarin die HBV-S-geen in die antisinoriëntasie gekloneer is, te transfekteer en om dan die mate van HBsAg-sintese te meet. Hiervoor is die hoeveelheid HBsAg wat deur die selle uitgeskei is, gemeet.

## HOOFSTUK 3

### 'n ONDERSOEK NA DIE GEBRUIK VAN ANTISIN OLIGNUKLEOTIEDE VIR

### DIE INHIBISIE VAN DIE HEPATITIS B-VIRUS S-OPPERVLAKANTIGEEEN

### (HBsAg).

#### **3.1 Inleiding**

In hierdie studie is van antisin oligodeoksienukleïensure gebruik gemaak ten einde inhibisie van die HBs-Ag-uitdrukking te bewerkstellig. 'n Antisin oligonukleotied (A.O.) van 15 nukleotiede is gebruik en is met behulp van 'n geskikte oordragetegnisk na 'n viraal-geïnduseerde heptosellulêre karsinomie se selyn oorgedra. Die selaktiwiteit gedurende die periode van behandeling is gemonitor deur inbouing van  $^{14}\text{C}$ -gemarkte aminosure te bepaal. Voorts is die totale proteïenproduksie van die selyn bereken deur die totale hoeveelheid proteïene wat na afloop van die periode van behandeling geproduseer is, te bepaal. Die hoeveelheid antigeen wat geproduseer is, is gemonitor deur op gereelde tydsintervalle groeimedium te onttrek en met behulp van die ELISA-tegnisk te kwantifiseer.

#### **3.2. Eksperimenteel**

##### **3.2.1 Kweking van selle**

Die PLC/PRF/5 selyn (Alexander *et al.*, 1976) is van **Highveld Biologicals** (Johannesburg) aangekoop en in DMEM-groeimedium wat 10% geïnaktiveerde fetale kalfserum bevat, volgens standaardmetodes gekweek (Butler, 1991). Die selle het goed gegroei en vermeerder tydens inkubasie by  $37^{\circ}\text{C}$  met 5%  $\text{CO}_2$  en 80% humiditeit.

Sodra tussen 60 en 80% van die totale oppervlak van die flesbodem bedek was, is subkulture gemaak deur die selle een keer met 1x PBS te was en met 1 ml 0,5M EDTA en 1 ml tripsien (1:7 tripsien: 0,1% EDTA) te behandel. Die selle is eers by kamertemperatuur geïnkubeer, waarna inkubasie voortgesit is by 37°C vir drie minute. Ses milliliter volledige medium is bygevoeg en die selle is daarna heftig geskud en in 'n verhouding van 1:2 in nuwe weefselkultuurflesse verdeel. Die subkulture is weer volgens bogenoemde standaardmetodes geïnkubeer. Om aan die selle se voedingsbehoefes te voldoen, is die DMEM-medium vervang sodra 'n verandering in die kleur van die medium, naamlik vanaf pienk na geel, waargeneem is.

Nadat voldoende selle gekweek is, is subkulture gemaak deur die selle in 'n sesput multiput fles (Nunclon, Denemarke) te verdeel, sodanig dat elke put ongeveer dieselfde hoeveelheid selle bevat. Die res van die studie is in hierdie sesput weefselkultuurplate uitgevoer.

### **3.2.2 Liposoom-gemedieërde transfeksie**

Ten einde 'n aanduiding te kry van die spesifieke sellulêre aktiwiteit, is besluit om die selle *in vitro* in die teenwoordigheid van <sup>14</sup>C-gemerkte aminosure te kweek. Die transfeksiemengsel wat gebruik is, is volgens die vervaardiger se voorskrifte voorberei (Boehringer Mannheim, Randburg). Twee sesput weefselkultuurplate is in SVM geïnkubeer onder dieselfde toestande as voorheen (vergelyk Afdeling 3.2.1) totdat die putte ongeveer 60% volgroei was, waarna die L-[U-<sup>14</sup>C] aminosuurmengsel (250µCi) in 'n volume van 20µl/ml bygevoeg is. Die eerste byvoeging van 20 µl/ml medium is gedoen presies twintig uur voor die terminasie van die inkubasie soos vereis tydens transfeksie.

Die transfeksiemengsel is soos volg saamgestel:

Mengsel A is berei deur vir elke put 30  $\mu$ l van die DOTAP-transfeksiereagens (**Boehringer Mannheim**, Randburg) aan te vul tot 100  $\mu$ l met SVM in 'n gesileerde Eppendorf-buis (De Vries, 1995).

Mengsel B is berei soos aangedui in Tabel 3.1. (X ml A.O. waarvan die konsentrasie bekend is, is met Y ml SVM gemeng. Die waardes van X en Y het deurgaans gevarieer ten einde 'n konsentrasiereeks, soos uitgebeeld in Tabel 3.1, in die ses putte te bewerkstellig).

**Tabel 3.1 Volumes van die reagense soos tydens transfeksie gebruik**

Put	A.O. konsentrasie (mMol)	ml A.O. (X)	ml SVM (Y)
1	0	0.00	100.00
2	4	0.28	99.72
3	8	0.56	99.44
4	12	0.84	99.16
5	16	1.12	98.88
6	20	1.40	98.60

In kolom 1 van die tabel verskyn die nommer van die put waarin getransfekteer is. Kolom 2 dui die verlangde A.O.-konsentrasie aan. Die waardes in die derde en vierde kolomme dui op die hoeveelhede A.O. en SVM wat bymekaargevoeg is ten einde die verlangde eindkonsentrasie te verkry.

Mengsels A en B is bymekaargevoeg en liggies gemeng, waarna dit vir tien minute by kamertemperatuur geïnkubeer is. Die mengsels is in die putte gevoeg, sodanig dat dit eweredig in die putte versprei is. Die plaat is daarna vir vyf uur by 37°C geïnkubeer, waarna alle medium onttrek is en by -20° C gevries is. Volledige groeimedium is in 3ml-hoeveelhede in elke put gevoeg en vir die duur van die eksperiment in die putte gelaat.

Na afloop van presies twaalf uur en elke daaropvolgende twaalf uur is 100 $\mu$ l van die groeimedium onttrek en by -20° C gebêre tot na afloop van die eksperiment. Die tweede

byvoeging van L-[U-<sup>14</sup>C] aminosuurmengsel (20µl/ml) is uitgevoer na honderd uur van inkubasie, sodat alle medium onttrek kon word na afloop van die 120 uur wat die eksperiment geduur het.

### 3.2.3 Analises

Om die hoeveelheid <sup>14</sup>C in die onderskeie mediumfraksies te bepaal, is die onderskeie fraksies wat onttrek is aan sintillasetelling onderwerp volgens 'n gewysigde metode soos beskryf deur Ausubel *et al.*,(1989). Vir hierdie doel is die 100 µl van die medium wat onttrek is, aangevul tot 1 ml met ddH<sub>2</sub>O waarna 0,5 ml 1M NaOH bygevoeg is. Die mengsel is vir vyftig minute by 37°C geïnkubeer, waarna 0,5ml 20% TCA bygevoeg is, en die mengsel is dan vir vyftien minute op ys geplaas en af en toe goed geskud. Nitrosellulosemembrane is voorberei vir filtrasie deur dit uit te pons en daarna in 5% TCA te week. Die deurweekte membraan is bo-op 'n filtreerapparaat geplaas en met 1 ml 5% TCA benat deur dit deur te suig. Hierna is die onderskeie mediummengsels oorgedra na 'n membraan en die buise waarin die mediummengsel berei is, is met 5 ml 5% TCA gespoel en hierdie 5 ml is deur dieselfde membraan gefiltreer. Die membraan is toegelaat om lugdroog te word, waarna dit in 3 ml telvloeistof (1,4-di-2-(5-feniel-oksazoliel)-benseen 50 mg/l; 2,5 difenieloksazol 5g/l opgelos in 1l toluen) geplaas is en aan vloeistofsintillasetelling (**Packard**, Tri-Carb 460c vloeistofsintillasië teller) onderwerp is.

'n Proteïenbepaling is met behulp van die Bradford-metode (Bradford, 1976) soos volg uitgevoer. Nadat die laaste onttrekking by honderd-en-twintig uur gedoen is, waartydens alle medium onttrek is, is die selle een keer met 1x PBS gewas om die serum te verwyder. Hierna is die selle met behulp van 'n selskraper vanaf die bodem van die put verwyder en in

PBS gesuspendeer en vir vyf minute in 'n banksentrifuge gesentrifugeer. Hierdie wasstap is nog twee keer herhaal om te verseker dat alle serum verwyder is. Hierna is 0,5 ml van 'n homogeniseringsmengsel [(0,267M Tris (pH 7.4); 0,266M NaCl; 22mM N-etiemaleiemied; 1,8mM para-aminobensamidiën; 2mM fenielmetiel-sulfoniëfluoried; 0,1% (v/v) Triton X100; 80mM EDTA)] bygevoeg. Die mengsel is deeglik gemeng met behulp van 'n spuit en naald voordat die volgende reaksiemengsel berei is: 10  $\mu$ l selsuspensie is tot 1 ml hoeveelhede aangevul met 990  $\mu$ l van die Bradford-reagens, 'n mengsel bestaande uit 100 mg Comassie helderblou G-250 [(Sigma, Johannesburg) opgelos in 50 ml 95% etanol en 85% fosforsuur, aangevul tot 1 l met ddH<sub>2</sub>O]. Hierdie selsuspensiemengsel is vir twintig minute by kamertemperatuur geïnkubeer. Die absorpsie by 595 nm is nou vir elke buis bepaal. 'n Vergelykende bepaling is eers uitgevoer waartydens beesserumalbumien van bekende konsentrasies vanaf 0.1  $\mu$ g / $\mu$ l tot 10  $\mu$ g / $\mu$ l berei is en waarvan die absorpsie by 595 nm bepaal is en gebruik is om 'n standaardkurwe te trek.

Die ELISA-bepaling is gebruik om die HBsAg-produksie deur die PLC/PRF/5-selle te bepaal. ELISA-plate wat vir die deteksie van HBsAg-positiewe bloedskenkers gebruik word, is vanaf die Natalse Bloedbank verkry. Alle bepalings is in triplikaat uitgevoer en daar is streng by die voorskrifte van die Natalse Bloedbank gehou. Hierdie tegniek berus op die "sandwich" beginsel, waar muis monoklonale anti HBsAg teenliggame aan 'n matriks gebind is. Die HBsAg in 'n monster bind aan hierdie monoklonale teenliggame en nadat die ongebinde HBsAg van die matriks af gewas is, word die anti-HBsAg monoklonale teenliggaam-HBsAg kompleks met 'n tweede anti-HBsAg monoklonale teenliggaam behandel. Hierdie tweede anti-HBsAg monoklonale teenliggaam is aan die peperwortel peroksidase ensiem gebind, sodanig dat 'n kleur reaksie ontstaan sodra die

antiHBsAg/HBsAg/anti-HBsAg kompleks met 'n kleur reagens behandel word. Dit is soos volg uitgevoer: Die ELISA-plaat is eers vir dertig minute by 45°C in 'n houer met hoë humiditeit geïnkubeer. 'n Konsentrasiereeks is gemaak deur 'n standaard wat by die ELISA ingesluit is opeenvolgend in 'n 1:1-verdunning te verdun totdat 'n verdunning van 0,195% verkry is. Die verdunnings is daarna in 50 µl-hoeveelhede in die putte versprei soos in Figuur 3.1 aangetoon.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.195	50	1	9	17	25	33	41	49	57	65	
B	0.391	H	2	10	18	26	34	42	50	58	66	
C	0.781	H	3	11	19	27	35	43	51	59		
D	1.563	M	4	12	20	28	36	44	52	60		
E	3.125	M	5	13	21	29	37	45	53	61		
F	6.250	L	6	14	22	30	38	46	54	62		
G	12.50	L	7	15	23	31	39	47	55	63		
H	25.00	Bl	8	16	24	32	40	48	56	64		

**Figuur 3.1 'n Skematiese voorstelling van 'n ELISA-plaat soos gebruik in hierdie studie.** Putte A1-A2 is bekende standaarde in toenemende konsentrasies, Putte B2-G2 is voorsiene kleurreagens in afnemende konsentrasies waar H 'n hoë konsentrasie is, M 'n middelmatige konsentrasie is en L 'n lae konsentrasie is. Put H2 is 'n blanko - geen monster. Putte A3-B11 is die onttrekte monsters. Die dubbelstreep onder sekere blokke dui op die einde van die onttrekkings van een tydsgreep.

Die medium wat na elke tydsinterval onttrek is, is in 50 µl-hoeveelhede in die putte gevoeg deur by put A3 te begin, sodanig dat elke ses opeenvolgende putte een tydsinterval se onttrekkings in toenemende A.O.-konsentrasie verteenwoordig.

Die plaat is met parafilm bedek en vir twee uur by 45°C in 'n houer met hoë humiditeit geïnkubeer. Tydens die inkubasiëperiode is die konjugaatverdunner (geleofilisierde mengsel van skaap, bees en mens serum) voorberei deur 6 ml ddH<sub>2</sub>O by te voeg en vir tien minute te laat, waarna dit liggies deur middel van swaaibewegings gemeng is om op te los. Die anti-HBs-konjugaat is verdun deur van bogenoemde verdunner volgens die volgende vergelyking by te voeg, waarna dit liggies gemeng is sonder om dit te skud:

$$\text{(Aantal putte gebruik} \times 50 \text{ ml)} / 150 \quad (3.3.1)$$

= Hoeveelheid konjugaat benodig

$$\text{(Aantal putte gebruik} \times 50 \text{ ml)} - \text{Hoeveelheid konjugaat} \quad (3.3.2)$$

= Hoeveelheid konjugaatverdunner benodig

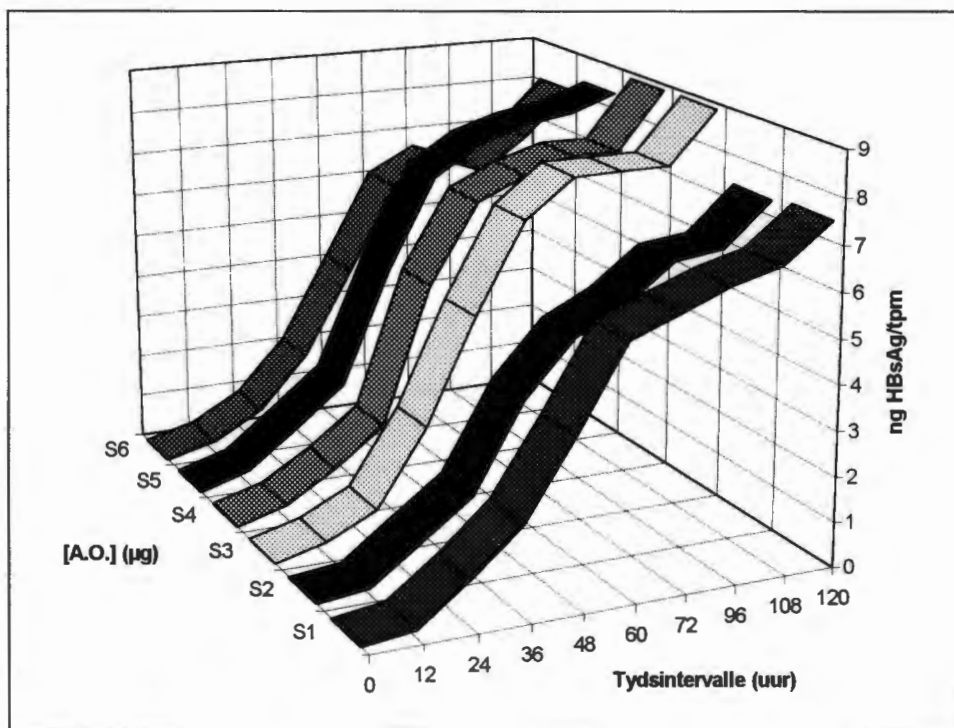
Na afloop van inkubasië is die plaat uit die inkubator gehaal maar die klam houer is in die inkubator gelaat. Die inhoud van die putte is op handdoekpapier uitgeskud en met ongeveer 200 µl TST (0,005 M Tris; 0,1 M NaCl; Tween 20 in ddH<sub>2</sub>O) gewas. Hierna is 50 µl konjugaat na al die putte oorgedra en die plaat is weer met parafilm verseël en in die klam houer vir sestig minute by 45°C geïnkubeer.

Na afloop van inkubasië is die plaat uit die inkubator verwyder en die meegaande chromogeenmengsel is berei deur die seël van die houer te breek en die reaksie binne-in die botteltjie aan die gang te sit. Hierna is die inhoud van die putte weer uitgeskud en is die putte 'n laaste keer met ongeveer 250 µl TST gewas. Deur by put A1 te begin, is die bereide chromogeen in tydsintervalle kleiner as vyftien sekondes by elke put gevoeg. Die plaat is vir dertig minute in die donker geïnkubeer om die kleurreaksie te laat plaasvind. Laasgenoemde reaksie is na dertig minute getermineer deur 100 µl van die verskafde

swaelsuur by te voeg in dieselfde tydsinterval waarmee die chromogeen bygevoeg is. Laastens is die absorbansie van die inhoud van elke put direk na afloop van die swaelsuurbyvoeging, by 492 nm bepaal.

### 3.3 Resultate

Die resultate van hierdie toetse is verwerk en word in Bylae 2 weergegee. 'n Grafiese voorstelling van hierdie resultate word in Figuur 3.2 weergegee. Die resultaat toon die hoeveelheid HBsAg wat gedurende die tydsduur van die eksperiment in die medium uitgeskei is in die teenwoordigheid van die verskillende antisin oligo's en die relatiewe sellulêre aktiwiteit soos bepaal met behulp van die  $^{14}\text{C}$ -gemarkte aminosure wat geïnkorporeer is.



**Figuur 3.2: Hoeveelheid HBsAg uitgeskei in verhouding met die sellulêre spesifieke aktiwiteit.** S1 tot S6 verteenwoordig die A.O. konsentrasie vanaf  $0\mu\text{M}$  tot  $20\mu\text{M}$ , waar S1 =  $0\mu\text{M}$ , S2 =  $4\mu\text{M}$ , S3 =  $8\mu\text{M}$ , S4 =  $12\mu\text{M}$ , S5 =  $16\mu\text{M}$ , S6 =  $20\mu\text{M}$ . Die tydsintervalle verteenwoordig medium onttrekkings wat elke 12 uur geneem is, waarvan die HBsAg produksie deur die selle by daardie tydsinterval bepaal is in ng HBsAg per milliliter groeimedium.

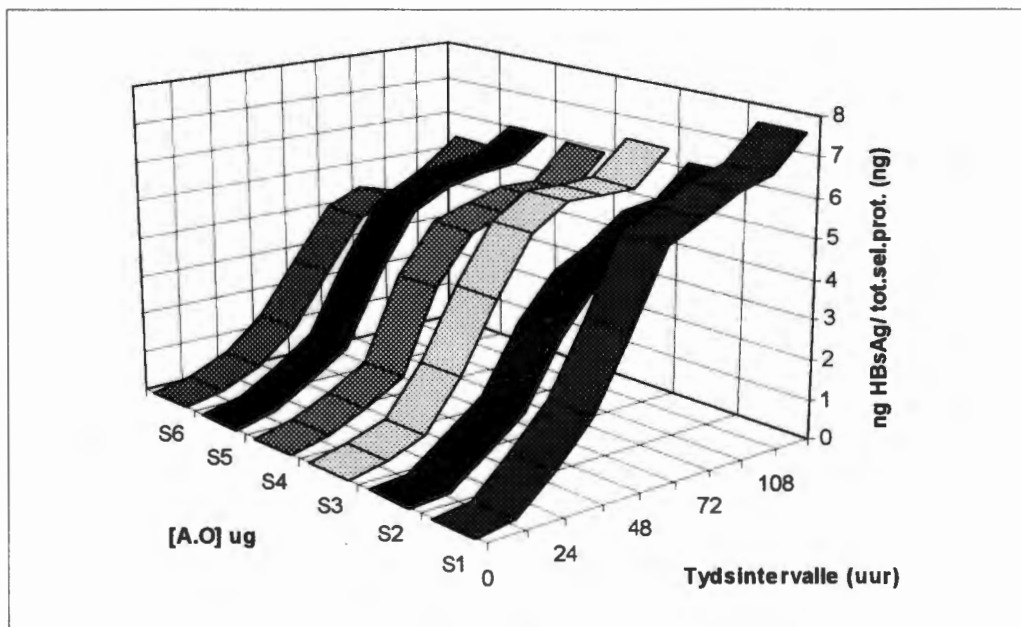
Ten einde hierdie resultaat te verkry, is die ELISA-waarde soos verkry vir elke konsentrasie antisin oligo, op 'n gegewe tydsinterval, met die ooreenstemmende sintillasietellingwaarde (d.i. die hoeveelheid gemerkte aminosure geïnkorporeer) gedeel, sodat die tempo van selgroei vir die duur van die studie in berekening gebring kon word.

Volgens hierdie resultate (Figuur 3.2) is dit duidelik dat die uitskeiding van die HBsAg deur die PLC/PRF/5 sellyn na behandeling met 'n reeks van toenemende antisin oligonukleotiedkonsentrasies in die eerste drie tydsintervalle redelik konstant gebly het. Tydens die vierde tydsinterval het die selle wat met al die A.O. konsentrasies behandel is, wel minder HBsAg geproduseer as die kontrole selle waarby geen A.O. gevoeg is nie. Die enigste uitsondering was die selle wat met  $8\mu\text{M}$  A.O. behandel was, wat meer HBsAg geproduseer het. In sekere gevalle is ook meer HBsAg geproduseer as in die kontrole selle. Hierdie verskynsel kan waargeneem word by alle tydsintervalle vanaf die vyfde tydsinterval vir A.O.-konsentrasies  $8\mu\text{M}$ ,  $12\mu\text{M}$  en  $16\mu\text{M}$ . Die  $8\mu\text{M}$  en  $20\mu\text{M}$  A.O. het egter vir die hele toetstydperk baie goed met die kontrole selle vergelyk.

Die resultate van Figuur 3.3 is verkry nadat soortgelyke berekenings uitgevoer is waar die ELISA waardes deur die totale sellulêre proteïen waardes gedeel is, sodat dat die aantal selle betrokke by die HBsAg-produksie in perspektief geplaas kan word ten opsigte van die inhibisie van die S-geen uitdrukking. Hierdie grafiek beeld die HBsAg-produksie van die selle uit deurdat die sellulêre aktiwiteit van die selle ook in ag geneem word sodat hierdie verwerking 'n uitspraak kan lewer oor die produksie van

HBsAg deur die selle, sodanig dat die groei wat plaasgevind het gedurende die verloop van die toets, ook in berekening gebring kon word.

Die resultate wat volgens hierdie berekening verkry is, dui duidelik op inhibisie van die HBsAg-uitskeiding deur die selle. Tydens al die tydsintervalle was die hoeveelheid HBsAg geproduseer deur die behandelde selle laer as die van die kontrole selle wat nie met A.O. behandel is nie. Tydens die eerste drie tydsintervalle (0 tot 36 uur) was die HBsAg- produksie vir al die selle relatief gelyk. Hierdie verwerking toon ook duidelik dat die HBsAg-produksie vir A.O.-konsentrasies  $8\mu\text{M}$ ,  $12\mu\text{M}$  en  $16\mu\text{M}$  hoër is as die vir A.O.-konsentrasies  $4\mu\text{M}$  en  $20\mu\text{M}$  vanaf die vyfde tydsinterval (60 uur), maar bly laer as die uitskeiding deur die kontrole selle .



**Figuur 3.3: :Hoeveelheid HBsAg uitgeskei in verhouding met die totale sellulêre proteïen produksie.**S1 tot S6 verteenwoordig die A.O. konsentrasie vanaf  $0\mu\text{M}$  tot  $20\mu\text{M}$ , waar S1 =  $0\mu\text{M}$ , S2 =  $4\mu\text{M}$ , S3 =  $8\mu\text{M}$ , S4 =  $12\mu\text{M}$ , S5 =  $16\mu\text{M}$ , S6 =  $20\mu\text{M}$ . Die tydsintervalle verteenwoordig medium onttrekkings wat elke 12 uur geneem is, waarvan die HBsAg produksie deur die selle by daardie tydsinterval bepaal is in ng HBsAg per mililiter groei medium. Die vlakke van HBsAg uitskeiding is bereken deur die totale hoeveelheid proteïen deur die selle geproduseer ook in berekening te bring

Tabel 3.2 gee 'n opsomming van die persentasie inhibisie soos in hierdie eksperimente waargeneem is. Die mate van inhibisie deur die onderskeie A.O.-konsentrasies is oor die tydperk onder beskouing, kan op grond van die tendens in drie groepe ingedeel word: Die eerste derde is die gemiddelde inhibisie vanaf 24 uur na transfeksie tot en met 48 uur na transfeksie. Die tweede derde is die gemiddelde inhibisie vanaf 60 uur na transfeksie tot en met 84 uur na transfeksie en die laaste derde is die gemiddelde inhibisie vanaf 96 uur na transfeksie tot en met 120 uur na transfeksie.

**Tabel 3.2 Mate van inhibisie deur die verskillende oligonukleotide**

$\mu\text{M}$ A.O.	Tydsgreep 1(24-48)	Tydsgreep 2(60-84)	Tydsgreep 3(96-120)
4	24.3	21.9	18.5
8	16.3	8.0	15.4
12	24.4	16.3	22.3
16	15.7	15.2	18.6
20	22.7	26.6	31.8

Hierdie tabel som die persentasie inhibisie soos verkry in hierdie studie op deur dit in drie tydsgrepe te verdeel. Getalle tussen hakies is uur.

Hierdie tabel gee 'n algehele oorsig oor die resultate en daaruit is dit duidelik dat die produksie van HBsAg deur die selle wel afgeneem het in die teenwoordigheid van die A.O. Dit is egter duidelik dat die mate van afname nie vir alle konsentrasies van die A.O. dieselfde was nie. Die  $4\mu\text{M}$  dui op die swakste mate van inhibisie en het die persentasie inhibisie afgeneem met verloop van tyd. By die  $8\mu\text{M}$  A.O. het die inhibisie feitlik konstant gebly op ongeveer 15%, behalwe vir 'n afname in die middelste tydsgreep. Die  $12\mu\text{M}$  A.O. het ook soos die  $4\mu\text{M}$  A.O. 'n afname in inhibisie tot gevolg gehad met verloop van tyd, maar die afname was nie so groot in omvang soos by die  $4\mu\text{M}$  A.O. nie. In die geval van die  $16\mu\text{M}$  en  $20\mu\text{M}$  A.O. is die enigste twee konsentrasies waar daar in noemenswaardige toename in persentasie inhibisie

waarneembaar is. Die inhibisie soos verkry by die 20 $\mu$ M A.O. dui op 'n toename van amper 8% vanaf die eerste tydsgreep tot die derde tydsgreep.

### **3.4. Samevatting**

Die resultate in hierdie hoofstuk beeld slegs die inhibisie verkry gedurende 'n kort tydsinterval naamlik 120 uur uit. Die rede hiervoor is dat die A.O. *in situ* slegs 'n beperpte tydperk stabiel is omdat degradasie heelwaarskynlik plaasvind. Hierdie tegniek is dus nie van veel waarde in in lewende sisteem nie.

Omdat relatief min inhibering van die HBsAg-produksie deur antisin oligonukleotiede verkry is, is die gebruik van 'a antisin uitdrukingsvektor ondersoek en word in die volgende hoofstuk beskryf.

## **HOOFSTUK 4**

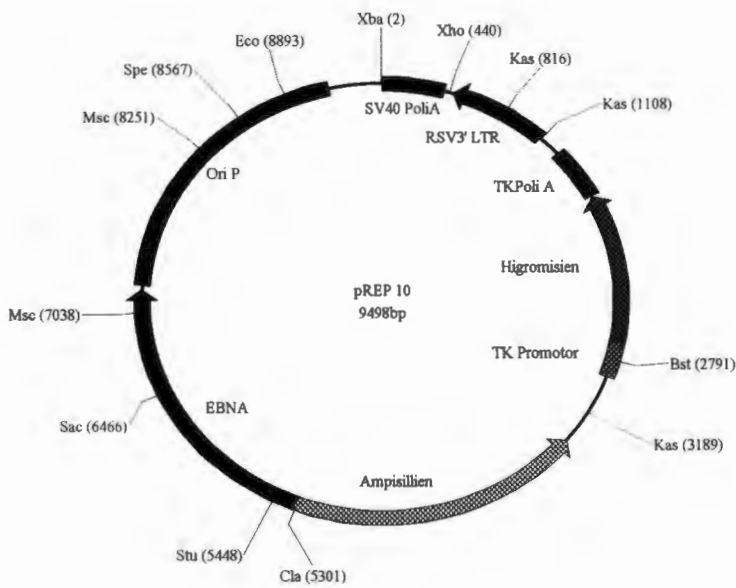
### **'n ONDERSOEK NA DIE GEBRUIK VAN 'n ANTISIN UITDRUKKINGSVEKTOR VIR DIE INHIBISIE VAN DIE S- ANTIGEEEN UITDRUKKING.**

#### **4.1 Inleiding**

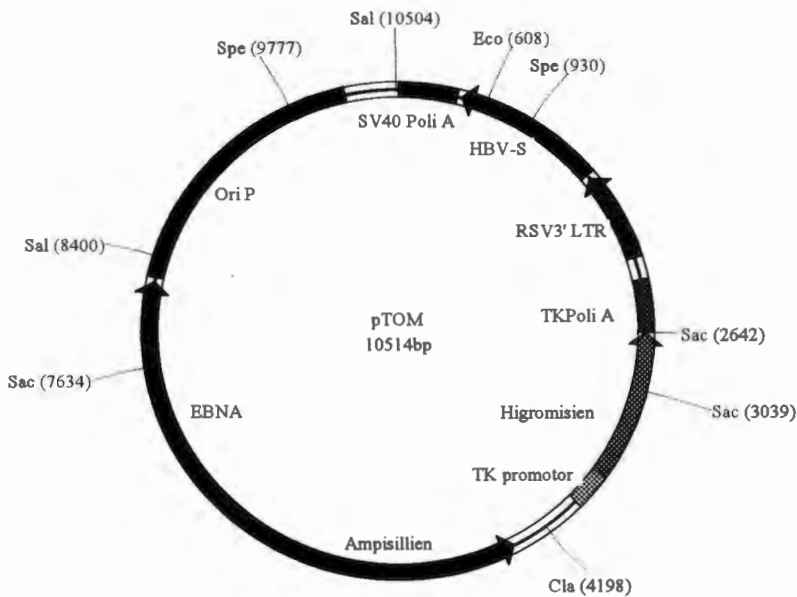
In hierdie deel van die studie is 'n antisingeoriënteerde uitdruktingsvektor gekonstrueer en gebruik ten einde inhibisie van die HBs-Ag uitdrukking te toets. 'n Episomaal-repliserende uitdruktingsvektor is met behulp van 'n geskikte oordragetegnisk na 'n viraal-geïnduseerde hepatosellulêre karsinomiese selyn oorgedra. Die totale proteienproduksie van die geselekteerde klone is bereken deur die totale hoeveelheid proteiene wat na afloop van die periode van behandeling geproduseer is, te bepaal. Die hoeveelheid antigeen wat geproduseer is, is gemonitor deur die groeimedium 49 dae na transfeksie te onttrek en met behulp van die ELISA-tegnisk te kwantifiseer.

#### **4.2 Die uitdruktingsvektor**

Die pREP 10 uitdruktingsvektor is van Invitrogen aangekoop. Hierdie vektor is deur die vervaardigers vanuit die Ebstein Barr-virus afgelei, sodanig dat dit episomaal repliserend is. Die eienskappe van hierdie vektor word in Figuur 4.1 weergegee.



**Figuur 4.1 'n Skematiese voorstelling van die pREP 10 vektor.** Die sirkelvormige DNA word uitgebeeld en sommige restriksie ensiensnitpunte word op die buiterand van die skema aangedui. Die gene van belang vir hierdie studie word aangedui en aan die binnerand van die sirkel word die gene benaam.



**Figuur 4.2 'n Skematiese voorstelling van die gekonstueerde pTOM plasmied.** Die sirkelvormige DNA word uitgebeeld en sommige restriksie ensiensnitpunte word op die buiterand van die skema aangedui. Die gene van belang in hierdie tudie word aangedui en is aan die binnerand van die sirkel benaam.

Eerstens bevat hierdie vektor 'n poli-adenileringsgeen afkomstig vanaf die SV 40-virus en ook 'n meervoudige kloneringspunt met restriksie-ensiemsnitpunte vir verskeie restriksie-ensieme. Dan volg 'n promotorgebied vir verhoogde geenuitdrukking. 'n Poli-adenileringsgebied vir die higromisiengene, TK poli-A, volg na die RSV-promotor, gevolg deur die higromisiengene. Hierdie gene maak dit moontlik om vir positiewe transfektante in soogdierselle te selekteer. Hierdie higromisiengene het ook sy eie promotor in die vorm van 'n TK-promotor. Ten einde replisering in prokariotiese selle moontlik te maak, is 'n ColE1-geen ingesluit. 'n Ampisilliengene is voorts ingesluit vir seleksie in prokariotiese selle. Die twee belangrikste gene volg na die ampisilliengene, naamlik die EBNA-1-geen en die OriP-geen. Beide hierdie gene is verantwoordelik vir die replisering en uitdrukking van hierdie vektor in soogdierselle.

### **4.3 Eksperimenteel**

#### **4.3.1 Klonering van die S-geen**

Die S-geen wat gekloneer is, is afkomstig van 'n pMAM-Neo-vektor wat hierdie geen huisves. Hierdie plasmied, pCOR313, is deur Strydom gekloneer (Strydom, 1992). Die pCOR313 bevat slegs 'n ampisilliengene, 'n soogdierselpromotor en die S-geen in die antisinoriëntasie en beslaan ongeveer 4.4 kb. Ten einde hierdie geen te isoleer, is die plasmied in *E coli* top 10-selle gekweek in die teenwoordigheid van ampisillien en is die plasmied volgens standaardmetodes geïsoleer (Maniatis 1982). Die geïsoleerde geen is gesuiwer en 'n konsentrasiebepaling is spektrofotometries gedoen. Voorts is die plasmied aan restriksie-ensiemvertering onderwerp, sodanig dat die geenfragment met behulp van Sall uit die vektor gesny is. Hierdie fragment is deur middel van

agarose-gelelektroforese van die plasmied geskei, waarna dit met 'n Qiagen "Gene Clean Kit" gesuiwer is (**Whitehead Scientific**, Kaapstad).

Die uitdruktingsvektor is onder dieselfde toestande as die pMAM-vektor in *E coli* top 10-selle gekweek, waarna die plasmied met behulp van 'n Qiaex "midi kit" vanuit die selle geïsoleer is (**Whitehead Scientific**, Kaapstad). 'n Konsentrasiebepaling van hierdie DNA is ook spektrofotometries gedoen.

Voorts is die uitdruktingsvektor pREP 10 aan restriksie-ensiemvertering onderwerp en met Xho1 behandel, wat die plasmied slegs eenkeer in die meervoudige kloneringsgebied sny. Die behandelde DNA is volgens die metode soos deur Maniatis beskryf (1982), met kalfdermdefosfatase behandel om dit te defosfateer. Na afloop van hierdie stap is die DNA uit die reaksiemengsel herwin deur dit in agarose te elektroforeer en met behulp van 'n Qiaex "Gene Clean Kit" te suiwer.

Ten einde 'n ligering van die geenfragment en die uitdruktingsvektor by optimale DNA-konsentrasies te doen, is die konsentrasie van die betrokke DNA-fragment met behulp van agarosegelelektroforese bepaal deur die intensiteit van die bande met die bekende DNA-konsentrasie te vergelyk. Die resultaat hiervan word in Figuur 4.2 weergegee.

Die hoeveelhede van die onderskeie DNA-komponente is soos volg bereken:

Vir ekwimolêre hoeveelhede van die komponente is:

Hoeveelheid geenfragment:

= Lengte van die fragment(bp)/Lengte van die vektor(bp) x konsentrasie van die vektor

$$= X \mu\text{l} \quad (4.3.1)$$

Hoeveelheid vektor:

= X ( $\mu\text{l}$ )/ Konsentrasie van die fragment x 2

$$= Y \mu\text{l} \quad (4.3.2)$$

'n Reaksiemengsel is in 'n Eppendorf-buis saamgestel wat die volgende bevat: die vektor (4.3.2), die geenfragment (4.3.1), Roberts-buffer, ligeringsbuffer en T-4-ligase. Die reaksiemengsel is vir vier uur by 21°C geïnkubeer. Vyf mikroliter van hierdie mengsel is aangewend vir die transformering van kompetente gasheerselle wat volgens die metode soos deur Vergeer beskryf, berei is (1988). Hierdie getransformeerde selle is vervolgens op groeimedium versprei en na inkubasie is die klone aan DNA-analise onderwerp.

Die DNA-analisemethode wat hier gebruik is, is 'n vinnige isolasie- en restriksieverteringsstegniek, genoem "Raps" (Vergeer 1988). Sestien kolonies is na inkubasie aan hierdie analise onderwerp en die analises is uitgevoer. Die restriksie-ensiem wat vir hierdie analise gebruik is, is SpeI (**Boehringer Mannheim** Randburg), omdat hierdie ensiem die uitdruktingsvektor en die geenfragment elk slegs eenkeer sny, sodanig dat 'n onderskeid getref kan word tussen die gewenste en verkeerde oriëntasies. Die fragmente wat tydens hierdie eksperiment verlang word, is onderskeidelik 8847 bp en 1667 bp groot en kan dus waargeneem word tydens agarosegelelektroforese. Die resultate van hierdie eksperimente word in Figure 4.3 en 4.4 weergegee. Uit hierdie

resultate was dit duidelik dat slegs kloon no 15 die plasmied bevat en dat die geen in die verlangde oriëntasie geligeer het.

Kloon nommer 15 is voorts grootskaals berei volgens die metode van Vergeer (1988), waarna die plasmied-DNA met behulp van 'n sesium-chloriedgradiënt, volgens standaardmetodes (Strydom 1992), geïsoleer is. Die konsentrasie van die verkrygte DNA is spektrofotometries bepaal en vir transfeksie voorberei.

#### **4.3.2 Transfeksie en seleksie van klone**

Die PLC/PRF/5-sellyn is volgens standaardmetodes soos in Afdeling 3.2.1 beskryf gekweek, totdat voldoende selle verkry is vir die analises soos in hierdie afdeling beskryf word.

Nadat voldoende selle gekweek is, is subkulture gemaak deur die selle in 'n Petri-bakkie met 'n deursnee van 55 mm (**Nuclon**, Denemarke) te verdeel, sodanig dat die bodem van die Petri-bakkie ongeveer sestig persent bedek was. Die res van die studie is in hierdie weefselkultuurplaat uitgevoer.

Die PLC/PRF/5-selle is na 'n periode van inkubasie getransfekteer en die transfeksie-mengsels is soos volg saamgestel:

Mengsel A is berei deur vir elke put 30 ml van die DOTAP-transfeksiereagens (**Boehringer Mannheim**, Randburg) aan te vul tot 100 ml met SVM in 'n gesilleerde Eppendorf-buis.

Mengsel B is berei deur die plasmied-DNA in SVM te verdun sodat 'n finale konsentrasie van 5µg/ml DNA verkry is

Mengsels A en B is bymekaargevoeg en liggies gemeng, waarna dit vir tien minute by kamertemperatuur geïnkubeer is. Die mengsels is in die Petri-bakkie gevoeg sodat die mengsel eweredig in die Petri-bakkie versprei is. Die Petri-bakkie is daarna vir twaalf uur by 37°C geïnkubeer, waarna alle medium onttrek en met seleksiemedium vervang is.

Hierdie seleksiemedium is saamgestel nadat 'n afsterwingskurwe met Higromisien B (**Boehringer Mannheim**, Randburg) gedoen is. Vir hierdie eksperiment is die weefselkultuur soos reeds beskryf, gekweek. Die subkulture is van hierdie kultuur berei en in ses gelyke hoeveelhede in 'n sesput weefselkultuurplaat geïnkubeer. Na 'n inkubasiëperiode van vier dae is die normale groeimedium met Higromisien B-bevattende groeimedium vervang. Die groeimedium in die eerste put het geen Higromisien B bevat nie. Die Higromisien B-inhoud van die groeimedium in die tweede put tot en met die sesde put het toegeneem in inkremente van 50µl/ml vanaf 250µl/ml tot 450µl/ml. Die geskikte seleksiekonsentrasie van die antibiotikum is die laagste konsentrasie waar alle selle na tien dae inkubasië onder normale toestande afgesterf het. Hierdie konsentrasie is as 350µl/ml medium bepaal.

Seleksie is voorts toegepas deur die getransfekteerde selle vir tien dae onder normale toestande in die teenwoordigheid van hierdie seleksiemedium te kweek. Na afloop van seleksie is twaalf klone afgetel met behulp van 'n gesteriliseerde selskraper en in 'n 24-

putplaat (Nuclon, Denemarke) gekweek. Hierdie klone is vir sewe weke onder normale toestande gekweek en die selle is verdeel wanneer nodig.

#### 4.4 Resultate

##### 4.4.1 Konstruksie van die antisin RNA-produiserende uitdrukkingsektor

'n Ligeringsmengsel is by optimale DNA-konsentrasies saamgestel en die ligering reaksie is volgens die kondisies soos deur De Vries beskryf uitgevoer. Die klone wat verkry is, is geanaliseer ten einde die oriëntasie van die geenfragment vas te stel. Die resultate wat verkry is deur die uitvoering van die vinnige karakterisering van plasmied DNA, oftewel "raps", kon 'n aanduiding gee van die kloon wat wel die plasmied in die korrekte oriëntasie opgeneem het. Die keuse van 'n geskikte restriksie-ensiem vir hierdie eksperiment is van kardinale belang. Volgens die vervaardiger se inligting was dit duidelik dat die restriksie-ensiem Spe 1 die beste resultaat so lewer. In Tabel 4.1 word 'n opsomming van die verlangde en ongewenste orientasies gegee.

**Tabel 4.1 Verlangde en ongewenste orientasies van die vektor.**

	Ensiemsnitpunte	Fragmentgroottes
Verlangde orientasie	930 : 9777	8847 : 1667
Ongewenste orientasie	1309 : 9205	9619 : 895

In kolom 2 van die tabel verskyn die punte in die geenvolgorde waar Spe1 die vektor sny om onderskeidelik 'n korrekte of verkeerde orientasie te identifiseer. Kolom 3 gee dienooreenkomstige fragmentgroottes aan wat met behulp van "raps" waargeneem kon word.

Volgens hierdie resultate verkry met behulp van die vinnige karakterisering van die klone, is dit duidelik dat kloon 15 wel die plasmied bevat en dat die geen in die verlangde orientasie geligter het omdat daar twee DNA-bande van ongeveer 8500 bp en 1700 bp onderskeidelik sigbaar was tydens elektroforese (vergelyk Afdeling 4.3.1).

#### **4.4.2 Transfeksie van die PLC/PRF/5-sellyn met die antisen RNA-produiserende uitdrukkingsvektor**

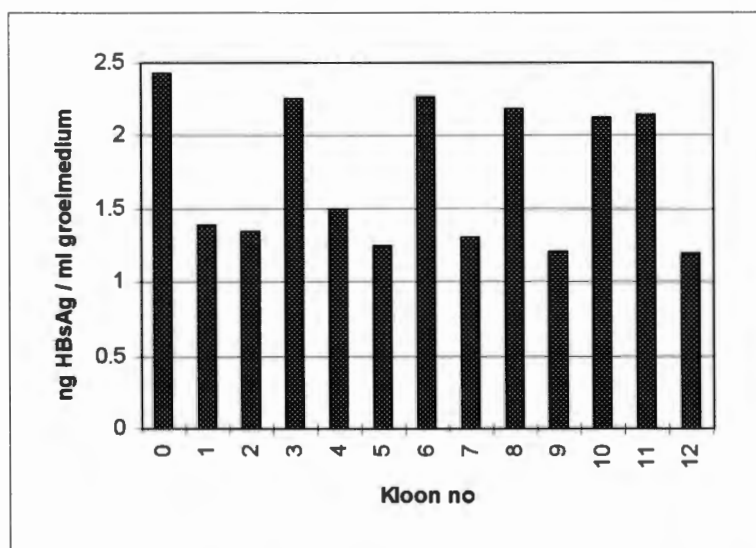
Ten einde die sukses al dan nie van die antisinkoderende konstruk te bepaal, moet die antisen RNA-produk getranskribeer word en komplementêr aan die sellulêre S-geen DNA-volgorde bind. Hierdie proses kan optimaal in die selsisteem gemonitor word. Die oordragstelsel wat hiervoor aangewend is, is soos in die geval van antisen oligonukleotiede, liposoom-gemedieerde transfeksie. Transfeksie van hierdie sellyn is soos in Afdeling 3.2.2 beskryf, gedoen, met die een verskil dat daar geen radioaktiefgemerkte isotope gebruik is nie.

Na afloop van die seleksieperiode wat op transfeksie volg, is die groeimedium soos normaalweg vervang en is die selle vir 49 dae in antibiotikumvrye medium geïnkubeer sodat die gesintetiseerde HBsAg in die groeimedium kon versamel. Hierdie medium is onttrek en aan ELISA-analise onderwerp. Die resultate verkry uit hierdie twee analyses is verwerk en word in Figuur 4.5 weergegee. Die ELISA-analise is uitgevoer volgens die spesifikasies van die vervaardiger van hierdie toets, (Sanofi, Johannesburg)<sup>11</sup>. Totale sellulêre proteïene is met behulp van die Bradford-reaksie gekwantifiseer soos in Hoofstuk 3. Die resultate

---

<sup>1</sup> Die ELISA-plate was nie meer verkrygbaar van die Natalse Bloedbank nie.

verkry uit hierdie analise is verwerk en word in Figure 4.5 en 4.6 weergegee.

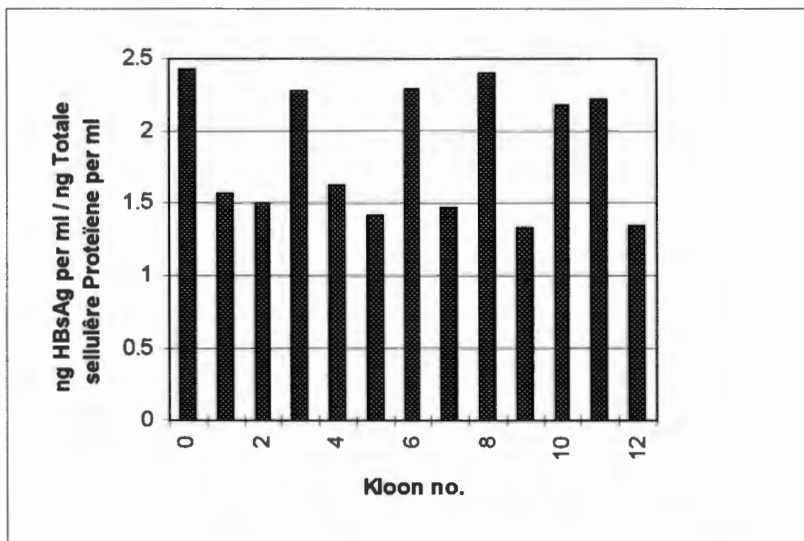


**Figuur 4.5 Inhibisie van die HBsAg-produksie uitgedruk as HBsAg-uitgeskei in die medium.** Op die x-as word die kloonnummer aangedui en op die y-as word die hoeveelheid HBsAg produksie in ng/ ml groeimedium aangedui.

Hierdie resultate (Figuur 4.5) vertoon met die eerste oogopslag baie goed, want by sewe van die twaalf klone (1,2,4,5,7,9 en 12) word minder HBsAg-produksie oor die inkubasiereperiode waargeneem. By die ander vyf klone (klone 3,6,8,10 en 11), kom ook inhibisie voor, maar heelwat minder. Die inhibisie wat in hierdie eksperiment verkry is, wissel tussen 6,8% (klone 3 en 6) en 50,6% (klone 9 en 12) met 'n gemiddelde inhibisie van 30,71%. Kloon 0 is die kontrole, bestaande uit ongetransfekteerde selle.

Aangesien die tydperk van kweking na transfeksie en seleksie lank was (49 dae), kan aangeneem word dat die getransfekteerde selle normaal kon funksioneer. Dus kan aangeneem word dat die moontlike nadelige effek van die transfeksietegniek nie meer

'n rol behoort te speel nie. Die aantal selle was wel laer as wat verwag is. Hierdie waarneming berus op die totale proteïenbepaling. Ten spyte hiervan word, wanneer laasgenoemde waardes in berekening gebring word, 'n soortgelyke mate van inhibisie waargeneem. Hierdie resultaat word in Figuur 4.6 weergegee.

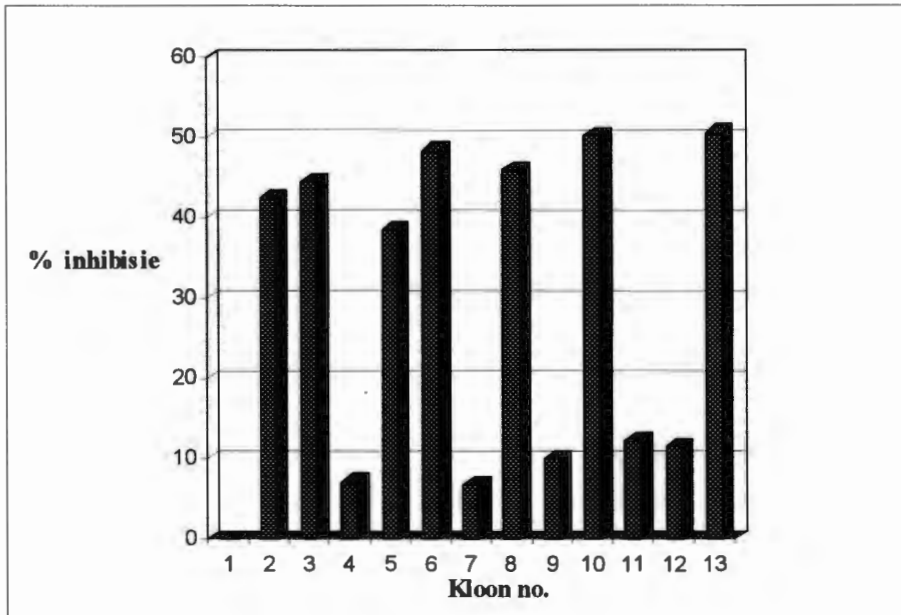


**Figuur 4.6 Inhibisie van die HBsAg-produksie uitgedruk in terme van die totale sellulêre proteïene.** Op die X-as word die kloonnummer aangedui en op die Y-as word die hoeveelheid HBsAg-produksie in ng/ml groeimedium aangedui.

Wanneer figure 4.5 en 4.6 vergelyk word, kan duidelik gesien word dat die hoeveelheid HBsAg-proteïene in die groeimedium verband hou met die totale hoeveelheid uitgeskeide sellulêre proteïene. Die uitskeiding van die HBsAg-proteïene is skaars noemenswaardig meer in Figuur 4.6 as in Figuur 4.5. Hierdie verskynsel kan moontlik toegeskryf word aan die metaboliese aktiwiteit van die weefselkultuur tydens inkubasie, want dit is moontlik dat die selle hoofsaaklik die HBsAg-proteïene uitgeskei het.

Om hierdie resultaat meer vergelykbaar te maak met die literatuur, is dit beter om dit

as persentasie inhibisie voor te stel. Hierdie berekening is gedoen deur die HBsAg-produksie van die kontroleselle as basis te neem, aangesien hierdie selle geen plasmied bevat het nie en gevolglik kon daar geen inhibisie plaasgevind het nie. Hierdie resultaat word in Figuur 4.7 weergegee.



Figuur 4.7 Persentasie inhibisie verkry vir die twaalf klone. Op die X-as word die kloonnummer aangedui en op die Y-as word die persentasie inhibisie van die HBsAg-produksie aangedui.

Volgens die resultate in Figuur 4.7 is dit duidelik dat daar 'n beduidende inhibisie van HBsAg-produksie by sekere klone voorgekom het. In die geval van klone 9 en 12 is die hoogste persentasie inhibisie verkry, naamlik. 50,35% en 50,63% onderskeidelik. Die ander klone wat inhibisie van meer as 40% vertoon, is klone 1,2,5 en 7. By klone 3,6,8,10 en 11 is inhibisie van  $\pm 10\%$  waargeneem.

#### 4.5 Samevatting

'n Uitdruktingsvektor wat die S-geen van die HBV-genoom in 'n antisinoriëntasie bevat, is berei sodat die RNA-produk komplementêr is aan die sellulêre viraal-gekodeerde DNA-fragment wat vir die HBsAg kodeer. Die mate van inhibering van die HBsAg-produksie is in getransfekteerde selle ondersoek. Twaalf klone is bekom, waarvan by ses 'n beduidende mate van inhibering ( $>49\%$ ) waargeneem is. Die klone wat getoets is, kan in twee groepe verdeel word, naamlik. waar lae inhibisie ( $\leq 10\%$ ) en waar tussen  $40\%$  -  $50\%$  inhibisie waargeneem is.

## HOOFSTUK 5

### BESPREKING

#### **5.1 Inleiding**

Soos in Hoofstuk 2 genoem, kan heptosellulêre karsinoma ontstaan as gevolg van oormatige uitskeiding van die HBsAg. Hierdie verskynsel het dan ook as motivering vir hierdie studie gedien, nl. om die moontlikheid te ondersoek om HBsAg-vorming te verminder en dus die kans vir die ontwikkeling van HCC te verlaag. Ten einde hierdie doelstelling te bereik, is die volgende benaderingswyse geformuleer:

- Die moontlikheid is ondersoek om die HBsAg-vorming met behulp van antisin tegnologie te verminder. Hiervoor is 'n geskikte HBsAg-produseerende sellyn met spesifieke antisin oligonukleotiede behandel (Hoofstuk 3) en met 'n antisin-vektor (Hoofstuk 4), onderskeidelik, getransformeer. Die mate van inhibering is bepaal deur die meting van die hoeveelheid HBsAg wat onder hierdie eksperimentele kondisies geproduseer is.

#### **5.2 Gebruik van antisin oligonukleotiede**

Ten einde inhibisie van die HBsAg-produksie te kon aantoon, is 'n geskikte toetsstelsel gekarakteriseer (vergelyk Figuur 3.1 baan 1). Hierdie toetsstelsel is 'n heptosellulêre sellyn wat die HBsAg-proteïen in oormaat produseer en in die groeimedium uitskei (Aspinal en Alexander 1988), en wat met 'n vyftien-meer antisin oligonukleotied komplementêr aan die inisiasiegebied van die S-geen behandel is. Die produksie van die HBsAg is oor 'n tydperk van vyf dae bepaal (Figuur 3.1). Die produksie van HBsAg is in verband gebring met die totale sellulêre aktiwiteit (Figuur 3.2) en die resultate wat so verkry is, oortuig dat hierdie 'n geskikte

toetsstelsel is. Gevolglik is die effek van verskillende konsentrasies van die antisin oligonukleotied op die uitskeiding van HBsAg getoets.

In Hoofstuk 3 is aangetoon dat daar wel 'n mate van inhibisie voorgekom het (Tabel 3.2). Die inhibisie het gewissel tussen 5,5% en 30,1% in vergelyking met die ongetransfekteerde selle se HBsAg-uitskeiding. Hierdie vlakke van inhibisie moet egter in perspektief geplaas word. Twee aspekte wat hier van belang is, is die effektiwiteit en die haalbaarheid van eksperimente waar van antisin oligonukleotide gebruik gemaak word om die geenuitdrukking te reguleer.

Uit die literatuur is dit duidelik dat dit moontlik is om die uitdrukking van die HBsAg te inhibeer deur van oligodeoksinukleotiede te gebruik. Juis omdat die Hepadna-virusse so 'n interessante en soms ingewikkelde repliseringswyses besit (Tiollais *et al.*, 1985; Ganem & Varmus 1987), is die tegnieke wat aangewend kan word vir die inhibisie van die uitdrukking van hierdie virale genome, baie beperk. Daarom was dit 'n noemenswaardige deurbraak toe daar in die vroeë tagtigerjare baie meer na die moontlikheid van komplementêre mRNA of antisinoligonukleotied (A.O.) behandeling van viraal-geïnfekteerde pasiënte gekyk is (Cohen 1989, 1992; Weintraub 1990).

Die vlakke van inhibisie wat tydens hierdie studie verkry is, het gewissel tussen 5,5% (Figuur 3.2) en 30,1% (Figuur 3.2) en die hoogste vlakke van inhibisie is na 24 uur verkry (vergeelyk tabel 3.2). Die inhibisie van die S-geen was afhanklik van die konsentrasie van die A.O. wat

gebruik is. Hierdie tendens is ook deur outeurs soos Nakazono waargeneem (Nakazono *et al.*, 1996). Na 36 uur het die persentasie inhibisie begin afneem tot ongeveer 19% (Figuur 3.2), waar dit vir die res van die inkubasieperiode gebly het. Hierdie verlaagde vlakke van inhibisie kan verklaar word deur die toksisiteit van die A.O (Cohen, 1991) op die selle in ag te neem. Volgens Cohen word die oligonukleotiede deur die nuklease-aktiwiteit in die selle en serum na mononukleotiede afgebreek. Cohen het aangetoon dat die vorming van mononukleotiede aanleiding kan gee tot moontlike toksisiteit van die A.O. vir die selle (Cohen, 1991).

'n Vergelyking van die resultate van hierdie studie met die literatuur wys dat die maksimum inhibisie wat waargeneem is, laag is in vergelyking met dié van Goodarzi *et al.*, (1990) en Reinis *et al.*, (1993). Hierdie verskynsel kan moontlik toegeskryf word aan die spesifisiteit van die A.O. Botha (1995) het aangetoon dat die keuse van die teiken vir inhibisie van kardinale belang is en dat die lengte van die A.O. wel 'n rol speel. Outeurs soos Wu en Wu (1992) het die probleem van spesifisiteit ondersoek en aangetoon dat inhibisie van HBV-gene nog meer spesifiek kan wees deur die oppervlakreseptore wat teenwoordig is op 'n geïnfecteerde lewenssel suksesvol te gebruik om die opname van die A.O. te verhoog (Wu *et al.*, 1992).

Die resultate van hierdie studie noop 'n mens egter om tot die gevolgtrekking te kom dat dit nie sinvol is om met hierdie tegniek soos dit hier ontwikkel is, voort te gaan nie. Die waargenome inhibisie was ook van korte duur en nie spesifiek genoeg nie. Dit kom duidelik na vore in Figuur 3.2, want die vlakke van HBsAg-uitskeiding deur die selle het 'n eenvormige patroon gevolg. Die HBsAg-proteïen is bykans altyd in verhouding tot die kontrole in laer

hoeveelhede uitgeskei en eers in die tweede helfte van die eksperiment (vergelyk Figuur 3.3) was daar 'n noemenswaardige verskil tussen die selle wat met die A.O. behandel is en die kontroleselle. 'n Moontlike verklaring hiervoor kan wees dat die A.O. nie lank genoeg en/of spesifiek genoeg was nie. Die hoë mate van toksisiteit van die materiaal (Cohen, 1989), wat in hierdie studie gebruik is, lei tot die gevolgtrekking dat die tegniek eerder nadelig is vir die selle as wat die HBsAg-proteïenproduksie verminder word deur die hibridisering van die A.O. met die virale DNA. Soos gesien uit die vlakke van inhibisie verkry in hierdie studie (Figure 3.1; 3.2; Tabel 3.2), is dit nie effektief genoeg om *in vivo* toe te pas nie.

Voortspruitend uit hierdie resultate het die tweede deel van hierdie ondersoek gevolg, naamlik, die konstruksie en transfeksie van 'n antisinuitdrukkingsvektor in dieselfde sellyn.

### **5.3 Gebruik van antisin plasmied**

Omdat die toetsstelsel wat in Hoofstuk 3 beskryf is, slegs gedeeltelik in die vraag na effektiewe inhibering van die HBsAg-proteïen beantwoord het, is 'n wysiging van daardie toets stelsel aangebring. In die eksperimente soos in Hoofstuk 4 beskryf, is dieselfde hepatosellulêre sellyn gebruik, maar in plaas van A.O.-behandeling, is 'n antisin-georiënteerde uitdrukkingsvektor in die selle getransfekteer. Die konstruksie van die uitdrukkingsvektor was die eerste stap in hierdie eksperiment. Die HBsAg-koderende geenfragment is in die regte oriëntasie gekloneer sodat 'n antisin-mRNA gesintetiseer sal word. Die produksie van die HBsAg is na 'n posttransfeksie-inkubasie periode van 49 dae bepaal (Figuur 4.5). Die HBsAg-produksie is ook in verband gebring met die sellulêre

aktiwiteit (Figuur 4.6). Die resultate wat verkry is, oortuig dat hierdie 'n goeie toetsstelsel is.

In Hoofstuk 4 is aangetoon dat daar verskillende vlakke van inhibisie verkry is (Figuur 4.7). Die inhibisie het gewissel tussen 6,76% en 50,63% relatief tot die ongetransfekteerde selle se HBsAg-proteïenuitskeiding. Die enkele kloon, kloon 4, wat meer HBsAg as die kontrole produseer, strook met die resultate soos deur Groenewald verkry (Groenewald, 1995). Hierdie outeur het aangetoon dat die PLC/PRF/5-selle meer HBsAg produseer na transfeksie met 'n antisenplasmied.

Sasaki het in 1993 aangetoon dat soogdiergene deur antisen DNA onderdruk kan word, deurdat hulle waargeneem het dat die aktiwiteit van sekere gene met tot 62% onderdruk kan word. Die gemiddelde inhibisie was egter ook ongeveer 50%, soos wat in hierdie studie verkry is (Sasaki *et al.*, 1993).

Nakazono en medewerkers het baie onlangs aangetoon dat daar na die transfeksie van selle, wat nie vooraf aan 'n antisen oligonukleotied blootgestel was nie, geen beduidende effek op die inhibisie van die uitdrukking van die S-antigeen waarneembaar was nie (Nakazono *et al.*, 1996). Dus sou die behandeling van hierdie selle met 'n A.O. kort voor transfeksie met die antisenplasmied die selle gunstig beïnvloed het sodat proteïenproduksie na transfeksie met die antisenplasmied heelwat verlaag sou wees.

Volgens Asangla en medewerkers word die uitdrukking van antisin-DNA beïnvloed deur die plek in die sel waar die plasmied geleë is (Asangla *et al.*, 1991). Hierdie aspek van die studie kon weens tyds- en finansiële faktore nie bepaal word nie. Dus kan daar slegs oor die invloed daarvan op die resultate bespiegel word, maar moet dit nogtans vermeld word, aangesien dit 'n onbepaalbare veranderlike is wat die resultate kon beïnvloed het.

Daar is egter sekere aspekte van rekombinante DNA-tegnologie wat normaalweg met 'n eksperiment soos hierdie geassosieer word en nie in hierdie studie aangespreek is nie. Hiervan is die kopiegetalbestemming van die onderskeie klone en die invloed van die promotors soos in Hoofstuk 4 genoem, die belangrikste. Beide hierdie aspekte is weens die omvang van die skripsie nie ondersoek nie. Dit is egter belangrik om te weet dat die resultate van die twee genoemde eksperimente wel die resultate soos in Hoofstuk 4 gegee, beter sou kon toelig. Dit sal ook insiggewend wees om die vlakke van HBsAg-uitdrukking op die tye tussen seleksie en die genoemde 49 dae-tydperk te kon bepaal. Daarom is dit belangrik om te noem dat die invloed van hierdie faktore in die toekoms ondersoek kan word.

Ter samevatting kan gesê word dat die ondersoek na die vermoë van hierdie plasmied om die HBsAg-produksie te inhibeer, 'n duidelike aanduiding is van die potensiaal van hierdie tegnologie. Voortspruitend uit hierdie werk is dit dus moontlik om, indien die toestande geoptimaliseer word, 'n antisin-georiënteerde plasmied te konstrueer wat genoegsame vlakke van inhibering kan bewerkstellig. Die resultate van hierdie ondersoek vergelyk goed met die resultate van ander outeurs (Hewison *et al.*, 1995; Kobayashi *et al.*, 1995).

Voorts lewer hierdie eksperimente 'n bydrae ten opsigte van die inhibering van viraal-gekodeerde proteïene oor 'n langer tydperk. Die probleem van toksisiteit, soos in Afdeling 5.2 beskryf, speel ook nie 'n rol in hierdie eksperiment nie, aangesien die resultate wat verkry is, afkomstig is van 'n later generasie selle as die selle wat getransfekteer is. Die inhibering van die sintese van proteïene kan dus as blywend van aard beskou word, aangesien die plasmied tydens selverdeling oorgedra word.

#### **5.4 Samevatting**

Ten einde uitspraak te lewer oor die sukses al dan nie van hierdie studie, moet daar eers na die doelstelling daarvan verwys word. In Hoofstuk 2 word dit duidelik gestel dat die doelstelling was om te bepaal in watter mate inhibisie van HBsAg-produksie verkry kan word deur van antisintegnologie gebruik te maak. Voorts moes bepaal word watter tegniek die beste inhibisie lewer. Aan die hand van die resultate soos in Hoofstukke 3 en 4 getoon, is dit duidelik dat die hoogste vlakke van inhibisie van die HBsAg 31% en 50% is.

Ten opsigte van die beste tegniek vir antisinbehandeling, is dit duidelik dat in die geval van antisinplasmied, die beste resultaat verkry is. Verder dui die feit dat inhibisie selfs na 'n tydperk van 49 dae nog gehandhaaf kon word, daarop dat die inhibisie permanent van aard is. Dit is egter teleurstellend dat die PLC/PRF/5-selle nie so goed groei na transfeksie met die antisinplasmied nie.

Dus kan met groot vrymoedigheid gestel word dat daar grootliks in die doelstelling van hierdie studie soos in Hoofstuk 2 gestel is, voldoen is en dat daar insiggewende resultate verkry is wat die basis lê vir verdere studie op hierdie gebied.

**Bylae 1****Onverwerkte Resultate****1. Antisin oilgonukleotiede**

Gemiddelde ELISA HBs-Ag		Tydsintervalle uur									
[A.O.]	(ng/ml)	0	12	24	36	48	60	72	96	108	120
0		0	0.99	6.9	13.79	25.61	38.42	41.37	44.33	46.3	52.21
4		0	0.89	6.88	12.81	26.6	35.46	39.4	45.31	46.28	53.19
8		0	1.8	4.93	14.78	28.57	40.39	45.31	45.31	45.31	52.2
12		0	1.93	5.92	10.84	29.57	40.37	43.34	45.33	45.29	53.21
16		0	1.91	6.79	11.83	26.58	38.47	42.4	44.31	45.32	50.24
20		0	1.89	5.94	13.83	26.62	39.43	43.21	40.38	45.33	52.19

C <sup>14</sup> tellings per minuut		Bradford totale sellulêre proteïene	
[A.O.]	t.p.m.	[A.O.]	(µg/ml)
0	7.015	0	6.91
4	7.249	4	8.595
8	5.889	8	8.171
12	6.003	12	8.957
16	5.674	16	8.324
20	6.507	20	8.762

## 2. Antisin uitdrukkingvector

Kloon	Gemiddelde ELISA HBsAg (ng/ml)	Bradford ( $\mu$ g/ml)	Inhibisie %
0	2.427	0.999	0
1	1.39345	0.886	42.5855
2	1.3477	0.899	44.47054
3	2.2541	0.987	7.124021
4	1.49325	0.921	38.47342
5	1.25235	0.886	48.39926
6	2.26285	0.989	6.763494
7	1.3102	0.886	46.01566
8	2.1844	0.911	9.99588
9	1.2049	0.901	50.35435
10	2.12925	0.974	12.26823
11	2.14725	0.965	11.52658
12	1.1981	0.888	50.63453

## **Bylae 2**

### **Plasmied volgorde**

prep10 Lengte: 9499

1 TCTAGAGTCG ACCGGTCATG GCTGCGCCCC GACACCCGCC AACACCCGCT  
51 GACGCGCCCT GACGGGCTTG TCTGCTCCCG GCATCCGCTT ACAGACAAGC  
101 TGTGACCGTC TCCGGGAGCT GCATGTGTCA GAGGTTTTCA CCGTCATCAC  
151 CGAAACGCGC GAGGCAGCCG GATCATAATC AGCCATACCA CATTGTAGA  
201 GGTTTTACTT GCTTTAAAAA ACCTCCCCAC CTCCCCCTGA ACCTGAAACA  
251 TAAAATGAAT GCAATTGTTG TTGTAACTT GTTTATTGCA GCTTATAATG  
301 GTTACAAATA AAGCAATAGC ATCACAAATT TCACAAATAA AGCATTTTTT  
351 TCACTGCATT CTAGTTGTGG TTTGTCCAAA CTCATCAATG TATCTTATCA  
401 TGTCTGGATC GGTACCAGCT GAAGCTTGCT AGCGGCCGCT CGAGGCCGGC  
451 AAGGCCGGAT CCGTACCCAG CTTGGAGGTG CACACCAATG TGGTGAATGG  
501 TCAAATGGCG TTTATTGTAT CGAGCTAGGC ACTTAAATAC AATTATCTCT  
551 GCAATGCGGA ATTCAGTGGT TCGTCCAATC CATGTCAGAC CTGTCTGTTG  
601 CCTTCCTAAT AAGGCACGAT CGTACCACCT TACTTCCACC AATCGGCATG  
651 CACGGTGCTT TTTCTCTCCT TGTAAGGCAT GTTGCTAACT CATCGTTACC  
701 ATGTTGCAAG ACTACAAGTG TATTGCATAA GACTACATTT CCCCTCCCT  
751 ATGCAAAAGC GAAACTACTA TATCCTGAGG GGA CTCCTAA CCGCGTACAA  
801 CCGAAGCCCC GCTGGGCGCC TAAACACACC CTAGTCCCCT CAGATACGCG  
851 TATATCTGGC CCGTACATCG CGAAGCAGCG CAAAACGCCT AACCCTAAGC

901 AGATTCTTCA TGCAATTGTC GGTCAAGCCT TGCCTTGTTG TAGCTTAAAT  
951 TTTGCTCGCG CACTACTCAG CGACCTCCAA CACACAAGCA GGGAGCAGAT  
1001 ACTGGCTTAA CTATGCGGCA GCAGAGCAGA TTGTA CTGAG AGTGCACCAT  
1051 ACAAGCTCAG GATCTGCGAT GATAAGCTGT CAAACATGAG AATTGGTCGA  
1101 CCACTGGGCG CCAGAAATCC GCGCGGTGGT TTTTGGGGGT CGGGGGTGTT  
1151 TGGCAGCCAC AGACGCCCGG TGTTCTGTGTC GCGCCAGTAC ATGCGGTCCA  
1201 TGCCCAGGCC ATCCAAAAAC CATGGGTCTG TCTGCTCAGT CCAGTCGTGG  
1251 ACCAGACCCC ACGCAACGCC CAAAATAATA ACCCCCACGA ACCATAAACC  
1301 ATTCCCCATG GGGGACCCCG TCCCTAACCC ACGGGGCCAG TGGCTATGGC  
1351 AGGGCCTGCC GCCCCGACGT TGGCTGCGAG CCCTGGGCCT TCACCCGAAC  
1401 TTGGGGGGTG GGGTGGGGAA AAGGAAGAAA CGCGGGCGTA TTGGCCCCAA  
1451 TGGGGTCTCG GTGGGGTATC GACAGAGTGC CAGCCCTGGG ACCGAACCCC  
1501 GCGTTTATGA ACAAACGACC CAACACCCGT GCGTTTTATT CTGTCTTTTT  
1551 ATTGCCGTCA TAGCGCGGGT TCCTTCCGGT ATTGTCTCCT TCCGTGTTTC  
1601 AGTTAGCCTC CCCCATCTCC CCTATTCCTT TGCCCTCGGA CGAGTGCTGG  
1651 GCGTTCGGTT TCCACTATCG GCGAGTACTT CTACACAGCC ATCGGTCCAG  
1701 ACGGCCGCGC TTCTGCGGGC GATTTGTGTA CGCCCGACAG TCCCGGCTCC  
1751 GGATCGGACG ATTGCGTCGC ATCGACCCTG CGCCCAAGCT GCATCATCGA  
1801 AATTGCCGTC AACCAAGCTC TGATAGAGTT GGTCAAGACC AATGCGGAGC

1851 ATATACGCC GGAGCCGCGG CGATCCTGCA AGCTCCGGAT GCCTCCGCTC  
1901 GAAGTAGCGC GTCTGCTGCT CCATACAAGC CAACCACGGC CTCCAGAAGA  
1951 AGATGTTGGC GACCTCGTAT TGGGAATCCC CGAACATCGC CTCGCTCCAG  
2001 TCAATGACCG CTGTTATGCG GCCATTGTCC GTCAGGACAT TGTTGGAGCC  
2051 GAAATCCGCG TGCACGAGGT GCCGGACTTC GGGGCAGTCC TCGGCCAAA  
2101 GCATCAGCTC ATCGAGAGCC TCGCGACGG ACGCACTGAC GGTGTCGTCC  
2151 ATCACAGTTT GCCAGTGATA CACATGGGGA TCAGCAATCG CGCATATGAA  
2201 ATCACGCCAT GTAGTGTATT GACCGATTCC TTGCGGTCCG AATGGGCCGA  
2251 ACCCGCTCGT CTGGCTAAGA TCGGCCGAG CGATCGCATC CATGGCCTCC  
2301 GCGACCGGCT GCAGAACAGC GGGCAGTTCG GTTTCAGGCA GGTCTTGCAA  
2351 CGTGACACCC TGTGCACGGC GGGAGATGCA ATAGGTCAGG CTCTCGCTGA  
2401 ATTCCCAAT GTCAAGCACT TCCGGAATCG GGAGCGCGGC CGATGCAAAG  
2451 TGCCGATAAA CATAACGATC TTTGTAGAAA CCATCGGCGC AGCTATTTAC  
2501 CCGCAGGACA TATCCACGCC CTCCTACATC GAAGCTGAAA GCACGAGATT  
2551 CTTCGCCCTC CGAGAGCTGC ATCAGGTCGG AGACGCTGTC GAACTTTTCG  
2601 ATCAGAACT TCTCGACAGA CGTCGCGGTG AGTTCAGGCT TTTTCATATC  
2651 TCATTGCCCG GGATCTGCGG CACGCTGTTG ACGCTGTAA GCGGGTCGCT  
2701 GCAGGGTCGC TCGGTGTTG AGGCCACACG CGTCACCTTA ATATGCGAAG  
2751 TGGACCTGGG ACCGCGCCGC CCCGACTGCA TCTGCGTGTT CGAATTCGCC

2801 AATGACAAGA CGCTGGGCGG GGTTCGTGTC ATCATAGAAC TAAAGACATG  
2851 CAAATATATT TCTTCCGGGG ACACCGCCAG CAAACGCGAG CAACGGGCCA  
2901 CGGGGATGAA GCAGGGCATG GCGGCCGACG CGCTGGGCTA CGTCTTGCTG  
2951 GCGTTCGCGA CGCGAGGCTG GATGGCCTTC CCCATTATGA TTCTTCTCGC  
3001 TTCCGGCGGC ATCGGGATGC CCGCGTTGCA GGCCATGCTG TCCAGGCAGG  
3051 TAGATGACGA CCATCAGGGA CAGCTTCAAG GATCGCTCGC GGCTCTTACC  
3101 AGCCTAACTT CGATCACTGG ACCGCTGATC GTCACGGCGA TTTATGCCGC  
3151 CTCGGCGAGC ACATGGAACG GGTGTCATG GATTGTAGGC GCCGCCCTAT  
3201 ACCTTGCTG CCTCCCCGCG TTGCGTCGCG GTGCATGGAG CCGGGCCACC  
3251 TCGACCTGAA TGGAAGCCGG CGGCACCTCG CTAACGGATT CACCACTCCA  
3301 AGAATTGGAG CCAATCAATT CTTGCGGAGA ACTGTGAATG CGCAAACCAA  
3351 CCCTTGGCAG AACATATCCA TCGCGTCCGC CATCTCCAGC AGCCGCACGC  
3401 GGCGCAGCAA AAGGCCAGGA ACCGTAAAAA GGCCGCGTTG CTGGCGTTTT  
3451 TCCATAGGCT CCGCCCCCT GACGAGCATC AAAAAATCG ACGCTCAAGT  
3501 CAGAGGTGGC GAAACCCGAC AGGACTATAA AGATACCAGG CGTTTCCCCC  
3551 TGGAAGCTCC CTCGTGCGCT CTCCTGTTCC GACCCTGCCG CTTACCGGAT  
3601 ACCTGTCCGC CTTTCTCCCT TCGGGAAGCG TGGCGCTTTC TCATAGCTCA  
3651 CGCTGTAGGT ATCTCAGTTC GGTGTAGGTC GTTCGCTCCA AGCTGGGCTG  
3701 TGTGCACGAA CCCCCGTTT AGCCCGACCG CTGCGCCTTA TCCGGTAACT

3751 ATCGTCTTGA GTCCAACCCG GTAAGACACG ACTTATCGCC ACTGGCAGCA  
3801 GCCACTGGTA ACAGGATTAG CAGAGCGAGG TATGTAGGCG GTGCTACAGA  
3851 GTTCTTGAAG TGGTGGCCTA ACTACGGCTA CACTAGAAGG ACAGTATTTG  
3901 GTATCTGCGC TCTGCTGAAG CCAGTTACCT TCGGAAAAAG AGTTGGTAGC  
3951 TCTTGATCCG GCAAACAAAC CACCGCTGGT AGCGGTGGTT TTTTGTGTTG  
4001 CAAGCAGCAG ATTACGCGCA GAAAAAAGG ATCTCAAGAA GATCCTTTGA  
4051 TCTTTTCTAC GGGGTCTGAC GCTCAGTGGA ACGAAACTC ACGTTAAGGG  
4101 ATTTTGGTCA TGAGATTATC AAAAAGGATC TTCACCTAGA TCCTTTTAAA  
4151 TTAAAAATGA AGTTTTAAAT CAATCTAAAG TATATATGAG TAAACTTGGT  
4201 CTGACAGTTA CCAATGCTTA ATCAGTGAGG CACCTATCTC AGCGATCTGT  
4251 CTATTCGTT CATCCATAGT TGCTGACTC CCCGTCGTGT AGATAACTAC  
4301 GATACGGGAG GGCTTACCAT CTGGCCCCAG TGCTGCAATG ATACCGCGAG  
4351 ACCCAGCTC ACCGGCTCCA GATTTATCAG CAATAAACCA GCCAGCCGGA  
4401 AGGGCCGAGC GCAGAAGTGG TCCTGCAACT TTATCCGCCT CCATCCAGTC  
4451 TATTAATTGT TGCCGGGAAG CTAGAGTAAG TAGTTCGCCA GTTAATAGTT  
4501 TGCGCAACGT TGTTGCCATT GCTGCAGGCA TCGTGGTGTC ACGCTCGTCG  
4551 TTTGGTATGG CTTCAATCAG CTCCGTTCC CAACGATCAA GGCGAGTTAC  
4601 ATGATCCCC ATGTTGTGCA AAAAAGCGGT TAGCTCCTTC GGTCTCCGA  
4651 TCGTTGTCAG AAGTAAGTTG GCCGCAGTGT TATCACTCAT GGTTATGGCA

4701 GCACTGCATA ATTCTCTTAC TGTCATGCCA TCCGTAAGAT GCTTTTCTGT  
4751 GACTGGTGAG TACTCAACCA AGTCATTCTG AGAATAGTGT ATGCGGCGAC  
4801 CGAGTTGCTC TTGCCCGGCG TCAACACGGG ATAATACCGC GCCACATAGC  
4851 AGAACTTTAA AAGTGCTCAT CATTGGAAAA CGTTCTTCGG GGCGAAAACT  
4901 CTCAAGGATC TTACCGCTGT TGAGATCCAG TTCGATGTAA CCCACTCGTG  
4951 CACCCAACTG ATCTTCAGCA TCTTTTACTT TCACCAGCGT TTCTGGGTGA  
5001 GCAAAAACAG GAAGGCAAAA TGCCGCAAAA AAGGGAATAA GGGCGACACG  
5051 GAAATGTTGA ATACTCATAC TCTTCCTTTT TCAATATTAT TGAAGCATTT  
5101 ATCAGGGTTA TTGTCTCATG AGCGGATACA TATTTGAATG TATTTAGAAA  
5151 AATAAACAAA TAGGGGTTCC GCGCACATTT CCCCAGAAAAG TGCCACCTGA  
5201 CGTCTAAGAA ACCATTATTA TCATGACATT AACCTATAAA AATAGGCGTA  
5251 TCACGAGGCC CTTTCGTCTT CAAGAATTCT CATGTTTGAC AGCTTATCAT  
5301 CGATAAGCTG ATCCTCACAG GCCGCACCCA GCTTTTCTTC CGTTGCCCCA  
5351 GTAGCATCTC TGTCTGGTGA CCTTGAAGAG GAAGAGGAGG GGTCCCGAGA  
5401 ATCCCATCC CTACCGTCCA GCAAAAAGGG GGACGAGGAA TTTGAGGCCT  
5451 GGCTTGAGGC TCAGGACGCA AATCTTGAGG ATGTTTCAGCG GGAGTTTTCC  
5501 GGGCTGCGAG TAATTGGTGA TGAGGACGAG GATGGTTCGG AGGATGGGGA  
5551 ATTTTCAGAC CTGGATCTGT CTGACAGCGA CCATGAAGGG GATGAGGGTG  
5601 GGGGGGCTGT TGGAGGGGGC AGGAGTCTGC ACTCCCTGTA TTCACTGAGC

5651 GTCGTCTAAT AAAGATGTCT ATTGATCTCT TTTAGTGTGA ATCATGTCTG  
5701 ACGAGGGGCC AGGTACAGGA CCTGGAAATG GCCTAGGAGA GAAGGGAGAC  
5751 ACATCTGGAC CAGAAGGCTC CGGCGGCAGT GGACCTCAA GAAGAGGGGG  
5801 TGATAACCAT GGACGAGGAC GGGGAAGAGG ACGAGGACGA GGAGGCGGAA  
5851 GACCAGGAGC CCCGGGCGGC TCAGGATCAG GGCCAAGACA TAGAGATGGT  
5901 GTCCGGAGAC CCCAAAAACG TCCAAGTTGC ATTGGCTGCA AAGGGACCCA  
5951 CGGTGGAACA GGAGCAGGAG CAGGAGCGGG AGGGGCAGGA GCAGGAGGGG  
6001 CAGGAGGGAG GCCGGGGTCG AGGAGGTAGT GGAGGCCGGG GTCGAGGAGG  
6051 TAGTGGAGGC CGCCGGGGTA GAGGACGTGA AAGAGCCAGG GGGGGAAGTC  
6101 GTGAAAGAGC CAGGGGGAGA GGTCTGGAC GTGGAGAAAA GAGGCCCAGG  
6151 AGTCCCAGTA GTCAGTCATC ATCATCCGGG TCTCCACCGC GCAGGCCCCC  
6201 TCCAGGTAGA AGGCCATTTT TCCACCCTGT AGGGGAAGCC GATTATTTTG  
6251 AATACCACCA AGAAGGTGGC CCAGATGGTG AGCCTGACGT GCCCCCGGGA  
6301 GCGATAGAGC AGGGCCCCGC AGATGACCCA GGAGAAGGCC CAAGCACTGG  
6351 ACCCCGGGGT CAGGGTGATG GAGGCAGGCG CAAAAAGGA GGGTGGTTTG  
6401 GAAAGCATCG TGGTCAAGGA GGTCCAACC CGAAATTTGA GAACATTGCA  
6451 GAAGGTTTAA GAGCTCTCCT GGCTAGGAGT CACGTAGAAA GGACTIONGA  
6501 CGAAGGAACT TGGGTCGCCG GTGTGTTTCGT ATATGGAGGT AGTAAGACCT  
6551 CCCTTTACAA CTAAGGCGA GGAAGTCCC TTGCTATTCC ACAATGTCGT

6601 CTTACACCAT TGAGTCGTCT CCCCTTTGGA ATGGCCCCTG GACCCGGCCC  
6651 ACAACCTGGC CCGCTAAGGG AGTCCATTGT CTGTTATTTT ATGGTCTTTT  
6701 TACAAACTCA TATATTTGCT GAGGTTTTGA AGGATGCGAT TAAGGACCTT  
6751 GTTATGACAA AGCCCGCTCC TACCTGCAAT ATCAGGGTGA CTGTGTGCAG  
6801 CTTTGACGAT GGAGTAGATT TGCCTCCCTG GTTCCACCT ATGGTGGAAG  
6851 GGGCTGCCGC GGAGGGTGAT GACGGAGATG ACGGAGATGA AGGAGGTGAT  
6901 GGAGATGAGG GTGAGGAAGG GCAGGAGTGA TGTAACCTGT TAGGAGACGC  
6951 CCTCAATCGT ATTAAAAGCC GTGTATTCCC CCGCACTAAA GAATAAATCC  
7001 CCAGTAGACA TCATGCGTGC TGTTGGTGTA TTTCTGGCCA TCTGTCTTGT  
7051 CACCATTTTC GTCCTCCCAA CATGGGGCAA TTGGGCATAC CCATGTTGTC  
7101 ACGTCACTCA GCTCCGCGCT CAACACCTTC TCGCGTTGGA AAACATTAGC  
7151 GACATTTACC TGGTGAGCAA TCAGACATGC GACGGCTTTA GCCTGGCCTC  
7201 CTAAATTCA CTAAGAATG GGAGCAACCA GCATGCAGGA AAAGGACAAG  
7251 CAGCGAAAAT TCACGCCCCC TTGGGAGGTG GCGGCATATG CAAAGGATAG  
7301 CACTCCCACT CTACTACTGG GTATCATATG CTGACTGTAT ATGCATGAGG  
7351 ATAGCATATG CTACCCGGAT ACAGATTAGG ATAGCATATA CTACCCAGAT  
7401 ATAGATTAGG ATAGCATATG CTACCCAGAT ATAGATTAGG ATAGCCTATG  
7451 CTACCCAGAT ATAAATTAGG ATAGCATATA CTACCCAGAT ATAGATTAGG  
7501 ATAGCATATG CTACCCAGAT ATAGATTAGG ATAGCCTATG CTACCCAGAT

7551 ATAGATTAGG ATAGCATATG CTACCCAGAT ATAGATTAGG ATAGCATATG  
7601 CTATCCAGAT ATTTGGGTAG TATATGCTAC CCAGATATAA ATTAGGATAG  
7651 CATATACTAC CCTAATCTCT ATTAGGATAG CATATGCTAC CCGGATACAG  
7701 ATTAGGATAG CATATACTAC CCAGATATAG ATTAGGATAG CATATGCTAC  
7751 CCAGATATAG ATTAGGATAG CCTATGCTAC CCAGATATAA ATTAGGATAG  
7801 CATATACTAC CCAGATATAG ATTAGGATAG CATATGCTAC CCAGATATAG  
7851 ATTAGGATAG CCTATGCTAC CCAGATATAG ATTAGGATAG CATATGCTAT  
7901 CCAGATATTT GGGTAGTATA TGCTACCCAT GGCAACATTA GCCCACCGTG  
7951 CTCTCAGCGA CCTCGTGAAT ATGAGGACCA ACAACCCTGT GCTTGGCGCT  
8001 CAGGCGCAAG TGTGTGTAAT TTGTCCTCCA GATCGCAGCA ATCGCGCCCC  
8051 TATCTTGGCC CGCCACCTA CTTATGCAGG TATTCCCCGG GTGCCATTA  
8101 GTGGTTTTGT GGGCAAGTGG TTTGACCGCA GTGGTTAGCG GGGTTACAAT  
8151 CAGCCAAGTT ATTACACCCT TATTTTACAG TCCAAAACCG CAGGGCGGCG  
8201 TGTGGGGGCT GACGCGTGCC CCCACTCCAC AATTTCAAAA AAAAGAGTGG  
8251 CCACTTGTCT TTGTTTATGG GCCCCATTGG CGTGGAGCCC CGTTTAATTT  
8301 TCGGGGGTGT TAGAGACAAC CAGTGGAGTC CGCTGCTGTC GGCCTCCACT  
8351 CTCTTTCCCC TTGTTACAAA TAGAGTGTA CAACATGGTT CACCTGTCTT  
8401 GGTCCCTGCC TGGGACACAT CTTAATAACC CCAGTATCAT ATTGCACTAG  
8451 GATTATGTGT TGCCCATAGC CATAAATTCG TGTGAGATGG ACATCCAGTC

8501 TTTACGGCTT GTCCCCACCC CATGGATTTT TATTGTAAA GATATTCAGA  
8551 ATGTTTCATT CCTACACTAG TATTTATTGC CCAAGGGGTT TGTGAGGGTT  
8601 ATATTGGTGT CATAGCACAA TGCCACCACT GAACCCCCG TCCAAATTTT  
8651 ATTCTGGGGG CGTCACCTGA AACCTTGTTT TCGAGCACCT CACATACACC  
8701 TTA CTGTTCA CAACTCAGCA GTTATTCTAT TAGCTAAACG AAGGAGAATG  
8751 AAGAAGCAGG CGAAGATTCA GGAGAGTTCA CTGCCCGCTC CTTGATCTTC  
8801 AGCCACTGCC CTTGTGACTA AAATGGTTCA CTACCCTCGT GGAATCCTGA  
8851 CCCCATGTAA ATAAAACCGT GACAGCTCAT GGGGTGGGAG ATATCGCTGT  
8901 TCCTTAGGAC CCTTTTACTA ACCCTAATTC GATAGCATAT GCTTCCCGTT  
8951 GGGTAACATA TGCTATTGAA TTAGGGTTAG TCTGGATAGT ATATACTACT  
9001 ACCCGGGAAG CATATGCTAC CCGTTTAGGG TTAACAAGGG GGCCTTATAA  
9051 ACACTATTGC TAATGCCCTC TTGAGGGTCC GCTTATCGGT AGCTACACAG  
9101 GCCCCTCTGA TTGACGTTGG TGTAGCCTCC CGTAGTCTTC CTGGGCCCT  
9151 GGGAGGTACA TGTCCTCCAG CATTGGTGTA AGAGCTTCAG CCAAGAGTTA  
9201 CACATAAAGG CAATGTTGTG TTGCAGTCCA CAGACTGCAA AGTCTGCTCC  
9251 AGGATGAAAG CCACTCAGTG TTGGCAAATG TGCACATCCA TTTATAAGGA  
9301 TGTCAACTAC AGTCAGAGAA CCCCTTTGTG TTTGGTCCCC CCCCGTGTCA  
9351 CATGTGGAAC AGGGCCAGT TGGCAAGTTG TACCAACCAA CTGAAGGGAT  
9401 TACATGCACT GCCCCGAATA CAAAACAAA GCGCTCCTCG TACCAGCGAA

9451 GAAGGGGCAG AGATGCCGTA GTCAGGTTTA GTTCGTCCGG CGGCGGGGC

S-geen volgorde

Pre-S1, pre-S2 en S-geen. Lengte: 1202

⇒preS1

1 ACAGCATGGGAGGTTGGTCA TCAAAACCTC GCAAAGGCAT GGGGACGAAT

51 CTTTCTGTTC CCAATCCTCT GGGATTCTTT CCCGATCATC AGTTGGACCC

101 TGCATTCCGA GCCAACTCAA ACAATCCAGA TTGGGACTTC AACCCCGTCA

151 AGGACGACTG GCCAGCAGCC AACCAAGTAG GAGTGGGAGC ATTCGGGCCA

201 AGGCTCACCC CTCCACACGG CGGTATTTTG GGGTGGAGCC CTCAGGCTCA

251 GGGCATATTG ACCACAGTGT CAACAATTCC TCCTCCTGCC TCCACCAATC

301 GGCAGTCAGG AAGGCAGCCT ACTCCCATCT CTCCACCTCT AAGAGACAGT

⇒preS2

351 CATCCTCAGG CCATGCAGTG GAATTCCACT GCCTTCCACC AAACCTCTGCA

401 GGATCCCAGA GTCAGGGGTC TTATCTTCCT GCTGGTGGCT CCAGTTCAGG

451 AACAGTAAAC CCTGCTCCGA ATATTGCCTC TCACATCTCG TCAATCTCCG

⇒S

501 CGAGGACTGG GGACCCTGTG ACGAACATGGAGAACATCAC ATCAGGATTC

551 CTAGGACCCC TGCTCGTGTT ACAGGCGGGG TTTTCTTGT TGACAAGAAT

601 CCTCACAATA CCGCAGAGTC TAGACTCGTG GTGGACTTCT CTCAATTTTC

651 TAGGGGGATC TCCCGTGTGT CTTGGCCAAA ATTCGCAGTC CCCAACCTCC

701 AATCACTCAC CAACCTCCTG TCCTCCAATT TGTCTGGTT ATCGCTGGAT

751 GTGTCTGCGG CGTTTTATCA TATTCCTCTT CATCCTGCTG CTATGCCTCA

801 TCTTCTTATT GGTTCTTCTG GATTATCAAG GTATGTTGCC CGTTTGCCT

851 CTAATTCCAG GATCAACAAC AACCAGTACG GGACCATGCA AAACCTGCAC  
901 GACTCCTGCT CAAGGCAACT CTATGTTTCC CTCATGTTGC TGTACAAAAC  
951 CTACGGATGG AAATTGCACC TGTATTCCCA TCCCATCGTC CTGGGCTTTC  
1001 GCAAAATACC TATGGGAGTG GGCCTCAGTC CGTTTCTCTT GGCTCAGTTT  
1051 ACTAGTGCCA TTTGTTCAAGT GGTTCGTAGG GCTTTCCCCC ACTGTTTGGC  
1101 TTTCAGCTAT ATGGATGATG TGGTATTGGG GGCCAAGTCT GTACAGCATC  
1151 GTGAGTCCCT TTATACCGCT GTTACCAATT TTCTTTTGTC TCTGGGTATA  
    ↓S-terminasie  
1201 CATTTAAACC

## Afkortingslys

°C	grade celcius
μCi	mikro-Curie
μCi/ml	mikro-Curie per milliter
μg/μl	mikrogram per mikroliter
μl	mikroliter
μM	mikromolêr
[A.O.]	konsentrasie antisin oligonukleotied
AAA	meervoudige adenileringsvolgorde
A	adenien
A.O.	antisin oligonukleotied
ATG	inisiasekodon
BSA	beeserumalbumien
bp	basepaar
C	sitosien
<sup>14</sup> C	radioaktiewe koolstof (atoom massa van 14)
CaCl <sub>2</sub>	kalsiumchloried
CaPO <sub>4</sub>	kalsiumfofaat
CHO	chinese marmot ovarium
cm <sup>2</sup>	kubieke sentimeter
CO <sub>2</sub>	koolstofdiksied
ddH <sub>2</sub> O	dubbel gedistilleerde water (gedeïoniseerde hoogsuiwer water )
DMEM	Eagle medium soos gewysig deur Dulbecco.
DMSO	dimetielsulfoksied (Me <sub>2</sub> SO)
DNA	deoksieribonukleïensuur
DOTAP	N-[1-(2,3-Dioleoieloksi)propiel]-N,N,N-trimietielammoniummetielsulfaat
DR	direkte herhalingsvolgorde
dsDNA	dubbelstring deoksieribonukleïensuur
EDTA	etileendiamientetra-asynsuur
ELISA	ensiemgekoppelde immuno-affiniteitstoets
esDNA	enkelstring deoksiribonukleïensuur
esRNA	enkelstring ribonukleïensuur
EBNA	Ebstein Bahr virus repliserings geenvolgordes
G	guanien
GC	guanien-sitosien
g/mol	gram per mol
g	gram
HBcAg	Hepatitis B kernatigteen
HBeAg	Hepatitis B suplimentêre antigeen
HBsAg	Hepatitis B oppervlaksantigeen

HBV	Hepatitis B-virus
HCC	hepatosellulêre karsinoom
HEPES	N-2-hidroksiëtielpiperazien-N'-2-etaansulfoonsuur
kb	kilobase
LTR	lang terminale herhalingsvolgorde
M	molêr
MEM	minimaal noodsaaklike medium
MIV	mens-immunodefekvirus
ml	milliliter
mM	millimolêr
mRNA	boodskapper ribonukleïensuur
NaCl	natriumchloried
ng	nanogram
NaOH	natriumhidroksied
OH	hidroksiel
ORF	oopleesraam
P	fosfaat
PBS	fosfaat gebufferde soutoplossing
pre-mRNA	voorvoerder ribonukleïensuur
PLC/PRF/5	hepatosellulêre karsinoma sellyn
poli A	meervoudige Adenileringsvolgorde
Raps	vinnige analiese metode
RNA	ribonukleïensuur
RSV	rous sarkoma virus
SV40	sarkoma virus
SVM	serumvrye medium
T	timien
TCA	trichloorasynsuur
TK	timidien kinase
t.p.m	tellings per minuut
Tris	tris-(hidroksiemetiel)-aminometaan
TST	tris-natrium-Tween 20
U	urasiel

## **LITERATUURVERWYSINGS**

Alexander, J.J., Bey, E.M., Geddes, E.W., & Lecatsas, G. 1976. Establishment of a continuously growing cell line from primary carcinoma of the liver. **South African Medical Journal** 50: 2124 - 2128.

Asangla, A.O., Erickson, R.P., Bevelacqua, A., & Karolyi, J. 1991. Antisense inhibition of  $\beta$ -Glucuronidase expression in preimplantation mouse embryos: A comparison of transgenes and oligonucleotides. **Antisense Research and Development** 1: 1-10.

Aspinall, S. & Alexander, J.J. 1988. A comparison of the expression of hepatitis B virus S and C gene products amongst several cell model systems. **Viral Hepatitis and Liver Disease**: 351 - 354.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., & Struhl, K. 1989. eds. **Current Protocols in Molecular Biology**.

Beasley, R.P. 1982. Hepatitis B Virus as the etiological agent in hepatocellular carcinoma - epidemiologic considerations. **Hepatology**. 2: 21-26.

Blumberg, W.S. & Lutwick, L.J. 1965. A "new" antigen in leukemia sera. **American Medical Association** 191: 101 - 106.

Botha, M. 1995. Die potensiele terapeutiese gebruik van anti-sin oligonukleotiede vir die inhibering van die hepatitis B oppervlaksantigeen. **M Sc verhandeling**. PU vir CHO.

Brown, J.L., Carman, W.F. & Thomas, H.C. 1990. The hepatitis B virus. **Bailliere's Clinical Gastroenterology**. 4(3): 721-747.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72: 248 - 254.

Butler, M. 1991. The characteristics and growth of cultured cells. (In: **Mamalian cell biotechnology - A practical approach**, M. Butler ed. Oxford University Press. New York. 1 - 23.)

Caruthers, M.H., Brill, W.K., Grandas, A., Ma, Y.X., Nielsen, J & Tang J.Y. 1989. Synthesis of oligodeoxynucleoside phosphorodithioates. **Nucleic Acids Symposium Series (England)** 21, 119 - 120.

Chisari, F.V., Klopchin, K., Pasquinelli, C., Dunsford, H.A., Sell, S., Pinkert, C.A., Brinster, L. & Palmiter, R.D. 1989. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. **Cell** 59: 1145 - 1156.

Cohen, J.S. 1989. Designing antisense oligonucleotides as pharmaceutical agents. **Trends in Pharmaceutical Science.**

10: 435-437.

Cohen, J.S. 1991. Oligonucleotides as therapeutic agents. **Pharmacological therapeutics.** 52: 211-225.

Cohen, J.S. 1992. Oligonucleotide therapeutics. **Trends in Biotechnology.** 10:87-90.

Crovati, P. 1995. Epidemiology of hepatitis B in Italy. **Vaccine.** 13 Supplement 1: S26-S30.

Dane, D.S., Cameron, C.H. & Briggs, M. 1970. Virus-like particles in serum of patients with Australian-antigen associated Hepatitis. **Lancet** 1: 695 - 698.

Departement van Gesondheid. 1996. Tables of notifiable conditions. **Epidemiological Comments.** 23.1.

De Vries, W.N. 1995. A new trans-acting transcriptional factor binding to sequences in regulatory regions of the human pro- $\alpha$ 1 (I) collagen gene. **Phd Tesis.** PU vir CHO.

Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. & Danielson, M. 1987. Lipofection: A highly efficient,

lipid-mediated DNA-transfection procedure. **National Academy of Science, Proceedings** 84: 7413 - 7417.

Fraley, R. & Subramani, S., 1980. Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells. **Journal of Biological Chemistry** 255: 10431 - 10435.

Gabizon, A., Huberty, J., Lapez, N., Straubin, R.M., Price, D. & Papadopoulos, D. 1987. Tailoring of liposomes for *in vivo* targeting - Reduced liver uptake and enhanced accumulation in tumors. **Proceedings of the American Association of Cancer Research**. 28,420.

Ganem, D. & Varmus, H.E. 1987. The molecular biology of the hepatitis B viruses. **Annual Review of Biochemistry**. 56, 651-693.

Gerlich, W.H. & Heerman, K-H., 1990. Functions of hepatitis B virus. Proteins and virus assembly. (In: **Viral Hepatitis and Liver disease**, F.B. Hollinger, S.M. Lemon, H.S. Margolis, eds. Williams & Williams. Baltimore. 121 - 134.)

Goddard, J. 1988. Hepatitis B infection in the South African context. **Nursing R.S.A. Verpleging**, 3 (1): 15 - 16.

Goodarzi, G., Gross, S.C., Tewari, A. & Watebe, K. 1990. Antisense oligodeoxiribonucleotides inhibit the expression of the gene for hepatitis B virus surface antigen. **Journal of General Virology** 71: 3021 -3025.

Goudeau, A. & The European Regional Study Group. 1990. Epidemiology and eradication strategy for hepatitis B in Europe. **Vaccine** 8: s113 - s115.

Groenewald, J.H. 1995. Geteikende inhibisie van Hepatitis B virus geenuitdrukking. **M Sc verhandeling**. PU vir CHO.

Hewson, M., Dabrowski, M., Vadher, S., Faulkner, L., Cockerill, F.J., Brickell, P.M., O'Riordan, J.L., & Katz, D.R., 1996. Antisense inhibition of vitamin D receptor expression induces apoptosis in monoblastoid U937 cells. **Journal of Immunology**. 156 (11): 4391 - 400.

Hsia, C.C., Kleiner, D.E.jr., Axiotis, C.A., Di Bisceglie, A., Nomura, A.M., Stemmermann, G.N. & Tabor, E. 1992. Mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma: roles of hepatitis B virus and aflatoxin contamination in the diet. **Journal of the National Cancer Institute**. 84(21): 1638 - 1641.

Kiire, C.F. 1996. The epidemiology and prophylaxis of hepatitis B in sub-Saharan Africa: a view from tropical and subtropical Africa. **Gut**. 38 supplement 2: S2 - S12.

Kobayashi, M., Yamauchi, Y., Yamaguchi, K., & Tanaka, A. 1995. Transient expression assay for antisense RNA's using episomal replication of plasmids: effective reduction of retinoblastoma gene (Rb-1) product by its antisense RNA complimentary to 3'-untranslated region. **Antisense Research Developments**. 5(2): 141 - 148.

Koch, I., Hofschneider, P.H., & Koshy, R. 1989. Expression of a hepatitis b virus transcript containing fused mitochondrial-like domains in human hepatoma cells. **Virology**. 170: 591 - 594.

Korbra, B.E., & Gerin, J.L. 1995. Antisenseoligonucleotides are effective inhibitors of hepatitis B virus replication *in vitro*. **Antiviral Research**. 28(3): 225 - 242.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J.1982. **Molecular cloning - A laboratory manual**. Cold Spring Harbour Laboratory press. VSA.

Mannino, R.J. & Gould-Fogerite, S. 1988. Liposome mediated gene transfer. **BioTechniques** 6 (7): 682 - 690.

Marion, P.C., Salazar, F.H., Alexander, J.J. & Robinson, W.S. 1980. Polypeptides of hepatitis B virus surface antigen produced by a Hepatoma cell line. **Journal of Virology** 33: 795 - 802.

Milich, D.R., Jones, J., Hughes, J. & Maruyama, T. 1994. Hepatitis B virus infection, the immune response and hepatocellular carcinoma. **Ciba Foundation Symposium**. 187:113-129, 129-131.

Nakazono, K., Ito, Y., Wu, C.H. & Wu, G.Y., 1996. Inhibition of hepatitis B Virus replication by targeted pretreatment of complexed antisense DNA *in vitro*. **Hepatology**. 23:1297-1303.

Offensperger, W.B., Blum, H.E., & Gerok, W. 1995. Therapy of hepadnavirus infection using antisense oligonucleotides. **Intervirolgy**. 38 91 0: 113 - 119.

Reinis, M., Reisinova, M., Kock, E. & Hlozaneck, I. 1993. Inhibition of hepatitis B virus surface gene expression by antisense oligodeoxynucleotides in a human hepatoma cell line. **Folia Biologica** 39: 262 - 269.

Robinson, W.S., Clayton, D.A., Greenman, R.L. 1974. DNA of a human Hepatitis B candidate. **Journal of Virology**. 14:384-391.

Robinson, W.S. 1994. Molecular events in the pathogenesis of hepadnavirus-associated hepatocellular carcinoma. **Annual Reviews in Medicine**. 45: 297 - 323.

Rogler, C.E., & Chisari, F.V. 1992. Cellular and molecular mechanisms of hepatocarcinogenesis. **Seminars in Liver Disease**. 12(3): 265 - 278.

Saski, K., Zak, O. & Aisen, P. 1993. Antisense suppression of transferrin receptor gene expression in a human hepatoma Cell(HUH-7) line. **American Journal of Hematology**. 42(1):74-80.

Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., Hofschneider, P.H. 1982. Liposome as gene carriers efficient transformation of mouse L cells by thymidine kinase gene. **Science** 215:166-168.

Schlicht, H.J., & Schaller, H. 1989. Core antigen of human hepatitis B virus is expressed on the cell surface. **Journal of Virology**. 63: 5399 - 5404.

Schoub, B.D. 1992. Estimations of the total size of the HIV and hepatitis B epidemics in South Africa. **South African Medical Journal** 81: 63 - 66.

Strydom, P.C.J. 1992. Uitdrukking van hepatitis B virus (subtype ADW2) oppervlaksantigene. **M.Sc. verhandeling** PU vir CHO. Potchefstroom.

Tiollais, P. Pourcel, C. & Dejean, A. 1985. The Hepatitis B virus. **Nature** 317: 489 - 495.

Toukan, A. & The middle East Regional Study Group. 1990. Strategy for the controle of Hepatitis B virus infection in the Middle East and North Africa. **Vaccine** 8, supplement.

Toukan, A. U. Hepatitis B in the Middle East: aspects of epidemiology and liver disease after infection. **Gut**. 38 suplement 2: S2 - S4.

Twu , J.S., Lai, M.Y., Chen, D.S. & Robinson W.S. 1993. Activation of protooncogene c-jun by the X protein of hepatitis B virus. **Virology**. 192(1): 346 - 350.

Vergeer, W.P. 1988. Transfeksie van soogdiersellyne met pendelvektore vir die bestudering van transkripsionele reguleringsvolgordes in die mensgeen vir pro- $\alpha$ 1 (I) kollageen. **M Sc Tesis, Pu vir CHO.**

Weintraub, H. 1990. Antisense RNA and DNA. **Scientific American.** January: 34 - 40.

Wu , G.Y. & Wu, C.H. 1992. Specific inhibition of hepatitis B viral gene exprssion *in vitro* by targeted antisense oligonucleotides. **Journal of Biological Chemistry.** 267(18): 12436 - 12439.

Yaginuma K, Kobayashi H, Kobayashi M, Morishima T, Matsuyama K, & Koike K. 1987. Multiple integration site of hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinoma and active hepatitis tissues from children. **Journal of Virology.** 61(6):1808 - 1813.

## **Bedankings**

Hierdie studie sou nie moontlik gewees het sonder die hulp van 'n aantal persone nie.

Graag spreek ek my opregte dank uit teenoor:

- My Hemelse Vader vir die vermoëns en geleentheid aan my toevertrou.
- Dr. Mimi de Vries vir haar leiding en ondersteuning tydens die moeilikste fase.
- Prof. Piet Pretorius vir die leiding en hulp tydens die voltooiing van die studie.
- Die Biotech span vir hulle ondersteuning, hulp en bystand.
- My vriende vir al hul belangstelling, veral Linelle vir al jou geduld en bemoediging.
- My moeder en familie vir hul liefde, ondersteuning en bemoediging.
- Mev. Elsa Brand vir die taalversorging.
- Die SNO Biotegnologie-program vir die finansiële steun soos toegeken aan Dr. W.J. de Wet.
- My employer for his patience during the completion of this dissertation.