



Bakulowirusy w biotechnologii

Anna Goździcka-Józefiak^{1,2}, Anna Olejnik²

¹Zakład Wirusologii Molekularnej, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

²Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza, Poznań

Baculovirus in biotechnology

Summary

Baculoviruses are a diverse group of large viruses with covalently close double-stranded DNA genomes of 80-200 kilobasepairs (kbp). Baculoviruses are pathogenic for invertebrates, primarily for insects. Baculovirus particles exist in two biochemically and morphologically distinct forms, an extracellular, nonoccluded (NOV), budded virus (BV) and an occluded form (OV), which are known as polyhedral derived viruses (PDV).

Baculovirus genes expression is divided into three basic phases: early (E), late (L) and very late (VL). Briefly, these phases correspond biologically to: (E) reprogramming the cell for virus replication, (L) producing BV and (VL) producing OV. The several baculovirus genes are nonessential for virus replication, and their lack in viral genome does not have any effect on forming of infectious virus particles in the tissue culture. Some of the gene expression is driven by very strong late promoters (polyhedrin and p10) and their loci are ideal cloning sites for genes of heterologous proteins.

The baculovirus expression vector system is the powerful tool for production of foreign proteins. One of the major advantages of the insect cell/baculovirus system over bacterial and mammalian systems is a very high expression of recombinant proteins, which is in many cases, antigenically, immunogenically and functionally similar to their native counterparts.

Key words:

baculovirus, baculovirus genes expression, recombinant proteins, biopesticides.

Adres do korespondencji

Anna Goździcka-Józefiak,
Zakład Wirusologii
Molekularnej,
Uniwersytet
im. Adama Mickiewicza,
ul. Międzychodzka 5,
60-371 Poznań.

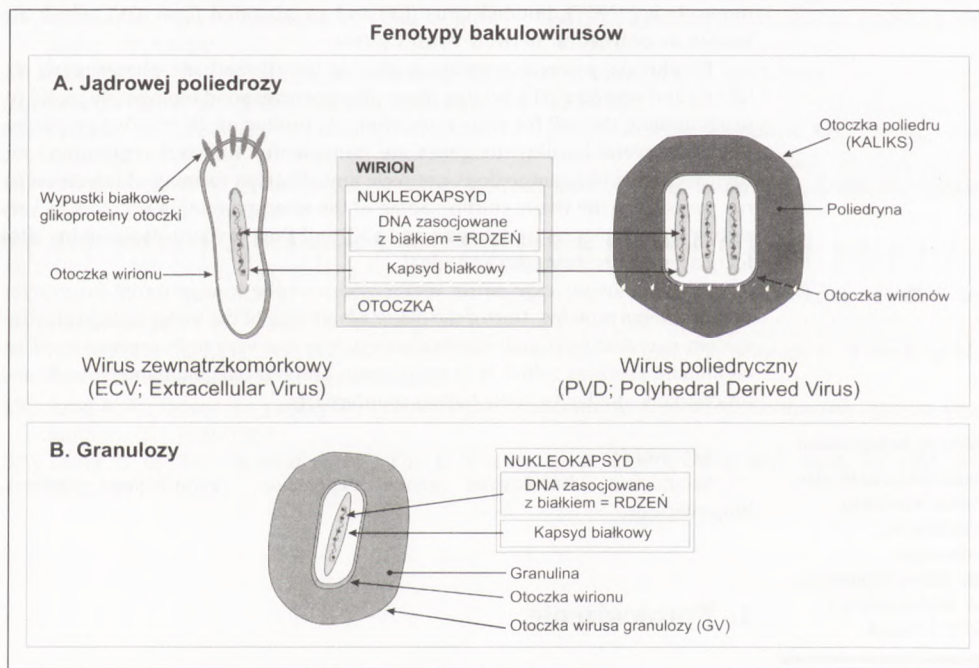
1. Wprowadzenie

Ogromny postęp w biotechnologii oraz rosnące zapotrzebowanie na szczepionki antywirusowe, hormony wzrostowe, inter-

ferony i inne substancje biologicznie czynne o farmaceutycznym, weterynaryjnym i diagnostycznym wykorzystaniu skłaniają do poszukiwania coraz lepszych, bardziej wydajnych i bezpiecznych układów biologicznych do ich produkcji. Niewątpliwie takim układem jest system komórek owadzych i modyfikowanych genetycznie bakulowirusów.

2. Ogólna charakterystyka bakulowirusów

Bakulowirusy należą do rodziny *Baculoviridae* i stanowią grupę wirusów strukturalnie i genetycznie złożonych, wykazujących tropizm do komórek owadzych. Patogeny te namnażają się w larwach owadów należących przede wszystkim do motyli (*Lepidoptera*) i muchówek (*Diptera*) oraz błonkówek (*Hymenoptera*), chrząszczy (*Coleoptera*) i chruścików (*Trichoptera*). Częstki bakulowirusów mają kształt pałeczkowaty o średnicy od 30 do 60 nm i długości od 200 do 400 nm, a ich materiałem genetycznym jest dwuniciowy, kolisty DNA zbudowany z 80 do 160 tysięcy par zasad (tpz), kodujący od 60 do 150 genów (rys. 1) (1,2). Wirusowy DNA zasocjowany z bogatym w argininę białkiem p6,9 stanowi rdzeń cząstki wirusa, który otoczony płaszczem białkowym nosi nazwę nukleokapsydu. Głównymi składnikami kapsydu są białka



Rys. 1. Różne fenotypy bakulowirusów.

o masie cząsteczkowej od 35 do 45 kDa. Nukleokapsydy potomnie powstające w jądrach zainfekowanych komórek osłaniane są fosfolipidową otoczką, która na jednym z końców może tworzyć wypustki tzw. peplomery zawierające wirusową glikoproteinę gp64. W przestrzeni pomiędzy nukleokapsydem a otoczką białkowo-lipidową (w tzw. wirusowym tegumencie) występują białka: gp41, p74 i p78. Przedstawiona budowa wirionu dotyczy zewnętrzkomórkowej (ECV – *extracellular virus*), nieokludowanej (NOV – *non-occluded virus*), pączkującej (BV – *budded virus*) formy wirusa. Wirusy BV tworzone są we wczesnej fazie infekcji i odpowiadają za rozprzestrzenianie się zakażenia w ciele owada (tzw. infekcję II-rzędową). Wiriony bakulowirusów poliedrozy jądrowej (NPV – *nuclear polyhedrosis virus*) są otaczane w jądrze komórkowym krystalicznym białkiem poliedryną p29. Struktury takie tworzą poliedryczne ciała okludowane zwane poliedrami (OV – *occluded virus* lub PIB – *polyhedral inclusion body*) o średnicy około 5 μm . W poliedrycznej matriks wiriony mogą być zatopione pojedynczo (wirusy SNPV – *single nucleocapsid polyhedrosis virus*) lub w grupach (wirusy MNPV – *multiple nucleocapsid polyhedrosis virus*). Poliedry są osłaniane otoczką poliedrową (kaliks), zbudowaną z białek i węglowodanów (3). Otoczka poliedru zwiększa jego stabilność, chroni wiriony przed enzymami proteolitycznymi oraz niekorzystnymi czynnikami zewnętrznymi, np. promieniowaniem UV. Podczas infekcji wirusowej powstają zarówno formy OV, jak i ECV o takich samych nukleokapsydach. Morfologiczne i biochemiczne różnice w ich budowie dotyczą osłaniających je błon. Formy ECV powstają we wczesnej fazie infekcji, a ich otoczka zawiera przede wszystkim błonę cytoplazmatyczną i wirusowe białko gp64, natomiast formy OV tworzone są w późnej fazie infekcji, a składnikami ich błon są białka: gp41, p74 ODV-E25, ODV-E56, ODV-E66, ODV-E28, ODV-E-35 i ODV-EC27, znajdujące również w kapsydzie wirusa (rys. 1) (4,5). Postać okludowana wirusa jest odpowiedzialna za transmisję wirionów do larw owadów (tzw. infekcję I-rzędową).

Do bakulowirusów należą także wirusy granulozy (GV), które wytwarzają ciała inkluzyjne o średnicy od 0,15 do 0,5 μm , zbudowane z białka granuliny, strukturalnie podobnej do poliedryny. Wirusy granulozy różnią się od wirusów poliedrozy jądrowej cytopatogennością. Ciała wtrętowe wirusów GV mają kształt elipsoidalny i wytwarzane są w cytoplazmie w pobliżu jądra (rys. 1). Patogenność wirusów granulozy jest ograniczona do owadów należących do rodzaju *Lepidoptera*, podczas gdy wirusy poliedrozy atakują także *Diptera*, *Hymenoptera* i *Trichoptera*, jak również niektóre skorupiaki należące do rodzaju dziesięcionogów (*Decapoda*) (2).

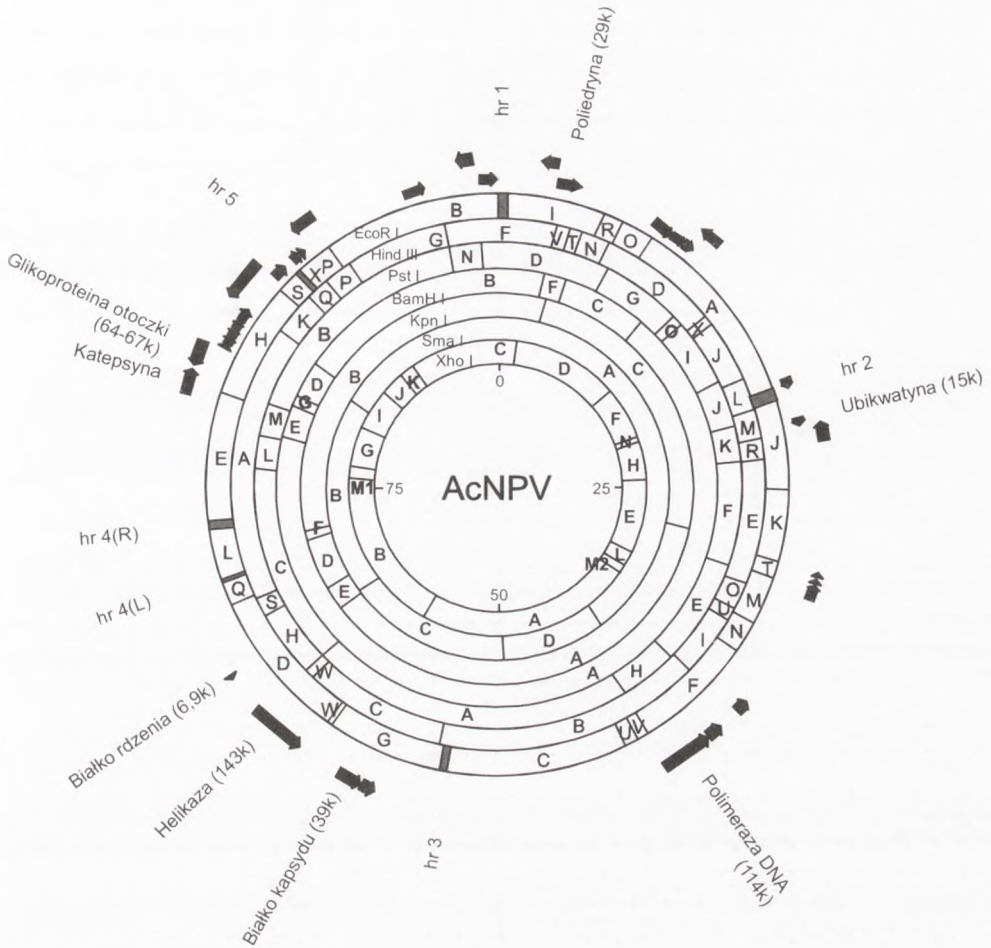
Najlepiej poznany pod względem molekularnym bakulowirusami są *Autographa californica* (AcMNPV), *Bombyx mori* (BmNPV), *Lymantria dispar* (LdMNPV) i *Orgyia pseudotsugata* (OpMNPV). Gospodarzami dla tych wirusów są komórki gąsienic, mierzwińca, jedwabnika i sówki. Proces infekcji rozpoczyna się od zjedzenia przez owady zakażonego pokarmu, zawierającego okludowane formy wirusa. Otoczka poliedrynowa ulega rozpuczczeniu w środowisku alkalicznym jelita gąsienic (pH 10,5) przy udziale specyficznych proteaz alkalicznych. Uwolnione wiriony penetrują błonę perytroficzną nabłonka docierając do komórek kolumnowych nabłonka, do

których wnikają na drodze endocytozy receptorowej lub fuzji z błoną komórkową. Po wnikięciu do komórki wirus przedostaje się do jądra. Wirusy granulozy pozbywają się płaszczka białkowego przechodząc przez pory jądrowe, natomiast wirusy poliedrozy jądrowej w całości przechodzą przez pory jądrowe i dopiero wewnątrz jądra tracą kapsyd białkowy. W jądrze komórkowym zachodzi replikacja wirusowego genomu i tworzenie potomnych nukleokapsydów. Nowo powstałe nukleokapsydy przechodząc przez błony komórkowe otaczane są otoczką glikoproteinową, część z nich jest uwolniana w postaci pączkującej do hemolimfy owada. Wraz z hemolimfą formy BV są transportowane do różnych tkanek, takich jak: ciało tłuszczowe, nabłonek tchawek, hipoderma, mięśnie czy system nerwowy, gdzie powstają formy OV. Infekcja bakulowirusami prowadzi do stopniowej lizy komórek i śmierci owada. Pierwsze ciała wtrętowe pojawiają się w jądrach komórkowych już 24 godziny po zakażeniu, a w końcowej fazie infekcji stanowią od 20 do 30% suchej masy owada (2,6). Do bakulowirusów zaliczane są także dwa wirusy nie wytwarzające ciał okludowanych: *Oryctes* i *Heliothis zea* (Hz-1). Ich genomy zbudowane są odpowiednio z 127 i 236 tpz. Replikacja wirusów zachodzi w jądrze komórkowym i trwa około 12 godzin. Cząstki potomne wirusów *Oryctes* są uwalniane z komórki przez pączkowanie, a Hz-1 w wyniku lizy komórki (2).

3. Struktura genomu bakulowirusów poliedrozy jądrowej

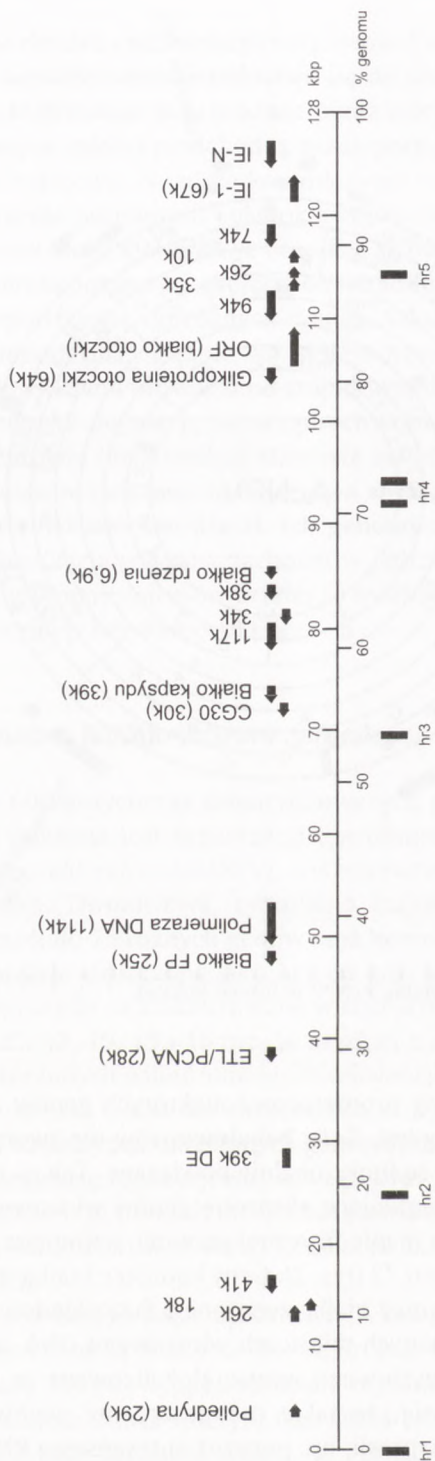
Spośród około 600 dotychczas zidentyfikowanych przedstawicieli rodziny *Baculoviridae*, najlepiej poznana jest organizacja i struktura genomu wirusa poliedrozy jądrowej *Autographa californica* (AcMNPV), wyizolowanego z larw ćmy miernikowca *Autographa californica*. Dwuniciowa, cyrkularna cząsteczka DNA jest zbudowana z 134 tpz i zawiera około 75 różnych genów oraz homologiczne regiony o podobnej strukturze i organizacji, oznaczone jako hr1 do hr6, bogate w pary AT, mające od 500 do 800 pz. Regiony hr są zlokalizowane w różnych miejscach DNA i przedzielone odpowiednio: 25, 42, 19, 15 i 15 tpz. W każdym z nich jest od dwóch do ośmiu niedokładnie powtórzonych palindromowych sekwencji zawierających 30 pz, w centrum których jest miejsce cięcia dla enzymu Eco RI (rys. 2) (7-9). Regiony hr biorą udział w aktywacji transkrypcji określonych genów wczesnych wirusa jak również są zaangażowane w regulację replikacji wirusowego DNA. Odcinki homologiczne do hr zidentyfikowano także w genomach innych bakulowirusów, np. *Choristoneura fumiferana* MNPV (10), *Lymantria dispar* MNPV (11), *Bombyx mori* MNPV (12), czy *Orgyia pseudotsugata* MNPV (13).

Genom wirusa jest bardzo ściśle upakowany, a zawarte w nim otwarte ramki odczytu (ORF) zlokalizowane są blisko siebie. Najkrótsza odległość pomiędzy ORF wynosi 2 pz, najdłuższa 350 pz, wyjątek stanowią regiony hr, z których najdłuższy zawiera 800 pz. Niektóre z ramek odczytu (np. ORF4 i ORF5) pokrywają się, a sygnał terminacji translacji UAA zachodzi często na sygnał poliadenylacji AAUAAA tran-



Rys. 2A. Schemat struktury genomu AcNPV w formie kolistej.

skryptu. Dodatkowo elementy promotorowe niektórych genów znajdują się w sekwencjach kodujących inne geny. Geny bakulowirusów nie tworzą zespołów, chociaż produkty szeregu z nich są funkcjonalnie powiązane. Tak na przykład geny *ie-1*, *ie-N* i *pe38* kodujące białka regulujące ekspresję genów wirusowych zlokalizowane są w rejonie od 95 do 100 na mapie fizycznej genomu, natomiast gen *cg30* homologiczny do *ie-N* i *pe-38* w miejscu 72 (rys. 2). Geny kodujące białka strukturalne wirusa (*gp64*, *cor*, *polh*, *vp38*) jak również białka związane z fazą okludowaną (*clx*, *p10*, *polh*, *fp25*) są rozmieszczone w różnych miejscach wirusowego DNA, a geny transkrybowane w fazie późnej cyklu życiowego wirusa zlokalizowane są pomiędzy genami wczesnymi (rys. 2). Uważa się, że takie rozmieszczenie genów może odgrywać ważną rolę w regulacji ich ekspresji, np. poprzez antysensowne RNA. Lokalizacja wy-



Rys. 2B. Schemat struktury genomu AcNPV w formie liniowej. Na rysunku 2 zaznaczone są także odcinki powstałe po cięciu DNA określonymi enzymami restrykcyjnymi, miejsca lokalizacji niektórych genów oraz rejony hr.

branych wirusowych genów oraz funkcje kodowanych przez nie białek zostały przedstawione w tabeli 1 (6).

Tabela 1

Lokalizacja niektórych poznanych genów *Autographa californica* MNPV i funkcje ich białkowych produktów (6,24)

Lokalizacja	Faza transkrypcji	Nazwa genu	Białko i jego funkcja
2,6-3,1	L	<i>603</i>	nie jest konieczne do replikacji wirusa
3,2-3,8	L	<i>pobl</i>	poliedryna, białko okluzyjne OV, rola ochronna
8,4-9,7	E	<i>egt</i>	UDP-glukozylotransferaza, przenosi cukrowce do ekdyzonu, blokuje przeobrażenie owada
9,7-10,2	E	<i>da26</i>	nie jest konieczne do replikacji wirusa
19,0-19,4	L lub E	<i>sod</i>	białko homologiczne do dysmutazy ponadtlenkowej Cu/Zn, nie jest konieczne do replikacji
22,0-22,2	L	<i>ubi</i>	homolog ubikwiny
22,2-22,8	E i L	<i>p39</i>	znajdowane w matriks jądrowej
29,7-30,4	E	<i>pcna</i>	p28, homolog komórkowego antygenu stymulującego proliferację, udział w replikacji DNA i ekspresji genów późnych
36,0-38,8	L lub VL	<i>fp25</i>	mutacje w genie prowadzą do powstania fenotypu FP
39,0-39,9	L lub VL	<i>p34,8</i>	homologiczne do genu entomopoksy virusów
40,0-42,3	E	<i>dnapol</i>	p114, wirusowa DNA polimeraza
56,1-56,9	E	<i>cg 30</i>	regulator transkrypcji
56,0-58,0	L	<i>p39</i>	główny składnik kapsydu
60,3-63,4	E	<i>bel</i>	p143, homolog helikazy, bierze udział w replikacji DNA
65,2-65,5	L	<i>cor</i>	p6,9, białko zasadowe zasocjowane z DNA
79,7- 80,4	?	<i>v-catb</i>	homolog proteazy cysteinowej
80,4-81,8	E i L	<i>gp64</i>	główne białko otoczki BV, ułatwia penetrację wirusa do komórki
82,6-83,4	L i VL	<i>clx</i>	p34, białko zasocjowane z kaliks OV
87,2-87,9	E	<i>p35</i>	blokuje apoptozę
88,9-89,4	VL	<i>p10</i>	nie jest konieczne do replikacji wirusa
89,4-90,0	L	<i>p74</i>	ważne dla infekcyjności OV
92,0	E i L	<i>ie-0</i>	p70, regulator transkrypcji
95,6-96,9	E i L	<i>ie-1</i>	p65, regulator transkrypcji
97,7-98,7	E	<i>ie-N</i>	p47, regulator transkrypcji
99,0-99,8	E	<i>pe38</i>	regulator transkrypcji

E – geny transkrybowane w fazie wczesnej, L – geny transkrybowane w fazie późnej, VL – geny transkrybowane w fazie bardzo późnej. Lokalizacja genów jest opracowana zgodnie z zamieszczoną mapą restrykcyjną genomu wirusa na rysunku 2.

W genomie bakulowirusów otwarte ramki odczytu znajdują się na obu niciach DNA i z obu nici mogą być transkrybowane. Produkty nie wszystkich genów są konieczne do replikacji cząstek wirusa. Według tego kryterium geny bakulowirusów

możemy podzielić na dwie grupy: 1) geny niezbędne lub zasadnicze, do których zalicza się geny kodujące białka konieczne do przeprowadzenia pełnego cyklu replikacyjnego wirusa i wytworzenia infekcyjnych cząstek potomnych oraz 2) geny zbędne lub niezasadnicze, których usunięcie z wirusowego genomu nie ma negatywnego wpływu na jego replikację. Do genów zbędnych zaliczane są na przykład geny: *26egt*, *da26*, *sod*, *pcna*, *clx*, *p10* oraz sekwencje kodujące wirusowy retroelement. Produkty białkowe wymienionych genów pełnią prawdopodobnie ważną rolę w regulacji cyklu życiowego wirusów w warunkach niekorzystnych dla ich replikacji. Stwierdzono, że produkt genu *egt* jest wydzielany z komórki i bierze udział w przenoszeniu aktywnych form cukru (UDP-cukier) do ekdyzonu, hormonu kierującego przeobrażeniem owada, co pozwala wirusowi zahamować przemiany metamorficzne. W regulacji ekspresji wirusowych genów bierze udział produkt genu *pcna*. Białko to nie jest jednak potrzebne we wszystkich typach komórek atakowanych przez bakulowirusy. W replikacji cząstek bakulowirusa nie jest również konieczny udział produktu genu *clx*, który wchodzi w skład otoczki osłaniającej poliedry. Do grupy genów zbędnych zaliczany jest także gen *p10* kodujący białko o nie poznanej do tej pory funkcji. Wiadomo, że białko p10 produkowane jest w dużych ilościach w późnej fazie cyklu replikacyjnego i należy do białek lizujących. Proteiną, nie mającą zauważalnego wpływu na cykl replikacyjny bakulowirusów, jest również produkt genu *da26* (2). W proces tworzenia okludowanych form bakulowirusów zaangażowane są produkty genów: *pohl*, *fp25* i *clx*. Uszkodzenie genu *fp25* prowadzi do powstania nowego fenotypu FP. Mutanty FP powstają często samorzutnie, np. w wyniku insercji owadziego elementu transpozonalnego do *fp25* locus lub innych mutacji, do których może dochodzić podczas wielokrotnego pasażowania wirusa w larwach owadów *in vivo* (14). W cyklu życiowym takich wirusów dochodzi do zaburzeń w wytwarzaniu osłonek i formowaniu poliedrycznej matryksy. W tym przypadku tworzenie poliedrów jest w nieznacznym stopniu zredukowane. Ważnym białkiem wirusowym jest produkt genu *p74*, którego uszkodzenie zaburza cykl replikacyjny wirusa w ciele owada, lecz nie wpływa negatywnie na jego rozwój w komórkach owadzych hodowanych *in vitro*. Prawdopodobnie białko to odgrywa ważną rolę w infekcji komórek owadzych *in vivo* (15).

Struktura i organizacja genomu różnych bakulowirusów, mimo że wykazują one ograniczone pokrewieństwo jest bardzo zachowawcza (2,10,16). Podobieństwo w organizacji genomu stwierdzono pomiędzy AcMNPV i OpMNPV. Podstawowe różnice genomowe dotyczą odcinków przedzielających geny, które w przypadku OpMNPV są dłuższe i mają do 1320 pz oraz zawierają wielokrotnie powtórzone dinukleotydowe sekwencje GC. Różnice stwierdzono również w genie kodującym białko otoczki poliedrynowej. W genomie AcMNPV występuje sekwencja odpowiedzialna za 16 powtórzeń aminokwasów ARGSER, której nie ma w OpMNPV (17,18), natomiast w genomie OpMNPV brak jest szeregu sekwencji, które obecne są w genomie AcMNPV. Uważa się, że różnice bakulowirusowych genomów mogą być wynikiem integracji sekwencji z genów owadzych lub pochodzących od innych wirusów (19).

W genomach szczepów AcMNPV zidentyfikowano dwa elementy transpozonalne zlokalizowane w różnych otwartych ramkach odczytu, z których jeden jest homologiczny do retrotranspozonu (14,20). Elementy transpozonalne bakulowirusów zbudowane są z kilku do kilku tysięcy nukleotydów i rzadko zawierają otwarte ramki odczytu. W transpozonach AcMNPV zidentyfikowano natomiast sekwencję ATAAG charakterystyczną dla promotorów genów późnych tych wirusów. Najlepiej poznanym elementem transpozonalnym bakulowirusów jest element D tzw. TED. TED jest zbudowany z 7,4 tpz, a na obu jego końcach usytuowane są długie powtórzenia sekwencji LTR (*long terminal repeats*) o strukturze typowej dla retrowirusów. Pomiędzy LTR-ami znajdują się trzy otwarte ramki odczytu: *gag*, *pol*, *env* (21). Z uwagi na ten fakt sądzi się, że element TED może być retrowirusem atakującym bezkręgowce (22,23). Znajdowane w genomie bakulowirusów ruchome elementy są odpowiedzialne za ich zmienność i różnorodność, jak również aktywację i inaktywację określonych genów. Wpływa to na infekcyjność wirusów oraz ich specyficzność względem atakowanych gospodarzy.

4. Ekspresja informacji genetycznej bakulowirusów

Geny bakulowirusów są transkrybowane w trzech fazach: wczesnej (E), późnej (L) i bardzo późnej (VL). Większość z nich ulega transkrypcji tylko w jednej z faz, lecz niektóre mogą być transkrybowane podczas całego cyklu życiowego wirusa. Wczesna faza ekspresji genów związana jest z przeprogramowaniem cyklu komórkowego dla replikacji wirusa oraz produkcją białek niezbędnych do ekspresji genów późnych i bardzo późnych, natomiast w fazie późnej, która trwa od 6 do 18-24 godziny po infekcji tworzone są formy BV. Formowanie okludowanych postaci wirusa rozpoczyna się w fazie VL ok. 20 godzin po infekcji. W komórce zainfekowanej bakulowirusem po 12 godzinach od infekcji znacznie spada poziom komórkowego mRNA, a po 24 godzinach transkrypcja genów komórkowych zostaje praktycznie wyłączona. Mechanizm regulacji odpowiedzialny za wyłączenie ekspresji genów komórkowych nie jest poznany. Obniżony poziom syntezy białek komórkowych może być wynikiem zmian w strukturze retikulum endoplazmatycznego, jądra i cytoszkieletu komórkowego, zachodzących pod wpływem infekcji wirusowej. Pojawienie się w komórce białek wirusowych zakłóca funkcjonowanie szeregu białek biorących udział w regulacji procesów komórkowych (6,25,26).

Transkrypcja licznych genów wczesnych bakulowirusa jest zależna od komórkowej polimerazy RNA II i produktu genu *ie-1*, pełniącego rolę transaktywatora promotorów genów wczesnych, w aktywacji których mogą brać również udział sekwencje. Białko IE-1 jest wytwarzane podczas całego cyklu infekcyjnego bakulowirusów. W jego cząsteczce występują moduły o strukturze heliks-pętla-heliks oraz podobnej do zamka leucynowego. Proteina ta jest także negatywnym regulatorem ekspresji genów *ie-0* i *ie-N*. Funkcja i właściwości transaktywujące białka IE-0 nie są dokładnie

poznane. Ekspresja genu *ie-N* może być autoregulowana. Gen *ie-N* (zwany także *ie-II*) zlokalizowany jest w sąsiedztwie genu *pe38*. Transkrypty obu genów są obecne we wczesnych fazach infekcji. Białka IE-N i PE-38 zawierają w cząsteczce moduł o strukturze palców cynkowych, zwany także C3HC4, który można również znaleźć w innych produktach genów wirusowych, tj. CG3 czy IAP oraz białkach komórkowych. Białka takie mogą wiązać się z DNA i regulować aktywność określonych genów. Do genów transkrybowanych w fazie wczesnej (do sześciu godzin po infekcji) należą także geny: *dnapol*, *hel*, *pcna* oraz geny kodujące czynniki regulujące ekspresję genów późnych.

Struktura promotorów genów wczesnych bakulowirusów jest podobna do promotorów genów komórkowych. Większość z nich zawiera w regionie -25-30pz sekwencję TATA, a miejsce startu transkrypcji jest zlokalizowane w rejonie sekwencji CAGT. Element CAGT jest podobny do zakonserwowanej sekwencji znajdującej się w licznych miejscach startu transkrypcji genów owadzich. Najlepiej poznane są sekwencje promotorowe genów *p35*, *gp64* i *p39*, w sąsiedztwie których znajdują się również elementy promotorowe charakterystyczne dla genów późnych (27-29). Stąd geny te mogą być transkrybowane zarówno we wczesnej, jak i późnej fazie infekcji. Produkt białkowy genu *p35* stymuluje ekspresję genu *vp39* (30).

Transkrypcja genów późnych odbywa się pomiędzy 6 a 24 godziną po infekcji i zachodzi prawdopodobnie przy udziale zmodyfikowanej polimerazy komórkowej, odpornej na działanie czynników hamujących aktywność polimerazy RNA III (31). Wirusowe transkrypty mRNA zawierają cap na końcu 5' i sekwencję poliA na końcu 3'. Transkrypcja genów późnych i bardzo późnych jest zależna od ekspresji genów wczesnych i replikacji DNA. Proces transkrypcji może być blokowany przez cykloheksimid oraz mutacje w genie *hel* wirusa. W opisywanej fazie ekspresji transkrybowane są geny kodujące białka strukturalne wirusa takie jak: *p6,9*, *vp39* i *gp64* oraz inne produkty białkowe identyfikowane w wirusowej stronie np. 39K, białka będące homologami komórkowej ubikwityny i dysmutazy ponadtlenkowej oraz polipeptyd pełniący rolę regulatora kanałów wapniowych.

Promotory genów późnych i bardzo późnych bakulowirusów różnią się strukturą i organizacją w zależności od ich rozmieszczenia w genomie oraz aktywnością transkrypcyjną w określonej fazie infekcji. Wszystkie jednak zawierają sekwencję TAAG, zlokalizowaną na początku startu transkrypcji. Najlepiej poznana jest struktura sekwencji promotorowej genu *polh*. Miejsce inicjacji transkrypcji zlokalizowane jest w obrębie sekwencji TAAATAAGTATT, która jest wysoce zachowawcza wśród znanych promotorów tego genu u innych bakulowirusów i bardzo podobna do miejsca startu transkrypcji genu *p10* (16,32-34). Start wszystkich transkryptów o silnej ekspresji inicjuje sekwencja ATAAG, natomiast słabszych TTAAG lub GTAAG (2,6). Niektóre geny mają kilka elementów TAAG w rejonie promotorowym, np. gen *vp39* w -57, -105 i -321. Delecje z końca 5' tego regionu prowadzące do eliminacji miejsc startu uniemożliwiają transkrypcję genu, natomiast zmiana kierunku lokalizacji sekwencji promotorowej nie znosi jej aktywności.

Spośród wszystkich genów bakulowirusowych najsilniejszej ekspresji ulega gen *polh* kodujący poliedrynę, który może być aktywowany również przez promotory genów *p10* i *cor*. Poliedryna ma masę cząsteczkową 29kD i jest zbudowana z 245 aminokwasów. Jest to najlepiej scharakteryzowane białko wirusa. Proteina ta jest syntetyzowana z dużą wydajnością w bardzo późnej fazie infekcji i stanowi około 25-50% ogólnego białka komórkowego. Regulatorem jej syntezy jest białko wirusowe 25K, które działa niezależnie od białka IE-1 (35,36). Innym genem wirusowym, który ulega silnej ekspresji jest gen *p10*. Białko p10 ma charakter włóknisty, występuje zarówno w jądrze, jak i cytoplazmie zainfekowanych komórek. Prawdopodobnie promotory genów *polh* i *p10* mogą być kompetytorami dla określonych czynników biorących udział w regulacji ich ekspresji. Aktywność promotora genu *pohl* jest jednak od nich mniej zależna niż promotora genu *p10* (37). Tempo transkrypcji genów późnych zależy także od produktu genu *p74* (38).

Produktami transkrypcji niektórych rejonów genomu bakulowirusowego są różne transkrypty o pokrywających się sekwencjach. Na przykład obie ramki odczytu przylegające do sekwencji genu *polh* są transkrybowane w późnej fazie infekcji z dwóch przeciwległych nici DNA. Poziom jednego z transkryptów zawierającego sekwencję komplementarną do sekwencji *polh* gwałtownie spada w fazie późnej infekcji. Rola transkryptów o sekwencjach pokrywających się i antysensowych nie jest poznana. Przypuszcza się, że biorą one udział w regulacji transkrypcji genów.

Późna transkrypcja DNA jest związana z jego replikacją. Wykazano, że czynniki blokujące transkrypcję genów późnych wirusa, hamują również replikację wirusowego DNA (39). W replikacji DNA biorą udział produkty genów kodowane przez około 20% bakulowirusowego genomu. Wśród nich są geny: *left* (1-3), *hel*, *ie-1*, *dnapol*, których aktywność regulowana jest przez białka P35, IE-II, PE38 i PCNA. Replikacja DNA rozpoczyna się w ośmiu miejscach wirusowego DNA. Siedem z nich jest zlokalizowanych w rejonach hr, jeden poza nimi we fragmencie Hind III-K.

Poznanie regulacji transkrypcji wirusowych genów ma ważne znaczenia w opracowaniu specyficznych bakulowirusowych wektorów. Silna aktywność transkrypcyjna promotora genu *polh*, którego produkt nie jest konieczny dla przeprowadzenia cyklu replikacyjnego bakulowirusów zadecydowała o tym, że pod promotor ten często klonowane są obce geny, a wiele wektorów i układów służących do produkcji obcych białek opartych jest na systemie bakulowirus/komórki owadzie (BKO).

5. Bakulowirusy w biotechnologii

Duża kolekcja ustalonych owadzich linii komórkowych, szereg handlowo dostępnych pożywek, stosunkowo łatwe prowadzenie kultur owadzich oraz niezwykle cenne właściwości bakulowirusów, sprawiają, że wirusy te cieszą się coraz większą popularnością. Ich atrakcyjność podnosi fakt, że są one bezpieczne dla ludzi, zwierząt wyższych i roślin.

System bakulowirusy/komórki owadzie jest wykorzystywany do produkcji bioinsektycydów i heterologicznych białek.

5.1. Bakulowirusy jako bioinsektycydy

Szkodliwe działanie chemicznych środków ochrony roślin oraz zdolność uodparniania się szkodników na główne grupy insektycydów sprawiają, że prace nad opracowaniem skutecznych biopreparatów do zwalczania owadów mają bardzo istotne znaczenie.

Zaletą biologicznego zwalczania owadów za pomocą bakulowirusów jest fakt, że wirusy te wykazują wysoką selektywność i działają przede wszystkim na zwalczane szkodniki, powodując ograniczenie liczebności populacji owadów, a nie całkowite jej wyniszczenie. Stosując wirusowe preparaty obniża się liczebność owadów poniżej progu szkodliwości bez poważniejszego naruszania równowagi w biocenozie. Niewątpliwie cenną zaletą bakulowirusów jest ich zdolność do współdziałania z innymi czynnikami kontrolującymi, np. synergistyczne oddziaływanie z pestycydami, co pozwala na obniżenie ilości stosowanych chemicznych insektycydów (40).

Obok znacznych korzyści preparaty bakulowirusowe mają również poważne wady, takie jak wrażliwość na czynniki zewnętrzne, np. promieniowanie UV, i związany z tym krótki czas półtrwania w środowisku, czy powolne zabijanie gospodarza (od 5 do 15 dni po infekcji). Zwiększenie skuteczności infekcji i przyspieszenie śmierci owada można uzyskać przez stosowanie zrekombinowanych bakulowirusów, do genomów których wprowadza się geny kodujące specyficzne dla owadów toksyny, hormony czy enzymy katalizujące przemiany metaboliczne (40-42). Najczęściej są to toksyny pochodzące ze skorpionów *Buthus eupeus* i *Androctonus australis*, delta-endotoksyny i toksyny Cry1A z *Bacillus thuringiensis*, neurotoksyny Tox-34 z roztocza *Pyemotes tritici* oraz białka mitochondrialnego URF 13 kukurydzy (43-48). Alternatywą dla substancji toksycznych są hormony odpowiedzialne za rozwój, metamorfozę i rozmnażanie owadów, do których należą: ekdysteroidy, hormony juwenilne oraz neurohormony (41,44,49,50). Do genomu bakulowirusów wprowadzane są również geny antypeptydów zdolnych do wiązania się z neurohormonami i blokowania ich fizjologicznych funkcji (49,51).

Badania nad skutecznością działania modyfikowanych genetycznie bakulowirusów wykazały, że pozwalają one na zredukowanie czasu zabijania owadów o 25 do 40%, lecz produkcja poliedrów w larwach zainfekowanych rekombinantami jest o 20 do 60% mniejsza niż w larwach infekowanych dzikim typem wirusa. Z tego wynika, że dzikie bakulowirusy mają większe zdolności do recyrkulacji i utrzymywania się w środowisku (40).

Ograniczona i zależna od wielu czynników środowiskowych (temperatury, nasłonecznienia, wieku owada i in.) skuteczność biopreparatów oraz wysoki koszt wielkoskalowej produkcji bakulowirusowych insektycydów znacznie limituje ich praktycz-

ne zastosowanie (40). Natomiast wprowadzanie genetycznie zmodyfikowanych organizmów do środowiska naturalnego budzi obawy i wywołuje liczne protesty i kontrowersje (42,52,53). Mimo prowadzonych w wielu krajach badań nad zrekombinowanymi bakulowirusami, do chwili obecnej nie dopuszczono jeszcze do powszechnego stosowania żadnego biopreparatu opartego na genetycznie zmienionym bakulowirusie (40,53).

5.2. Bakulowirusy jako wektory ekspresyjne

Od 1983 r., kiedy po raz pierwszy przedstawiono technologię bakulowirusowego wektora ekspresyjnego, stał się on szeroko stosowanym narzędziem do produkcji heterologicznych białek w komórkach owadów *in vitro* i larwach *in vivo*. Badania ostatnich pięciu lat wskazują na możliwość wykorzystania zrekombinowanych bakulowirusów do ekspresji obcych genów w komórkach ssaków (54-56). BKO umożliwia uzyskanie białek immunogennych i funkcjonalnie podobnych do swoich naturalnych odpowiedników.

W układzie komórki owadzie – zrekombinowane bakulowirusy możliwe jest syntetyzowanie dużych białek, gdyż do genomu wirusowego można włączyć dodatkowo nawet 100 tpz obcego DNA, bez wpływu na replikację i powstawanie prawidłowych cząstek wirusa (6).

Zastosowanie BKO pozwala również na jednoczesną ekspresję kilku heterologicznych genów wprowadzonych do komórki przez infekcję jednym, dwoma lub więcej zrekombinowanymi wirusami.

Ekspresja obcych genów zachodzi najczęściej pod późnymi promotorami: poliedrynowym i białka p10. Geny bardzo późne bakulowirusa są genami niezłożonymi, dlatego BKO jest polecany szczególnie do ekspresji takich właśnie genów. Mimo że w systemie bakulowirusowym zachodzi co najmniej kilka „splicingów”, to dla uzyskania wysokiego poziomu ekspresji genów zawierających introny, rekomendowane jest zastosowanie cDNA. Silny promotor poliedrynowy zapewnia uzyskanie wysokiego poziomu ekspresji tego białka, do około 1g poliedryny na 10^9 komórek. Wprowadzenie obcego genu w miejsce genu *polh* stwarza możliwość podobnie wydajnej syntezy heterologicznego białka, pod warunkiem, że nie jest ono toksyczne dla wirusa i komórek żywiciela. Najczęściej jednak ilość otrzymywanego zrekombinowanego białka jest niższa i wynosi od 10 do 100 mg na 10^9 komórek owadów (6). Zastosowanie bardzo późnych promotorów genów *polh* i *p10*, które są aktywne dopiero w fazie okluzyjnej cyklu wirusowego, ma zarówno pozytywne, jak i negatywne skutki. Rozdzielenie etapu maksymalnej ekspresji obcego białka od etapu formowania cząstek BV ma szczególne znaczenie dla powstawania prawidłowych zrekombinowanych cząstek wirusowych, ponieważ znacznie zmniejsza ryzyko wystąpienia mutacji prowadzących do delekcji czy inaktywacji heterologicznego genu (6). Ujemne efekty bardzo późnej ekspresji związane są natomiast z gwałtownym spadkiem

przeżywalności komórek i obniżeniem ich zdolności do modyfikacji potranslacyjnych białek. Zamieranie komórek owadzych podczas litycznej infekcji wirusowej decyduje o przewadze metod okresowych nad ciągłymi przy produkcji zrekombinowanych białek na dużą skalę.

Bakulowirusy – komórki owadzie to układ, w którym zachodzą wszystkie typowe dla komórek eukariotycznych modyfikacje potranslacyjne. Klonowane białka mogą ulegać takim modyfikacjom jak: usuwanie sekwencji sygnałowych, glikozylacja (N-glikozylacja i O-glikozylacja), fosforylacja, acylacja, izoprenylacja czy α -amidaacja (6,49,57). Istnieją jednakże doniesienia, że modyfikacje te czasami różnią się od procesów przebiegających w komórkach ssaków. W szczególności sposób dotyczy to zdolności przyłączania grup oligosacharydowych do grupy NH_2 asparaginy. W przypadku niekompletnej modyfikacji otrzymuje się często glikoproteinę o nieco niższej masie cząsteczkowej niż forma natywna białka (58,59). Wykazano, że proces N-glikozylacji można sztucznie spotęgować poprzez wprowadzenie zwierzęcych glikotransferaz do komórek owadzych (58,60).

Heterologiczne białka uzyskiwane w BKO są bezpośrednio transportowane do kompartmentów komórkowych, które odpowiadają miejscom ich lokalizacji w macierzystej komórce (6). Poprzez wprowadzenie specyficznej sekwencji sygnałowej razem z obcym genem można często wywołać wydzielenie zrekombinowanego białka na zewnątrz komórki. Zastosowanie bezsurowiczej i bezbiałkowej pożywki hodowlanej pozwala w tym przypadku na łatwiejszą separację i oczyszczanie produktu (58).

Ze względu na stosunkowo niską optymalną temperaturę do namnażania bakulowirusów (27°C), w BKO można otrzymywać z dużą wydajnością aktywne białka kodowane przez wrażliwe na wyższą temperaturę allele genów, co jest niemożliwe przy zastosowaniu systemu pracującego w temperaturze 37°C . Jednakże wektory bakulowirusowe nie są przydatne do ekspresji genów kodujących białka wrażliwe na niższe temperatury (6).

Zdolność zrekombinowanych bakulowirusów do ekspresji genów w komórkach ssaków zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* udokumentowana m.in. przez Duisita i in. (1999), Shoji i in. (1997) oraz Boyce i Buchera (1996) wskazuje na możliwość ich wykorzystania w terapii genowej. Dla tego kierunku aplikacji, bakulowirusowe wektory ekspresyjne posiadają również cenne właściwości. Podobnie, jak przy ekspresji w komórkach owadzych, ważną zaletą bakulowirusów jest bardzo duża pojemność insercyjna bakulowirusowego DNA. Z uwagi na fakt, że wydajna transdukcja bakulowirusowa wymaga dobrej jakości wirusowego inokulum o wysokim mianie, korzystną cechą BKO jest zdolność do produkcji silnie skoncentrowanych preparatów wirusowych, co znacznie ułatwia i przyspiesza proces ich zagęszczania. Najważniejszą cechą zrekombinowanych bakulowirusów jest nietoksyczny charakter oddziaływania na komórki ssaków. Brak ekspresji wirusowych genów w kulturach ssaków związana jest z wysoką owadospecyficznością bakulowirusowych promotorów transkrypcyjnych (54,56).

Atrakcyjność układu komórki owadzie/bakulowirusy wzbudziła duże zainteresowanie badawcze, czego wyrazem jest ogromna ilość białek różnego pochodzenia uzyskiwanych w tym systemie ekspresyjnym oraz opracowanie technologii produkcji substancji biologicznie czynnych, w tym szczepionek dla ludzi na skalę przemysłową.

Literatura

1. Blissard G. W., Rohrmann G. F., (1990), *Annu. Rev. Entomol.*, 35, 127-155.
2. Fields B. N., Krupke D. M., Howley P. M., Chanoch R. M., Melnick J. L., Monath T. P., Roizman B., Straus E-S., (1995), *Fields Virology*, 3rd ed., Lippincott Raven, New York.
3. Russel R. L. K., Rohrmann G. F., (1990), *Virology*, 174, 177-184.
4. Braunagel S. C., He H., Ramamurthy P., Summers M. D., (1996), *Virology*, 222, 100-114.
5. Roelvink P. W., van Meer M. M. M., de Kort C. A. D., Possee R. D., Hammock B. D., Vlak J. M., (1992), *J. Gen. Virol.*, 73, 1481-1489.
6. O'Reilly D. R., Miller L. K., Luckow V. A., (1994), *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*, Freeman, Oxford University Press.
7. Guarino L. A., Gonzalez M. A., Summers M. D., (1986), *J. Virol.*, 60, 224-229.
8. Kool M., Voeten J. T. M., Goldbach R. W., Tramper J., Vlak J. M., (1993), *J. General Virology*, 74, 2661-2668.
9. Pearson M., Bjornson R., Pearson G., Rohrmann G., (1992), *Science*, 257, 1382-1384.
10. Arif B. M., Doerfler W., (1984), *EMBO J.*, 3, 525-529.
11. McClintock J. T., Dougherty E. M., (1988), *J. Virol.*, 69, 2303-2312.
12. Maeda S., Majima K., (1990), *J. Virol.*, 71, 1851-1855.
13. Theilmann D. A., Stewart S., (1992), *Virology*, 187, 97-106.
14. Friesen P. D., Nissen M. S., (1990), *Mol. Cell. Biol.*, 10, 3067-3077.
15. Carstens E. B., Lu A., (1990), *J. Gen. Virol.*, 71, 3035-3040.
16. Theim S. M., Miller L. K., (1989), *J. Virol.*, 69, 2008-2018.
17. Gombart A. F., Pearson M. N., Rohrmann G. R., Beaudreau G. S., (1989), *Virology*, 169, 182-193.
18. Whitford M., Stewart S., Kuzio J., Faulkner P., (1989), *J. Virol.*, 63, 1393-1399.
19. Szatkowski M., Friesen P. D., (1996), *Virology*, 226, 252-259.
20. Friesen P. D., (1993), *Parasites nad Pathogens of Insects*, Eds. Beckage N. E., Thompson S. N., B. A. Federici, 147-178, Academic Press, San Diego, CA.
21. Miller D. W., Miller L. K., (1982), *Nature*, 299, 562-564.
22. Xiong Y., Eickbush T. H., (1990), *EMBO J.*, 9, 3353-3362.
23. Wang H. H., Frase M. J., Cary L. C., (1989), *Gene*, 81, 97-108.
24. Smith G. E., Vlak J. M., Summers M. D., (1983), *J. Virol.*, 45, 215-225.
25. Charlton C. A., Volkman L. E., (1993), *Parasites and Pathogens of Insects*, Eds. Backage N. E., Thompson S. N., Federici B. A., 103-125, Academic Press, New York.
26. Oppenheimer D. J., Volkman L. E., (1995), *Virology*, 207, 1-11.
27. Blissard G. W., Rohrmann G. F., (1989), *Virology*, 170, 537-555.
28. Carson D. D., Summers M. D., Guarino L. A., (1991), *J. Virol.*, 65, 945-951.
29. Carson D. D., Summers M. D., Guarino L. A., (1991), *Virology*, 182, 279-286.
30. Gong M., Guarino L. A., (1994), *Virology*, 204, 38-44.
31. Passarelli A. L., Miller L. K., (1993), *Virology*, 197, 704-714.
32. Todd J. W., Passarelli A. L., Miller L. K., (1995), *J. Virol.*, 689, 968-974.
33. von Oers M. M., Malanee D., Jore J. M. P., Hal J. M., (1992), *Arch. Virol.*, 123, 131.
34. Williams G. V., Rohel D., Kuzio J., Faulkner P., (1989), *J. Gen. Virol.*, 70, 187-202.
35. Harrison R. L., Jarvis D. L., Summers M. D., (1996), *Virology*, 226, 34-46.

36. Jarvis D. L., Bohlmeier D. A., Garcia Jr. A., (1992), *J. Virol.*, 66, 6903-6911.
37. Chabini H., Ogliastro M. H., Martin M., Giraud C., Devauchelle G., Cerutti M., (1993), *J. Virol.*, 67, 2664-2671.
38. Rohrmann G. F., (1992), *J. Gen. Virol.*, 73, 749-761.
39. Laufus S., Lu A., Arrell K., Carstens E. B., (1997), *Virology*, 228, 98-106.
40. Moscardi F., (1999), *Annu. Rev. Entomol.*, 44, 257-289.
41. Bonning B. C., Possee R. D., Hammock B. D., (1999), *J. Invert. Pathol.*, 73, 234-236.
42. Wood A. H., (1996), *Molecular biology of the biological control of pests and diseases of plants*, 91-101, CRC Press, Florida.
43. Korth K. L., Levings C. S., (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 3399.
44. Stewart L. M. D., Hirst M., Ferber M. L., Merryweather A. T., Cayley P. J., Possee R. D., (1991), *Nature*, 352, 85-88.
45. Tomalski M. D., Miller L. K., (1991), *Nature*, 352, 82-85.
46. Martens J. W. M., Honee G., Zuidema D., van Lent J. W. M., Viss B., Vlaskovits J. M., (1990), *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 2764.
47. Merryweather A. T., Weyer U., Harris M. P. G., Hirst M., Booth T., Possee R. D., (1990), *J. Gen. Virol.*, 71, 1535-1544.
48. Carbonell L. F., Hodge M. R., Tomalski M. D., Miller L. K., (1988), *Gene*, 73, 409-418.
49. Shuler M. L., Hammer D. A., Granados R. R., (1995), *Baculovirus expression systems and biopesticides*, 1-12, Eds. Shuler M. L., Wood H. A., Granados R. R., Hammer D. A., Wiley-Liss, Inc. New York.
50. Maeda S., (1989), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 165, 1177-1183.
51. Michalik J., (1993), *Kosmos*, 42, 583-597.
52. Richards A., Matthews M., Christian P., (1998), *Annu. Rev. Entomol.*, 43, 493-517.
53. Lewidow L., (1995), *Bioscience*, 45, 545-551.
54. Boyce F. M., Bucher N. R. L., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 2348-2352.
55. Duisit G., Saleun S., Douthe S., Barsoum J., Chadeuf G., Moullier P., (1999), *J. Gene Med.*, 1, 93-102.
56. Shoji I., Aizaki H., Tani H., Ishii K., Chiba T., Saito I., Miyamura T., Matsuura Y., (1997), *J. Gen. Virol.*, 78(10), 2657-2664.
57. Kochan G., Szewczyk B., (1993), *Biotechnol.*, 2(21), 69-75.
58. Bienkowska-Szewczyk K., Szewczyk B., (1999), *Acta Biochim. Pol.*, 46, 325-339.
59. Altmann F., Staudacher E., Wilson I. B. H., Marz L., (1999), *Glycoconj. J.*, 16, 109-123.
60. Hollister J. R., Shaper J. H., Jarvis D. L., (1999), *Glycobiology*, 25, 76-82.