

Zastosowanie wirusa owadziego — bakulowirusa AcNPV do ekspresji obcych genów

Grażyna Kochan
Bogusław Szewczyk
Katedra Biochemii
Uniwersytet Gdański
Gdańsk

1. Ogólna charakterystyka bakulowirusów

Bakulowirusy (rodzina *Baculoviridae*) — to wirusy namnażające się w larwach owadów wielu rzędów, głównie motyli (*Lepidoptera*) i muchówek (*Diptera*). W niektórych krajach (np. USA) są zarejestrowane jako pestycydy i czasami stosowane w tym celu. Dotychczas opisano ponad 600 gatunków należących do tej rodziny, jednak zaledwie kilka badano na poziomie molekularnym. Najlepiej jest poznany bakulowirus AcNPV (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) wyizolowany z larw ćmy miernikowca *Autographa californica* żywiącego się rzeżuchą.

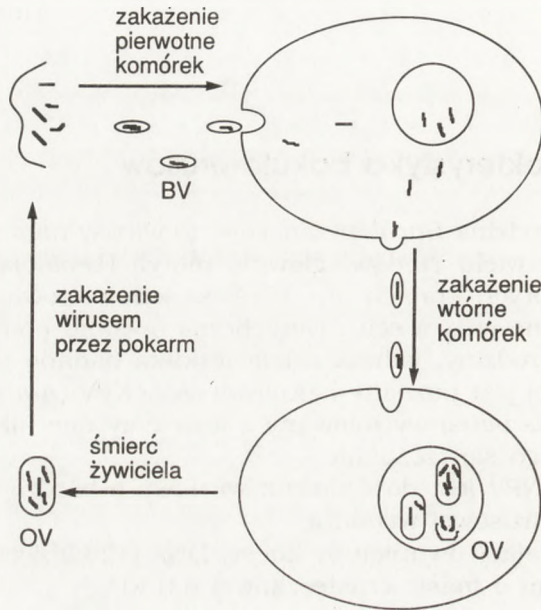
Bakulowirus AcNPV jest dość dużym wirusem o bardzo złożonej budowie. W skład cząstki wirusowej wchodzi:

- 1) rdzeń zawierający dwuniciowy kolisty DNA (128 kb) związany z bogatym w argininę białkiem o masie cząsteczkowej 6,9 kD,
- 2) kapsyd białkowy okrywający rdzeń,
- 3) otoczka białkowa,
- 4) otoczka polihedrynowa w przypadku jednej z form wirusa tzw. formy OV (1).

Podczas zakażenia AcNPV powstają dwie funkcjonalnie i morfologicznie różne formy wirusa: tzw. forma okluzyjna OV (ang. *occluded virus*), od której zaczyna się zakażenie żywiciela po zjedzeniu przez larwę pokarmu zainfekowanego wirusem i tzw. forma pączkująca BV (ang. *budded virus*). Formy OV tworzą ciała okluzyjne (2 – 5 μm wielkości) (2) w jądrach zakażonych komórek. Matriks ciał okluzyjnych stanowi białko polihedryna (29 kD), w której są rozmieszczone cząstki wirusowe. Rola otoczki polihedrynowej polega na ochronie wirusa przed czynnikami zewnętrznymi poza organizmem żywiciela oraz na ochronie przed enzymami proteolitycznymi w pierwszych etapach zakażenia. Otoczka polihedrynowa ulega rozpuszczeniu w warunkach alkalicznych jelita gąsienic (pH 10,5) (3). Uwolnione wirusy zakażają komórki jelita. Tam zachodzi replikacja i tworzenie form potomnych BV. Wirusy są uwalniane do hemolimfy owada. Tą drogą przedostają się do innych tkanek, gdzie wywołują

wtórne zakażenie. W wyniku tego zakażenia powstają formy OV. W momencie śmierci żywiciela wirus formy OV stanowi 25 – 30% suchej masy ciała owada (4).

Produkcja form OV i BV jest rozdzielona w czasie (rys. 1). W hodowlach tkankowych formą zakażającą jest BV. Wirusy BV pojawiają się w komórce już 12 godzin po zakażeniu i są produkowane przez 22 godziny. Formowanie OV rozpoczyna się 20 godzin po zakażeniu i trwa przez 70 godzin. W tym czasie w jądrze zakażonej komórki pojawia się 70 – 100 ciał okluzyjnych (2).



Rys. 1. Cykl życiowy bakulowirusa. Gąsienice zakaża się wirusem w formie okluzyjnej, OV, znajdującym się w pożywieniu. Otoczka poliheдрыnowa formy OV rozpuszcza się w jelicie gąsienic i uwolnione wirusy zakażają komórki jelita. W komórkach tych tworzone są formy potomne BV wirusa pozbawione poliheдрыny. Po przedostaniu się do hemolimfy larwy wirusa atakują inne tkanki prowadząc w efekcie do śmierci żywiciela. Wirusy powstałe w wyniku zakażenia wtórnego są otoczone poliheдрыną.

Wyróżnia się trzy fazy ekspresji genów wirusowych: α) wczesna, β) późna, γ) bardzo późna (okluzyjna).

α) Wczesna faza ekspresji genów (0 – 6 godzin po infekcji). Faza ta jest słabo poznana. Ekspresję genów w tej fazie poprzedza replikacja DNA. Do wczesnej fazy zalicza się dwie grupy genów: I) bardzo wczesne (np. aktywator transkrypcji IE 1), II) wczesne, opóźnione.

β) Późna faza ekspresji genów (6 – 18 godzin po zakażeniu). Dochodzi do formowania cząstek wirusowych BV, co wiąże się z syntezą strukturalnych białek nukleokapsydu. Zachodzi synteza białka otoczkowego (64kD) odgry-

wającego rolę we wnikaniu BV do komórek (białko to oddziałuje z receptorami komórkowymi) (1). W tym czasie przebiega także replikacja DNA.

γ) Bardzo późna faza ekspresji (faza okluzyjna) (18 – 72 godzin po zakażeniu). Faza ta charakteryzuje się intensywną syntezą polihedryny i formowaniem cząstek wirusowych OV. W tym czasie polihedryna stanowi dominującą ilościowo białko (50 – 75%) wszystkich białek wirusowych (3). Równocześnie syntetyzowane jest białko p10 o masie cząsteczkowej 10kD. Tworzy ono w komórce fibrylarne struktury o nie poznanej dotychczas funkcji (5).

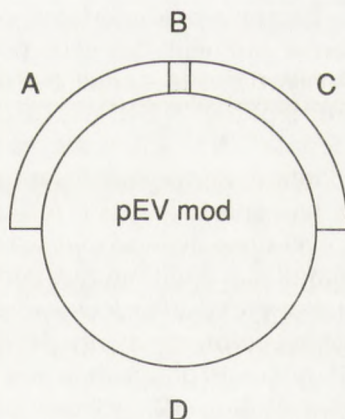
Późne i bardzo późne geny transkrybowane są przez wirusową polimerazę RNA.

2. Zastosowanie bakulowirusa do ekspresji obcych genów

Formą zakażającą komórki w hodowlach tkankowych jest forma BV, a usunięcie genu polihedryny nie obniża infekcyjności wirusa. Te właściwości w powiązaniu z niezwykle wysokim poziomem syntezy polihedryny (do 1 mg/ml hodowli) (3) zostały wykorzystane do konstrukcji układu ekspresji obcych genów w bakulowirusie.

Genom bakulowirusa jest duży (128 kb) i wprowadzenie do niego obcego genu drogą rekombinacji uzyskuje się przez zastosowanie wektorów transferowych. Wektory takie (przykład na rys. 2) zawierają:

- 1) replikon bakteryjnego plazmidu wielokopijnego,
- 2) marker selekcyjny,
- 3) fragmenty DNA wirusowego zawierające rejon promotorowy i terminatorowy genu polihedryny z sekwencjami otaczającymi (2 – 5kb) (6, 7) ,
- 4) miejsca wielokrotnego klonowania pomiędzy promotorem i terminatorem polihedryny.



Rys. 2. Schemat wektora transferowego używanego do transfekcji komórek owadzieh. Przykładowo przedstawiamy wektor pEVmod (wielkość około 5 tysięcy par zasad). Umownie został on podzielony na 4 części od A do D.

- A. Rejon promotorowy genu polihedryny bakulowirusa 850 par zasad.
- B. Miejsce wielokrotnego klonowania, tzw. polilinker.
- C. Rejon terminatorowy genu polihedryny bakulowirusa 1500 par zasad.
- D. Replikon bakteryjnego plazmidu wielokopijnego z markerem selekcyjnym (oporność na ampicylinę).

Wprowadzenie obcego genu do bakulowirusa uzyskuje się w wyniku rekombinacji zachodzącej po transfekcji komórek owadzych w hodowli *in vitro* mieszaniną DNA wirusowego i DNA plazmidowego zawierającego obcy gen (3). Inną metodą uzyskania zrekombinowanego wirusa jest transfekcja DNA plazmidowym poprzedzona zakażeniem dzikim wirusem (8). Częstość rekombinacji wynosi około 0,1%. Rozróżnienie między dzikim i zrekombinowanym wirusem jest możliwe dzięki różnicy w morfologii łyseinek (3). Brak polihedryny w rekombinantach powoduje, że wytwarzane przez nie łyseinki różnią się od łyseinek wirusa dzikiego. Potwierdzenie wyniku można uzyskać przez hybrydyzację DNA/DNA klonowanego genu, zastosowanie PCR (9) lub reakcję z przeciwciałami (10).

System ten pozwala na jednoczesną syntezę kilku białek w jednej komórce. Można to uzyskać przez zakażenie komórek mieszaniną różnych zrekombinowanych wirusów lub zakażenie wielokrotnie zrekombinowanym wirusem (zawierającym dwa lub więcej obcych genów) (11, 12). Klonowanie kilku genów do jednego bakulowirusa stało się możliwe dzięki zastosowaniu innych promotorów niż promotor polihedryny (13, 14). Bardzo często obcy gen wprowadza się w miejsce genu p10 (15), którego produkt nie jest konieczny do przeżycia wirusa.

3. Modyfikacje potranslacyjne

Białka uzyskiwane w bakulowirusowych systemach ekspresyjnych są immunologicznie i funkcjonalnie podobne do ich naturalnych odpowiedników. Jest to wynik modyfikacji potranslacyjnych zachodzących w komórkach owadzych.

3.1. Proteoliza, odcinanie sekwencji sygnałowych

Enzymy w komórkach owadzych odcinają sekwencje sygnałowe z prekursorów polipeptydowych, podobnie jak enzymy w komórkach ssaczy (16). Uzyskane w systemie bakulowirusów ludzkie interferony α i β (17, 18) oraz interleukiny 2 i 3 (1, 19) są rozpoznawane i cięte jak ich naturalne odpowiedniki. Na podstawie tych i wielu innych przykładów wydaje się prawdopodobne, że większość, a nawet wszystkie białka z sekwencjami sygnałowymi są transportowane do retikulum endoplazmatycznego i tam cięte. Nie zostało dotychczas stwierdzone czy podobne modyfikacje zachodzą w białkach lizosomalnych i mitochondrialnych. Jedynie w przypadku wirusowych produktów białkowych, gdy cięcie przeprowadza proteaza wirusowa uzyskuje się białka nie w pełni cięte, np. HIV gp20, HIV gp41, (4) hemaglutynina grypy (20). Modyfikacje poliprotein zawierających proteazy wirusowe, np. poliproteina wirusa sindbi (12), wirusa polio, wirusa pryszczycy (4) zachodzą we właściwy sposób.

3.2. Glikozylacja

Syntetyzowane w komórkach owadziegich glikoproteidy zawierają oligosacharydy bogate w mannozę (21). Wiele białek posiada jednak mniejszy ciężar cząsteczkowy niż ich naturalne odpowiedniki lub ulega glikozylacji w różnym stopniu (obecność kilku produktów różniących się ciężarem cząsteczkowym) (22, 23). Wrażliwość na tunikamycynę sugeruje, że jest to N-glikozylacja (22). Traktowanie glikoprotein endoglikozydazami H i F daje rezultaty pozwalające przypuszczać, że uzyskane produkty podobne są do ich naturalnych odpowiedników (24).

3.3. Fosforylacja

Fosforylacja białek w komórkach owadziegich została stwierdzona w przypadku syntezy kilku białek: ludzkiego białka c-myc, produktu genu Kruppel z *Drosophila* (18), HTLV-1 p40^x (25) i ludzkiej terminalnej transferazy.

Fosforylację przeprowadza endogenna kinaza białkowa. Najczęściej fosforylacji ulega reszta seryny. Wierność tego procesu została potwierdzona na przykładzie ludzkiego receptora insuliny (4).

3.4. Acylacja

Dowodem na obecność enzymów acylujących w komórkach owadziegich jest uzyskanie acylowanego antygeny T SV40 (4).

4. Synteza białek w bakulowirusie

Syntezę białek w bakulowirusowych systemach ekspresyjnych można uzyskać w hodowlach tkankowych lub w całym larwach.

4.1. Hodowle tkankowe

Spośród wielu dostępnych linii komórek owadziegich do prac z bakulowirusami wybrano linię komórek jajnikowych, pochodzących ze *Spodoptera frugiperda* IPLB-SF 21 (2). Charakteryzują się one bardzo dobrym wzrostem w hodowlach płynnych i jednowarstwowych.

Do uzyskania małych ilości białka preferuje się jego syntezę w hodowlach tkankowych, mimo ich znacznych kosztów. Łatwość prowadzenia hodowli Sf 21 oraz wiedza o cyklu rozwojowym wirusa w tych komórkach powodują, że jest to system częściej stosowany. Ponadto, oczyszczanie białek z hodowli jest stosunkowo proste dzięki zastosowaniu syntetycznych pożywek o małej zawartości białka. Użycie hodowli do produkcji białka na dużą skalę pozostaje wciąż w sferze badań, mimo opisywanych już technik syntezy białka w hodowlach w dużej objętości (26 – 30).

4.2. Owady

Do syntezy zrekombinowanych białek w bakulowirusie wykorzystuje się dwa gatunki larw: *Trichoplusia ni* i *Bombyx mori* (19,30). Drugi z wymienionych preferowany jest w Japonii ze względu na długą historię hodowli larw jedwabnika w tym kraju oraz skomputeryzowane systemy hodowli. Larwy zakaża się wstrzykując im zrekombinowane wirusy (gdy wirus pozbawiony jest genu polihedryny — AcNPV pol⁻) lub podając zakażony pokarm (AcNPV pol⁺). Ilość białka uzyskiwana w larwach przewyższa ilość uzyskiwaną w hodowlach nawet dziesięciokrotnie. Przykładem może być synteza IGFII (*insulin growth factor II*). W hodowlach tkankowych uzyskano 0,3 mg białka/ml, podczas gdy z jednej larwy 3,6 mg tego produktu. Syntetyzowane białko odkładane jest w hemolimfie lub w komórkach sekrecyjnych żywiciela (31).

5. Podsumowanie

Wektory bakulowirusowe do produkcji obcych białek są obecnie często stosowane. Analiza uzyskanych produktów białkowych pozwala stwierdzić, że system ten posiada szereg zalet:

- 1) poziom syntezy białka jest bardzo wysoki,
- 2) genom wirusowy może przyjąć dodatkowo 25 kb obcego DNA i nie wpływa to na powstawanie właściwych cząstek wirusowych (pod warunkiem, że obcy DNA nie koduje białka toksycznego dla wirusa lub komórek żywiciela),
- 3) modyfikacje potranslacyjne zachodzące w tym systemie są identyczne lub podobne do analogicznych w komórkach ssaków,
- 4) różnorodność wektorów transferowych stwarza duże możliwości doboru właściwego wektora do klonowania genu i późniejszej jego ekspresji,
- 5) wirusy te infekują tylko bezkręgowce.

Literatura

1. Miller L. K., (1988), *Ann. Rev. Microbiol.*, 42, 177 – 199.
2. Miller L. K., (1989), *BioEssays*, 11, 91 – 95.
3. Summers M. D., Smith G. E., (1987), *A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures*, Texas Agricultural Experimental Station, Bull., 1555.
4. Vlak J. M., Keus R. J. A., (1990), *Viral Vaccines*, Wiley-Liss, Inc., 91 – 128.
5. Williams G. V., Rohel D. Z., Kuzio J, Faulkner P., (1989), *J. Gen. Virol.*, 70, 187 – 202.
6. Matsuura Y, Possee R. D., Overton H. A., Bishop D. H. L., (1987), *J. Gen. Virol.*, 68, 1233 – 1250.
7. Luckow V. A., Summers M. D., (1988), *Virology*, 167, 56 – 71.
8. Goswami B. B., Glazer R. I., (1991), *Biotechniques*, 10, 626 – 630.
9. Malitschek B., Schartl M., (1991), *Biotechniques*, 11, 177 – 178.
10. Manns A., Grosse F., (1991), *Biotechniques*, 10, 154 – 158.
11. Haseman C. A., Capra J. D., (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 3942 – 3946.
12. Oker-Blom C., Summers M. D., (1989), *J. Virol.*, 63, 1256 – 1264.
13. Thiem S. M., Miller L. K., (1990), *Gene*, 91, 87 – 94.

14. Wang X., Ooi B. G., Miller L. K., (1991), *Gene*, 100, 131 – 137.
15. Vlaskovits J. M., Schouten A., Usmany M., Belsham G. J., Klinge-Rhodes E. C., Maule A. J., Van Lent J. W. M., Zuidema D., (1990), *Virology*, 179, 312 – 320.
16. Lebacqz-Verheyden A. M., Kasprzyk P. G., Raum M. G., Van Wyke Coelingh K., Lebacqz J. A., Battey J. F., (1988), *Mol. Cell. Biol.*, 8, 3129 – 3135.
17. Smith G. E., Summers M. D., Fraser M. J., (1983), *Mol. Cell. Biol.*, 3, 2156 – 2165.
18. Luckow V. A., Summers M. D., (1988), *Biotechnology*, 6, 47 – 55.
19. Miyajima A., Schreus J., Otsu K., Kondo A., Arai K., Maeda S., (1987), *Gene*, 58, 273 – 281.
20. Possee R. D., (1986), *Virus Res.*, 5, 43 – 59.
21. Ghiasi H., Nesburn A. B., Wechsler S. L., (1991), *Virology*, 185, 187 – 194.
22. Inumaru S., Yamada S., (1991), *Virus Res.*, 21, 123 – 139.
23. Sanchez-Martinez D., Pellett P. E., (1991), *Virology*, 182, 229 – 238.
24. Wells D. E., Vugler L. G., Britt W. J., (1990), *J. Gen. Virol.*, 71, 873 – 880.
25. Nyunoya H., Akagi T., Ogura T., Maeda S., Schimotohno K., (1988), *Virology*, 167, 538 – 544.
26. Kompier R., Tramper J., Vlaskovits J. M., (1988), *Biotechnol. Lett.*, 10, 849 – 854.
27. Kompier R., Kislev N., Segal I., Kadouri A., (1991), *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 822 – 827.
28. Van Lier F. L. J., Van Den End E. J., De Gooijer C. D., Vlaskovits J. M., Tramper J., (1990), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 43 – 47.
29. King G. A., Daugulis A. J., Faulkner P., Bayly D., Goosen M. F. A., (1988), *Biotechnol. Lett.*, 10, 683 – 688.
30. Maiorella B., Inlow D., Shauger A., Harano D., (1988), *Biotechnology*, 6, 1406 – 1410.
31. Marumoto Y., Sato Y., Fujiwara H., Sakano K., Saeiki Y., Agata M., Furusawa M., Maeda S., (1987), *J. Gen. Virol.*, 68, 2599 – 2606.

Application of insect virus — baculovirus AcNPV in the expression of foreign genes

Summary

Baculovirus vectors are very useful in producing high levels of proteins. This system yields recombinant proteins similar to their original counterparts. Expression of foreign genes occurs in infected cells which provide a suitable environment for post-translational modifications and folding of the protein product. The size of baculovirus genome allows to insert large DNA segments (up to 25kb). Constructions of recombinant baculoviruses are very simple and need minimum of viral manipulation.

key words:

baculovirus, insect virus, recombinant proteins.

Adres dla korespondencji:

Grażyna Kochan, Katedra Biochemii, Uniwersytet Gdański, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk.