

## **БАКУЛОВИРУСНАЯ СИСТЕМА ЭКСПРЕССИИ ЧУЖЕРОДНЫХ ГЕНОВ — НАСТОЯЩЕЕ И БУДУЩЕЕ БИОТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ БЕЛКОВ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

*В обзоре проанализированы особенности молекулярно-генетической организации бакуловирусов, позволяющие использовать их в качестве суперпродуцентов белков различного происхождения.*

*Рассмотрены также подходы, при помощи которых можно добиться максимального выхода биологически активного продукта в данной системе экспрессии.*

С каждым годом возрастает число лабораторий, использующих для экспрессии чужеродных генов бакуловирусные экспрессивные системы, достоинства и преимущества которых представлены в ряде обзоров [1—3].

За последнее время проведено много исследований в области изучения молекулярно-генетической организации бакуловирусов. В результате были созданы новые конструкции бакуловирусных векторов, послужившие основой для получения высокоэффективных экспрессивных систем, которые обеспечивают 30—100 %-й выход рекомбинантов с уровнем экспрессии чужеродных генов, сравнимым с таковым гена полиэдрина в клетках, зараженных диким вирусом. Выход гетерологичного белка в таких системах составляет до 500 мг/л среды [1].

В данном обзоре проанализированы особенности молекулярно-генетической организации бакуловирусов, позволяющие использовать их в качестве суперпродуцентов белков различного происхождения. Рассмотрены также подходы, при помощи которых можно добиться максимального выхода биологически активного продукта в данной системе экспрессии. Обоснованы преимущества бакуловирусной экспрессивной системы перед другими системами экспрессии чужеродных генов.

**Преимущества бакуловирусной экспрессивной системы.** Традиционными продуцентами прокариотических и эукариотических белков являются экспрессивные системы на основе клеток бактерий, дрожжей, культур клеток млекопитающих. Основная задача, связанная с получением эукариотических белков, заключается в том, чтобы найти систему, в которой при относительно высоком выходе продукта белки были бы функционально активными, что связано с посттрансляционной модификацией экспрессируемых белков.

В клетках бактерий, экспрессирующих как прокариотические, так и эукариотические клонированные гены, можно достичь довольно высокого выхода продукта, но практически все белки эукариотического происхождения не проходят в этих системах процесса созревания, что ведет к отсутствию у них биологической активности. Даже в дрожжевых системах экспрессии биологическая активность продуктов остается не на достаточном уровне. Проблема функциональной активности рекомбинантных белков успешно решается в системах клеток млекопитающих, однако выход продукта в этих системах очень мал.

Начиная с 1983 года [4], все большее распространение получает бакуловирусная система экспрессии, представляющая собой линию кле-

ток или организм насекомого, инфицированные рекомбинантным бакуловирусом с интегрированным чужеродным геном. Эта система используется для получения как прокариотических, так и эукариотических белков различного происхождения. В ней наряду с высоким выходом продукта осуществляется его посттрансляционная модификация. В клетках насекомых гетерологичные белки подвергаются правильному протеолитическому расщеплению [5—7], фосфорилированию [8, 9], ацилированию [10, 11], происходит корректное образование дисульфидных мостиков [12]. Кроме того, осуществляется гликозилирование белков [9, 13] и, несмотря на то, что в бакуловирусной системе это происходит за счет присоединения только простых олигосахаридов [8, 12, 14], практически все полученные в этой системе белки функционально активны [6, 8, 12]. Ферментные системы клеток насекомых, в основном, узнают и отщепляют сигнальный пептид секретируемых белков, а также успешно транспортируют эти белки из клеток в среду [4, 13, 15], хотя для некоторых белков отмечен низкий уровень секреции [16].

Сравнение различных систем экспрессии по способности к посттрансляционным модификациям белка, а также по количественному выходу экспрессируемого продукта дано в табл. 1.

Заслуживает особого внимания возможность правильной сборки в клетках насекомых сложных макромолекул, состоящих из нескольких субъединиц. Так, например, в клетках насекомых с помощью дисульфидных мостиков происходит правильная сборка гетеродимера иммуноглобулина, состоящего из двух легких и двух тяжелых цепей мономеров [17].

В последнее время бакуловирусная система экспрессии используется также для изучения структурной организации надмолекулярных образований, в частности, вирусных капсидных оболочек. Экспрессируемые в этой системе капсидные белки способны к самосборке, образуя вирусоподобные частицы, по структурным и иммунологическим характеристикам сходные с капсидами нативного вируса [18, 19].

Несомненны достоинства бакуловирусной системы в качестве продуцента различных антигенов, использующихся для иммунологических исследований, серологической диагностики вирусных инфекций, создания вакцин [20, 21]. Клетки насекомых, экспрессирующие рекомбинантный антиген, не содержат собственных антигенов, способных реагировать с антителами сывороток мышей, кроликов, обезьян и человека. Поэтому высокая степень очистки, необходимая для рекомбинантных антигенов, полученных из систем *Escherichia coli* и дрожжей, не является обязательной при получении антигенов, экспрессируемых в бакуловирусной системе.

Бакуловирусная система экспрессии может оказаться незаменимой при получении биологически активных белков, токсичных для клеток млекопитающих, например, онкогенов [22].

Таблица 1

Посттрансляционный процессинг и количественный выход белков в различных экспрессивных системах [16]

Способ модификации	Система экспрессии			
	<i>E. coli</i>	Дрожжи	Клетки насекомых	Клетки млекопитающих
Протеолитическое расщепление	+/-	+/-	+	+
Гликозилирование	-	+	+	+
Секреция	+/-	+	+	+
Упаковка	+/-	+/-	+	+
Фосфорилирование	-	+	+	+
Ацилирование	-	+	+	+
Амидирование	-	-	+	+
Выход (по отношению к сухой массе), %	1—5	1	30	1

Одним из аспектов применения описываемой системы является создание высокоэффективных вирусных инсектицидов, представляющих собой рекомбинантные бакуловирусы — продуценты гормонов или токсинов, вызывающих гибель насекомых на ранних стадиях инфицирования [23—25].

Следует отметить, что практически все гены, экспрессируемые в бакуловирусной системе, имеют непрерывную структуру. До сих пор четко не установлено, является это правило обязательным или можно использовать нативные гены. Пока только в двух работах показана возможность экспрессии генов, содержащих интроны и экзоны, при этом происходил правильный сплайсинг мРНК [26, 27]. В принципе, возможность использования нативных генов для экспрессии в бакуловирусной системе подтверждается обнаружением интронных и экзонных областей у некоторых бакуловирусных генов [28], хотя ранее считалось, что все гены бакуловирусов имеют непрерывную структуру.

Таким образом, использование экспрессивной бакуловирусной системы позволяет получать в относительно больших количествах гетерологичные белки (до 30 % от общего количества белка в клетке) различного происхождения — прокариотические, вирусные, эукариотические. Структурно-функциональные характеристики этих белков подобны или максимально приближены к свойствам их аналогов естественного происхождения.

#### **Особенности молекулярно-генетической организации бакуловирусов.**

В качестве векторов в бакуловирусных системах используются вирусы ядерного полиэдруса (ВЯП). Наиболее изученным и часто используемым в генноинженерных экспериментах является ВЯП калифорнийской совки (*Autographa californica*) [1, 2], хотя ведутся работы и с другими вирусами: ВЯП тутового шелкопряда (*Bombyx mori*) [13], ВЯП вошинной моли (*Galleria mellonella*) [3], ВЯП кольчатого шелкопряда (*Malacosoma neustria*) [29], ВЯП непарного шелкопряда (*Lymantria dispar*) [30].

Репродукция ВЯП, структура вирионов и вирусной ДНК, временная регуляция экспрессии вирусных генов описаны ранее [1—3, 32]. Напомним только, что уникальной особенностью бакуловирусов является наличие очень поздних  $\sigma$ -генов, интенсивно экспрессирующихся в тот период, когда функционирование предранних  $\alpha$ -, ранних  $\beta$ - и поздних  $\gamma$ -генов уже репрессировано. Таких генов два и представлены они белками — полиэдрином и *P10*, на долю которых приходится основная масса белков в инфицированной клетке на поздних этапах развития инфекции. Большое количество этих белков коррелирует с таковым их мРНК, что свидетельствует о наличии сильных промоторов у генов полиэдрина и *p10* [33]. Структура этих промоторов хорошо изучена [34]. Анализ их нуклеотидной последовательности показал наличие признаков, характерных для эукариотических промоторов. Промотор гена полиэдрина ВЯП *A. californica* состоит из 49 нуклеотидов 5'-некодирующей лидерной области и короткой последовательности из 15—20 нуклеотидов выше сайта инициации транскрипции (САР-сайт) [35, 36]. Промотор гена *p10* включает 70 нуклеотидов 5'-некодирующей лидерной последовательности и область из 30 нуклеотидов выше сайта инициации транскрипции [37, 38]. В промоторах этих генов локализованы ТАТА- и СААТ-подобные последовательности, а также по два тандемных повтора в области выше САР-сайта. В районе инициации транскрипции мРНК расположена консервативная последовательность из 12 нуклеотидов. Такая же последовательность найдена у всех поздних и очень поздних промоторов бакуловирусных генов [32]. Пока неясно, какие факторы способствуют высокой эффективности этих промоторов. Было показано, что вставки из 8, 95, 785 нуклеотидных пар между СААТ- и ТАТА-боксами не меняют активности промотора гена полиэдрина [35]. Кроме того, делеция ТАТА-боксов также не оказывает влияния на промотор гена полиэдрина, хотя для активности промоторов некоторых эукариотических генов наличие этого бокса обязательно [35].

Для сохранения максимальной промоторной активности необходима последовательность из 69 нуклеотидных пар выше АТГ-кодона гена полиэдрина. Эта активность уменьшается на 90 %, если остается только 56 нуклеотидов. Промоторную активность не обнаруживали в случае делеции САР-сайта. Есть данные о том, что гомологичная область *hg5* [39], расположенная на значительном расстоянии от промотора *p10*, может играть важную роль в его функционировании [40]. В то же время в другой работе [36] был сделан вывод о том, что этот элемент мало влияет на промотор гена полиэдрина.

Несмотря на отсутствие целостной картины во взглядах на факторы, обуславливающие функционирование  $\sigma$ -промоторов, их высокая эффективность побудила исследователей использовать гены полиэдрина и *p10* для встраивания чужеродной ДНК. Это оказалось возможным и по той причине, что указанные гены кодируют белки, не являющиеся необходимыми для репликации вируса [4, 41, 42]. Позднее же включение  $\sigma$ -промоторов приводит к тому, что продукт экспрессии гетерологичного гена не оказывает влияния на репликацию вируса даже при токсичности этого продукта для клетки.

В случае клонирования генов под промотором полиэдрина наличие легковыявляемого селективного маркера — отсутствие полиэдров у вирусов с нарушенной кодирующей последовательностью гена полиэдрина — делает систему практически удобной [43]. Кроме того, большой размер вирусного генома (100—130 тыс. п. н.) позволяет клонировать в нем крупные фрагменты гетерологичной ДНК [1, 2].

Все эти особенности и побудили ученых применить бакуловирусы в качестве суперпродукентов различных белков. Впервые эта возможность была реализована на ВЯП *A. californica* со встроенным геном  $\beta$ -интерферона человека под контролем промотора полиэдрина с использованием в качестве хозяина линии клеток *Spodoptera frugiperda* [4]. Большинство лабораторий и фирм до настоящего времени в качестве бакуловирусной экспрессивной системы используют именно эту систему хозяин — вектор.

**Исследование молекулярно-структурной организации бакуловирусных векторов.** Из-за большого размера вирусного генома невозможно встроить чужеродный ген сразу же под промотор гена полиэдрина. Поэтому получение рекомбинантных вирусов проходит стадию конструирования транспортного вектора, представляющего собой рекомбинантную плазмиду, содержащую чужеродный ген, встроенный в ген полиэдрина. Транспортный вектор содержит все регуляторные элементы гена полиэдрина и прилежащие к гену области вирусного генома, наличие которых обеспечивает гомологичную рекомбинацию между вирусной ДНК и транспортным вектором при котрансфекции клеток хозяина. В результате образуются рекомбинантные вирусные частицы, несущие чужеродный ген под промотором гена полиэдрина.

Уже в первых исследованиях было показано, что уровни экспрессии рекомбинантных белков при использовании различных конструкций векторов на основе одного и того же вируса могут существенно различаться. И хотя в большинстве случаев достигался высокий уровень выхода продукта, он все же был несравнимым с количеством полиэдрина, экспрессирующегося вирусом дикого типа [1].

Прежде всего была исследована зависимость экспрессии гетерологичных белков от места встройки чужеродных генов в ген полиэдрина. Были сконструированы транспортные векторные плазмиды, в которых гетерологичный ген был встроен в разные области кодирующей и 5'-некодирующей лидерной последовательностей гена полиэдрина.

При использовании ряда векторных конструкций, различающихся по степени делетированности лидерной последовательности (плазмиды типа *pAcRP*), было показано, что уровень синтеза белка повышается с увеличением уровня представленности лидерной последовательности [44]. Аналогичные данные получены для векторов на основе ВЯП *B.*

*mori* [45], а также для векторов, использующих промотор белка *P10* [40]. Эти исследования указали на необходимость сохранения всей лидерной последовательности для высокоэффективной экспрессии. Наиболее широко применяемыми плазмидами для конструирования бакуловирусных векторов являются *pAcUM1* [44], где сохранена вся лидерная последовательность, а также *pAc373* [15], в которой привнесенный в конструкцию олигонуклеотид за счет сходства нуклеотидного состава создает эффект отсутствующих восьми нуклеотидов лидерной последовательности.

Более высокий уровень рекомбинантных белков был достигнут после создания векторных конструкций, сохраняющих помимо полной лидерной последовательности часть нуклеотидов 5'-кодирующей области гена полиэдрина. Было создано несколько конструкций, в которых сайт встраивания гетерологичного гена находился на разных расстояниях от АТГ-кодона в рамке считывания с геном полиэдрина [46]. Как выяснилось при анализе векторов различного происхождения, для высокоэффективной экспрессии было достаточно 8—12 нуклеотидов 5'-кодирующего конца гена полиэдрина. Белок в этом случае получался химерным, т. е. несущим на N-конце часть аминокислотных последовательностей полиэдрина.

Для выяснения влияния 3'-кодирующей области полиэдрина на экспрессию рекомбинантных белков сравнивали количественный выход продукта при использовании двух векторов, различающихся тем, что у одного из них (*pAcRP61*) в отличие от другого (*pAcRP6*) полностью делетирована кодирующая последовательность гена полиэдрина, а также 13 нуклеотидов после терминирующего кодона [44]. Количество белка, продуцируемые каждым вектором, были эквивалентными. Эти данные, а также работы других исследователей [17] свидетельствуют о том, что 3'-кодирующая область гена полиэдрина не влияет на экспрессию гетерологичных белков.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что для высокоэффективной экспрессии белка бакуловирусный вектор должен сохранять лидерную последовательность гена полиэдрина и несколько нуклеотидов 5'-кодирующей области, при этом делетированность 3'-кодирующей области несущественна. Но при этом высокоэкспрессируемый рекомбинантный белок получается химерным. Химерные белки вполне пригодны для иммунологических исследований и производства диагностикумов. Однако в ряде случаев, например для использования в терапевтических целях, для структурного анализа необходимы большие количества чистого белка. Для получения чистых рекомбинантных белков при конструировании векторных молекул использовали два подхода: 1) введение в векторные конструкции, экспрессирующие слитный белок, терминирующего кодона перед кодоном АТГ клонированного гена; 2) замена в этих же векторах при помощи сайт-направленного мутагенеза АТГ-кодона гена полиэдрина на АТТ или АТС, не инициирующие трансляцию [47].

Необходимо в связи с изложенными результатами остановиться на предыстории, натолкнувшей исследователей на мысль об использовании первого подхода, заключающегося в введении стоп-кодона. При работе с векторами для получения химерных белков авторы работы [46] обратили внимание на то, что в конструкциях, где ген хлорамфениколацетилтрансферазы (САТ) с собственной лидерной последовательностью был встроен после АТГ-кодона гена полиэдрина не в рамке считывания с этим геном, в небольших количествах синтезировался чистый белок. В этом случае количество гетерологичной мРНК было сравнимо с таковым мРНК химерных белков и мРНК полиэдрина. При анализе векторной конструкции выяснилось, что в лидерной последовательности гена САТ содержится терминирующий кодон, оказавшийся в рамке считывания гена полиэдрина. Эти данные свидетельствуют о том, что в клетках насекомых возможна реинициация трансляции со второго АТГ-кодона.

Ранее реинициация трансляции эукариотическими рибосомами в случае, когда терминирующий кодон находится в рамке считывания с первым АТГ и расположен перед вторым АТГ, была показана для системы экспрессии в клетках млекопитающих на основе вируса SV-40 [48].

Опираясь на описанные выше результаты, исследователи встроили стоп-кодон в векторные конструкции для получения химерных белков перед вторым АТГ в рамке считывания с АТГ полиэдрина (*pLV670*) [47]. Экспрессия рекомбинантных белков при использовании таких векторных конструкций оказалась очень низкой, как и в случае с CAT [46]. Большое количество мРНК этих белков указывало на то, что при высоком уровне транскрипции эффективность реинициации трансляции со второго АТГ в бакуловирусной системе невысока. Показано также, что эффективность трансляции со второго АТГ несколько возрастает с увеличением расстояния между стоп-кодоном и вторым АТГ-кодоном, не достигая, однако, при этом значительного уровня. Был сделан вывод о том, что для получения больших количеств чистых белков следует искать другие подходы.

В связи с вопросом о реинициации трансляции следует остановиться на возможности экспрессии в бакуловирусной системе некоторых генов, находящихся под контролем одного промотора. Как известно, трансляция нескольких белков с полицистронной мРНК — отличительный признак прокариотических систем, эукариотические же мРНК имеют моноцистронную структуру. Характерной особенностью и одним из преимуществ бакуловирусной экспрессивной системы является то, что в ней успешно транслируются бицистронные мРНК ряда вирусов [49, 50]. Трансляция вирусных белков осуществляется при этом либо за счет механизма «скольжения» рибосомы по мРНК [49], либо путем непосредственного присоединения рибосомы к иницирующему кодону второго гена [50]. Важно отметить, что при создании конструкций с искусственным объединением под промотором гена полиэдрина двух генов, как, например, в случае с генами легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина [17], экспрессия второго гена не обнаруживается, хотя уровень транскрипции бицистронной мРНК очень высок. Таким образом, пока в бакуловирусной системе не удается экспрессировать несколько генов, находящихся под одним промотором и разделенных стоп-кодонами, за исключением вирусных перекрывающихся генов естественного происхождения. Возможно, это ограничение удастся обойти, если последовательность терминирующего кодона первого гена будет перекрываться с последовательностью иницирующего кодона второго гена (ТААТГ-последовательность на стыке генов), как было недавно показано при конструировании универсального прокариотического вектора для экспрессии генов в составе бицистронной системы сопряженной трансляции [51].

Второй подход для получения чистого рекомбинантного белка, а именно: модификация иницирующего кодона гена полиэдрина оказался более удачным. В двух векторных конструкциях *pAc311* и *pVL670* с помощью сайт-направленного мутагенеза АТГ-кодон гена полиэдрина был заменен на АТС (вектор *pAc360*) и АТТ (вектор *pVL945*). При этом кодирующая последовательность гена полиэдрина превращается в продолжение лидерной, а кодон АТГ рекомбинантного белка становится иницирующим [47, 52]. Эти векторные плазмиды давали высокий выход чистого рекомбинантного белка, эквивалентный количеству полиэдрина, продуцируемого диким вирусом.

При разработке стратегии получения суперпродуцентов возник вопрос: как влияют нарушения сигналов транскрипции и трансляции на эффективность созданных векторов?

Для выяснения влияния транскрипции наряду с определением количества синтезирующегося рекомбинантного белка регистрировали уровень синтеза соответствующей мРНК [46, 47]. Обнаружено, что в конструкциях с делегированной лидерной последовательностью гена полиэдрина снижены уровни синтеза мРНК по сравнению с теми, у ко-

торых лидерная последовательность остается интактной. Из этого следует, что в области, расположенной перед ATG гена полиэдрина, находятся сигналы инициации транскрипции.

Самые высокие уровни мРНК наблюдались в конструкциях для получения химерных белков, а также для векторов с измененным ATG-кодоном [47]. При сравнении количества мРНК рекомбинантных белков, синтезируемых вектором с измененным ATG-кодоном (*pAc360*) и вектором без кодирующей области гена полиэдрина (*pAcUM1*), было показано, что количества мРНК в этих системах эквивалентны, следовательно, сигналы транскрипции не распространяются далее ATG-кодона гена полиэдрина. В то же время уровень экспрессии исследуемых белков в системах с измененным ATG-кодоном значительно выше, очевидно, за счет повышения стабильности мРНК, содержащей на 5'-конце нуклеотидные последовательности гена полиэдрина [47].

Уровни экспрессии рекомбинантных белков могут зависеть от эффективности трансляции соответствующей мРНК. Обнаружено, что для бакуловирусной системы экспрессии наблюдаются те же закономерности в отношении последовательностей, граничащих с AUG, что и для эукариот вообще. Последовательности, окружающие AUG-кодон, значительно влияют на уровень трансляции мРНК эукариот [53]. Экспериментально подтверждена необходимость консервативного А в —3-положении для достижения высокого уровня трансляции в бакуловирусной системе [46]. Но описано несколько примеров того, когда при высоких уровнях мРНК и оптимальном для трансляции окружении AUG уровень экспрессии оставался низким [46, 54]. В этих случаях следует признать, что незначительная способность к трансляции является внутренним свойством данной гетерологичной мРНК, связанным, возможно, с ее стабильностью или стабильностью самого белка. Поэтому оценка предполагаемой эффективности каждого конкретного вектора, несущего определенный гетерологичный ген, будет иметь вероятностный характер, так как количество экспрессируемого продукта может оказаться различным не только при использовании разных векторов для наработки одного и того же белка, но и когда один и тот же вектор экспрессирует разные белки.

**Модификации бакуловирусных векторов, направленные на оптимизацию системы экспрессии рекомбинантных белков.** Применение модифицированных бакуловирусных векторов позволило значительно увеличить выход рекомбинантных белков, но достичь уровня экспрессии полиэдрина не удалось. Поэтому возникла идея о привнесении новых элементов, способных повысить количественный выход рекомбинантного белка.

В качестве такого элемента была использована бактериальная лидерная последовательность из 24 нуклеотидов, полученная из 3'-конца гена *trpD E. coli*, где она функционирует как часть сайта связывания с рибосомой прилежащего гена *trpD* [55]. Эту последовательность встраивали непосредственно перед ATG-кодоном гетерологичного гена в векторные конструкции с сохраненной лидерной последовательностью и частью кодирующей последовательности полиэдрина с измененным иницирующим кодоном (*pYL941*, *pAc360*). В работе [55] приведены данные по уровням экспрессии трех различных белков, продуцируемых векторами, содержащими и не содержащими бактериальной лидерной последовательности. Во всех трех случаях присутствие бактериальной лидерной последовательности значительно повышало количество экспрессируемого белка, что, очевидно, связано с более эффективной трансляцией, так как количества мРНК для всех векторов были одинаковы. Заслуживает внимания тот факт, что в векторах без бактериальной лидерной последовательности окружение ATG-кодона было более оптимальным для эффективной трансляции, поскольку в —3-положении находился А в отличие от векторов с бактериальной лидерной последовательностью, где в —3-положении расположен G. По-видимому, совокупность всех нуклеотидов бактериальной последовательности оказывается

настолько эффективнее при связывании с рибосомой, что перекрывает действие А в —3-положении. Этот несколько неожиданный эффект функциональной последовательности, привнесенной из «чуждой» прокариотической системы, требует дальнейших исследований, которые, возможно, помогут прояснить механизм связывания рибосомы с сайтом инициации трансляции.

Как отмечалось выше, бакуловирусная система осуществляет экспрессию секретируемых белков. При этом происходит правильное узнавание сигнального пептида, его отщепление и выделение белка на поверхность клетки или в среду. Даже те белки, которые в природных условиях не секретируются, в бакуловирусных экспрессивных системах могут обнаруживаться не только в клетках, но и в среде инфицированных клеток. Так, белок VP6 ротавирусов выявлен и в клетках, и в среде [56]. Но в таких случаях эффективность секреции низкая. Необходимость повышения количества секретируемого белка обусловлена несколькими факторами. Во-первых, выделение рекомбинантного белка в среду облегчает его очистку, во-вторых, на секреторном пути клетки осуществляются некоторые посттрансляционные модификации белков, такие как гликозилирование, образование дисульфидных мостиков, отщепление пролина. Поэтому повышение уровня секреции косвенным образом влияет на качественный и количественный выход продукта.

При создании векторов с более высоким уровнем секреции рекомбинантных белков был применен оригинальный подход: исследователи заменили сигнальный пептид рекомбинантного белка на таковой другого происхождения [57]. В качестве подобных пептидов были избраны сигнальные пептиды эффективно и высокосекретируемых белков насекомых — пчелиного мелиттина и  $\alpha$ -амилазы дрозофилы. Модельным геном служил ген предшественника папаина. Когда сигнальный пептид пропапаина был замещен таким же пептидом мелиттина пчелы, наблюдалось пятикратное увеличение уровня секреции пропапаина.

Пока неясно, является ли данный подход применимым для любого рекомбинантного белка, экспрессируемого в бакуловирусной системе, или он пригоден только для секретируемых белков. Векторы такого типа могут быть особо эффективными при получении высокогликозилированных белков.

**Применение других промоторов бакуловирусов в связи с перспективой использования рекомбинантных вирусов в качестве инсектицидов и полипромоторных векторов.** В качестве безопасных для человека вирусных инсектицидов бакуловирусы используются давно. В связи с развитием техники конструирования бакуловирусных векторов открываются новые возможности по созданию вирусов, несущих в своем геноме гены токсинов или гормонов, ускоряющих гибель насекомых [26—28]. Но рекомбинантные бакуловирусы, содержащие чужеродный ген под промотором гена полиэдрина, не могут применяться в качестве биоинсектицидов, так как вирусы с дефектным геном полиэдрина не образуют полиэдров, посредством которых инфекция распространяется среди насекомых. Отсутствие полиэдров ограничивает также использование организмов насекомых в качестве хозяев в бакуловирусной системе экспрессии, поскольку необходимость инфицирования каждого насекомого путем инъекций связана со значительными затратами труда и травмированием насекомых.

Для преодоления этих ограничений была проведена коинфекция клеток насекомых рекомбинантным вирусом и вирусом дикого типа, в результате которой произошла комплементация, и рекомбинантный вирус оказался окруженным полиэдренной оболочкой [58]. Описанный метод достаточно прост, однако недостатком его является сниженный выход рекомбинантов. Поэтому более перспективной представляется стратегия создания векторов, экспрессирующих рекомбинантный белок и сохраняющих при этом ген полиэдрина в интактной форме.

Первая попытка создания такого вектора заключалась в дупликация гена полиэдрина [59]. Транспортный вектор *pAcVC2* содержал два

гена полиэдрина с промоторными участками в противоположной ориентации по отношению друг к другу. Один ген полиэдрина замещали гетерологичным геном, второй — оставляли интактным. В такой системе классический отбор рекомбинантов по полиэдрин-отрицательным бляшкам оказался неприемлемым, так как рекомбинантный вирус образовывал полиэдры подобно дикому. В связи с этим для конифекции с транспортным вектором использовали вирус, дефектный по гену полиэдрина и не способный по этой причине образовывать полиэдры. Отбор рекомбинантов в такой системе вели по полиэдрин-положительным бляшкам.

Другой подход, позволяющий сохранить интактный ген полиэдрина, состоял в применении вектора *AcUW2-lacZ*, где промотором, контролирующим экспрессию рекомбинантного белка, служил промотор белка *p10* [60]. Первый опыт использования такого промотора показал перспективность работы в этом направлении, так как нарушение, вызванное вставкой в ген *p10*, не отражалось на репликации вируса, и количество экспрессируемой химерной  $\beta$ -галактозидазы было сравнимо с таковым этого же белка, экспрессируемого другими векторами под контролем промотора полиэдрина.

Промоторы полиэдрина и *p10* относятся к сильным и обеспечивают эффективную экспрессию белков, гены которых находятся под их контролем. Поэтому закономерно было бы предположить, что они являются конкурирующими по отношению к системам, обеспечивающим транскрипцию и/или трансляцию. Ответ на эти вопросы был получен в серии работ по созданию двупромоторных векторов [59, 60], а также в специальных исследованиях по изучению взаимодействия промоторов полиэдрина и *p10* [41, 61]. Показано, что у последних отсутствует конкуренция за использование систем транскрипции и трансляции. Изменение локализации промоторов внутри геномов бакуловирусов не влияет на эффективность их функционирования. Не обнаружено взаимовлияния промоторов или их продуктов, что способствует высокому выходу рекомбинантных белков с каждого промотора и осуществлению манипуляций по перемещению промоторов внутри генома.

Использование промотора гена *p10* и гена полиэдрина в одних и тех же векторных конструкциях стало шагом на пути создания полипромоторных векторов. Прежде всего, были получены векторные конструкции, облегчающие отбор рекомбинантных вирусов. Идея была заимствована из работ по экспрессивным системам в линиях клеток млекопитающих, где в качестве вектора использовали вирус осповакцины, один из промоторов которого контролировал экспрессию рекомбинантного белка, а другой — экспрессию гена  $\beta$ -галактозидазы [62]. Такие рекомбинантные вирусы в монослое клеток давали легко выявляемые синие бляшки. Рекомбинанты по цвету бляшек в бакуловирусной системе отбирали в работе, где исследователи для котрансфекции с транспортным вектором использовали рекомбинантный бакуловирс с геном  $\beta$ -галактозидазы под контролем промотора полиэдрина [43]. В этом случае вирус, полученный в результате рекомбинации и несущий интересующий исследователей ген, будет образовывать белые бляшки в монослое клеток в отличие от исходного вируса, образующего синие бляшки. Подобный метод, однако, ненамного облегчил поиск рекомбинантов, так как белые бляшки на синем фоне были мало контрастными и их идентификация требовала определенных навыков.

Следующим этапом явилось создание конструкции, позволяющей получать рекомбинантные бакуловирусы, образующие легко выявляемые синие бляшки [63]. В транспортный вектор, основанный на *rAc373*, в районе фланкирующей последовательности на расстоянии 900 нуклеотидов от промотора полиэдрина были встроены под промотором *p10* ген  $\beta$ -галактозидазы и сигналы полиаденилирования вируса SV-40. Промотор гена *p10* в таком векторе контролировал синтез  $\beta$ -галактозидазы, а промотор гена полиэдрина — синтез рекомбинантного белка. Рекомбинантный вирус, полученный в результате котрансфекции, форми-

ровал легковыявляемые синие бляшки. Авторы вектора еще более усовершенствовали созданную конструкцию, введя в нее *ori* репликации фага M13, дающий возможность получать однитчатую ДНК. Эту ДНК можно использовать для введения или выщепления определенных последовательностей. Таким способом под промотор полиэдрина был введен уникальный *NheI*-сайт. Транспортный вектор *pJV(NheI)* имеет широкие возможности для высокоэффективной экспрессии, быстрого скрининга рекомбинантов и сайт-направленного мутагенеза гетерологичного гена или промоторной области полиэдрина. Рекомбинантный вирус, полученный в результате котрансфекции с этим вектором, имеет две копии гена *p10*, одна из которых остается интактной и контролирует синтез нативного белка. Возможно, что этот белок выполняет какую-то роль при функционировании вируса в системе *in vivo* в организме насекомого, поэтому вектор с интактным геном *p10* может быть особенно перспективным при использовании его в качестве инсектицида.

Применение нескольких промоторов для экспрессии рекомбинантных белков в пределах одного вектора продиктовано необходимостью получения белков, состоящих из определенного числа гетерологичных субъединиц, а также белков, взаимодействующих друг с другом. В принципе, проблему синтеза двух или более белков в одних клетках можно решить котрансфекцией клеток насекомых несколькими рекомбинантными вирусами, несущими гены гетерологичных белков или белковых субъединиц [10, 17]. Но в этом случае белки экспрессируются, как правило, в неэквивалентных количествах. Недавно появилось сообщение о конструировании экспрессирующего вектора, включающего три или четыре промотора с местами встройки для гетерологичных генов [64]. Вектор *pAcAB3* содержит промотор гена полиэдрина и два промотора гена *p10*, расположенных с двух сторон гена полиэдрина и в противоположных ориентациях. Вектор *pAcAB4* имел еще один дополнительный промотор гена полиэдрина. Эти векторные конструкции были использованы для одновременной экспрессии трех или четырех гетерологичных генов. При инфицировании клеток насекомых рекомбинантным вирусом, содержащим четыре мажорных структурных гена вируса синего языка, в них обнаружены вирусоподобные частицы, состоящие из четырех вирусных белков.

В связи с проблемой создания полипромоторных векторов необходимо отметить возможность функционирования в бакуловирусной системе экзогенных эукариотических промоторов [65, 66]. Эффективность их работы в такой системе гораздо ниже, чем у промоторов полиэдрина и *p10*, и синтез белков, находящихся под их контролем, происходит конститутивно без временного контроля, характерного для экспрессии бакуловирусных белков. Экзогенный эукариотический промотор, а именно: промотор гена теплового шока дрозодилы был использован в бакуловирусном векторе для получения  $\beta$ -галактозидазы [65]. Вектор *pAcDZ1* конститутивно в небольших количествах экспрессировал  $\beta$ -галактозидазу под контролем этого промотора, тогда как промотор полиэдрина был применен для экспрессии другого гена.

Этот вектор представляет собой альтернативу описанному ранее вектору *pJV(NheI)*, где  $\beta$ -галактозидаза экспрессировалась в больших количествах, находясь под контролем сильного промотора *p10* [63]. Использование кластера из промотора гена теплового шока и гена  $\beta$ -галактозидазы для скрининга рекомбинантов может быть предпочтительнее в полипромоторной бакуловирусной системе, поскольку позволяет освободить два сильных промотора — гена полиэдрина и гена *p10* для экспрессии рекомбинантных белков.

Логическим продолжением работы по созданию полипромоторных векторов является изучение генов других бакуловирусных белков и их промоторов. Особого внимания заслуживает основной белок ВЯП *A. californica*, ассоциированный с вирусной ДНК и продуцируемый в инфицированной клетке в сравнительно высоких количествах на ранних стадиях инфекции [67]. На основе промотора этого белка был скон-

струирован транспортный вектор *pAcMPl* [68]. Прямое замещение основного гена невозможно, так как этот полипептид связан с упаковкой вирусной ДНК, поэтому было решено дублировать промотор. Сайдом встройки блока из промотора основного белка и гена  $\beta$ -галактозидазы был избран район кодирующей последовательности гена полиэдрина. Временная регуляция экспрессии  $\beta$ -галактозидазы соответствовала таковой основного белка, и уровень ее был сравнительно высок. Это указывает на перспективы использования бакуловирусных систем на основе промотора основного белка для высокоэффективной экспрессии рекомбинантных белков на ранних стадиях инфицирования.

Недавно показана возможность временной регуляции экспрессии гетерологичных генов в полипромоторных векторных конструкциях. Авторами работы [69] создан оригинальный вектор, объединяющий два промотора с различной временной регуляцией. Гетерологичный ген в этой конструкции находится под контролем химерного промотора, представляющего собой тандем из основных регуляторных элементов промотора полиэдрина и промотора позднего белка *Vp39*. Рекомбинантный белок, находящийся под контролем этого промотора, начинает экспрессироваться на поздних стадиях инфекции, и синтез его продолжается на очень поздних стадиях вплоть до лизиса клеток, что указывает на дополнительную возможность повышения уровня гетерологичных белков.

Для экспрессии тканевого плазминогенного активатора использовали промотор другого очень раннего белка *IE1* [70]. Экспрессирующийся под промотором гена *IE1* высокогликозилированный рекомбинантный белок был более эффективно процессирован, чем этот же белок, продуцируемый под контролем полиэдрина.

Экспрессия белка на ранних стадиях инфицирования может иметь некоторые преимущества. Во-первых, возможно создание многокомпонентных экспрессирующих систем, использующих промоторы очень поздних и ранних генов, что позволит экспрессировать гены в определенной временной последовательности. Таким образом можно обеспечить синтез белков, которые затем будут играть значительную роль в процессинге белков, продуцирующихся на более поздних стадиях инфекционного цикла. Во-вторых, вероятно, что некоторые посттрансляционные модификации в бакуловирусной системе более эффективно осуществляются на ранних стадиях инфицирования, когда синтез собственных клеточных белков еще не блокирован. Так можно было бы решить проблему неполного гликозилирования. В-третьих, рекомбинантные вирусы с гетерологичным геном под контролем промотора основного белка могут иметь преимущества в качестве вирусных инсектицидов, так как синтез гормонов или токсинов на ранних стадиях инфицирования может ускорить летальный эффект.

**Нетрадиционные методы получения бакуловирусных векторов. Пути увеличения процентного соотношения рекомбинантных вирусов.** Количество рекомбинантных вирусных частиц, образующихся в результате котрансфекции вирусной ДНК с транспортным вектором, составляет обычно 0,5—2 % от общего количества вируса, в большинстве случаев — менее 1 % [43]. Малое количество рекомбинантов приводит к затратам времени на анализ и расчистку сотен бляшек. Описанные в предыдущей главе векторные конструкции с геном  $\beta$ -галактозидазы, облегчающие идентификацию рекомбинантов, при всех их достоинствах обладают определенными недостатками: размер таких транспортных векторов увеличен за счет присутствия гена  $\beta$ -галактозидазы; возможна конкуренция за системы транскрипции и трансляции между маркерным геном и генами рекомбинантных белков, интересующих исследователей; наличие  $\beta$ -галактозидазы может затруднять очистку рекомбинантного белка. Поэтому повышение количества рекомбинантов, сокращающее время на их поиск, было бы шагом по пути оптимизации бакуловирусной системы.

Первый метод, предложенный для увеличения числа рекомбинантов, заключался в линеаризации вирусной ДНК, используемой при котрансфекции с транспортным вектором [71]. ДНК ВЯП *A. californica* не имеет уникальных сайтов рестрикции, поэтому с помощью сайт-направленного мутагенеза в районе кодирующей последовательности гена полиэдрина был введен сайт *Bsu361*, что позволило получить линейную форму вирусного генома. Вирусная ДНК в линейной форме в 10 раз менее инфекционна для клеток, чем нативная кольцевая, но при этом вызывает 30-кратное увеличение количества рекомбинантов, что составило 10—30 % от общего количества вирусных частиц. Объяснение возрастания уровня рекомбинантов заключается в том, что вирусная ДНК в линейной форме не может реплицироваться, гомологичная же рекомбинация с транспортным вектором восстанавливает кольцевую форму ДНК вируса, способную к репликации. Тот факт, что исходный тип вируса все же составляет 70 % от общего количества, обусловлен возможностью вирусной ДНК самозамыкаться в кольцо.

Стратегия повышения количества рекомбинантного вируса нашла свое продолжение в создании модифицированного вируса *VacPAK6* [72], геном которого содержит встроенный под промотор гена полиэдрина ген  $\beta$ -галактозидазы и два сайта *Bsu361*, локализованные в областях, граничащих с 5'- и 3'-последовательностями гена полиэдрина. *Bsu361* выщепляет из генома бакуловируса фрагмент ДНК, который несет часть гена *ORF1629*, примыкающего к 3'-концу гена полиэдрина и необходимого для репликации вируса. Только рекомбинация с транспортным вектором может восстановить целостность этого гена и, следовательно, способность вируса к репликации. Вследствие этого котрансфекция клеток насекомых ДНК *VacPAK6* с транспортным вектором приводит к 85—99 %-му выходу рекомбинантного вируса, несущего гетерологичный ген. Рекомбинанты будут образовывать белые бляшки, в отличие от синих бляшек *VacPAK6*.

Недавно были предложены новые способы, позволяющие полностью исключить этап скрининга вирусных бляшек [73]. Суть их заключается в том, что рекомбинантные вирусы получают в гетерологичных системах дрожжей или клеток *E. coli*, где их легко выявить по фенотипическим признакам клеток, и они сразу могут быть выделены без дополнительных расчисток, необходимых при работе с бляшками. Принципы введения гетерологичных генов в бакуловирусный геном под промотор полиэдрина при помощи этих методов значительно отличаются от описанных выше. Этим обуславливается невозможность использования традиционных транспортных векторов, что в настоящее время ограничивает применение указанных подходов.

Первый метод основан на конструировании бакуловирусов, реплицирующихся в дрожжах, где соответствующие рекомбинанты можно легко отселектировать [74]. Бакуловир, способный реплицироваться в дрожжах, получен гомологичной рекомбинацией при котрансфекции клеток Sf9 препаратами ДНК дикого вируса и транспортного вектора *pAcC4*, несущего три дрожжевых элемента: последовательности *ARS*, необходимые для автономной репликации в дрожжах, *CEN*-последовательности, которые выполняют митотические функции на молекуле ДНК и обеспечивают стабильную низкокопийность плазмидных ДНК, а также селективный маркерный ген *URA3*. Показано, что вирусная ДНК, содержащая эти элементы, может реплицироваться в дрожжах и, более того, оставаться инфекционной для клеток насекомых. Введение второго селективного маркерного гена (*SUP4-o*) позволило идентифицировать рекомбинантные бакуловирусные репликоны в дрожжевых колониях. Этот ген при трансформации дрожжей транспортной плазмидой замещается чужеродным геном, при этом рекомбинантные бакуловирусы могут быть выявлены по независимости дрожжевых колоний от аденина или по устойчивости к канаванину.

Второй метод заключается в получении модифицированного вирусного генома, способного реплицироваться в клетках *E. coli*, при этом

гетерологичный ген в локус гена полиэдрина переносится посредством транспозиции [75]. Такой модифицированный бакуловирус («бакмида») наряду с мини-F-репликоном *E. coli*, обеспечивающим его репликацию в клетках бактерий, содержит в полиэдринном локусе маркерный ген устойчивости к канамицину и *lacZ*-последовательность плазмиды *pUC*, в которой в рамке считывания с *lacZ* встроен сайт — мишень для бактериального транспозона Tn7. Бакмида осуществляет комплементарную галактозидазу по С-концевой части этого гена, и в присутствии хромогенного субстрата колонии, несущие бакмиду, имеют голубую окраску. Транспортная плазида содержит под промотором гена полиэдрина гетерологичный ген и ген устойчивости к канамицину, фланкированные левым и правым концами транспозона Tn7. Транспозиция гетерологичного гена в геном бакуловируса происходит в присутствии хелперной плазмиды, экспрессирующей белок, необходимый для транспозиции. Встраивание гетерологичного гена в область гена *lacZ* нарушает его экспрессию, что делает возможным отбор рекомбинантов по белым колониям.

Новым способом получения рекомбинантных бакуловирусов является метод, основанный на реакции рекомбинации в системе *in vitro* [77]. В реакции используется *cre*-рекомбиназа бактериофага P1, субстратом которой служит 34-нуклеотидная последовательность *loxP*. Геном модифицированного бакуловируса и транспортный вектор содержат *lox*-сайты, по которым с помощью *cre*-фермента осуществляется рекомбинация, в результате которой гетерологичный ген оказывается в составе генома бакуловируса. Транспортный вектор содержит в тандеме с гетерологичным ген *lacZ* под контролем промотора *p10*, что позволяет идентифицировать рекомбинантный вирус при анализе бляшек. Количество рекомбинантов в этом случае составляет около 50 %. Это значительно ниже по сравнению со 100 %-м выходом рекомбинантов, полученных в гетерологичных системах, описанных выше. Однако общее количество рекомбинантов, рассчитанное на 1 мкг транспортного вектора, в системе *in vitro* значительно выше, что может оказаться важным преимуществом при использовании бакуловирального вектора для получения кДНК-овой экспрессионной библиотеки. В табл. 2 суммированы представленные в настоящем разделе данные о методах повышения процентного соотношения рекомбинантов.

**Эффективность экспрессии гетерологичных генов в бакуловиральной системе в зависимости от условий культивирования клеток насекомых.** До сих пор речь шла о факторах усовершенствования бакуловиральной системы экспрессии, связанных непосредственно с модификациями генома векторного вируса. Следует также остановиться на описании обстоятельств, влияющих на второй компонент системы экспрессии — клетки хозяина. Нужно отметить, что эффективность экспрессии рекомбинантного белка зависит от состояния клеточной культуры, качества среды, от правильного подбора условий и множественности заражения клеток вирусом [43]. Существуют стандартные методики работы с бакуловирусами и культурами клеток насекомых, однако возможности в этом направлении еще не исчерпаны. Так, в последнее время предпочтение отдается методу котрансфекции клеток ДНК вируса и транс-

Таблица 2

Современные методы получения рекомбинантных бакуловирусов [73]

Метод	Хозяин	Селекция	Частота рекомбинации, %
Линеаризация бакуловирального генома	<i>Sp. frugiperda</i>	Не нужна	10—25
Линеаризация и освобождение <i>ORF1629</i>	<i>Sp. frugiperda</i>	<i>ORF1629, lacZ</i>	85—99
УАС-направленная рекомбинация	<i>S. cerevisiae</i>	<i>SUP4-0</i>	100
Транспозон-направленная рекомбинация	<i>E. coli</i>	<i>gen, lacZ</i>	100
Сайт-специфическая рекомбинация <i>in vitro</i>	<i>In vitro</i>	<i>lacZ</i>	50

портного вектора с использованием липосом [77], что в 10 раз повысило эффективность введения ДНК в клетку по сравнению с традиционно применявшимся многие годы хлор-кальциевым методом [43]. Большая часть работ по созданию бакуловирусных систем экспрессии выполнена на системе с вирусом *A. californica* в качестве вектора и выступающей в роли хозяина перmissive линии клеток Sf9. В настоящее время активно исследуется пригодность других перmissive для данного вируса культур клеток. Так, показано, что в культуре клеток Sf21 эффективность экспрессии рекомбинантного белка  $\beta$ -галактозидазы при использовании одного и того же вектора в 5 раз выше, чем в клетках Sf9 [78]. Перспективным видится и применение в качестве хозяев целых насекомых, в организме которых эффективность экспрессии, как правило, выше по сравнению с культурами клеток [79—82].

Помимо поиска перmissive культур клеток и насекомых ведутся работы по адаптации вирусов к неперmissive для них культурам. Недавно появилась работа, в которой показано, что при котрансфекции неперmissive для данного вируса культуры клеток препаратом ДНК этого же вируса и рестрицированной ДНК вируса, для которого эта культура является перmissive, в результате гетерологичной рекомбинации образуются вирусные изоляты, способные реплицироваться в этой культуре [83, 84]. Работа в таком направлении может привести к созданию универсальных вирусных инсектицидов с широким спектром действия. При этом, однако, следует ужесточить контроль над внедрением подобных инсектицидов, поскольку трудно предсказать последствия от попадания в окружающую среду вируса, круг хозяев которого расширен.

**Заключение.** Представленный обзор многочисленных работ зарубежных исследователей убедительно доказывает перспективность бакуловирусной экспрессивной системы в настоящем и будущем для получения биологически активных белков различного происхождения.

Безопасность бакуловирусов для человека, животных и растений, высокие количественные и качественные характеристики получаемых в бакуловирусной экспрессивной системе белков, а также относительная дешевизна системы позволили уже сегодня множеству зарубежных фирм использовать бакуловирусную систему для наработки ряда лекарственных белковых препаратов. Стоимость таких препаратов значительно ниже, чем их аналогов естественного происхождения.

Возможность создания с помощью рекомбинантных бакуловирусов экологически чистых вирусных инсектицидов расширяет сферу применения бакуловирусной экспрессивной системы и может явиться важным фактором в борьбе с загрязнением окружающей среды.

*І. М. Кіхно, Л. І. Строковська*

#### БАКУЛОВІРУСНА СИСТЕМА ЕКСПРЕСІЇ ЧУЖОРІДНИХ ГЕНІВ — СУЧАСНЕ І МАЙБУТНЄ БІОТЕХНОЛОГІЇ ОДЕРЖАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ БІЛКІВ РІЗНОГО ПОХОДЖЕННЯ

##### Резюме

Узагальнено дані, що стосуються вискоєфективної системи експресії на основі рекомбінантних бакуловірусів у культурі клітин або в організмі комах. Проаналізовано особливості молекулярно-генетичної організації бакуловірусів, які дозволяють використовувати їх як суперпродукентів білків різного походження. Розглянуто підходи, за допомогою яких можна досягти максимального виходу біологічно активного продукту в даній системі експресії. Обґрунтовано переваги рекомбінантних бакуловірусів як експресійних векторів та вискоєфективних біоінсектицидів.

BACULOVIRUS SYSTEM FOR FOREIGN GENES EXPRESSION —  
PRESENT AND FUTURE OF BIOTECHNOLOGY RECEIVING  
OF BIOLOGICALLY ACTIVE PROTEINS OF VARIOUS ORIGIN

Summary

Recombinant baculoviruses have become popular expression vectors for heterologous proteins. This review deals with the current status and potential use of baculovirus vectors for the expression of foreign genes in insect cells. Advantages of this invertebrate virus expression vector comparing with bacterial, yeast and mammalian system are proved. Trends in the development of transfer vectors for the expression of heterologous genes and strategies for maximizing levels of expression are discussed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Luskow V. A., Summers M. D. Trends in development of baculovirus expression vectors // *Bio/Technology*.—1988.—6, N 1.—P. 47—55.
2. Miller L. K. Baculovirus as gene expression vectors // *Annu. Rev. Microbiol.*—1988.—42.—P. 177—199.
3. Щелкунов С. Н. Высокоэффективная система экспрессии клонированных генов на основе бакуловирусов // *Успехи соврем. биологии*.—1990.—110, № 3.—С. 338—350.
4. Smith G. T., Summers M. D., Fraser M. J. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector // *Mol. and Cel. Biol.*—1983.—3, N 12.—P. 2156—2165.
5. Kuroda K. C., Hauser R., Rott N. D., Doerfler K. Expression of influenza virus haemagglutinin in insect cells by a baculovirus vector // *EMBO J.*—1986.—5, N 6.—P. 1359—1365.
6. Goo D., Parker M. D., Babiuk L. A. Analysis of the S spike (peplomer) glycoprotein in bovine coronavirus synthesized in insect cells // *Virology*.—1990.—179, N 1.—P. 121—128
7. Van Bokhoven H., Wellink J., Usmany M. et al. Expression of plant genes in animal cells: high-level synthesis of cowpea mosaic virus B-RNA-encoded proteins with baculovirus expression vector // *J. Gen. Virol.*—1990.—71, N 7.—P. 2509—2517.
8. Miyamoto C., Smith G. E., Farrell-Towt J. et al. Production of human *c-myc* protein cells infected with a baculovirus expression vector // *Mol. and Cel. Biol.*—1985.—5, N 10.—P. 2860—2865.
9. Greenfield C. G., Clark P. S., Jones N., Waterfield M. D. Expression of the human EGF receptor with ligand-stimule table kinase activity in insect cell using a baculovirus vector // *EMBO J.*—1988.—7, N 1.—P. 139—146.
10. Ellis L., Levitan A., Cobb M. H., Ramos P. Efficient expression in insect cells of a soluble, active human insulin receptor protein-tyrosine kinase domain by use of a baculovirus vector // *J. Virol.*—1988.—62, N 5.—P. 1634—1639.
11. Roberts T. E., Faulkner P. Fatty acid acylation of the 67K envelope glycoprotein of a baculovirus: *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus // *Virology*.—1989.—172, N 2.—P. 377—381.
12. Wojchowski D. M., Orkin S. M., Sytkowski A. Active human erythropoietin expressed in insect cells using a baculovirus vector, a role for N-linked oligosaccharide // *Biochim et biophys. acta.*—1987.—910, N 1.—P. 224—232.
13. Miyajima A., Schreurs J., Otsu K. et al. Use of the silkworm *Bombyx mori* and an insect baculovirus vector for high-level expression and secretion of biological active mouse interleukin 3 // *Gene*.—1987.—58, N 2.—P. 273—281.
14. Wells D. E., Vulger L. G., Britt W. J. Structural and immunological characterization of human cytomegalovirus gp 55-116 (gB) express in insect cells // *J. Gen. Virol.*—1990.—71, N 3.—P. 873—880.
15. Smith G. E., Ju G., Ericson B. L. et al. Modification and secretion of human interleukin 2 produced in insect cells by baculovirus expression vector // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1985.—82, N 23.—P. 8804—8808.
16. Kitts P. A. A novel virus construct increases the utility of the baculovirus expression system // *Clontechiques*.—1992.—7, N 2.—P. 1—3.
17. Hasemann C. A., Carpa J. D. High level production of a functional immunoglobulin heterodimer in a baculovirus expression system // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1990.—87, N 9.—P. 3942—3946.
18. French T. J., Marshall J. J., Roy D. Assembly of double-shelled, viruslike particles of bluetongue virus by the simultaneous expression of four structural proteins // *J. Virol.*—1990.—64, N 12.—P. 5695—5700.
19. Safiri J. T., Mizar B., Flore H. P. et al. Canine parvovirus empty capsids produced by expression in a baculovirus vector: use in analysis of viral properties and immunization of dogs // *J. Gen. Virol.*—1992.—73, N 2.—P. 369—374.
20. Rota P., Black R. A., De B. K. et al. Expression of influenza A and B virus nucleoprotein antigens in baculoviruses // *Ibid.*—1990.—71, N 6.—P. 1545—1554.

21. Schmaljohn C. S., Sugiyama K., Schmaljohn A. L., Bishop D. H. L. Baculovirus expression of the small genome segment of Hantaan virus and potential use of the expressed nucleocapsid protein as a diagnostic antigen // *Ibid.*—1988.—69, N 2.—P. 777—786.
22. Ju G., Miamoto C., Farrell-Towty T. et al. Use of baculovirus cell expression system // Gene transfer vectors mammalian cells: Banbury conf.—New York: Cold Spring Harbor, Lab., 1987.—P. 39—45.
23. Chisholm G. E., Henner D. J. Multiple early transcripts and splicing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus IE-1 gene // *J. Virol.*—1988.—62, N 9.—P. 3193—3200.
24. Jeang K. T., Holmgren-Konig M., Khoury G. A baculovirus vector can express intron-containing genes // *Ibid.*—1987.—61, N 5.—P. 1761—1764.
25. Lanford R. E. Expression of simian 40 T antigen in insect cells using a baculovirus expression vector // *Virology.*—1988.—167, N 1.—P. 72—81.
26. Carbonell L. F., Hodge M. R., Tomalski M. D., Miller M. K. Synthesis of a gene coding for an insect-specific scorpion neurotoxin and attempts to express it using baculovirus vectors // *Gene.*—1988.—73, N 2.—P. 409—418.
27. Maeda S. Increased insecticidal effect by a recombinant baculovirus carrying a synthetic diuretic hormone gene // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1989.—165, N 3.—P. 1177—1183.
28. Merreywether A. T., Weyer U., Harris M. P. G. et al. Construction of genetically engineered baculovirus insecticides containing the *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki HD-73 delta endotoxin // *J. Gen. Virol.*—1990.—71, N 5.—P. 1535—1544.
29. Строковская Л. И., Кихно И. М., Веселовский О. В. и др. Экспрессивный бакуловиральный вектор на основе вируса ядерного полиэдроа кольчатого шелкопряда *Malacosoma neustria* // Биополимеры и клетка.—1990.—6, № 3.—С. 84—89.
30. Yu G., Podvaite I. D., Wood H. A. Genetic engineering of a *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus for expression of foreign genes // *J. Gen. Virol.*—1992.—73, N 5.—P. 1509—1514.
31. Обухов М. Л. Структурная организация вирусов — членов семейства *Baculoviridae* // *Вопр. вирусологии.*—1990.—№ 5.—С. 356.
32. Rohrmann G. F. Polyhedrin structure // *J. Gen. Virol.*—1986.—67, N 5.—P. 1499—1513.
33. Smith G. E., Vlak J. M., Summers M. D. Physical analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus transcripts for polyhedrin and 10000 molecular weight protein // *J. Virol.*—1983.—45, N 1.—P. 215—225.
34. Bissard G. W., Rohrmann G. F. Baculoviruses diversity and molecular biology // *Annu. Rev. Entomol.*—1990.—35, N 5.—P. 127—155.
35. Possee R. D., Howard S. C., Analysis of the polyhedrin gene promoter of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus // *Nucl. Acids Res.*—1987.—15, N 24.—P. 10233—10248.
36. Rankin C., Ooi B. G., Miller L. K. Eight base pairs encompassing the transcriptional start point are the major determinants for the baculovirus polyhedrin gene expression // *Gene.*—1988.—70, N 1.—P. 39—49.
37. Weyer U., Possee R. D. Analysis of the promoter of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus *p10* gene // *J. Gen. Virol.*—1989.—70, N 1.—P. 203—208.
38. Weyer U., Possee R. D. Functional analysis of the *p10* gene 5' leader sequence of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus // *Nucl. Acids Res.*—1988.—16, N 8.—P. 3635—3653.
39. Cochran M. A., Faulher P. Location of homologous DNA sequences interspersed at five regions in the baculovirus AcMNPV genome // *J. Virol.*—1983.—45, N 3.—P. 961—970.
40. Qin J., Liu A., Weaver R. F. Studies on the control region of the *p10* gene of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus // *J. Gen. Virol.*—1989.—70, N 4.—P. 1273—1279.
41. Van Oers M. M., Malarme D., Jore J. M. P., Vlak J. M. Expression of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus *p10* gene: effect of polyhedrin gene expression // *Arch. Virol.*—1992.—123, N 1.—P. 1—11.
42. Williams G. V., Rohel D. Z., Kuzio J., Faulkner P. A. Cytopathological investigation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus *p10* gene function using insertion deletion mutants // *J. Gen. Virol.*—1989.—70, N 1.—P. 187—202.
43. Summers M. D., Smith G. E. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures // *Texas Agric. Exp. Stn. Bull.*—1987.—1555.—P. 56.
44. Matsuura Y., Possee R., Overton H. A., Bishop D. H. L. Baculovirus expression vectors: the requirements for high level expression of proteins including glycoproteins // *J. Gen. Virol.*—1987.—68, N 4.—P. 1233—1250.
45. Iatrou K., Meidingedr R. G. *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus-based vectors for expressing passenger genes in silkworm cells under viral of cellular promoter control // *Gene.*—1989.—75, N 1.—P. 59—71.
46. Luskow V. A., Summers M. D. Signals important for high-level expression of foreign genes in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus expression vectors // *Virology.*—1988.—167, N 1.—P. 56—71.
47. Luskow V. A., Summers M. D., High level expression of nonfused genes in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis expression vectors // *Ibid.*—1989.—179, N 1.—P. 31—39.

48. Kozak M. At least six nucleotides preceding the AUG initiation codon enhance transcription in mammalian cells // *J. Mol. Biol.*—1987.—196, N 2.—P. 947—950.
49. Overton H. A., Fujii G., Price I. R., Jones J. M. The protease and gag gene products of the human immunodeficiency virus: authentic cleavage and post-translational modification in an insect cell expression system // *Virology.*—1989.—170, N 1.—P. 107—116.
50. McGlynn E., Reutener S., Matter A. et al. Hepatitis B virus polymerase gene: expression of a the long open reading frame using the baculovirus expression system // *J. Gen. Virol.*—1992.—73, N 5.—P. 1515—1519.
51. Рипух К. Р., Лебедево Е. Н., Берлин Ю. А. Плазмидный вектор, содержащий энкапсид транскрипции, для экспрессии генов в прокариотической двуирионной системе // *Биоорг. химия.*—1993.—19, № 12.—С. 1234—1237.
52. Page M. J., p36C: an improved baculovirus expression vector for producing high level of mature recombinant proteins // *Nucl. Acids Res.*—1989.—17, N 1.—P. 454—459.
53. Kozak M. Comparison of initiation of protein synthesis in prokaryotes, eukaryotes and organelles // *Microbiol. Rev.*—1983.—47, N 1.—P. 1—45.
54. Roosien J., Belsham G. J., Ryan M. D. et al. Synthesis of foot-and-mouth disease virus capsid proteins in insect cells using baculovirus expression vectors // *J. Gen. Virol.*—1990.—71, N 7.—P. 1703—1711.
55. Peakman T. C., Chorles G. G., Sydenhan M. A. et al. Enhanced expression of recombinant proteins in insect cells using a baculovirus vector containing a bacterial leader sequence // *Nucl. Acids Res.*—1992.—20, N 22.—P. 6111—6112.
56. Estes M. K., Crawford S. E., Penaranda M. E. et al. Synthesis and immunogenicity of the rotavirus major capsid antigen using a baculovirus expression system // *J. Virol.*—1987.—61, N 4.—P. 1488—1494.
57. Yessier D. C., Thomas D. G., Knouri M. E. et al. Enhanced secretion from insect cells of a foreign protein fused to the honeybee melittin signal peptide // *Gene.*—1991.—98, N 2.—P. 177—183.
58. Price P. M., Riccelderfer C. F., Johansson B. E., Killbowine E. D. Complementation of recombinant baculovirus by coinfection with wild-type virus facilitates production in insect larvae virus and influence virus // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1989.—86, N 4.—P. 1453—1456.
59. Emery V., Bishop D. H. L. The development of multiply expression of eukaryotic *Autographa californica* polyhedrin protein by a recombinant baculovirus // *Protein Engineer.*—1987.—1, N 3.—P. 359—366.
60. Vlak J. M., Kleinkenbergh F. A., Zaai K. J. M., Usmany M. J. W. Functional studies on the p10 gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus using a recombinant expressing a p10- $\beta$ -galactosidase fusion gene // *J. Gen. Virol.*—1988.—69, N 3.—P. 765—777.
61. Weyer U., Knight S., Possee R. D. Analysis of very late gene expression by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus and the further development of multiple expression vectors // *Ibid.*—1990.—71, N 5.—P. 1525—1534.
62. Chakrabarti S. H., Brechling K., Moss B. Vaccinia virus expression vector: coexpression of  $\beta$ -galactosidase provides visual screening of recombinant virus plaque // *Mol. and Cell. Biol.*—1985.—5, N 9.—P. 3404—3409.
63. Vialard J., Lulimiere M., Vernet T. et al. Synthesis of the membrane fusion and hemagglutinin proteins of measles virus containing the  $\beta$ -gal gene // *J. Virol.*—1990.—64, N 1.—P. 37—50.
64. Belyaev A. S., Roy P. Development of baculovirus triple and quadruple expression vectors: co-expression of three or four bluetongue virus proteins and synthesis of bluetongue virus-like particles in insect cells // *Nucl. Acids. Res.*—1993.—21, N 5.—P. 1219—1223.
65. Zuidema D., Schuten A., Usmany M. et al. Expression of cauliflower mosaic virus gene I in insect cells using a novel polyhedrin based baculovirus expression vector // *J. Gen. Virol.*—1990.—71, N 7.—P. 2201—2209.
66. Carbonell L. F., Klowden M. J., Miller L. K. Baculovirus-mediated expression of bacterial genes in Dipteran and mammalian cells // *J. Virol.*—1985.—56, N 1.—P. 153—160.
67. Rohel D. L., Faulkner P. Time course analysis and mapping of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus transcripts // *Ibid.*—1984.—50, N 2.—P. 739—747.
68. Hill-Perkins M. S., Possee R. D. A baculovirus expression vector derived from the basic protein promoter of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus // *J. Gen. Virol.*—1990.—71, N 2.—P. 971—976.
69. Thiem S. M., Miller L. K. Differential gene expression mediated by late, very late and hybrid baculovirus promoters // *Gene.*—1990.—91, N 1.—P. 87—94.
70. Jarvis D. L., Heming J. A. G. W., Rovacs G. R. et al. Use of early baculovirus promoters for continuous expression and efficient processing of the foreign gene products in stably transformed Lepidopteran cells // *BioTechnology.*—1990.—8, N 10.—P. 950—955.
71. Kitts P., Ayres M. D., Possee R. D. Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery of recombinant virus expression vectors // *Nucl. Acids Res.*—1990.—18, N 19.—P. 5667—5672.
72. Kitts P. A., Possee R. D. A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency // *Biotechniques.*—1993.—14, N 5.—P. 810—817.

73. Davies A. Current methods for manipulating baculoviruses // Bio/Technology.— 1994.— 12, N 1.— P. 47—50.
74. Patel G., Nasmyth K., Jones N. A new method for the isolation of recombinant baculovirus // Nucl. Acids Res.— 1992.— 20, N 1.— P. 97—104.
75. Luskow V. A., Lee S. C., Barry G. F., Olins P. O. Efficient generation of infectious recombinant baculovirus by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli* // J. Virol.— 1993.— 67, N 8.— P. 4566—4579.
76. Peakman T. C., Harris R., Gewert D. R. Highly efficient generation of recombinant baculoviruses by enzymatically mediated site-specific *in vitro* recombination // Nucl. Acids Res.— 1992.— 20, N 3.— P. 495—500.
77. Harting P. C., Cardon M. C., Kawanishi C. J. Generation of recombinant baculovirus via episome-mediated transfection // Biotechniques.— 1991.— 11, N 3.— P. 310—313.
78. King L. A., Mann S. G., Lawrie A. M., Mulsham S. H. Replication of wild-type and recombinant *Autographa californica* in a cell derived from *Mamestra brassicae* // Virus Res.— 1991.— 19, N 1.— P. 93—104.
79. Benenbaugh M. J., Balog L., Lei P. S. Production of recombinant proteins by baculovirus-infected gypsy moth cells // Biotechnol. Prog.— 1991.— 7, N 3.— P. 462—467.
80. Hara T., Nonaka K., Etou N. et al. *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase production by baculovirus-insect cell system // Biosci., Biotech. and Biochem.— 1992.— 56, N 7.— P. 1124—1125.
81. Miyajima A., Schreus J., Otsu K. et al. Use of the silkworm *Bombyx mori* and an insect baculovirus vector for high-level expression and secretion of biologically-active mouse interleukin-3 // Gene.— 1987.— 58, N 2.— P. 273—281.
82. Hellers M., Steiner H. Diapausing pupae of *Hyalophora cecropia*: an alternative host for baculovirus mediated // Insect Biochem. and Mol. Biol.— 1992.— 22, N 1.— P. 35—39.
83. Kondo A., Maeda S. Host range expansion by recombination of the baculovirus *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus // J. Virol.— 1991.— 65, N 9.— P. 3625—3632.
84. Mori Y., Nakazawa H., Shirai N. et al. // Foreign gene expression by a baculovirus vector with an expanded host range // J. Gen. Virol.— 1992.— 73, N 4.— P. 1877—1880.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики  
НАН Украины, Киев

Получено 31.03.94