

## Взаимодействие бакуловирuсов с клетками позвоночных в системе *in vitro*

А. П. Соломко, Е. А. Захарук, Л. И. Чащина, Л. И. Строковская

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, Украина, 03680

solomko@imbg.org.ua

---

*Проанализированы данные литературы относительно изучения новой векторной системы для клеток позвоночных, основанной на вирусах насекомых – бакуловирuсах. Рассмотрены пути и механизмы проникновения рекомбинантных бакуловирuсов в клетки, факторы, влияющие на эффективность трансдукции, принципы модификации вирусного дисплея, реакция разных типов клеток на внедрение вируса. Обсуждаются перспективы использования рекомбинантных бакуловирuсов в клеточной инженерии.*

*Ключевые слова: бакуловирuс, позвоночные, взаимодействие, трансдукция, дисплей, клеточный ответ.*

---

**Введение.** В последние годы бурное развитие получили исследования, посвященные разработке векторных систем для целевой доставки терапевтически важных генов в клетки и ткани высших организмов. Среди них выделяют вирусные векторные системы на основе аденовирусов, вирус герпеса, лентивирусов и ретровирусов [1]. Каждая из этих систем имеет свои достоинства и недостатки. К последним следует отнести малую клонирующую емкость генома аденоассоциированного вируса (до 4 тыс. н.) и наличие сильного иммунного ответа на вирусные белки.

Широко используемые в исследовательских целях векторы на основе ретровирусов и лентивирусов интегрируют трансген в геном трансдуцируемой клетки, что чревато возникновением инсерционных мутаций. Поиск альтернативы этому привел к разработке многочисленных невирусных систем доставки, основным ограничением применения которых является низкая эффективность трансдукции [2].

Обнаружение в середине 90-х годов прошлого столетия способности бакуловирuсов (вирусов, инфицирующих более 500 видов насекомых), а именно – вируса *Autographa californica*, наиболее изученного из них и содержащего кольцевую ковалентно замкнутую двуспиральную геномную ДНК (модифицированную за счет встраивания специфичной для клеток млекопитающих экспрессионной кассеты), обеспечивать синтез репортерного белка в клетках млекопитающих создало предпосылки для разработки еще одной векторной системы [3]. Особенностью бакуловирuсов является наличие двух сильных промоторов поздних генов – полиэдрина и p10, обуславливающих суперсинтез кодируемых ими белков. Это свойство использовали при конструировании на основе бакуловирuсов и культивируемых клеток насекомых высокоэффективных экспрессионных систем, с помощью которых синтезировано большое количество рекомбинантных белков [4].

Преимущество бакуловирuсного вектора по отношению к другим вирусным векторам состоит в том, что он не реплицируется в клетках млекопита-

ющих, при этом слабо транскрибируется часть ранних генов и не транскрибируются основные регуляторные гены. Размер его генома (около 130 тыс. п. н.) позволяет делать крупные вставки. Вирус малотоксичен для клеток и организмов позвоночных из-за отсутствия в них продуктивной бакуловирусной инфекции и благодаря этому предсуществующих антител к нему. Учитывая вышеперечисленные свойства, бакуловир *A. californica* в последние годы стал полифункциональным инструментом молекулярной биологии.

Дальнейшее совершенствование новой бакуловирусной векторной системы шло в нескольких направлениях: исследование спектра клеточных линий млекопитающих, трансдуцируемых рекомбинантным бакуловиром, модификация вирусного дисплея для повышения эффективности трансдукции *in vitro* и *in vivo*, обеспечения специфичности ткане- и органотропизма при решении проблем доставки иммуногенных вакцин, тканевой инженерии и терапии рака.

**Механизмы проникновения бакуловирусов в клетки млекопитающих.** Для большинства исследованных вирусов описано несколько механизмов их проникновения в клетки: посредством клатрин- или динамин-опосредованного эндоцитоза, вследствие образования кавеол и локального лизиса мембраны клеток, а также макропиноцитоза. Для больших ДНК-содержащих вирусов характерно внедрение за счет слияния вирусной и клеточной оболочек с использованием набора специфических белков. Процесс проникновения бакуловируса в клетки насекомых и механизмы его осуществления детально проанализированы в обзоре [5].

Бакуловирусным белком слияния, характерным для так называемого budded-вируса, образующегося после первичного инфицирования клеток эпителия кишечного тракта насекомого и функционально предназначенного для инфицирования клеток различных его тканей и органов, является gp64. Этот белок имеет в своем составе сигнальный пептид, вовлеченный в процесс слияния. В дальнейшем речь пойдет именно об этой фракции вирусных частиц, используемых при работе с культивируемыми клетками насекомых и млекопитающих. Детальный механизм эндоцитоза и участвующие в нем молекулы, способствующие функциональному внедрению бакуловируса в клетки – мишени мле-

копитающих, все еще не полностью охарактеризованы. Отражая общие черты с клетками насекомого, бакуловирусное внедрение в клетки млекопитающих осуществляется, по одним данным, через low-pH-dependent-путь эндоцитоза, по-видимому включающий клатрин-зависимый эндоцитоз и/или макропиноцитоз [6]. (Клатрин – клеточный консервативный фибриллярный белок, образующий вместе с другим полипептидом специфический многогранный чехол на поверхности так называемых «окаймленных пузырьков», возникающих при рецепторном эндоцитозе.)

Однако есть и другие результаты экспериментальных исследований [7], свидетельствующие о существовании клатрин-независимого пути встраивания бакуловируса, по крайней мере, для изученных авторами линий клеток человека. При этом достаточно убедительно продемонстрировано отсутствие ассоциатов бакуловируса с тяжелой цепью клатрина при трансдукции. Более того, установлено, что внедрение бакуловируса усиливает поглощение неспециализированными эпителиальными клетками бактериальных частиц *Escherichia coli* путем, напоминающим фагоцитоз и также регулируемым динамином. Вышеприведенные данные двух разных групп исследователей свидетельствуют о существовании различных функциональных путей встраивания бакуловирусов в клетки млекопитающих.

Показано также, что последующие этапы процесса трансдукции – выход из ранних эндосом, эндоплазматический транспорт и ядерный импорт – являются критическими стадиями в процессе попадания бакуловируса в клетки млекопитающих [8].

Изучение механизма внедрения и ядерного импорта бакуловирусного генома в клетках млекопитающих с использованием метода электронной микроскопии на модели неделящихся клеток, обладающих ядерной мембраной в отличие от клеток, находящихся в митозе, выявило наличие вирусного капсида в ядерных порах и последующую его локализацию в ядре [9], что свидетельствует об общности путей транспорта и локализации бакуловируса как в клетках насекомых, так и в клетках млекопитающих. Однако для некоторых линий клеток этот процесс имеет свои особенности.

Так, для клеток YAC-1 характерно ингибирование процесса ядерного транспорта вирусных час-

тиц [10], вполне вероятно происходящее при участии микротубулиновой сети, деполимеризация которой нокодазолом или винбластином в гепатоцитах человека усиливает транспортировку вирусного капсида в ядра клеток и повышает уровень экспрессии трансгена [11]. В то же время для линии макрофагальных иммунокомпетентных клеток RAW264.7 показано внедрение бакуловируса путем фагоцитоза с последующей транслокацией и деградацией нуклеокапсида во внутриклеточных компартментах [12].

**Трансдукция рекомбинантными бакуловирусами клеток позвоночных.** Многочисленными исследованиями различных лабораторий определен широкий спектр клеточных линий высших и низших позвоночных, перmissive для бакуловирусной трансдукции. Среди них клетки человека, в том числе раковые, стволовые мезенхимальные и эмбриональные, клетки приматов, бычки, свиньи, овечьи, клетки кроликов, рыб и птиц, грызунов и кошек [13, 14]. Приведенный авторами обзоров список трансдуцируемых рекомбинантными бакуловирусами клеток эукариотов является далеко не полным, однако дает представление о том, что в подавляющем большинстве использовали линии клеток человека. Это объясняется, в первую очередь, генотерапевтической направленностью исследований. Эффективность трансдукции варьирует от 5–10 до 90 % в зависимости от происхождения клеточной линии, протокола трансдукции (используемые среды, температура и время инкубации с вирусом, множественность инфицирования) и ряда других факторов [15]. Например, добавление неспецифического ингибитора ацетилазы гистонов бутирата натрия повышает уровень экспрессии трансдуцированных генов во многих клеточных линиях [16].

Весьма существенной составляющей рекомбинантного бакуловирусного вектора является наличие сильного промотора, активного в клетках позвоночных и, в идеале, обладающего органо- и тканеспецифичностью. Как правило, используют промоторы вирусов млекопитающих, такие как CMV (цитомегаловирус), RSV (вирус саркомы Рауса), SV40 (обезьяний вирус) и гибридный промотор CAG [17].

Во многих случаях применяют сильный гибридный промотор CAG, содержащий промоторную

последовательность куриного гена  $\beta$ -актина и энхансерную последовательность промотора немедленно-раннего гена CMV, а также сигнал полиаденилирования кроличьего гена  $\beta$ -глобина [18]. Кроме вышеперечисленных вирусных, в отдельных работах использованы тканеспецифические клеточные промоторы: гена глиального кислого фибриллярного белка астроцитов [19], нейронспецифического белка синапсина-1 и фактора роста  $\beta$  из тромбоцитов [20], клеточные промоторы гена человеческого убиквитина C [21] и гена белка EF-1 $\alpha$  [22].

Для большинства рекомбинантных бакуловирусов отмечена незначительная длительность экспрессии трансгена – от 7 до 14 дней, что далеко не всегда устраивает исследователей. Это связано, скорее всего, с деградацией вирусного генома и отсутствием интеграции трансгена в геном клетки-хозяина [23].

В некоторых случаях все же происходит интеграция маркерного трансгена в геном клеток позвоночных [24, 25]. Последняя работа интересна тем, что трансдуцировали стволовые клетки низшего позвоночного – рыбы. Эффективность трансдукции достигала 100 % и трансген обнаруживался в ряде хромосом. Однако эти результаты требуют уточнения и детализации в отношении того, какие фрагменты именно бакуловирусного генома встраиваются в геном трансдуцированных клеток, свойственно ли это преимущественно клеткам низших позвоночных или является общим событием?

Необходимость пролонгированной экспрессии трансгена для проведения эксперимента и генной терапии стала причиной появления работ, связанных с модификацией генома рекомбинантного бакуловируса за счет создания гибридных бакуловирусов. Наиболее привлекательной, с нашей точки зрения, является модификация введением в конструкцию последовательностей ориджина репликации (OriP) вируса Эпштейн-Барра (EBV) и гена ядерного антигена этого вируса (EBNA-1). Такая конструкция обеспечивает экспрессию маркерного гена *EGFP* на протяжении двух месяцев за счет поддержания в эписомном состоянии рекомбинантного трансгена, чему способствует синтез вирусного ядерного антигена, отвечающего за эписомное состояние генома EBV в латентно инфицированных клетках [26].

Другой вариант обеспечения пролонгированной экспрессии целевого гена заключается в конструировании гибридного бакуловирусного/аденоассоциированного вирусного вектора, содержащего генную кассету, на обоих концах которой находятся последовательности инвертированных терминальных повторов аденоассоциированного вируса (AAV ITR). В результате интеграции модифицированной генной кассеты в геном клетки получена длительная экспрессия маркерного гена [27, 28]. Необходимо отметить, что в работе [28] эксперименты выполнены на эмбриональных стволовых клетках человека и достоверно установлено, что трансдукция бакуловиром не влияет на их нормальный рост и плюрипотентность. Это свидетельствует о безопасности генетических манипуляций не только с эмбриональными стволовыми клетками при использовании трансдуцирующих рекомбинантных бакуловиров.

**Бакуловирусный дисплей.** Одним из важных направлений развития бакуловирусной векторной системы, как уже упоминалось, является повышение эффективности трансдукции клеток и тканей позвоночных, в первую очередь, млекопитающих, а также модификация тропизма бакуловirusа. Для этого производят определенные генно-инженерные манипуляции, связанные с мажорным гликопротеином gp64, экспонированным на поверхности вирусной частицы и необходимым для взаимодействия вирусной частицы с поверхностью клеток насекомых и млекопитающих, или капсидным белком vp39, а также используют химические способы модификации дисплея вирусной частицы.

В первом случае модификации осуществляют конструированием слитного гена, включающего последовательность вирусного гена *gp64* и гетерологического белка или пептида под контролем сильных промоторов одного из поздних бакуловирусных генов – полиэдрина или p10. Показано, что добавление к конструкции еще одной копии гена *gp64* повышает эффективность трансдукции различных типов клеток млекопитающих [29]. Для увеличения уровня связывания и проникновения рекомбинантного бакуловirusа используют весьма разнообразные и многочисленные варианты генно-инженерного слияния с *gp64*, включая авидин-биотиновую технологию [30], основанную на метаболическом биотинилировании в живых клетках. Эта реакция

катализируется биотиновой лигазой *E. coli*, присоединяющей биотин к специфическим белкам через амидную связь между карбоксильной группой биотина и аминокислотной группой лизина. Принцип метаболического биотинилирования ранее успешно применен при модификации аденовируса для повышения степени его очистки и использования в опытах *in vitro* [31] и *in vivo* [32].

Метод метаболического биотинилирования бакуловirusа совершенствуется в направлении увеличения эффективности трансдукции, а также способа очистки и концентрации модифицированного вируса. Установлено, что вставка небольшого биотин-акцепторного пептида (BAP) в различные сайты вирусного гликопротеина gp64 позволяет варьировать степень связывания биотина на поверхности вирусной частицы и оптимизировать эффективность трансдукции раковых клеток, а также упростить способ концентрирования вируса [33].

Альтернативный подход для модификации вирусного дисплея на основе использования якорного мембранного домена вируса везикулярного стоматита позволил экспонировать на поверхности вирусной частицы ряд гетерогенных мембранных белков и пептидов, среди которых рецепторы вируса кори [34], нейраминидазы [35], G-белок вируса везикулярного стоматита, что дало возможность повысить степень трансдукции модифицированным бакуловиром в условиях *in vitro* и *in vivo* [36].

Применение гена G-белка вируса везикулярного стоматита в качестве партнера для конструирования слитного белка позволило экспонировать на вирусной поверхности опухолеспецифические лиганды, такие как LyP-1, F3 CGKRK, что привело к усилению связывания с клеточными рецепторами и возрастанию уровня трансдукции клеток карциномы человека [37].

Гетерогенные белки и пептиды могут быть экспонированы на вирусной частице также благодаря слиянию с мажорным вирусным капсидным белком vp39 [8], ассоциированным с процессом полимеризации актина во время вхождения вируса в цитоплазму и ядра инфицированных клеток насекомых [38].

В основе принципиально отличного подхода к модификации дисплея бакуловиров лежит способ химической модификации, основанный на свя-

звании поверхностных вирусных белков с целевыми лигандами или пептидами. Конъюгаты бакуловируса с полиэтиленгликолем (ПЭГ) или с ПЭГ и фолатом в отдельных случаях дают возможность повысить эффективность трансдукции, однако подобная модификация существенно снижает титр вируса в инфицированных модифицированным вирусом клетках насекомых [39, 40].

Тем не менее, далеко не всегда увеличение уровня связывания рекомбинантного бакуловируса с клеточной поверхностью приводит к возрастанию эффективности трансдукции [41].

В то время как рекомбинантный бакуловирусный вектор демонстрирует достаточно высокую эффективность в трансдукции клеток млекопитающих *in vitro*, в системе *in vivo* она существенно снижается из-за комплемент-опосредованной инактивации вируса. Система комплемента включает в себя сывороточные и мембраносвязанные белки, участвующие в различных специфических и неспецифических иммунных реакциях. При взаимодействии с вирусом система комплемента активирует ряд ферментативных реакций, что приводит либо к модификации вируса и его инактивации, либо к лизису инфицированных таким вирусом клеток.

Необходимость модификации вирусного вектора с использованием синтетических полимеров вызвана потребностью предохранения его от инактивации системой комплемента в опытах *in vivo*. Применяемые для этого ранее генетические модификации с помощью генов комплемент-регуляторного белка человека DAF [42], G-белка вируса везикулярного стоматита и растворимого ингибитора комплемента 1 (sCR1) хотя и позволяли защитить вирус от влияния системы комплемента, однако при этом существенно снижалась либо вообще отсутствовала экспрессия трансгена [43, 44].

На этом фоне повышенный интерес вызывает создание новых гибридных векторных систем на основе вирусов и катионных синтетических полимеров, в частности, полиэтиленimina и его производных, используемых в качестве компонентов невирусных векторов [45, 46]. Гибридная векторная система формируется благодаря электростатическому взаимодействию между положительно заряженным полимерным комплексом и отрицательно заряженной вирусной частицей. Перспективность подобных гибридных векторных систем для ис-

пользования в экспериментах *in vitro* и *in vivo* заключается в сочетании высокой внутриклеточной эффективности рекомбинантных вирусов и низкой иммуногенности, обеспечиваемой значительным системным потенциалом полиэтилениминных экранирующих невирусных векторов. Аналогичные гибридные системы разработаны и для бакуловирусов [47, 48].

Оптимизация условий при создании комплекса полиэтиленimina и бакуловируса позволила существенно уменьшить цитотоксичность модифицированного бакуловируса в системе *in vitro* на клетках глиобластомы человека линии U87 и обеспечить достаточно высокую экспрессию маркерного трансгена в этих клетках и клетках гепатокарциномы HepG2.

**Клеточный ответ на внедрение бакуловируса в системе *in vitro*.** Весьма важным аспектом процесса взаимодействия трансдуцирующего бакуловируса с клетками позвоночных является структурно-функциональное состояние вирусного и клеточного геномов и вероятность участия транскрипционного комплекса клетки в экспрессии векторного генома.

Установлено, что взаимодействие бакуловируса с клетками млекопитающих ведет к активации транскрипции целого ряда вирусных генов, при этом существуют значительные различия в количестве экспрессируемых генов в зависимости от линии клеток. Так, в клетках HeLa14 (человек) с использованием техники ДНК-микрочипов показана транскрипция 43 вирусных генов, а в клетках ВНК (хомячок) – лишь 14 бакуловирусных генов, при этом экспрессия 12 ранних бакуловирусных генов является общей для обоих типов клеток. В этом случае отмечена и клеточная реакция на встраивание вируса в виде временного увеличения транскрипции клеточного  $\beta$ -актинового гена [49], как и в клетках насекомых, где наблюдается суперэкспрессия клеточного актина. Среди транскрибируемых бакуловирусных генов зафиксированы три ранних гена: *ie-0*, *ie-1*, *pe-38*, продукты которых участвуют в трансактивации промоторов других вирусных генов.

Трансдукция клеток млекопитающих еще одним членом семейства бакуловирусов, *Bombyx mori NPV*, также приводит к транскрипции ранних вирусных генов [50].

Более того, в результате исследования причастности двух основных бакуловирусных трансрегуляторов транскрипции IE1 и IE2 к активации вирусного генома в клетках VeroE6 (клетки почек зеленой мартышки) установлено, что комбинация обоих факторов вызывает стимуляцию экспрессии 59 бакуловирусных генов (около трети бакуловирусного генома).

Наличие в промоторах вирусных генов, взаимодействующих с трансаktиваторами, бакуловирусного раннего транскрипционного сайта СAGТ (являющегося и фрагментом эукариотного сайта инициации транскрипции) и мотива ТАТА вызывает формирование промоторной структуры, аналогичной таковой эукариотной РНК-полимеразы II, следствием чего является участие хозяйской полимеразы в транскрипции бакуловирусных генов [51], как и при инфицировании бакуловирусом клеток насекомых.

Транскрипция немедленно-ранних трансаktиваторных бакуловирусных генов *ie-1*, *ie-2* продемонстрирована в человеческих клетках почек линии 293 и печени HepG2. Одним из последствий встраивания бакуловируса в клетку и дальнейшего его транспорта в ядро является существенная модификация ядерной архитектоники трансдуцированных клеток [52], что характерно и для ряда вирусов млекопитающих. При этом достоверно установлена экспрессия белка IE-2, который в клетках насекомого накапливается в одном сайте с полифункциональной ядерной субструктурой – PML NBs (promyelocytic leukemia nuclear bodies), находящейся в непосредственной близости от зоны репликации вируса [53].

Весьма интересны результаты авторов работы [54] относительно функциональной активности ранне-позднего бакуловирусного промотора ETL в клетках млекопитающих, продукт гена которого необходим для экспрессии ряда бакуловирусных генов. Активность этого промотора неодинакова в исследуемых клеточных линиях, наиболее низкой она оказалась в клетках COS1 (почечные фибробластоподобные клетки зеленой африканской мартышки) в отличие от высокой активности в человеческих клетках эмбриональных остеобластов hFob1.19. Авторы делают вывод о недостаточности либо отсутствии в клетках COS1, HeLa и хомячковых клетках CHO-K1 транскрипционных факторов,

необходимых для проявления полноценной активности бакуловирусного ETL-промотора.

В связи с этим довольно значительны результаты изучения транскрипционной активности трансдуцированного с помощью бакуловируса модельного трансгена в ряде производных мезенхимальных стволовых клеток – предшественников остеоцитов, адипоцитов и хондроцитов. При практически одинаковой эффективности транспорта трансгена в ядра исследованных типов клеток транскрипция маркерного гена оказалась существенно ниже в предшественниках хондроцитов. Использование при этом в конструкциях различных промоторов генов CMV, СAG и EF-1 $\alpha$  выявило несущественные промоторзависимые отличия в уровне транскрипции трансгена. Следовательно, неодинаковый уровень эффективности транскрипции связан со степенью и направлением дифференциации предшественников, а также возможной разницей в количестве и наборе транскрипционных факторов, соответствующих специализации частично дифференцированных предшественников [22].

Реакция клеточного генома на внедрение бакуловируса проявляется в большинстве случаев в частичной дерегуляции экспрессии ряда клеточных генов в зависимости от их функциональной и видовой специфичности. Прежде всего важно отметить активацию клеточного иммунного ответа, что индуцирует синтез некоторых цитокинов – TNF- $\alpha$ , IL1- $\alpha$ , IL1- $\beta$  в гепатоцитах крысы [55], хемокинов и интерферонов первого типа [56].

Так, трансдукция вирусом тутового шелкопряда (BmNPV) приводит к изменению профиля экспрессии 22 генов клеток HEK293 [50]. Еще более драматической оказывается реакция мезенхимальных стволовых клеток человека на введение бакуловируса AcNPV – около 816 генов, связанных с функционированием пяти сигнальных путей, демонстрируют существенные отклонения в транскрипционной активности как в сторону ее увеличения, так и снижения. При этом наблюдается существенное возрастание синтеза двух цитокинов – IL6 и IL8, в то же время общий профиль экспрессии цитокиновых генов весьма отличается от такового для специализированных иммунных клеток [57]. Авторы отмечают активацию Toll-like 3-рецепторного сигнального пути ДНК-содержащим вирусом в стволовых мезенхимальных клетках человека,

что весьма необычно для активируемого двуспиральными вирусными и синтетическими РНК каскада генов. Важным результатом этих исследований является вывод о том, что бакуловирус индуцирует в мезенхимальных стволовых клетках умеренный и краткосрочный ответ. Это позволяет рассчитывать на эффективную и безопасную модификацию их для генной терапии.

Активация бакуловирусом рецепторов другого сигнального пути – Toll-like 9, обычно распознающих метилированные CpG-динуклеотиды молекулы бактериальной ДНК, стимулирует синтез провоспалительных цитокинов в клетках перитонеальных макрофагов и спленических дендритных клетках мыши [12]. Учитывая, что бакуловирусная ДНК содержит значительное количество потенциально активных CpG-динуклеотидов, этот вывод можно было бы признать логичным. Однако дальнейшее исследование этих же авторов [58] показывает, что наряду с участием Toll-like 9-рецепторного сигнального пути в активации синтеза интерферона  $\beta$  и стимулируемых им хемокинов в иммунокомпетентных клетках эмбриональных фибробластов мыши его индукция происходит независимо от этого сигнального пути – с привлечением интерферон-регуляторных факторов IRF7/IRF3. Следовательно, в этом случае имеет место зависимость от функциональной специализации клеток сигнальная система индукции клеточного адаптивного и иммунного ответов. Пока что окончательно это не установлено.

Вышеизложенные результаты свидетельствуют о том, что такие далекоотстоящие в эволюционном плане системы, как клетки насекомых, а также высших и низших позвоночных, имеют весьма схожие механизмы взаимодействия с бакуловirusами и их геномами. Следует подчеркнуть, что эффективность трансдукции клеток позвоночных демонстрирует выраженную зависимость от типа клеток, их тканевой принадлежности и функционального состояния. Этот тезис подтверждается и дифференцированным набором экспрессируемых ранних бакуловирусных генов, обусловленным типом клеток. Такие результаты важны для определения степени безопасности использования рекомбинантных бакуловirusов для клеточной инженерии, создания клеточных векторов на базе рекомбинантных бакуловirusов и трансдуцированных ими различных типов клеток, использования их в систе-

ме *in vivo* для генной терапии, создания и доставки рекомбинантных вакцин.

Совершенствование технологии работы с бакуловirusами, возможность достаточно легко и за короткий срок (от семи до десяти дней) конструировать рекомбинантный вирус, делая вставки размером до 38 тыс. п. н., получение высоких титров вируса с использованием клеток насекомых делает весьма привлекательной идею применения рекомбинантных бакуловirusов в современной молекулярной медицине. Отмеченная выше экспрессия ранних генов при трансдукции клеток позвоночных является кратковременной, и синтез вирусных белков является следовым. Низкая токсичность бакуловirusов для эмбриональных и мезенхимальных стволовых клеток, отсутствие интеграции бакуловirusных последовательностей в геномы этих клеток, а также достаточно быстрая деградация вируса открывают большие возможности для направленной модификации стволовых клеток и использования их для локального продуцирования целевых белков при восстановительной сочетанной клеточной и генотерапии. В последние годы интенсивно проводят изучение потенциала рекомбинантных бакуловirusов на животных моделях, где получены весьма интересные результаты. Обзор и анализ подобных данных являются предметом нашей последующей работы.

*A. P. Solomko, O. A. Zaharuk, L. I. Chashchina, L. I. Strokovskaya*

Baculovirus integration with the vertebrate cells in system *in vitro*

Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine  
150, Akademika Zabolotnoho Str., Kyiv, Ukraine, 03680

Summary

*In this review the literature data are analyzed relative to the study of a new vector system for the cells of vertebrates, based on the insect viruses – baculoviruses. The ways and mechanisms of recombinant baculoviruses penetration into cells, the factors, which influence the effectiveness of transduction, the principles of the modification of virus display, and the reaction of the different types of cells on virus introduction are examined. The prospects of using recombinant baculoviruses in cellular engineering are discussed.*

*Keywords: baculovirus, vertebrates, interaction, transduction, display, cell response.*

*О. П. Соломко, О. А. Захарук, Л. І. Чащина, Л. І. Строчковська*

Взаємодія бакуловірусів з клітинами хребетних  
у системі *in vitro*

Резюме

*Проаналізовано дані літератури стосовно вивчення нової векторної системи для клітин хребетних, заснованої на вірусах*

комаха – бакуловірусах. Розглядаються шляхи та механізми проникнення рекомбінантних бакуловірусів у клітини, фактори, що впливають на ефективність трансдукції, принципи модифікації вірусного дисплея, реакція різних типів клітин на вбудовування вірусу. Обговорюються перспективи використання рекомбінантних бакуловірусів у клітинній інженерії.

Ключові слова: бакуловірус, хребетні, взаємодія, трансдукція, дисплей, клітинна відповідь.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Zhang X., Godbey W. T. Viral vectors for gene delivery in tissue engineering // *Adv. Drug Deliv. Rev.*–2006.–**58**, N 4.–P. 515–534.
- Camradt S. C., Lieberman J. R. Genetic modification of stem cells to enhance bone repair // *Ann. Biomed. Eng.*–2004.–**32**, N 2.–P. 136–147.
- Boyce F. M., Bucher N. Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*–1996.–**93**, N 6.–P. 2348–2352.
- Summers M. D. Milestones leading to the genetic engineering of baculovirus as expression vector systems and viral pesticides // *Adv. Virus Res.*–2006.–**68**, N 1.–P. 3–73.
- Kikhno I. M. Penetration of baculoviruses into cell: universal mechanism and intriguing details // *Mol. Gen. Microbiol. Virus.*–2009.–**24**, N 2.–P. 47–55.
- Long G., Pan X., Kormelink R., Vlaskovits J. M. Functional entry of baculovirus into insect and mammalian cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis // *J. Virol.*–2006.–**80**, N 17.–P. 8830–8833.
- Laakkonen J. P., Makela A. R., Kakkonen E., Turkki P., Kukkonen S., Peranen J., Yla-Herttuala S., Airene K. J., Okerblom C., Vihinen-Ranta M., Marjomaki V. Clathrin-independent entry of baculovirus triggers uptake of *E. coli* in non-phagocytic human cells // *PLoS One.*–2009.–**4**, N 1.–P. 1–12.
- Kukkonen S. P., Airene K. J., Marjomaki V., Laitinen O., Lehtolainen P., Kankaanpaa P., Mahonen A. J., Raty J. K., Nordlund H. R. Baculovirus capsid display; a novel tool for transduction imaging // *Mol. Ther.*–2003.–**8**, N 5.–P. 853–862.
- Van Loo N.-D., Fortunati E., Ehlert E., Rabelink M., Grosveld F., Scholte B. J. Baculovirus infection of nondividing mammalian cells: mechanisms of entry and nuclear transport of capsids // *J. Virol.*–2001.–**75**, N 2.–P. 961–970.
- Kitajima M., Hamazaki H., Miyano-Kurosaki N., Nakaku H. Characterisation of baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus infection in mammalian cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*–2006.–**343**, N 2.–P. 378–384.
- Salminen M., Airene K. J., Rinnankoski R., Reimari J., Valilehto O., Rinne J., Suikkanen S., Kukkonen S., Yla-Herttuala S., Kulomaa M. S., Vihinen-Ranta M. Improvement in nuclear entry and transgene expression of baculoviruses by disintegration of microtubules in human hepatocytes // *J. Virol.*–2005.–**79**, N 5.–P. 2720–2728.
- Abe T., Hemmi H., Miyamoto H., Moriishi K., Tamura S., Takaku H., Akira S., Matsuura Y. Involvement of the Toll-Like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus // *J. Virol.*–2005.–**79**, N 5.–P. 2847–2858.
- Kost T. A., Condreay J. P. Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors // *TRENDS Biotech.*–2002.–**20**, N 4.–P. 173–180.
- Hu Y.-C. Baculoviral vectors for gene delivery // *Curr. Gene Ther.*–2008.–**8**, N 1.–P. 54–65.
- Hsu C. S., Ho Y. C., Wang K. S., Hu Y. C. Investigation of optimal transduction conditions for baculovirus-mediated gene delivery into mammalian cells // *Biotechnol. Bioeng.*–2004.–**88**, N 1.–P. 42–51.
- Condreay J. P., Witherspoon S. M., Clay W. C., Kost T. A. Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*–1999.–**96**, N 1.–P. 127–132.
- Hu Y.-C. Baculovirus vectors for gene therapy // *Adv. Virus Res.*–2006.–**68**, N 2.–P. 287–320.
- Shoji I., Aizaki H., Tani H., Ishii K., Chiba T., Saito I., Miyamura T., Matsuura Y. Efficient gene transfer into various mammalian cells, including non-hepatic cells, by baculovirus vectors // *J. Gen. Virol.*–1997.–**78**, N 10.–P. 2657–2664.
- Wang C. Y., Wang S. Astrocytic expression of transgene in the rat brain mediated by baculovirus vectors containing an astrocyte-specific promoter // *Gene Ther.*–2006.–**13**, N 20.–P. 1447–1456.
- Lu B. H., Yang Y., Paton J. F. R. GAL4-NF-kappa B fusion protein augments transgene expression from neuronal promoters in the rat brain // *Mol. Ther.*–2006.–**14**, N 6.–P. 872–882.
- Spenger A., Ernst W., Condreay J. P., Kost T. A., Grabherr R. Influence of promoter choice and trichostatin A treatment on expression of baculovirus delivered genes in mammalian cells // *Protein Exp. Purif.*–2004.–**38**, N 1.–P. 17–23.
- Lee H. P., Ho Y. C., Hwang S. M., Sung L.-Y., Shen H.-C., Liu H.-J., Hu Y.-C. Variation of baculovirus-harbored transgene transcription among mesenchymal stem cell-derived progenitors leads to varied expression // *Biotechnol. Bioeng.*–2007.–**97**, N 3.–P. 649–655.
- Wang K. C., Wu J. C., Chung Y. C., Ho Y. C., Chang M. D., Hu Y. C. Baculovirus as a highly efficient gene delivery vector for the expression of hepatitis delta virus antigens in mammalian cells // *Biotechnol. Bioeng.*–2005.–**89**, N 4.–P. 464–473.
- Merrihew R. V., Clay W. C., Condreay J. P., Witherspoon S. M., Dallas W. S., Kost T. A. Chromosomal integration of transduced recombinant baculovirus DNA in mammalian cells // *J. Virol.*–2001.–**75**, N 2.–P. 903–909.
- Yan Y., Du J., Chen T., Yi M., Li M., Wang S., Li C. M., Hong Y. Establishment of medakafish as a model for stem cell-based gene therapy: Efficient gene delivery and potential chromosomal integration by baculoviral vectors // *Exp. Cell Res.*–2009.–**315**, N 13.–P. 2322–2331.
- Shan L., Wang L. Y., Yin J., Zhong P. An OriP/EBNA-1-based baculovirus vector with prolonged and enhanced transgene expression // *J. Gen. Med.*–2006.–**8**, N 12.–P. 1400–1406.
- Wang C. Y., Wang S. Adeno-associated virus inverted terminal repeats improve neuronal transgene expression mediated by baculoviral vectors in rat brain // *Hum. Gen. Ther.*–2005.–**16**, N 10.–P. 1219–1226.
- Zeng J., Du J., Zhao Y., Palanisamy N., Wang S. Baculoviral vector-mediated transient and stable transgene expression in human embryonic stem cells // *Stem Cells.*–2007.–**25**, N 4.–P. 1055–1061.
- Tani H., Nishijima M., Ushijima H., Miyamura T., Matsuura Y. Characterisation of cell-surface determinants important for baculovirus infection // *Virology.*–2001.–**279**, N 1.–P. 343–353.
- Raty J. K., Airene K. J., Marttila A. T., Majomaki V., Hytonen V. P., Lehtolainen P., Laitinen O. H., Mahonen A. J., Kulomaa M. S., Yla-Herttuala S. Enhanced gene delivery by avi-



- din-displaining baculovirus // *Mol. Ther.*—2004.—**9**, N 2.—P. 282–291.
31. Parrott M. B., Mok H., Campos S. K., Adams K. E., Mercier G. T., Barry M. A. Metabolically biotinylated adenovirus for cell targeting, ligand screening and vector purification // *Mol. Ther.*—2003.—**8**, N 4.—P. 688–700.
  32. Pereboeva L., Komarova S., Roth J., Ponnazhagan S., Curiel D. T. Targeting EGFR with metabolically biotinylated fibromosaic adenovirus // *Gene Ther.*—2007.—**14**, N 8.—P. 627–637.
  33. Kaikkonen M. U., Viholainen J. I., Narvanen A., Yia-Herttuala S., Airenne K. J. Targeting and purification of metabolically biotinylated baculovirus // *Hum. Gen. Ther.*—2008.—**19**, N 6.—P. 589–600.
  34. Kitagawa Y., Tani H., Kwang C., Matsunaga L. T. M., Moriishi K., Matsuura Y. Ligand-directed gene targeting to mammalian cells by pseudotype baculoviruses // *J. Virol.*—2005.—**79**, N 6.—P. 3639–3652.
  35. Borg J., Nevsten P., Wallenberg R., Stenstrom M., Cardell S., Falkenberg C., Holm C. Amino-terminal anchored surface display in insect cells and budded baculovirus using the amino-terminal end of neuraminidase // *J. Biotechnol.*—2004.—**114**, N 1–2.—P. 21–30.
  36. Kaikkonen M. U., Raty J. K., Airenne K. J., Wirth T., Heikura T., Yla-Herttuala S. Truncated vesicular stomatitis virus G protein improves baculovirus transduction efficiency *in vitro* and *in vivo* // *Gene Ther.*—2006.—**13**, N 4.—P. 304–312.
  37. Makela A. R., Matilainen H., White D. J., Ruoslahti E., Oker-Blom C. J. Enhanced baculovirus-mediated transduction of human cancer cells by tumor-homing peptides // *Virology.*—2006.—**80**, N 13.—P. 6603–6611.
  38. Ohkawa T., Rowe A. R., Volkman L. E. Identification of six *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus early genes that mediate nuclear localization of G-actin // *J. Virol.*—2002.—**76**, N 23.—P. 12281–12289.
  39. Kim Y.-K., Park I. K., Jiang H. L., Choi J. Y., Je Y. H., Jin H., Kim H. W., Cho M. H., Cho C. S. Regulation of transduction efficiency by pegylation of baculovirus vector *in vitro* and *in vivo* // *J. Biotechnol.*—2006.—**125**, N 1.—P. 104–109.
  40. Kim Y.-K., Choi J. V., Yoo M.-K., Jiang H. L., Arote R., Je Y. H., Cho M. H., Cho C. S. Receptor-mediated gene delivery by folate-PEG-baculovirus *in vitro* // *J. Biotechnol.*—2007.—**131**, N 3.—P. 353–361.
  41. Ojala K., Koski J., Ernst W., Grabbher R., Jones I., Oker-Blom C. Improved display of synthetic IgG-binding domains on the baculovirus surface // *Technol. Cancer Res. Treat.*—2004.—**3**, N 1.—P. 77–84.
  42. Huser A., Rudolph M., Hofmann C. Incorporation of decay-accelerating factor into the baculovirus envelope generates complement-resistant gene transfer vectors // *Nat. Biotechnol.*—2001.—**19**, N 5.—P. 451–455.
  43. Tani H., Limn C. K., Yap C. C., Onishi M., Nozaki M., Nishimune Y., Nishimune Y., Okahashi N., Kitagawa Y., Watanabe R., Mochizuki R., Moriishi K., Matsuura Y. *In vitro* and *in vivo* gene delivery by recombinant baculoviruses // *J. Virol.*—2003.—**77**, N 18.—P. 9799–9808.
  44. Hoare J., Waddington S., Thomas H. C., Coutelle C., McGarvey M. J. Complement inhibition rescued mice allowing observation of transgene expression following intraportal delivery of baculovirus in mice // *J. Gen. Med.*—2005.—**7**, N 1.—P. 325–333.
  45. Hsu P. Y., Yang Y. W. Effect polyethylenimine on recombinant adeno-associated virus mediated insulin gene therapy // *J. Gene. Med.*—2005.—**7**, N 10.—P. 1311–1321.
  46. Russ V., Gunther M., Halama A., Orgis M., Wagner E. Oligo-ethylenimine-grafted polypropylenimine dendrimers as degradable and biocompatible synthetic vectors for gene delivery // *J. Contr. Release.*—2008.—**132**, N 1.—P. 131–140.
  47. Kim Y.-K., Choi J. Y., Jiang H.-L., Arote R., Jere D., Cho M.-H., Je Y. H., Cho C.-S. Hybrid of baculovirus and galactosylated PEI for efficient gene carrier // *Virology.*—2009.—**387**, N 1.—P. 89–97.
  48. Yang Y., Lo S.-L., Yang J., Yang J., Goh S. S. L., Wu C., Feng S.-S., Wang S. Polyethylenimine coating to produce serum-resistant baculoviral vectors for *in vivo* gene delivery // *Biomaterials.*—2009.—**30**, N 29.—P. 5767–5774.
  49. Fujita R., Matsuyama T., Yamagishi J., Sahara K., Asano S., Bando H. Expression of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus genes in mammalian cells and upregulation of the host  $\beta$ -actin gene // *J. Virol.*—2006.—**80**, N 5.—P. 2390–2395.
  50. Kenoutis C., Efrore R. C., Swevers L., Lavadas A. A., Gaitanou M., Matsas R., Latrou K. Baculovirus-mediated gene delivery into mammalian cells does not alter their transcriptional and differentiating potential but is accompanied by early viral gene expression // *J. Virol.*—2006.—**80**, N 7.—P. 4135–4146.
  51. Liu C. Y. Y., Wang C. H., Wang J. C., Chao Y. C. Stimulation of baculovirus transcriptome expression in mammalian cells by baculoviral transcriptional activators // *J. Gen. Virol.*—2007.—**88**, N 8.—P. 2176–2184.
  52. Laakkonen J. P., Kalkkonen M. U., Ronkainen P. H. A., Ihalaainen T. O., Niskanen E. A., Hakkinen M., Salminen M., Kulomaa M. S., Yla-Herttuala S., Airenne K. J., Vihinen-Ranta M. Baculovirus-mediated immediate-early gene expression and nuclear reorganization in human cells // *Cell. Microbiol.*—2008.—**10**, N 3.—P. 667–681.
  53. Mainz D., Quadt I., Knebel-Morsdorf D. Nuclear IE2 structures are related to viral DNA replication sites during baculovirus infection // *J. Virol.*—2002.—**76**, N 9.—P. 5198–5207.
  54. Liu Y.-K., Chu C.-C., Wu T.-Y. Baculovirus ETL promoter acts as a shuttle promoter between insect cells and mammalian cells // *Acta Pharm. Sinica.*—2006.—**27**, N 3.—P. 321–327.
  55. Beck N. B., Sidhu J. S., Omiecinski C. J. Baculovirus vectors repress Phenobarbital-mediated gene induction and stimulate cytokine expression in primary cultures of rat hepatocytes // *Gene Ther.*—2000.—**7**, N 4.—P. 1274–1283.
  56. Hervas-Stubbs S., Rueda P., Lopes L., Leclerc C. Insect baculoviruses strongly potentiate adaptive immune responses by inducing type I IFN // *J. Immunol.*—2007.—**178**, N 4.—P. 2361–2369.
  57. Chen G.-Yu., Shian H.-C., Su H.-J., Chen C.-Yu., Chuang Y.-J., Lo W.-H., Huang J.-L., Chuang C.-K., Hwang S.-M., Hu Yu.-C. Baculovirus transduction of mesenchymal stem cells triggers the Toll-Like receptor 3 pathway // *J. Virol.*—2009.—**83**, N 20.—P. 10548–10556.
  58. Abe T., Kaname Y., Wen X., Tani H., Moriishi K., Uematsu S., Takeuchi O., Ishii K. J., Kawai T., Akira S., Matsuura Y. Baculovirus induces type I interferon production through Toll-Like receptor-dependent and -independent pathways in a cell-type-specific manner // *J. Virol.*—2009.—**83**, N 15.—P. 7629–7640.

UDC 578.841.1:578.233  
Received 22.02.10