

39  
NN02963  
71230

MAG

1998-02-12 96633

562

CA

Landbouwniversiteit

de veelzijdigheid  
van baculovirussen

door prof. dr. J.M. Vlak

# **DE VEELZIJDIGHEID VAN BACULOVIRUSSEN**

door prof.dr. J.M. Vlak



Inaugurale rede uitgesproken op 27 november 1997 ter gelegenheid van de aanvaarding van het ambt van persoonlijk hoogleraar bij het Laboratorium voor Virologie aan de Landbouwniversiteit Wageningen

## **Mijnheer de Rector Magnificus, dames en heren,**

Wie het boek 'The hot zone' van Simon Preston heeft gelezen over het dodelijke Ebolavirus (25) of de film 'Outbreak' heeft gezien met Dustin Hoffman in de hoofdrol (23) zal ervan overtuigd zijn dat virussen uiterst onaangename gasten zijn. Ze komen geregeld voor en veroorzaken vaak nare ziekten. Denken we bijvoorbeeld aan griep, mazelen, rode hond, hondsdolheid en AIDS bij de mens en de varkenspest en mond- en klauwzeer bij landbouwhuisdieren. Daarnaast zijn virussen betrokken bij twintig procent van de tumoren bij de mens (9). Ook zijn virussen wellicht bepalend geweest voor de loop van de geschiedenis. Hoe zou bijv. de kolonisatie van Amerika door de Spanjaarden in de zestiende eeuw zijn verlopen, wanneer een pokkenepidemie de Spaanse troepen niet was vooruit gegaan? Kortom, virussen hebben een bedenkelijk imago.

Bij de aanvaarding van het ambt van persoonlijk hoogleraar bij het Laboratorium voor Virologie van het Departement Plantenveredeling en Gewasbescherming wil ik graag het beeld van virussen enigszins bijstellen en laten zien dat virussen ook positieve kanten hebben. Ik wil dat doen aan de hand van de veelzijdigheid van baculovirussen.

### **De virologie**

De virologie houdt zich bezig met de bestudering van virussen en van ziekten die door virus worden veroorzaakt (10, 17). Virussen zijn microscopisch kleine ziekteverwekkers, die afhankelijk zijn van een gastheer om zich te manifesteren. Het zijn dus echte parasieten. Ze komen voor bij alle levende organismen; bij mensen, dieren, planten en zelfs bij micro-organismen, zoals bacteriën en schimmels.

Wageningen neemt een belangrijke plaats in de ontwikkeling van de virologie in. Op het eind van de negentiende eeuw trad in de buurt van Rhenen veelvuldig een mozaïekziekte in tabak op. Deze ziekte werd door Adolf Mayer, werkzaam aan de toenmalige Rijkslandbouwschool te Wageningen, onderzocht en in 1882 beschreven als zijnde veroorzaakt door iets dat via plantensap werd overgebracht (20). Zijn collega Martinus Beijerinck toonde in 1898, volgend jaar 100 jaar geleden, aan

dat deze ziekte werd veroorzaakt door wat hij aanduidde als 'contagium vivum fluidum' (5). Deze 'levende vloeibare smetstof' kon bacteriefilters passeren en de ziekteverwekker moest dus kleiner zijn dan een bacterie. We kennen deze ziekteverwekker nu als virus. Het werk van Mayer en Beijerinck markeert het begin van de virologie als wetenschapsdiscipline. Sinds Beijerinck zijn we veel te weten gekomen over de structuur van virussen en de biologie van virusziekten. Door de snelle ontwikkelingen in de moleculaire biologie is daar de laatste twee decennia veel kennis bijgekomen over de moleculaire structuur en over de wijze, waarop ze ziekten veroorzaken, bijgekomen. Tot op de dag van vandaag is de aandacht voor virussen van planten terug te vinden aan de Landbouwwuniversiteit (12, 29, 34, 35). Ik ben er daarom trots op, werkende in Wageningen aan virussen van insecten, in zekere zin een erfgenaam van Mayer en Beijerinck te zijn.

## **Virussen**

Zoals gezegd, virussen zijn zeer kleine ziekteverwekkers. Ze hebben een deeltjeskarakter en zijn kleiner dan een miljoenste deel van een meter. Dus alleen met speciale methoden en geavanceerde apparatuur, zoals een elektronenmicroscop, kunnen ze worden bestudeerd en zichtbaar gemaakt. De erfelijke of genetische informatie van virussen is opgeslagen in nucleïnezuren, in DNA of RNA. De bouwstenen van DNA en RNA bestaan uit nucleotiden of basenparen. Deze basiseenheden komen in een zodanige volgorde voor, dat voor ieder virus een unieke code ontstaat, als waren het letters van een tekst. Deze tekst bevat de informatie voor eiwitten, die functies vervullen bij de vermeerdering van het virus en bij het veroorzaken van ziekte in de gastheer. Het nucleïnezuur van het virusdeeltje wordt omgeven door een capsid, een mantel van eiwitten. Deze nucleocapsiden zijn bij sommige virussen nog omgeven door een soort envelop, ook wel membraan genoemd.

Als zodanig is virus dode stof, maar zodra het een gastheer binnentreedt komt het virus als het ware 'tot leven'. Het virus voert een soort kaping uit en is erop gericht om zichzelf te vermeerderen. Vaak gaat deze infectie gepaard met ziekte of dood van de gastheer. De infectie geschiedt via cellen, die in

de mens bijv. aanwezig zijn in de mond, darmslijmvliezen, longen en wondjes in de huid. Soms wordt het virus, zoals bij HIV, via bloed overgedragen, maar het virus moet altijd in een cel terecht komen om te vermeerderen. Om tot infectie te komen moet wel eerst een moleculaire striptase worden uitgevoerd in de geïnfecteerde cel, waarbij het virus wordt ontmanteld en het nucleïnezuur vrij komt. Na vermenigvuldiging kunnen de vele nieuwe dochtervirussen op hun beurt weer nieuwe infecties veroorzaken. Op deze wijze kunnen virusepidemieën ontstaan, zoals bijvoorbeeld bij griep en varkenspest om bij de actualiteit te blijven.

De gastheer kan zich meestal wel verdedigen tegen virussen. Hogere dieren hebben een afweer- of immuunsysteem, dat gebaseerd is op speciale eiwitten, beter bekend als antilichamen. Deze kunnen het virus samen met een cellulaire afweer onschadelijk maken. Door verzwakte stammen of geïnactiveerde vormen van het virus aan mens of dier toe te dienen (vaccinatie), kan de ziekte in veel gevallen worden voorkomen of zelfs uitgeroeid, zoals bij pokken en hopelijk binnenkort polio. Het virus kan echter onder die afweer uitkomen door sneller te zijn (Ebolavirus), zich te verstoppen (Herpesvirus, HIV) of zich genetisch te veranderen (influenzavirus, HIV). Ook voor diervirussen zijn vele goede vaccins beschikbaar, ondermeer tegen varkenspest om bij de actualiteit te blijven. Planten en bacteriën hebben ook mogelijkheden tot afweer, maar die is anders geregeld.

### **Virussen en insecten**

Is er dan alleen slechtheid over virussen te melden? Dat hangt er maar vanaf hoe men het bekijkt. Wie geniet niet van de prachtig gevlamde tulpen op zeventiende-eeuwse schilderijen of koopt ze toevallig op de markt. Het betreft hier symptomen van een virusinfectie en ze schenken ons het genoegen van hun schoonheid. Dit voorbeeld vormt wellicht nog onvoldoende tegenwicht tegen het negatieve imago van virussen. Aan de hand van baculovirussen zal ik trachten dit beeld verder in positieve zin bij te stellen.

Ongewervelde dieren, waartoe insecten, behoren, vormen de grootste en ook oudste groep van dierlijke organismen in de wereld. Er bestaan twee typen relaties tussen virussen en

insecten. Enerzijds zorgen insecten voor de overdracht van virussen van de ene gastheer (plant of dier) naar de andere. Op deze wijze wordt het gebrek aan contact tussen vatbare individuen gecompenseerd. Goede voorbeelden zijn de overdracht van het gelekoortsvirus door muggen van de ene mens of aap op de andere en de overdracht van vele plantenvirussen van de ene plant naar de andere bijv. door tripsen en bladluizen. In deze relatie heeft het insect over het algemeen geen last van het virus. Plantenvirussen hebben een grote landbouwkundige betekenis en worden uiteraard ook op het Laboratorium voor Virologie uitgebreid bestudeerd.

Daarnaast zijn er ook virussen die insecten ziek maken, zoals de baculovirussen (13). Deze virussen komen vrijwel uitsluitend bij insecten voor en zijn al bijna veertig jaar onderwerp van studie binnen het Laboratorium voor Virologie. Ze kunnen nl. als biologisch bestrijdingsmiddel worden gebruikt tegen schadelijke insecten. Vooral tegen rupsen, die vraatschade veroorzaken in bossen, boomgaarden en cultuurgewassen, al of niet onder glas, vormen baculovirussen een aantrekkelijk alternatief voor chemische middelen. In 1976 begon ik mijn werk aan deze virussen in Wageningen. Het beschikbaar komen van insectencellen en moleculaire methoden medio de jaren '70 maakte deze baculovirussen toegankelijk voor moleculair en cellulair onderzoek. Daarnaast bestond er behoefte om ook in het onderwijs met diervirussen te werken en aan mogelijkheden voor studenten zich in diervirologische richting te ontwikkelen. Zie hier het startpunt van mijn activiteiten in Wageningen.

## Geschiedenis

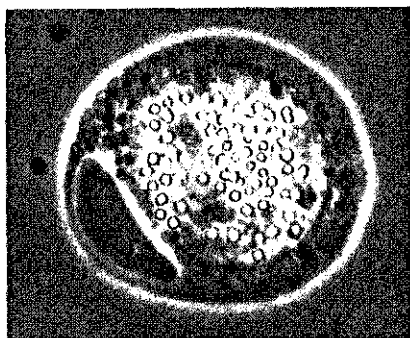
In 1527 publiceerde Marcus Hieronimus Vida, de latere bisschop van Cremona in Italië, een gedicht, 'De Bombice' geheten oftewel 'Over de zijderups' (33). Hierin beschrijft hij een ziekte, die sterk doet denken aan wat we nu kennen als een polyhedrose.

*Dadelijk valt, terwijl ze verslappen, hun gouden huid op, die  
vervolgens zwelt.*

*Een schandelijke loomheid overvalt hun luie zielen.*

*Uiteindelijk barsten ze open en besmeuren alles met walgelijk etter;  
En gif stroomt van alle kanten over hun ledematen.*

De ziekte kenmerkt zich door interne vertering of verslijming van de rups aan het eind van het ziekteproces. In de jaren '90 van de vorige eeuw werd vastgesteld dat de bolvormige deeltjes in de verslijmde rups verantwoordelijk waren voor de ziekte (7). Deze deeltjes werden vanwege hun veelzijdigheid polyeders (*poly* = veel; *hedra* = vlak, zijde) genoemd. In verslijmde rupsen treft men grote aantallen polyeders aan. Eén zieke rups kan wel een miljard polyeders bevatten. Het insectenlijk is geheel gevuld met polyeders en wordt alleen bijeengehouden door zijn vel. Deze polyeders kan men overigens via de lichtmicroscopie waarnemen, hetgeen een uitzondering op de regel is, nl. dat virussen alleen met de elektronenmicroscopie te zien zijn (Figuur 1)



*Figure 1. Insectencel geïnfecteerd met een baculovirus. De witte bolletjes stellen de polyeders voor.*

Ziekten in de zijderups bleven het onderzoek lange tijd bepalen vanwege het enorme economische belang van zijde. In het begin van deze eeuw nog was de zijdeteelt een zeer belangrijke economische activiteit in China en vooral Japan. Nog in de Tweede Wereldoorlog onderzocht een speciale eenheid op het Kaiser Wilhelm Instituut in Oppau, Duitsland, de polyhedrose in de zijderups vanwege het strategisch belang van zijde voor de parachute-industrie (2). Pas in 1942 werd dit onderzoek stopgezet met het beschikbaarkomen van nylon als grondstof voor valschermen. Inmiddels had dat onderzoek

vooral via het werk van G.H. Bergold (4) wel veel nieuwe informatie over de structuur van baculovirussen opgeleverd.

### Baculovirussen en hun genetische informatie

In de polyeders bevinden zich staafvormige deeltjes, virions genaamd (Figuur 2). Vanwege de staafvorm wordt deze groep baculovirussen genoemd (*baculum* = staaf). Het beste zijn deze polyeders nog te vergelijken met krentenbollen. De krenten stellen hier de virions voor. In deze virions bevindt zich DNA als erfelijk materiaal. Het 'deeg' van de polyeder bestaat uit één type eiwit, dat polyhedrine wordt genoemd. Deze bijzondere manier van verpakking zorgt ervoor dat deze baculovirussen in de natuur lange tijd, jaren, hun activiteit kunnen behouden, voordat ze weer een nieuwe generatie rupsen infecteren. De polyeder zorgt er ook voor dat de virions tegen afbraak zijn beschermd tijdens de desintegratie van de rups.

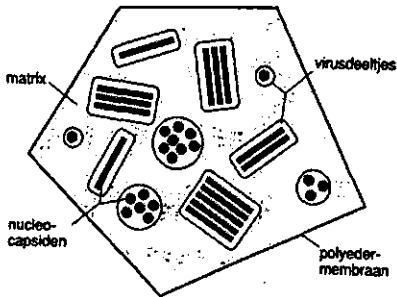


Figure 2. Schematische weergave van een polyeder.

Baculovirussen worden via het voedsel opgenomen en alleen rupsen zijn er vatbaar voor, motten of vlinders niet. De polyeder valt in de darm van de rups uiteen vanwege het basisch milieu aldaar. De vrijkomende virions infecteren de darmcellen. Vanuit deze cellen ontsnappen virions naar de hemolymfe, de bloedvloeistof van insecten. Als gevolg van de infectie sterven de darmcellen af en verdwijnen via de feces naar buiten. Het is een race tegen de tijd. Sommige insecten hebben hun darmcellen al opgeruimd voordat de infectie tot



nieuwe virusdeeltjes heeft geleid en ontsnappen dus aan de ziekte. Wanneer virussen eenmaal de darmbarrière hebben genomen, is het lot van de rups bezegeld. Andere cellen en weefsels zijn binnen 2-3 dagen geïnfecteerd en na 5-7 dagen is vrijwel de hele inhoud van de rups omgezet in polyeders. Een fenomenale biotransformatie (38).

Het baculovirus DNA bevat informatie voor zo'n 100 erfelijke eigenschappen oftewel genen (21). Van een aantal baculovirussen is de nucleotidenvolgorde volledig bekend. Het DNA van het baculovirus van spanrups *Autographa californica* bijv. bevat 133.894 nucleotidenparen (1). De functie van veel genen en hun producten is nog onbekend en het onderzoek in de wereld en ook binnen onze groep is erop gericht deze functies te achterhalen. Zo trachten wij thans de code van het baculovirus van floridamot *Spodoptera exigua* (14, 30) en de katoenrups *Heliothis armigera* op te helderen. Deze twee virussen worden in Nederland, resp. de Volksrepubliek China als biologisch bestrijdingsmiddel met succes gebruikt.

Alle genen worden niet tegelijkertijd tot eiwit vertaald, tot expressie gebracht, maar in golven van toenemende intensiteit. Voor ieder golf is een categorie genen verantwoordelijk. De eerste categorie betreft genen die de infectie op gang brengen en de gastheer aanzetten aan de infectie medewerking te verlenen, de zogeheten 'vroeg' genen. Een tweede categorie genen, 'late genen', wordt door de eerste categorie aangestuurd en is betrokken bij de feitelijke verzorging van de verdubbeling (replicatie) van het virale DNA en de vorming van nieuwe virions. Een derde categorie van genen, de 'zeer late' genen, is betrokken bij de vorming van de polyeders. Een aparte categorie genen is specifiek voor de interactie met insecten. De regulatie van de expressie vindt plaats bij het overschrijven van DNA in boodschapper RNA, dat op zijn beurt weer nodig is om de informatie in eiwit te vertalen.

Deze laatste twee categorieën van genen zijn uniek voor baculovirussen en noodzakelijk voor een succesvolle infectie van insecten. Het onderzoek naar het mechanisme van DNA-replicatie, met name de rol van diverse virale genproducten (14, 16), en het onderzoek naar de functie van genen, die bij de vorming van polyeders zijn betrokken (22), vormen een

belangrijk onderdeel van het onderzoek van het laboratorium voor Virologie. Vele studenten en promovendi hebben hieraan meegewerkt of doen dat nog.

Het infectie proces van baculovirus verloopt in twee fasen (figuur 3). In de eerste fase worden infectieuze virions gemaakt, die zorgen voor de verspreiding van de infectie in het insect. In de tweede fase worden dergelijke virions ingesloten in polyeders, die insecten onderling kunnen infecteren. Van belang voor het verdere verhaal dat baculovirussen op het eind van de infectie twee eiwitten in grote hoeveelheden maken: polyhedrine, het 'deeg'eiwit van de polyeder, en een klein eiwit, aangeduid met 'p10'. De functie van dit laatste eiwit is nog niet geheel duidelijk, maar uit ons onderzoek is gebleken dat het betrokken is bij het vrijkomen van polyeders uit de cellen (22).

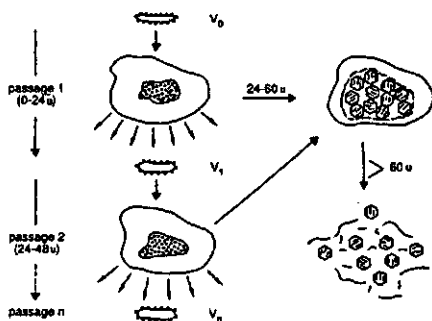


Figure 3. Schematische weergave van de twee fasen van het infectieproces.

### Toepassing als bestrijdingsmiddel

De veelzijdigheid van baculovirussen wil ik nader illustreren aan de hand van twee toepassingen, nl. als bestrijdingsmiddel en als expressievector voor recombinante eiwitten. In de natuur treden baculovirusinfecties vaak op wanneer er grote aantallen rupsen op een klein oppervlak leven of externe omstandigheden (temperatuur, voedselgebrek) aanleiding geven tot stress. Baculovirussen decimeren dan insectenpopulaties en ze gedragen zich dan als natuurlijke vijand van insecten. Alleen treedt de ziekte meestal pas op als

het gewas al verdwenen is als gevolg van vraat. Dus is het zaak om het baculovirus tijdig in het gewas te brengen om vraat te voorkomen. In dit opzicht kan dus de vijand voor het insect tot bondgenoot van de mens worden gemaakt (28, 29).

Op dit moment zijn er meer dan zevenhonderd baculovirussen beschreven. Een belangrijk biologisch kenmerk is dat baculovirussen zeer specifiek zijn voor één of enkele verwante insectensoorten en dat maakt ze bij uitstek geschikt als specifiek biologisch bestrijdingsmiddel. Bovendien zijn baculovirussen behoorlijk infectieus. Afhankelijk van het rupsenstadium (er zijn er meestal vijf, die via vervellingen tot stand komen) zijn slechts enkele polyeders nodig om sterfte teweeg te brengen. Wel is het zo dat, hoe ouder de rups, hoe meer polyeders nodig zijn om hetzelfde bestrijdingseffect te bereiken. Leeftijdsafhankelijke resistentie wordt dat genoemd. Als vuistregel geldt, dat polyeders uit 100-500 geïnfecteerde rupsen nodig zijn om één hectare gewas met succes tegen vraat te beschermen.

In de wereld zijn thans ongeveer vijftien op baculovirus gebaseerde bestrijdingsmiddelen tegen insecten op de markt. De eenvoudige wijze van bereiding maakt deze methode ook bijzonder geschikt voor gebruik in ontwikkelingslanden. In de Volksrepubliek China bijvoorbeeld worden elk jaar 100.000 hectaren katoen met succes met een baculoviruspreparaat behandeld. Iets soortgelijks vindt plaats in soja in Brazilië. In Nederland hebben we een op baculovirus gebaseerd bestrijdingsmiddel tegen de floridamot (*Spodoptera exigua*). Dit insect komt sinds 1976 als ongenode gast veel voor in teelten onder glas en maakt er een gewoonte van om bloemknoppen van bijv. chrysanten en gerbera's aan te tasten. De rups wordt dan ook wel 'koppensneller' genoemd. Dit biologisch middel is in de jaren '80 ontwikkeld via het promotiewerk van dr. P.H. Smits op ons laboratorium en later door het Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek van de Dienst Landbouwkundig Onderzoek (IPO-DLO) uitontwikkeld en geregistreerd (27). Dit product is thans onder de merknaam Spodex<sup>R</sup> in de handel en wordt in Nederland in ca. 400 ha kassen gebruikt, en verder in de Verenigde Staten en Zuid-Oost Azië. Kennis Centrum Wageningen avant la lettre!

## Toepassing als producent van recombinante eiwitten

Een tweede belangrijke toepassing betreft het gebruik van baculovirus als producent van recombinante eiwitten. Er bestaat veel behoefte aan eiwitten voor medische, farmaceutische en veterinaire toepassingen, bijv. als basis voor therapeutica, diagnostica en vaccins, en derhalve aan systemen om grote hoeveelheden te maken. Het baculovirus-insectencel-expressiesysteem kan daarbij een goed alternatief zijn (Figuur 4). De cellen zijn afkomstig van insectenweefsel en groeien op speciale voedingsoplossingen (35). Het infectieproces kan gecontroleerder verlopen en op grote schaal kan worden uitgevoerd. De geïnfecteerde cel bestaat voor ca. dertig procent uit polyhedrine en voor twintig procent uit p10. De genetische informatie voor deze twee eiwitten kan via een proces van genetische modificatie wordt vervangen door informatie voor bijvoorbeeld een farmaceutisch interessant eiwit en op deze wijze kunnen in principe grote hoeveelheden recombinant eiwit in insectencellen worden gemaakt. We spreken dan van een baculovirus-expressievector (15).

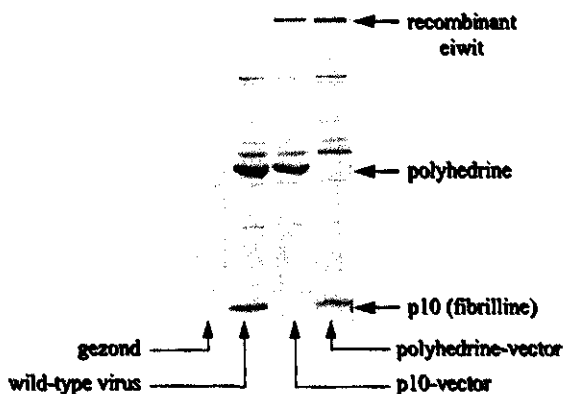


Figure 4. Het baculovirus-insectencel-expressiesysteem. Patroon van eiwitten, gescheiden op grootte (kleine onder; grote boven) van ongeïnfecteerde cellen (linkerbaan), en cellen geïnfecteerd met wild type baculovirus (tweede baan van links), met een p10-vector (tweede baan van rechts) en met een polyhedrine-vector (rechter baan). Als voorbeeld is in de p10 vector het p10 gen en in de polyhedrine-vector het polyhedrine-gen vervangen door een gen voor een recombinant eiwit.

De ontwikkeling van het expressievectorsysteem startte in ons laboratorium met de ontdekking eind jaren '70, dat het polyhedrine-gen een product van het virus is en waar het gen op het virale DNA is gelokaliseerd (3). In 1983 slaagden dr. M.D. Summers en zijn groep, Texas A&M University, College Station, Texas, Verenigde Staten, erin recombinant interleukine-2 met dit systeem te produceren (26). Op zijn laboratorium mocht ik in 1980 een sabbatical doorbrengen en dat bezoek is van bijzondere betekenis geweest voor de ontwikkeling van het moleculaire baculovirusonderzoek in Wageningen en de introductie van dit systeem in Nederland. In 1988 konden wij expressievectoren op basis van het p10-gen aan het arsenaal van vectoren toevoegen (37) en sindsdien hebben wij diverse verbeteringen aangebracht (19). Inmiddels is dit expressiesysteem op basis van baculovirus en insectencellen in diverse vormen commercieel verkrijgbaar.

Een groot voordeel boven alternatieve systemen, zoals bacteriën en gist, is niet alleen dat er zeer veel van een bepaald soort eiwit snel kan worden gemaakt, maar vooral dat deze eiwitten na synthese, bijv. door het aanhaken van koolhydraten (glycosylering), fosforgroepen (fosforylering) en vetzuurgroepen (myristoylering), verder worden vervolmaakt. Dit is van belang, omdat eiwitten voor medische en veterinaire toepassingen zoveel mogelijk moeten lijken op authentieke eiwitten, zoals we die aantreffen bij zoogdieren. Op dit moment zijn meer dan 3000 verschillende eiwitten geproduceerd voor een veelheid van toepassingen. Inmiddels zijn met succes diverse vaccins en diagnostica, ook in Nederland, ontwikkeld. Zo is het vaccin, dat thans door Intervet International, dochter van AKZO, en door het ID-DLO tegen de varkenspest is bereid, ook via een van onze baculovirusvectoren gemaakt. Helaas mag het vaccin om politieke redenen niet worden gebruikt. Voor de kosten hoeft men het niet te laten. De kosten van de epidemie, thans begroot op 4 miljard, zouden via vaccinatie tot een fractie beperkt zijn gebleven.

Vaak is het nodig voor de eiwitproductie insectencellen op grotere schaal te kweken. Dat gebeurt dan in grote, geroerde

vaten, oftewel bioreactoren, van 2 - 4000 liter volume. Deze expertise is op ons laboratorium echter niet voorhanden en daarom werken we al ruim tien jaar vruchtbaar samen met de afdeling Proceskunde van het Departement Levensmiddelen-technologie en Voeding o.l.v. prof.dr.ir. J. Tramper. In deze bioreactoren zwemmen de cellen in vloeibare voedingsoplossing en produceren ze recombinant eiwit nadat ze geïnfecteerd zijn met een expressievector. Tijdens het onderzoek om dit te realiseren bleek echter dat de productie in de tijd terugliep. De oorzaak bleek het 'passage-effect' te zijn. Door opeenvolgende vermenigvuldigingsronden in cellen, verliest het baculovirus enkele stukken DNA die ondermeer voor de productie van recombinante eiwitten van belang zijn (16). Via een speciale bioreactor-opstelling kon het passage-effect worden gereduceerd, maar niet worden opgeheven (8, 18). Thans proberen we uit te zoeken waarom en op welke wijze het virus deze stukken DNA verliest, om daarna wellicht via genetische weg het virus te kunnen repareren.

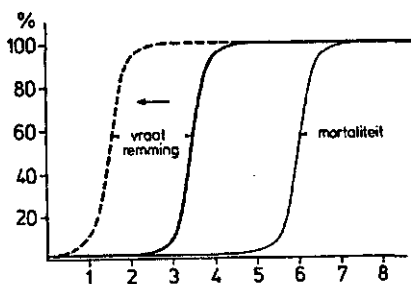
De eliminatie van het polyhedrine-gen maakt het vrijwel onmogelijk dat dergelijke expressievectoren zich kunnen verspreiden in de natuur dan wel anderszins in het milieu kunnen overleven. Ze zijn voor hun levenscyclus te zeer afhankelijk van celcultures. Daarnaast zijn baculovirussen specifiek voor insecten en komen ze bij mens en hogere dieren niet voor (36).

### **Genetisch gemodificeerde baculovirussen voor de bestrijding van schadelijke insecten**

Een drietal problemen staat een ruimere toepassing van wild-type baculovirussen in de weg (34). De technologie, die toegepast wordt bij de constructie van expressievectoren, is ook bruikbaar voor verbetering van baculovirussen als insectenbestrijdingsmiddel. In de eerste plaats zijn baculovirussen in hoge mate specifiek. Een drietal problemen staat nl. een ruimere toepassing van wild-type baculovirussen in de weg. Dit is een groot voordeel in biologisch opzicht, omdat alleen het doelinsect wordt aangepakt. Praktisch en commercieel is het echter een nadeel, omdat voor elke plaag een ander baculovirus zou moeten worden gebruikt. Wanneer we de achterliggende principes van specificiteit begrijpen, kunnen we wellicht via genetische modificatie baculovirussen

geschikt maken voor meerdere schadelijke insecten (31). Op dit moment echter is er nog te weinig over specificiteit bekend om dat gericht te doen. De vraag is of een dergelijke ontwikkeling ook wenselijk is. Het is voorstelbaar is dat deze recombinante virussen ook nuttige insecten infecteren. In elk geval zal een uitgebreide risico-analyse noodzakelijk zijn voordat tot toepassing kan worden overgegaan.

Een tweede probleem is de geringe infectiositeit van sommige baculovirussen t.o.v. bepaalde rupsen, bijv. Lymantriden. Ook de afnemende gevoeligheid van oudere rupsen voor baculovirus noopt tot het toepassen van hoge doses om nog een acceptabel bestrijdingsresultaat te verkrijgen. Er zal nog veel onderzoek moeten gebeuren om de oorzaak van de geringe infectiositeit te achterhalen en via genetische modificatie verbeteringen te kunnen aanbrengen.



*Figure 5. Effect van (genetisch gemodificeerde) baculovirussen op de mortaliteit en de vraatremming van rupsen. Getrokken lijn: wild-type baculovirus; stippellijn: genetisch gemodificeerd baculovirus.*

Tenslotte werken baculovirussen niet al te snel, althans in vergelijking met chemische middelen. Virussen hebben er meestal geen belang bij om hun slachtoffers snel te doden. Immers dan wordt er minder virus geproduceerd en is de kans op verspreiding kleiner. Met behulp van recombinant-DNA-technieken is men er in de Verenigde Staten en Engeland in geslaagd eigenschappen in baculovirussen te brengen, die het insect bij infectie snel verlammen of doden (6). De tijd die verloopt tussen het begin van de infectie en het stoppen met eten kan worden teruggebracht van ca. 5 tot ca. 2 dagen (Figuur 5). Dit is nog niet voldoende om te kunnen con-

curreren met chemische op werkzaamheid middelen, maar het begin is er. Bij veldproeven met dergelijke recombinanten bleek dat de schade aan het gewas door insecten aanzienlijk geringer te zijn dan wanneer wild-type virussen werden gebruikt.

Een vergelijkbare verbetering van het virus werd door O'Reilly e.a. verkregen door een bepaalde eigenschap uit het virus te verwijderen oftewel te deleteren (23). Deze deletie-strategie wordt thans op ons laboratorium toegepast op baculovirussen van de floridamot en de katoenrups, dit laatste in samenwerking met het Institute of Virology in Wuhan, onderdeel van de Chinese Academie van Wetenschappen. Deze strategie geeft m.i. veel betere perspectieven, omdat dergelijke mutanten de concurrentie met ongemodificeerde baculovirussen in de natuur verliezen. De biologische veiligheid is hiermee dus beter gewaarborgd. Overigens is er nog geen enkele aanwijzing dat genetisch gemodificeerde baculovirussen onbedoelde, nadelige neveneffecten hebben.

In het licht van de mogelijke toepassing van genetisch gemodificeerde baculovirussen is onze onderzoeksgroep erin geïnteresseerd het gedrag van baculovirussen in een ecosysteem te bestuderen. In samenwerking met de afdeling Theoretische Produktie Ecologie van het Departement Plantenteelt (i.o.) trachten wij het gedrag van baculovirussen in kassen via een simulatiemodel te beschrijven. Dit model bevat ook gegevens over gewasgroei en gedrag van insecten. Wij hopen dit model te gebruiken o.a. om een voorspelling te doen over het gedrag van genetisch gemodificeerde baculovirussen in kassen en in het veld.

Via genetische modificatie kunnen baculovirussen effectiever worden gemaakt in de bestrijding van insectenplagen. Economische factoren, alternatieve bestrijdingsstrategieën, bijv. het gebruik van insect-resistente planten, en publieke acceptatie zullen echter bepalen of deze recombinante baculovirussen ook een commercieel succes worden.

### **Toekomstige ontwikkelingen**

In het voorgaande heb ik hier en daar al aangegeven waar ons huidig onderzoek zich op richt. Het beschikbaar komen van



de genetische informatie van meer baculovirus DNA's geeft de mogelijkheid de verwantschap tussen baculovirussen nader te bestuderen. De vraag is bijv. of baculovirussen lang geleden zijn ontstaan en zijn gecoëvolueerd met insecten tijdens de soortvorming, of dat baculovirussen veel later zijn ontstaan en zich via recombinatie of mutatie over het insectenrijk hebben verspreid. Tenslotte worden virussen ook wel aangeduid als een verzameling genen 'op drift'. Om een tijdsbalk (moleculaire klok) op deze evolutie te kunnen zetten is het nodig om ook moleculaire verwantschapsanalyses (fylogenie) van insecten zelf uit te voeren. Via recent onderzoek via promovendi is ook duidelijk geworden dat naast de verwantschapsanalyse van genen ook de genenvolgorde op het DNA een fylogenetisch kenmerk van baculovirussen kan zijn (14, 30). Ik heb het voornemen om dit type onderzoek bij baculovirussen in de toekomst verder vorm te geven.

Het beschikbaar komen van genetisch gemodificeerde baculovirussen geeft ook de mogelijkheid het ziekteproces in het insect *in vivo* te vervolgen (11), bijv. door aan het virus fluorescerende eigenschappen toe te voegen. Daarnaast kan met dergelijke recombinanten bij onvatbare of gedeeltelijk vatbare insectensoorten worden onderzocht welke stap van het infectieproces geblokkeerd is. Op deze wijze kan inzicht worden verkregen in de cellulaire en moleculaire achtergronden van onvatbaarheid of resistentie.

Een recente ontwikkeling is het onderzoek betreft virussen in garnaal. In het Verre Oosten en Noord-Amerika keldert op het ogenblik keldert de opbrengst aan garnalen door het optreden van ziekten. Een belangrijke veroorzaker blijkt een virus te zijn, dat op grond van pathologische en celbiologische kenmerken op een baculovirus lijkt. Dit virus komt niet alleen bij garnalen voor, maar ook bij andere kreeftachtigen, zoals krab, etc. Op basis van moleculaire kenmerken (informatie over nucleotidenvolgorde) trachten we de vraag te beantwoorden of dit virus inderdaad een baculovirus is en wat de mate van verwantschap met baculovirussen van insecten. Misschien gaat het hier wel om een recente introductie van baculovirussen bij de garnaal. Uiteraard is het ook van belang te bezien of, op basis van wat we van baculovirussen weten, iets tegen de ziekte kan worden gedaan. In samenwerking met

de leerstoelgroep Visteelt en Visserij van het Departement Dierwetenschappen en met Intervet gaan wij na of vaccinatie van garnalen tot de mogelijkheden behoort.

**Dames en heren,**

Hiermee is de cirkel rond. Immers, oorspronkelijk richtte het onderzoek aan baculovirussen zich ook op het voorkómen van ziekte, bij de zijderups. Bij de garnaal is dit wederom het geval. Met dit verhaal heb ik getracht een wat genuanceerder, en positiever beeld van virussen te geven. Ik hoop dat u overtuigd bent geraakt van de veelzijdigheid van baculovirussen en van de aantrekkelijkheid om fundamenteel en toegepast onderzoek hand in hand te laten gaan. Uit mijn verhaal is hopelijk ook duidelijk geworden, dat veelzijdigheid heeft niet alleen betrekking op baculovirussen, maar ook op de mensen die er bij betrokken waren.

Gekomen aan het eind van mijn rede wil ik enkele personen en organisaties bedanken, die een bijzondere bijdrage hebben geleverd aan het feit dat ik hier nu sta.

**Mijnheer de Rector Magnificus en andere magistraten**

Het onderzoek van baculovirussen vormt thans een onderdeel van de Onderzoeksschool Productie Ecologie en draagt bij tot duurzame gewasbescherming. In de recente evaluatie van de Sector Plant- en Gewaswetenschappen is aangegeven dat het onderzoek aan o.a. baculovirussen moet worden gekoesterd. Als dit ertoe leidt dat meer middelen naar het Laboratorium voor Virologie zullen vloeien, zal ik me daar niet tegen verzetten. Het zal u ook duidelijk zijn dat dit onderzoek van betekenis is voor andere wetenschapsgebieden van onze instelling - ik denk dan in het bijzonder aan de Biologie en de Biotechnologie. Ik zal mij ook in de toekomst regelmatig op die gebieden blijven bewegen.

In de achterliggende periode heb ik deel mogen uitmaken van de Universiteitsraad en daardoor kennisgemaakt met de 'achterkant van het gelijk'. Ik hoop van ganser harte dat u deze raad zult missen, maar ik vrees van niet. Wageningen wordt een Centrum van Kennis. Ik hoop dat het nieuwe College van Bestuur kans ziet de universitaire taken van de

'Agropolis van het Noorden' herkenbaar te houden. Wetenschap en kennis zijn immers wezenlijk verschillend.

### **Geachte leden van de Benoemings Advies Commissie**

U bent voor mij onbekend gebleven. Het omgekeerde gelukkig niet. Ik dank u voor het vertrouwen dat u in mij heeft gehad door mij voor te dragen als persoonlijk hoogleraar.

### **Hoog- en zeergeleerde opleiders,**

In de eerste plaats dank ik mijn opleiders tijdens mijn studie in de Biologie in Utrecht. Het enthousiasme van prof.dr. Peter Bloemers heeft mij definitief doen kiezen voor wat nu ongetwijfeld moleculaire biologie zou hebben geheten. Dr. Wolter Sillevius Smitt, dr. Paul van der Saag en prof.dr. Tom Rozijn, zorgden voor de wetenschappelijke en experimentele hygiëne, die mij in staat stelde zelfstandig onderzoeker te zijn.

### **Hooggeleerde Tramper, beste Hans,**

Toen wij elkaar in 1984 voor het eerst ontmoetten, was dat het begin van een lange samenwerking. Je hebt mij geleerd hoe aardig het is multi- en interdisciplinair te werken. Niet gehinderd door de grenzen van onze vakgebieden zijn wij begonnen aan een boeiend avontuur. De introductie van insectencellen op de Sectie Proceskunde en van bioreactoren op het Laboratorium voor Virologie hebben de basis gelegd, niet alleen voor een uniek stuk onderzoek in de wereld, maar ook voor een vernieuwing in het onderwijs in de biotechnologie van dierlijke cellen. Ik dank je voor je partnership.

### **Hooggeleerde Van der Want, beste Jan,**

Je hebt mij de volledige vrijheid gegeven om het onderwijs en onderzoek in de diervirologie in Wageningen naar eigen inzicht in te richten. Als je kijkt naar het aantal studenten dat zich in deze discipline in de afgelopen jaren heeft bekwaamd en naar de resultaten die het onderzoek heeft opgeleverd, is dat denk ik een juiste beslissing geweest.

### **Zeergeleerde Peters, beste Dick,**

Er zijn weinig mensen die meer weten van insectenvirussen dan jij. Een betere introductie in het vakgebied kon ik me indertijd niet wensen. Van je kennis en ervaring zo naast de deur hoop overigens ik nog lang gebruik te mogen maken.

### **Hooggeleerde Goldbach, beste Rob**

Je aantreden in 1986 heeft veel verandering met zich mee gebracht. Dank zij jou heb ik de gelegenheid gekregen de baculovirusgroep verder uit te bouwen en nieuwe initiatieven te nemen, die de virologie soms overstijgen. Ik dank je voor het permanente vertrouwen en voor de stimulansen om op ingeslagen wegen voort te gaan, en ik stel me voor dat onze samenwerking ook in de toekomst op dezelfde plezierige wijze wordt gecontinueerd. De leiding van het Laboratorium voor Virologie, en straks ook het Departement Plantenveredeling en gewasbescherming, is bij jou in zeer goede handen.

### **Dames en heren (voormalige) studenten en promovendi,**

Baculovirussen en insectencellen vormen een prachtig systeem met een groot aantal aspecten van de dierlijke biotechnologie in aanraking te komen. In de afgelopen twintig jaar hebben meer dan 150 studenten een afstudeervak bij de baculovirusgroep gedaan en daarmee blijk gegeven van hun belangstelling en enthousiasme voor het werken met baculovirussen en insectencellen. Het feit dat zovelen van jullie hier aanwezig zijn beschouw ik als een bijzonder teken van verbondenheid met mij en het onderwerp.

Promovendi en post-docs vormen een belangrijk deel van een onderzoeksgroep. Zonder jullie zou zeer veel in onze groep niet tot stand gekomen zijn. Ik dank jullie allen voor jullie grote inzet. Ook de aanwezigheid van vele buitenlandse studenten en gastmedewerkers heeft een positieve bijdrage geleverd aan het wetenschappelijke klimaat.

## **Dames en heren, leden van het Laboratorium voor Virologie,**

Met zeer veel genoegen maakte en maak ik deel uit van het laboratorium voor Virologie. De goede onderlinge sfeer door de jaren heen is zeer belangrijk geweest voor mijn plezier in het werk. Wat mij betreft zal daar niets aan veranderen. Het gevoel de opdrachten gezamenlijk en in goede harmonie te kunnen klaren is de kracht van ons lab.

Een bijzonder woord van dank gaat naar Magda Usmany, die al meer dan twintig jaar mijn trouwe assistente is. Meer nog dan ik heb jij de vele studenten en medewerkers vertrouwd gemaakt met de geheimen van baculovirussen en insectencellen en mij daarmee veel werk uit handen genomen. Dank daarvoor. Samen met Douwe Zuidema en Els Roode vormen wij de kern van de baculovirusgroep en ik hoop dat wij dat nog lange tijd zullen blijven.

### **Familie, vrienden en overige aanwezigen**

Ik hoop met deze rede iets van het mysterie van virussen te hebben opgeheven en iets van de veelzijdigheid van baculovirussen en van mijn werk te hebben laten zien. Ik prijs jullie uithoudingsvermogen maar de wetenschap, dat er nog een vervolg is, houdt jullie waarschijnlijk op de been.

Mijn bijzondere dank gaat uit naar mijn ouders, die dit helaas niet meer mee mogen maken, en naar mijn schoonouders, die mij altijd met zoveel belangstelling hebben gevolgd en die de rol van ouders al zoveel jaren geruisloos hebben overgenomen.

### **Lieve Ellen**

Ik spreek je zelden in het openbaar toe, maar nu moet het maar eens gebeuren. Misschien zou je het aardiger hebben gevonden dat in de vorm van een 'scripto' te doen, maar ik zeg het maar in 'gewoon' Nederlands. Ik dank je voor je onvoorwaardelijke steun en kameraadschap in de achterliggende jaren. Je immer opgeruimde humeur en je speelse humor droegen ertoe bij vele zaken in de juiste verhoudingen te blijven zien. Dank zij je talenkennis en nauwkeurigheid heb

je overigens vele 'manuscripto's' van commentaar voorzien. Daarmee heb je ook de wetenschap voor veel ongerechtigheden behoed.

Monique en Astrid, ik hoop niet dat jullie verwantschap voelen met de kinderen van de STER-reclame, die zeggen: 'wie is die man die 's zondags het vlees komt snijden'. Maar iets goed te maken heb ik misschien wel.

**Mijnheer de Rector, dames en heren,**

Ik dank u voor uw aandacht.

### Referenties

1. Ayres, M.D., S.C. Howard, J. Kuzio, M. Lopez-Ferber en R.D. Possee. 1994. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 202: 586-605
2. Benz, G.A. 1986. Introduction: historical perspectives. In: *The biology of baculoviruses* (R.R. Granados en B.A. Federici, eds), CRC Press, volume 1, 1-35
3. Beek, C.P. van der. 1981. On the origin of the polyhedral protein of the nuclear polyhedrosis virus of *Autographa californica*. Proefschrift, LUW, 74 pp
4. Bergold, G.H. 1953. Insect viruses. *Adv. Virus Res.* 1: 91-13
5. Beijerinck, M.W. 1898. Ueber ein contagium vivum fluidum als Ursache der Fleckenkrankheit der tabaksblätter. *Verhandel. Koninkl. Ned. Acad. van Wetensch.* 65: 3
6. Black, B.C., L.A. Brennan, P.M. Dierks en I.E. Gard. 1997. Commercialization of baculovirus insecticides. In: *The baculoviruses* (L.K. Miller, ed., Plenum Press), p.341-387
7. Bolle, G. 1894. Il giallume od il mal del grasso del baco da seta. *Atti.e Mem. dell. I.R. Soc.Agr. Gorizia* 34: 133-136
8. De Gooijer, C.D. 1996. Cascades of bioreactors. Proefschrift, LUW, 277 pp

9. Doll, R. 1997. In: Wetenschap & Onderwijs NRC van 15 november, p. 51
10. Fields, B.N., D.M. Knipe en P.M. Howley (eds.). 1996. Virology (3<sup>e</sup> editie). Lippincott-Raven Publishers (twee delen)
11. Flipsen, J.T.M. 1995. Pathogenesis induced by (recombinant) baculoviruses in insects. Proefschrift, LUW, 103 pp
12. Goldbach, R.W. 1986. Virussen: Vijand en vriend. Oratie, 26 pp
13. Granados, R.R. en Federici, B.A. (eds). 1986. The biology of baculoviruses (2 delen). CRC Press, Baton Rouge
14. Heldens, J.G.M. 1998. Molecular genetics of the *Spodoptera exigua* multi-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus genome. Proefschrift, LUW, in druk
15. King, L.A. en R.D. Possee. 1992. The baculovirus expression system.: a laboratory guide. Chapman en Hall, London, 229 pp
16. Kool, M. 1994. Baculovirus DNA replication. Proefschrift, LUW, 200 pp
17. Levine, A.J. 1992. Virussen. Wetenschappelijke Bibliotheek, deel 36, Uitgave van Natuur en Techniek
18. Lier, F.L.J. van, 1995. Two-stage baculovirus production in insect cell bioreactors. Proefschrift, LUW, 184 pp
19. Martens, J.M. 1994. Development of a baculovirus insecticide exploiting the *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein. Proefschrift, LUW, 135 pp
20. Mayer, A. 1882. Over de mozaïekziekte in de tabak. Tijdschr. Landbouwk., Groningen, p. 359-364
21. Miller, L.K. (ed.). 1997. The baculoviruses. Plenum Press, 447 pp
22. Oers, M.M. van. 1994. Functional analysis of the baculovirus 10 kilodalton protein. Proefschrift, LUW, 143 pp
23. O'Reilly, D.R. en L.K. Miller. 1991. Improvement of a baculovirus insecticide by deletion of the *egt* gene. Bio/Technology 9: 1086-1089
24. Outbreak. 1995. Warner Bros
25. Preston, R. 1994. The hot zone. Corgi Books, 384 pp
26. Smith, G.E., M.D. Summers, M.D. en M.J. Fraser. 1983. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. Mol. Cell. Biol. 3: 2156-2165

27. Smits, P.H. 1987. Nuclear polyhedrosis virus as biological control agent of *Spodoptera exigua*. Proefschrift, LUW, 127 pp
28. Steinhaus, E.A. 1954. The effects of disease on insect populations. *Hilgardia* 23: 197-261
29. Steinhaus, E.A. 1956. Microbial control - the emergence of an idea. *Hilgardia* 26: 107-160
30. Strien, E.A. 1997. Characterization of the *Spodoptera exigua* baculovirus genome: structural and functional analysis of a 20 kb fragment. Proefschrift, LUW, 135 pp
31. Thiem, S.M. 1997. Prospects for altering host range for baculovirus bioinsecticides. *Current Opinion in Biotechnology* 8: 317-322
32. Thung, T.H. 1950. De ontwikkelingsgang der plantenvirologie. Oratie, 24 pp
33. Vida, M.H. 1527. De bombice (poem)
34. Vlak, J.M. 1993. Genetic engineering of baculovirus insecticides. In: *Molecular Approaches to Pure and Applied Entomology* (M.J. Whitten en J.G. Oakeshott, eds.), Springer, p. 90-127
35. Vlak, J.M., C.D. de Gooijer, J. Tramper en H.G. Miltenburger (eds.). *Insect cell culture: fundamental and applied aspects*, Kluwer Academic Publishers, 309 pp
36. Vlak, J.M. en Hu ZhiHong. 1997. Biosafety of engineered baculoviruses and cultured insect cells. In: *Invertebrate cell culture: Novel directions and biotechnology applications* (K. Maramorosch en J. Mitsuhashi, eds.), Science Publishers, Inc., p.181-191
37. Vlak, J.M., A. Schouten, M. Usmany, G.J. Belsham, E.C. Klinge-Roode, A.J. Maule, J.W.M. van Lent en D. Zuidema. 1990. Expression of cauliflower mosaic virus gene I using a baculovirus vector based upon the p10 gene and a novel selection method. *Virology* 197: 312- 320
38. Volkman, L.E. 1990. Nuclear polyhedrosis virus pathogenesis. *Sem. Virol.* 1: 249-256
39. Want, J.P.H. van der. 1986. Kleiner dan bacil. Afscheidsrede, 23 pp
40. Want, J.P.H. van der. 1959. Drie steunpunten van fytopathologisch onderzoek. Oratie, 19 pp

Met dank aan dr.ir. J.W.M. van Lent voor het doornemen van deze rede en voor de hulp bij het samenstellen van de lichtbeelden.