

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie
Studijní obor: Biochemie



Mgr. Petr Vaculík

Biotechnologické využití rostlinných virů

Plant virus-based biotechnology

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/školitel:

Doc. RNDr. Noemi Čeřovská, CSc.

Praha, 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 08.06.2015

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval své školitelce Doc. RNDr. Noemi Čeřovské CSc. za její laskavé vedení, trpělivost a cenné rady, které mi v průběhu doktorského studia věnovala. Dále bych chtěl poděkovat Dr. rer. nat. Ing. Heleně Plchové a Mgr. Tomáši Moravcovi, Ph.D., kteří byli vždy ochotni poradit a v neposlední řadě patří můj dík paní Renatě Hadámkové za její pomoc v laboratoři.

Abstrakt

Model terciární struktury kapsidového proteinu X viru bramboru (PVX CP) byl využit jako předloha pro navržení nových pozic pro vkládání antigenů za účelem jejich prezentace na povrchu částic PVX. Na základě tohoto modelu bylo vybráno sedm pozic (A-G), které se nacházejí na povrchu virionu. Jako antigen pro prezentaci byl použit 17 aminokyselinový epitop onkoproteinu E7 odvozený od lidského papilomaviru typu 16 (E7 epitop) ve fúzi s 6xHis kotvou nebo StrepII kotvou, a to v obou možných uspořádáních (6xHis-E7, E7-6xHis, StrepII-E7 a E7-StrepII).

Modifikované PVX CP byly nejprve exprimovány v *Escherichia coli* MC1061, kde docházelo k tvorbě virových částic pouze v případě vložení inzertů StrepII-E7 a E7-StrepII do pozice A v PVX CP.

Výsledky z transienční exprese modifikovaných PVX CP v *Nicotiana benthamiana* prokázaly, že nejvhodnější pozice pro prezentaci antigenů je pozice A, která je situovaná mezi 24. a 25. aminokyselinou v PVX CP. Dále bylo zjištěno, že virové částice mohly být detekovány pouze v přítomnosti StrepII kotvy a že stabilita těchto částic je ovlivněna uspořádáním inzertu (StrepII-E7 vs. E7-StrepII), neboť bylo možné purifikovat pouze virové částice nesoucí inzert v uspořádání E7-StrepII.

Kromě využití PVX pro přípravu antigen prezentujícího systému byl také posouzen vliv infekce PVX na integritu DNA *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi metodou kometové analýzy, která prokázala, že k poškození rostlinné DNA při infekci PVX dochází, a že stupeň tohoto poškození odpovídá množství PVX.

Abstract

The latest model of tertiary structure of capsid protein of potato virus X (PVX CP) was used as a template to design new insertion sites suitable for the preparation of PVX-based antigen presentation system. Based on this model, seven insertion sites (A-G) located in putative surface loops were tested. As an antigen inserted into these sites was used 17 amino acids long epitope derived from human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein (E7 epitope) fused with either 6xHis tag or StrepII tag in both possible orientations (6xHis-E7 and E7-6xHis, StrepII-E7 and E7-StrepII).

Prior to plant expression, modified PVX CPs were expressed in *Escherichia coli* MC1061. The results showed that only PVX CP carrying StrepII-E7 or E7-StrepII in the insertion site A formed virus particles.

The results from transient expression experiments with modified PVX CPs in *Nicotiana benthamiana* showed that only the insertion site A (located between 24th and 25th amino acid in the PVX CP) could tolerate all tested inserts. Importantly, viral particles were detected only in the presence of StrepII tag and their stability was affected by the insert orientation (StrepII-E7 vs. E7-StrepII) as only the viral particles presenting E7-StrepII could be purified.

Besides the preparation of PVX-based antigen presentation system, an evaluation of DNA damaging potential of PVX on *Nicotiana tabacum* var. Xanthi by the comet assay was performed. Based on this assay, it was shown that PVX caused DNA damage and the extent of DNA damage correlated with amount of PVX.

Obsah

Seznam použitých zkratek	8
1. Literární úvod	12
Rostlinné viry	12
Morfologie a složení rostlinných virů	12
Vstup rostlinných virů do buněk a jejich šíření.....	14
Obrana rostlin proti virům	16
Rostlinný expresní systém	22
Rostlinná glykosylace	22
Stabilní rostlinná exprese	25
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	26
Transientní rostlinná exprese	27
Transientní exprese pomocí rostlinných virových vektorů	28
X virus bramboru (PVX)	33
Lidské papilomaviry (HPV)	36
Projevy infekce HPV	38
Vakcíny proti HPV	39
Dosavadní výzkum přípravy vakcín proti HPV v rostlinách.....	41
Kometová analýza	43
2. Cíle práce	44
3. Materiál a metody	45
Roztoky	45
Bakterie	45
Plazmidy	46
Rostlinný materiál	46
Příprava modifikovaných PVX CP pro expresi v <i>E. coli</i> MC1061 a rostlinách	48
Expresce modifikovaných PVX CP v <i>E. coli</i> MC1061	52
<i>In vitro</i> skládání virových částic z PVX RNA a modifikovaných PVX CP.....	53
Denaturační agarosová RNA elektroforéza	53
Příprava modifikovaných PVX CP pro expresi v <i>E. coli</i> BL21(DE3)	54

Expresie modifikovaných PVX CP v <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	57
Transientní expresie modifikovaných PVX CP v rostlinách.....	57
Purifikace PVX a PVX E7-StrepII A z rostlin	58
SDS-PAGE elektroforéza a Western blot analýza	59
Detekce glykoproteinů.....	59
Transmisní imunoelektronová mikroskopie	60
Kometová analýza.....	61
4. Výsledky	63
Vložení E7 epitopu do možných povrchových smyček PVX CP	63
Expresie PVX CP 6xHis-E7/E7-6xHis v <i>E. coli</i> MC1061	66
Transientní expresie PVX CP 6xHis-E7/E7-6xHis v rostlinách	72
Expresie PVX CP StrepII-E7/E7-StrepII v <i>E. coli</i> MC1061	74
<i>In vitro</i> skládání virových částic z PVX RNA a PVX CP StrepII-E7/E7-StrepII	76
Expresie PVX CP StrepII-E7/E7-StrepII A v <i>E. coli</i> BL21(DE3)	77
Transientní expresie PVX CP StrepII-E7/E7-StrepII v rostlinách	79
Purifikace PVX E7-StrepII A	83
Imunizace myši purifikovaným PVX E7-StrepII A.....	85
5. Diskuse	91
Expresie modifikovaných PVX CP v bakteriích.....	91
Tvorba VLP a virových částic v bakteriích	92
Transientní expresie modifikovaných PVX CP v rostlinách.....	93
Tvorba modifikovaných PVX v rostlinách	93
Imunogenita PVX E7-StrepII A	94
Kometová analýza.....	96
6. Závěr	97
Expresie modifikovaných PVX CP v bakteriích.....	97
Expresie modifikovaných PVX CP v rostlinách	98
Poškození rostlinné DNA při infekci PVX	99
Shrnutí.....	99
7. Literatura	100
Přílohy	117

Seznam použitých zkratek

35S = 35S promotor viru mozaiky květáku

AMK = aminokyselina

BSA = bovinní (hovězí) sérový albumin

(-)ssRNA = jednovláknová RNA s negativní polaritou

(+)ssRNA = jednovláknová RNA s pozitivní polaritou

A. tumefaciens = *Agrobacterium tumefaciens*

AGO proteiny = proteiny patřící do proteinové rodiny Argonaute

BeYDV = virus žluté zakrslosti fazole (bean yellow dwarf virus)

BMV = virus mozaiky sveřepu (bromo mosaic virus)

BSV = virus proužkovitosti banánu (banana streak virus)

CaMV = virus mozaiky květáku (cauliflower mosaic virus)

CMV = virus mozaiky okurky (cucumber mosaic virus)

CPMV = virus mozaiky vigny (cowpea mosaic virus)

DGB = virové pohybové proteiny patřící do rodiny proteinů „double gene block“

DNA = deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)

dsDNA = dvojláknová DNA (double-stranded DNA)

dsDNA (RT) viry = viry s dsDNA genomem, které pro svůj životní cyklus vyžadují reverzní transkriptasu (RT)

dsRNA = dvojláknová RNA (double-stranded RNA)

E. coli = *Escherichia coli*

EDTA = ethylendiamintetraoctová kyselina / 2-[2-[bis(karboxymethyl)amino]ethyl-(karboxymethyl)amino]octová kyselina

ELISA = enzymová imunosorpční analýza (enzyme-linked immunosorbent assay)

ELISPOT = imunologická metoda otiskové (spotové) analýzy skvrn (enzyme-linked immunospot assay)

Episom = extrachromozomální cirkulární DNA

GFP = zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein)

HPV = lidský papilomavirus (human papillomavirus)

HPV 16 = lidský papilomavirus typu 16

LMV = virus mozaiky salátu (lettuce mosaic virus)

LRR doména = proteinová doména bohatá na leucin (LRR domain)

MNSV = virus nekrotické skvrnitosti melounu (melone necrotic spot virus)

MOPS = 3-morfolinopropan-1-sulfonová kyselina

MSV = virus proužkovitosti kukuřice (maize streak virus)

N. benthamiana = *Nicotiana benthamiana*

N. tabacum = *Nicotiana tabacum*

NB doména = nukleotidová vazebná doména (nucleotide-binding domain)

Nerozpustná frakce = bakteriální nerozpustná frakce (proteinové agregáty) získaná po lyzi bakteriálních buněk

OVA = ovalbumin

PAMP = molekulární motivy spojené s patogenitou (pathogen-associated molecular patterns)

PBS = solný roztok pufovaný fosforečnany (phosphate-buffered saline)

PBST = pufr PBS s přísávkem Tween 20

PCR = polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

PepMov = virus skvrnitosti papriky (pepper mottle virus)

PLRV = virus svinutky bramboru (potato leafroll virus)

PPV = virus šarky švestky (plum pox virus)

PRR = receptory rozeznávající patogeny (pathogen recognition receptors)

PTA-ELISA = plate-trapped antigen ELISA

PVA = A virus bramboru (potato virus A)

PVX = X virus bramboru (potato virus X)

PVX CP = kapsidový protein X viru bramboru (potato virus X capsid protein)

PVY = Y virus bramboru (potato virus Y)

RDV = virus zakrslosti rýže (rice dwarf virus)

RISC = RNA-induced silencing complex

RITC = RNA-induced transcription silencing complex

RNA = ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)

RNAi = RNA interference

Rozpustná frakce = bakteriální rozpustná frakce získaná po lyzi bakteriálních buněk

RYMV = virus žluté skvrnitosti rýže (rice yellow mottle virus)

SDS-PAGE = elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

SOE-PCR = splicing by overlap extension (SOE)-PCR

siRNA = 19 - 25 bp malé RNA (small RNA) uplatňující se v mechanismu RNAi

ssDNA = jednovláknová DNA (single-stranded DNA)

ssRNA = jednovláknová RNA (single-stranded RNA)

ssRNA (RT) viry = viry s ssRNA genomem, které pro svůj životní cyklus vyžadují reverzní transkriptasu

TBSV = virus keříčkovitosti rajčete (tomato bushy stunt virus)

TCEP = 3,3',3''-fosfantriltriopropanová kyselina / tris(2-karboxyethyl)fosfin

T-DNA = transferová DNA *Agrobacterium tumefaciens*

TGB = virové pohybové proteiny patřící do proteinové rodiny „triple gene block“

TMV = virus mozaiky tabáku (tobacco mosaic virus)

ToMV = virus mozaiky rajčete (tomato mosaic virus)

Tris = tris(hydroxymethyl)aminomethan / 2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol

TSWV = virus bronzovitosti rajčete (tomato spotted wilt virus)

Virion = virová částice

VLP = viru podobná částice (virus-like particle); proteinový obal viru neobsahující nukleovou kyselinu

1. Literární úvod

Rostlinné viry

Virus může být definován jako nebuněčný intracelulární parazit, jehož životní cyklus je zcela závislý na hostitelské buňce. Rostlinné viry jsou viry, jejichž hostitelem jsou rostlinné buňky, respektive rostliny. Na rostlinné viry se nejčastěji pohlíží jako na rostlinné patogeny, které způsobují nezanedbatelné ekonomické ztráty především při pěstování obilnin, ovoce a zeleniny. Mezi nejznámější a ekonomicky významné virové patogeny patří například virus svinutky bramboru (PLRV; potato leafroll virus) způsobující až 90% redukci výnosu bramborových hlíz, Y virus bramboru (PVY; potato virus Y) způsobující až 80% redukci výnosu bramborových hlíz a virus šarky švestky (PPV; plum pox virus), který představuje nejškodlivější a nejrozšířenější virus peckovin v Evropě [1, 2]. Rostlinné viry však nezastávají pouze roli patogenů, ale nacházejí uplatnění také v biotechnologii [3].

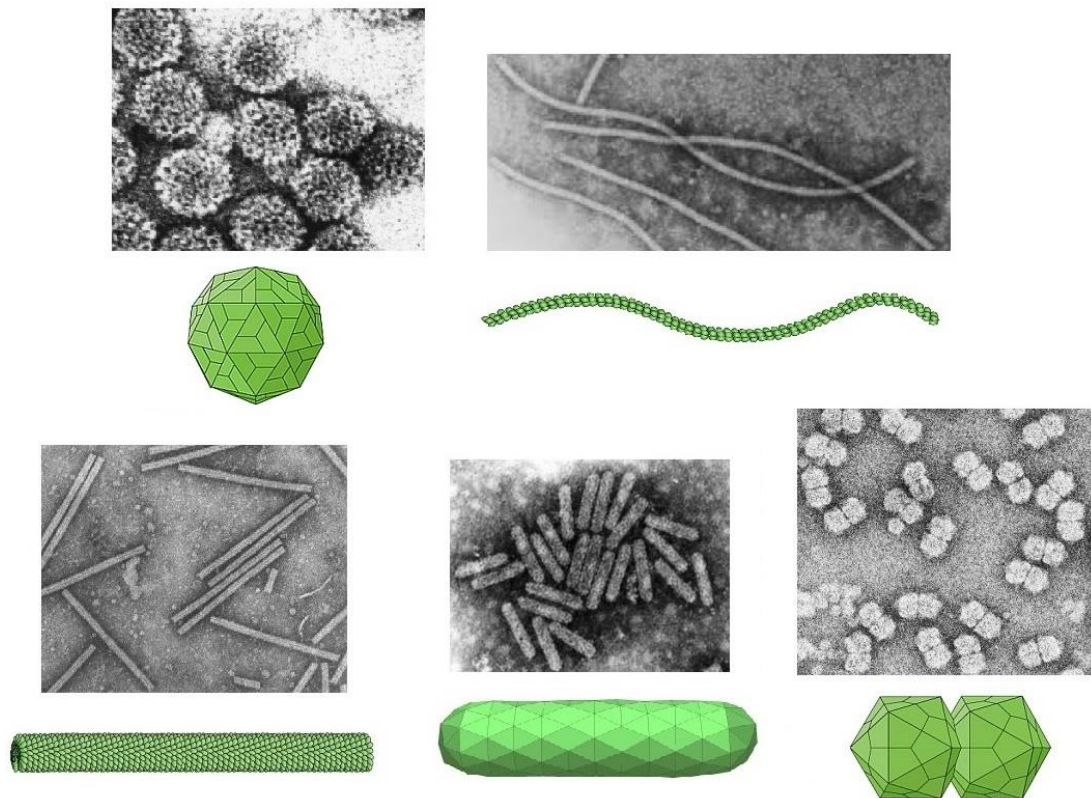
Jedním z využití rostlinných virů v biotechnologii je produkce rekombinantních peptidů a proteinů v rostlinách [4]. Rostlinný expresní systém je považován za atraktivní především z důvodů relativně nízkých nákladů na provoz (kultivaci rostlin), přítomnosti post-translačních modifikací a nepřítomnosti savčích patogenů a toxinů [5]. Ve spojení s tímto expresním systémem se rostlinné viry díky své schopnosti reprodukovat se v rostlinách do vysokých titrů jeví jako slibná expresní platforma pro produkci rekombinantních peptidů a proteinů v rostlinách.

Morfologie a složení rostlinných virů

Velikost rostlinných virů se pohybuje přibližně v rozmezích 20 - 500 nm a podle tvaru je můžeme dělit na viry sférické (kulovité), filamentární (vláknité), tyčinkovité, baciliformní a gemini (z lat. dvojčata; Obr. 1, str. 14). Strukturně nejjednodušší rostlinné

viry jsou složeny pouze z genetické informace uložené v DNA nebo RNA a proteinu obalujícího tuto genetickou informaci (tzv. kapsidového proteinu). Genetická informace většiny (přibližně 75 %) rostlinných virů představuje (+)ssRNA a je obalena pouze jedním kapsidovým proteinem. Totéž platí o většině virů, s kterými se v laboratořích nejčastěji pracuje - například virus mozaiky tabáku (TMV; tobacco mosaic virus), X virus bramboru (PVX; potato virus X), PVY a virus mozaiky okurky (CMV; cucumber mosaic virus) [6-9]. V případě složitějších virů je proteinový obal viru (kapsida) tvořen několika kapsidovými proteiny - například virus mozaiky vigny (CPMV; cowpea mosaic virus) [10], případně několika proteinovými vrstvami - například v případě rostlinných reovirů jako je virus zakrslosti rýže (RDV; rice dwarf virus) [11]. Pokud je součástí rostlinného viru i fosfolipidová dvojvrstva tvořící vnější obal viru (tzv. obálku), označuje se takovýto virus jako virus obalený - například virus bronzovitosti rajčete (TSWV; tomato spotted wilt virus) [12]. Genetická informace všech rostlinných obalených virů je tvořena (-)ssRNA. Mimo (+)ssRNA a (-)ssRNA obsahují rostlinné viry jako genetickou informaci molekuly ssDNA, dsRNA nebo dsDNA (RT). Rostlinné viry obsahující genetickou informaci založenou na dsDNA nebo ssRNA (RT) doposud objeveny nebyly.

Z hlediska genetické informace se rostlinné viry dále rozdělují na viry s nesegmentovaným a segmentovaným genomem. Nesegmentovaný genom je tvořen pouze jednou molekulou DNA nebo RNA, zatímco segmentovaný genom je reprezentován několika molekulami DNA nebo RNA. Velká většina rostlinných virů je tvořena nesegmentovaným genomem (například TMV, PVX a PVY) a mezi zástupce virů se segmentovaným genomem můžeme zařadit například TSWV (tři segmenty) a RDV (dvanáct segmentů) [13, 14]. Speciálním případem rostlinných virů se segmentovaným genomem jsou tzv. multipartitní viry, kde jsou jednotlivé segmenty genomu individuálně obaleny kapsidovým proteinem. Virus je tak v tomto případě tvořen několika částicemi jako je tomu například u banana bunchy top virus (BBTV), který je tvořen šesti virovými částicemi [15].



Obr. 1 Schématické znázornění morfologie rostlinných virů

Horní řada zleva: sférické (kulovité; virus mozaiky sveřepu; BMV; brome mosaic virus [16]), filamentární (vláknité; X virus bramboru; PVX; potato virus X [17]). Dolní řada zleva: tyčinkovité (virus mozaiky tabáku; TMV; tobacco mosaic virus [18]), baciliformní (virus proužkovitosti banánu; BSV; banana streak virus [19]) a gemini (virus proužkovitosti kukuřice; MSV; maize streak virus [20]).

Vstup rostlinných virů do buněk a jejich šíření

Rostlinné viry mohou vstoupit do cytoplazmy rostlinné buňky až po narušení rostlinné buněčné stěny a plazmatické membrány. Velká většina rostlinných virů (asi 80 %) je v přírodě přenášena vektory (přenašeči). Mezi vektory patří především hmyz (hlavně mšice a brouci), dále pak roztoči, hlístice, houby a některé parazitické rostliny (například kokotice) [21]. Vektory dopravují rostlinných virus do cytoplazmy buněk díky

narušení buněčné stěny a plazmatické membrány svým bodavě-sacím ústrojím (například mšice, roztoči a hlístice), kousacím ústrojím (například brouci), cytoplazmatickou výměnou při prorůstání hyf (houby), případně pomocí haustorií vrůstajících do cévních svazků rostliny (například kokotice). Rostlinné viry, které nejsou přenášeny vektory se šíří mechanickým přenosem z rostliny na rostlinu (například dotykem a otěrem listů nebo stroji a náradím používaných při pěstování) [22]. Některé viry se také mohou šířit prostřednictvím rostlinných semen nebo pylu [23, 24].

Podle charakteru interakce virus-vektor se rozlišuje přenos necirkulativní (neperzistentní) a cirkulativní (perzistentní). Při necirkulativním přenosu se rostlinný virus váže na receptor v ústním ústrojí vektoru a nedochází k jeho šíření (transportu z buňky do buňky) či reprodukci ve vektoru (například virus mozaiky kvěťáku; CaMV; cauliflower mosaic virus). V případě cirkulativního přenosu se rostlinný virus ve vektoru šíří (například u mšic prochází střevními buňkami do hemolymfy a odtud do slinných žláz). Pokud dochází pouze k šíření viru ve vektoru, hovoříme o cirkulativní nepropagativní interakci (například PLRV) a pokud současně dochází i k reprodukci rostlinného viru, hovoříme o cirkulativní propagativní interakci (například TSWV) [25]. Všechny vektory přenášející rostlinné viry jsou charakterizovány latentní periodou, která představuje časový interval od doby získání viru vektorem, po jehož uplynutí se vektor stává infekční a má tedy schopnost infikovat rostlinu virem. Vektory přenášející rostlinné viry cirkulativním způsobem mají latentní periodu odpovídající hodinám až dnům (například PLRV 12 h a RDV 2 týdny) [26, 27], zatímco vektory přenášející rostlinné viry necirkulativním způsobem mají latentní periodu odpovídající sekundám až minutám [25].

Po vstupu do permissivní rostlinné buňky se virus začne reprodukovat a šířit se do sousedních buněk pomocí plazmodezmat. Pro transport plazmodezmaty využívají viry tzv. pohybové proteiny (movement proteins), které jsou kódovány virovým genomem. Pohybové proteiny zvyšují propustnost plazmodezmat a umožňují tak transport virových částic nebo virových ribonukleoproteinových komplexů, které by bez přítomnosti pohybových proteinů plazmodezmaty neprošly. Mechanismus působení pohybových proteinů není přesně znám, ale hraje v něm mimo jiné roli regulace polymerizace aktinového cytoskeletu a regulace aktivity β -1,3-glukanasy (enzym podílející se na zvyšování propustnosti plazmodezmat degradací rostlinného polysacharidu kalosy) [28].

U velké většiny rostlinných virů jsou pohybové proteiny dobře definovány. Tyto viry můžeme rozdělit na ty, které mají jeden pohybový protein, dva pohybové proteiny (DGB; double-gene block) nebo tři pohybové proteiny (TGB; triple gene block). U ostatních rostlinných virů není pohybový protein (nebo proteiny) přesně charakterizován (například u čeledi *Potyviridae*) [29-32].

Rostlinné viry se mohou z buňky do buňky pohybovat ve formě virových částic (například virus keříčkovitosti rajčete; TBSV; tomato bushy stunt virus) nebo ve formě ribonukleoproteinových komplexů, které svojí strukturou a často i složením nemají povahu virových částic (například TMV). V případě virů, které se pohybují jako ribonukleoproteinové komplexy je lze rozdělit na viry, které pro mezibuněčný transport kapsidový protein vyžadují (například PVX) nebo nevyžadují (například TMV).

Zvláštním typem pohybových proteinů u některých virů pohybujících se jako virové částice jsou tzv. tubuly-formující pohybové proteiny (tubule-forming movement proteins). Tyto pohybové proteiny mají schopnost tvořit tubuly, kterými jsou viriony transportovány přes plazmodezmata (například CPMV) [25].

Dále se virus šíří rostlinou systémově pomocí vodivých pletiv (především floémem), nicméně mechanismus šíření je velmi málo prostudován.

Obrana rostlin proti virům

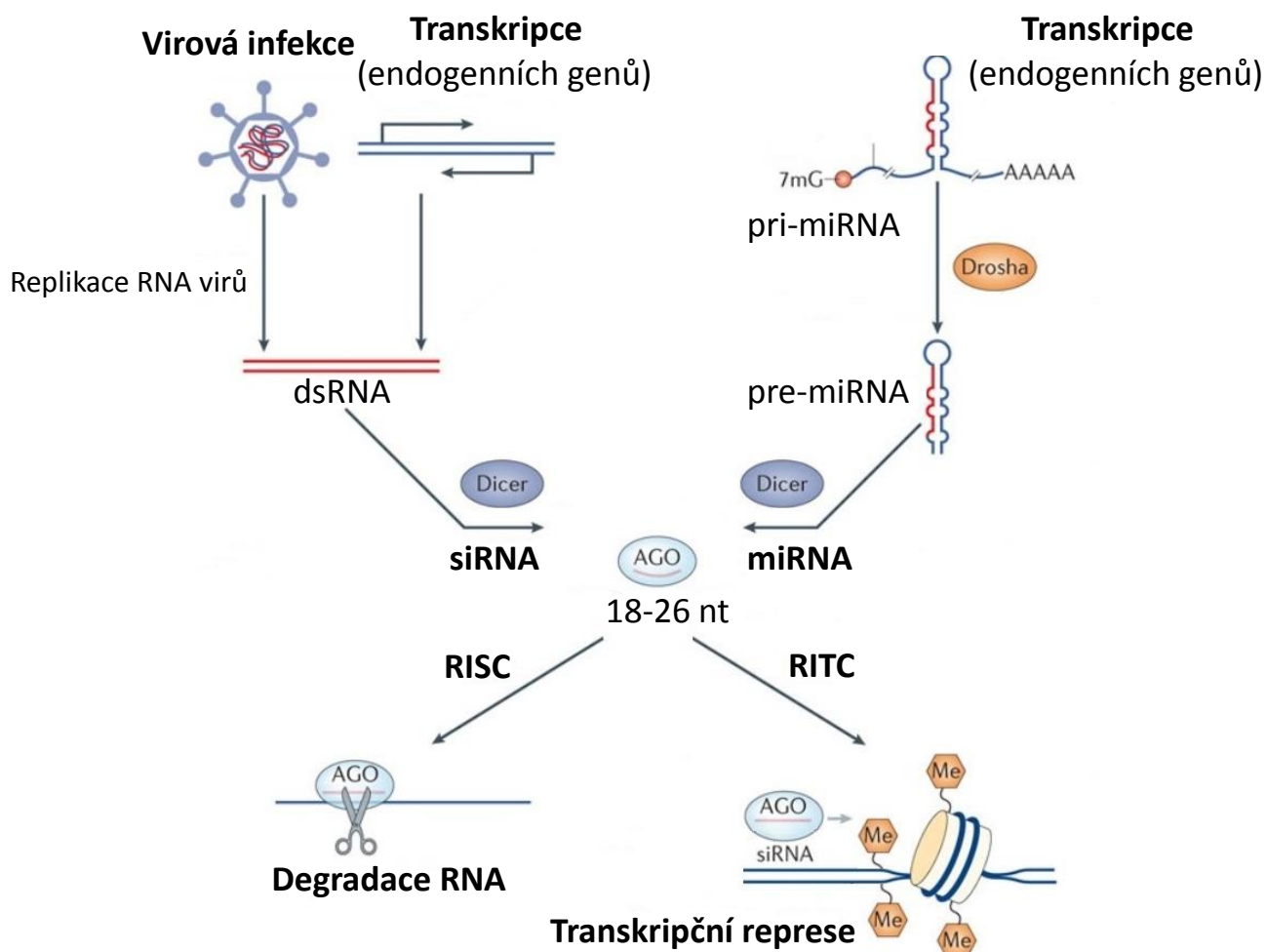
Univerzálním obranným mechanismem rostlin proti virům je RNA interference (RNAi), jehož základem je degradace virové RNA a zřejmě také methylace a transkripční inaktivace virové DNA [33, 34]. RNAi neplní pouze obrannou roli, ale také reguluje expresi rostlinných genů. RNAi je založena na rozeznání komplementárních úseků RNA (jednovláknové komplementární RNA nebo dsRNA), které jsou následně štěpeny za vzniku malých dsRNA (sRNA) o velikostech v rozmezí přibližně 18 – 26 bp [35].

Podle způsobu vzniku se molekuly sRNA označují jako miRNA nebo siRNA. Molekuly miRNA vznikají z transkriptů, které mají strukturu vlásenky (viz. Obr. 2, str. 18). Tyto transkripty, tzv. pri-miRNA, jsou v buněčném jádře štěpeny endonukleasou Drosha

za vzniku pre-miRNA, která je dále transportována do cytoplazmy. Molekuly siRNA oproti miRNA vznikají z dsRNA, které mohou vznikat v důsledku párování komplementárních transkriptů nebo například z dsRNA intermediátů vznikajících při replikaci rostlinných RNA virů. Pre-miRNA a dsRNA jsou v cytoplazmě štěpeny endonukleasami DCL (DICER-like) za vzniku miRNA, respektive siRNA [36]. Molekuly sRNA obsahují na 3' OH koncích 2 nt přesah a jsou stabilizovány methyloací 2'O nebo 3'O ribosy posledního nukleotidu. Proteiny z rodiny Argonaute (tzv. AGO proteiny) tvoří v cytoplazmě s molekulami sRNA komplex RISC (RNA-induced silencing complex), který štěpí molekuly RNA komplementární k dané sRNA. Vzniklé sRNA mohou dále tvořit společně s AGO proteiny, methyltransferasami a dalšími proteiny komplex RITC (RNA-induced transcription silencing complex), který působí v buněčném jádře a podílí se na transkripční inaktivaci - především methyloací cytosinů v oblastech promotorů a methyloací histonů (Obr. 2, str. 18) [37].

Komplex RISC působí především proti rostlinným RNA virům, u nichž v rámci replikace dochází k tvorbě dsRNA, která je substrátem pro endonukleasy DCL. V případě rostlinných DNA virů hraje RNAi také obrannou roli, avšak role komplexu RISC a RITC není přesně známa, stejně jako vznik sRNA odvozených od DNA virů.

RNAi je aktivně potlačována prostřednictvím virových proteinů, které slouží jako antagonisté RNAi. Mezi mechanismy antagonistů patří například inhibice endonukleas DCL, degradace sRNA a vazba sRNA nebo AGO proteinů za účelem zabránění složení nebo funkce RISC/RITC [38].



Obr. 2 Schématické znázornění mechanismu RNAi

RNAi reguluje translaci prostřednictvím komplexu RISC nebo transkripci pomocí komplexu RITC. Reguluje translaci a transkripci endogenních genů a uplatňuje se jako obranný mechanismus proti rostlinným virům. Proti rostlinným RNA virům, u nichž v rámci replikace vzniká dsRNA, dochází k degradaci virové RNA pomocí RISC. V případě rostlinných DNA virů hraje RNAi také obrannou roli, avšak role komplexu RISC a RITC není zcela objasněna, stejně jako vznik sRNA odvozených od DNA virů. Drosha – jaderná endonukleasa, Dicer – Dicer-like cytoplazmatické endonukleasy, AGO – proteiny z rodiny Argonaute, Me – methylace. Obrázek byl převzat z [37] a upraven.

Dalším mechanismem, který se uplatňuje v boji proti rostlinným virům je přítomnost rostlinných proteinů kódovaných dominantními geny rezistence (tzv. dominantní R geny). Proteiny kódované dominantními R geny mají povahu receptorů rozpoznávajících patogeny (PRR; pathogen recognition receptors) a rozeznávají kromě bakteriálních a houbových také virové molekulární motivy spojené s patogenitou (PAMP; pathogen-associated molecular patterns). Jedná se například o struktury kapsidových a pohybových proteinů nebo nukleových kyselin (viz. Tab 1, str. 21). Velká většina proteinů kódovaných dominantními R geny působících proti virovým patogenům obsahuje společně s proteinovou nukleotidovou vazebnou doménou (NB domain; nucleotide binding domain) také proteinovou doménu bohatou na leucin (LRR domain; leucine rich repeat domain) a označují se proto jako NB-LRR proteiny [39].

Výsledkem tohoto obranného mechanismu je v případě virových patogenů velmi často tzv. hypersenzitivní odpověď, která představuje nekrózu infikovaných buněk a tím zabránění dalšího šíření viru [40]. Společně s hypersenzitivní odpovědí dochází často také k tzv. systémově získané rezistenci, kdy se neinfikované buňky stávají pro virus, který hypersenzitivní odpověď spustil, nepermissivní [41]. Mimo hypersenzitivní odpovědi může v některých případech docházet také k tzv. extrémní rezistenci. V tomto případě dochází k eliminaci patogena bez viditelných symptomů (nekrózy buněk) [42]. Ne ve všech případech však dochází v důsledku aktivace NB-LRR proteinů k rezistenci, tedy ke znemožnění reprodukce a šíření viru v rostlině. V některých případech dochází k toleranci, která představuje vztah viru a rostliny, kdy se virus v rostlině reprodukuje a šíří, ale nedochází k symptomatickým projevům. Přesný molekulární mechanismus, kterým interakce virových proteinů nebo nukleových kyselin s NB-LRR proteiny navozuje stav rezistence, případně tolerance, není přesně znám, nicméně uplatňují se v něm rostlinné hormony jako jsou kyselina salicylová, jasmonová a ethylen a dále také reaktivní kyslíkové intermediáty [43].

Rezistence proti virovým patogenům není založena pouze na přítomnosti dominantních R genů, ale také na přítomnosti recesivních genů rezistence (tzv. recesivní R geny). Recesivní R geny nemají, jako je tomu u dominantních R genů, primární roli v obraně proti patogenu. Ve skutečnosti se jako recesivní R geny označují jakékoli rostlinné geny, při jejichž mutaci dojde k omezení nebo zastavení životního cyklu viru

(v důsledku zeslabení nebo neschopnosti interakce produktu recesivního R genu a viru). Tento typ rezistence není založen na žádné signální kaskádě a aktivní obranné reakci rostliny a označuje se proto jako pasivní rezistence. Doposud všechny známé recesivní R geny působící proti virovým patogenům představují geny, jejichž proteinovými produkty jsou translační iniciační faktory eIF4E/eIF(iso)4E nebo eIF4G/eIF(iso)4G [44]. Příklady recesivních R genů jsou uvedeny v Tab 1, str. 21. Jako recesivní se tyto R geny nazývají z důvodu, že je pro rostlinnou rezistenci nutné, aby k mutaci došlo v obou alelách patřičného genu (rostlina musí být z pohledu recesivního R genu homozygotní).

Dominantní i recesivní R geny jsou podstatou šlechtění jednotlivých kultivarů rostlin vedoucích ke vzniku požadovaných kultivarů tolerantních nebo rezistentních vůči virovým, bakteriálním nebo houbovým patogenům. Obecně se dá říci, že obranný mechanismus založený na R genech je oproti RNAi velmi rychlý, vysoce účinný a specifický, avšak přítomnost R genů se v rámci jednotlivých rostlinných druhů a odrůd velmi liší.

Tab. 1 Příklady dominantních (d) a recesivních (r) genů rezistence (R genů) [25]

R gen(d)	Host	Virus	Elicitor
N	Tabák <i>Nicotiana tabacum</i> cv. Samsun NN	TMV	Virová RdRP
Rx1	Brambor <i>Solanum tuberosum</i> cv. Cara	PVX	Kapsidový protein
Sw5	Rajče <i>Lycopersicon peruvianum</i> cv. Stevens	TSWV	M segment RNA
Tm-2 ²	Rajče <i>Lycopersicon peruvianum</i> cv. Sophya	ToMV	Pohybový protein
RCY1	Huseníček <i>Arabidopsis thaliana</i> ekotyp C24	CMV	Kapsidový protein
R gen(r)	Host	Virus	Hostitelský faktor
Pvr1	Paprika <i>Capsicum annuum</i> cv. Dempsey	PepMoV	eIF4E
Mo1	Salát <i>Lactuca sativa</i> cv. Salinas 88	LMV	eIF4E
Rymv1	Rýže <i>Oryza sativa</i> cv. Gigante	RYMV	eIF(iso)4G
Nsv	Meloun <i>Cucumis melo</i> cv. Gulfstream	MNSV	eIF4E

Elicitor – molekula viru aktivující obrannou reakci. TMV – virus tabákové mozaiky (tobacco mosaic virus), PVX – X virus bramboru (potato virus X), TSWV – virus bronzovitosti rajčete (tomato spotted wilt virus), ToMV – virus mozaiky rajčete (tomato mosaic virus), CMV – virus mozaiky okurky (cucumber mosaic virus), PepMoV – virus skvrnitosti papriky (pepper mottle virus), LMV – virus mozaiky salátu (lettuce mosaic virus), RYMV – virus žluté skvrnitosti rýže (rice yellow mottle virus), MNSV – virus nekrotické skvrnitosti melounu (melone necrotic spot virus), RdRP – RNA-dependentní RNA polymerasa, eIF(iso)4E/G – eukaryotický translační iniciační faktor (iso) 4E/G. Výsledek obranné reakce závisí na typu kmene/izolátu viru a na homozygotní/heterozygotní povaze rostliny pro daný R gen.

Rostlinný expresní systém

Expresní systém založený na rostlinných buňkách, ve formě buněčné kultury/suspense nebo celé rostliny, představuje zajímavou alternativu k současným expresním systémům. Mezi výhody tohoto eukaryotického systému patří nepřítomnost živočišných patogenů a toxinů, přítomnost post-translačních modifikací a především menší ekonomická zátěž související s kultivací rostlin a rostlinných buněčných suspenzí/kultur. Právě díky menší ekonomické náročnosti na provoz jsou rostlinné expresní systémy považovány za slibnou platformu pro produkci rekombinantních peptidů a proteinů (například léků a vakcín) s ekonomicky výhodnější prodejní cenou [5].

V současnosti je na trhu několik produktů, které vznikly s využitím rostlinných expresních systémů. Jedná se například o Optiferrin (Ventria Bioscience) – lidský transferin produkovaný v zrnech rýže [45], TrypZean (ProdiGene) – bovinní trypsin produkovaný v zrnech kukuřice [46] nebo o lék Eleyso (Pfizer) pro léčbu Gaucherovy choroby - β -glukocerebrosidasa produkovaná v suspensi buněk mrkve [47].

Zatímco výše zmiňované komerčně dostupné proteiny jsou produkovány v zrnech rýže, kukuřice či suspensi buněk mrkve, nejrozšířenějším modelovým organismem pro laboratorní expresi rekombinantních peptidů/proteinů v rostlinách zůstává tabák *Nicotiana benthamiana*, a pro expresi v rostlinné buněčné kultuře/suspensi jsou to buňky tabáku *Nicotiana tabacum* cv. BY-2.

Rostlinná glykosylace

Velmi často je pro správnou funkci daného proteinu, případně peptidu, nutná správná glykosylace, která ovlivňuje především interakční vlastnosti, stabilitu a imunogenitu proteinu. Rostlinná glykosylace se od savčí glykosylace liší především v přítomnosti/nepřítomnosti některých sacharidů a způsobem jejich vazby. Průběh rostlinné a savčí N-glykosylace v endoplazmatickém retikulu je totožný a po odebrání tří molekul glukosy vzniká základní 11 sacharidový skelet (Obr. 3, str. 24), který je dále

upravován v Golgiho aparátu. N-glykosylace probíhající v Golgiho aparátu je však již rozdílná a vede k jiným N-glykosylačním vzorům (Obr. 3, str. 24).

Rostlinná N-glykosylace je oproti savčí charakteristická především nepřítomností sialových kyselin, přítomností β 1,2-vázané xylosy na manose, přítomností α 1,3-vázané fukosy na N-acetylglukosaminu (oproti savčí α 1,6-vázané fukose), přítomností α 1,4-vázané fukosy na koncovém N-acetylglukosaminu a přítomností β 1,3-vázané galaktosy na koncovém N-acetylglukosaminu (oproti savčí β 1,4-vázané galaktose) [48].

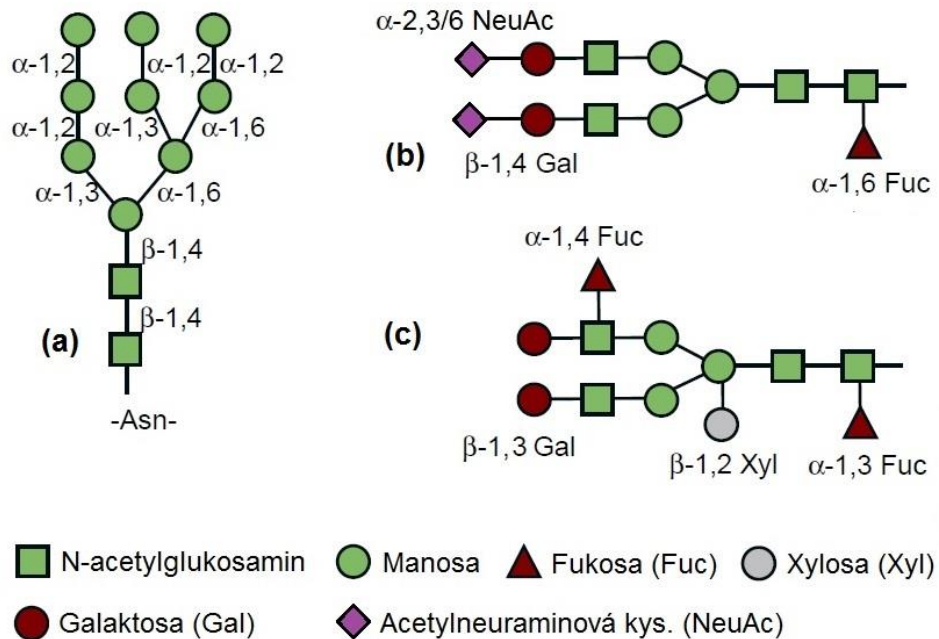
V případě produkce savčích proteinů může mít přítomnost rostlinných sacharidových struktur vliv například na imunogenitu, kdy může docházet k rychlé degradaci daného proteinu, případně k nežádoucí imunitní reakci [49]. Vhodnost rostlinného expresního systému z hlediska N-glykosylace je vždy nutné stanovit experimentálně.

Příklad představuje například lidská β -glukocerebrosidasa, která je využívána při enzymové substituční terapii Gaucherovy choroby. Gaucherova choroba je způsobena mutacemi v genu kódujícím β -glukocerebrosidasu vedoucími k nízké aktivitě enzymu nebo jeho nefunkčnosti, případně úplné nepřítomnosti. Vzhledem k faktu, že deficitem tohoto enzymu jsou nejvíce poškozeny buňky monocytů/makrofágů (dále pouze makrofágů), jsou zároveň hlavním cílem enzymové substituční terapie. Pro efektivní vstup β -glukocerebrosidasy do buněk makrofágů je nutná přítomnost koncových manosových zbytků. V případě produkce β -glukocerebrosidasy buňkami mrkve (lék Elelyso; Pfizer) je přítomnosti koncových manosových zbytků docíleno cílením β -glukocerebrosidasy do vakuol. Takto produkováný enzym v rostlinných buňkách obsahuje koncové manosové zbytky, ale také xylosu a α 1,3-vázanou fukosu na N-acetylglukosaminu [50]. V tomto případě však specifické rostlinné sacharidové struktury významně neovlivňují farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti preparátu.

Některé proteiny se však bez savčích vzorců glykosylace neobejdou, jako je tomu například v případě lidského erythropoetinu, který pro svoji správnou funkci vyžaduje přítomnost sialových kyselin. V nepřítomnosti sialových kyselin je erythropoetin rychle vychytáván jaterními buňkami a dochází k jeho degradaci. Poločas života desialyzovaného erythropoetinu je přibližně pět minut oproti pěti hodinám poločasu života sializovaného

erytropoteinu [51]. Rostlinný expresní systém, který neobsahuje sialové kyseliny, je proto v tomto případě pro produkci nevhodný.

V současné době již existují geneticky modifikované rostlinné expresní systémy, které svojí N-glykosylační dráhou připomínají savčí N-glykosylaci. Jedná se například o stabilně geneticky modifikovanou (viz. str. 25) *N. benthamiana* Δ XF postrádající aktivitu β 1,2-xylosyltransferasy a α 1,3-fukosyltransferasy na základě RNAi knock-down mechanismu [52]. Stabilně geneticky modifikované rostliny exprimující například β 1,4-galaktosyltransferasu nebo enzymy katalyzující tvorbu sialových kyselin doposud připraveny nebyly. Bylo však prokázáno, že těchto modifikací může být dosaženo při transientní expresi (viz. str. 27) β 1,4-galaktosyltransferasy nebo enzymů katalyzujících tvorbu sialových kyselin [53]. Transientní exprese daného proteinu společně s vhodnými glykosylačními enzymy tedy představuje cestu jak v rostlinách produkovat vhodně N-glykosylačně upravené proteiny.



Obr. 3 Schématické znázornění lidské a rostlinné N-glykosylace

(a) Společný prekurzor N-glykanů vznikající v endoplazmatickém retikulu, (b) Struktura savčího komplexního N-glykanu, (c) Struktura rostlinného komplexního N-glykanu.

Zatímco rostlinné a savčí N-glykosylační vzory jsou si relativně podobné, O-glykosylace je u rostlin zcela odlišná.

V případě glykoproteinů se savčí O-glykosylace uskutečňuje na hydroxylové skupině serinu nebo threoninu a sacharidová struktura začíná N-acetylgalaktosaminem (tzv. GalNAc O-glykosylace), a v případě proteoglykanů se O-glykosylace uskutečňuje na hydroxylové skupině serinu a sacharidová struktura začíná xylosou.

Rostlinná O-glykosylace se nejčastěji uskutečňuje na hydroxylové skupině hydroxyprolinu a sacharidové struktury jsou často založeny na arabinose [48]. Savčí O-glykosylační vzory tedy u rostlin chybí.

V současnosti probíhá výzkum za účelem pozměnit rostlinnou O-glykosylaci a připodobnit ji savčí O-glykosylaci (například inhibicí enzymu prolyl-4-hydroxylasy a expresí enzymů podílejících se na savčí O-glykosylaci) [54]. Stejně jako v případě N-glykosylace je nutné interferenci rostlinné O-glykosylace s funkcí daného proteinu experimentálně ověřit.

Stabilní rostlinná exprese

Stabilní rostlinná exprese je založena na integraci genu kódujícího příslušný protein do chloroplastového nebo jaderného genomu každé rostlinné buňky. Pro vpravení DNA do rostlinné buňky se nejčastěji využívá metoda biolistická nebo metoda využívající půdní gram-negativní bakterii *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) [55].

Principem biolistické metody, která je vhodná pro integraci genu do chloroplastového i jaderného rostlinného genomu, je adsorpce DNA nejčastěji na zlaté částice, kterými jsou poté pomocí genové pistole (z angl. Gene gun) bombardovány rostlinné buňky. Takto vpravený gen se v chloroplastu nebo rostlinném jádře může integrovat do genomu. V případě chloroplastu dochází k homologní rekombinaci a gen je vložen do specifické oblasti genomu, zatímco integrace do jaderného genomu probíhá neznámým mechanismem do náhodného místa [56, 57]. Předností chloroplastové exprese jsou její stabilita (nedochází k transkripční inaktivaci a RNAi) a poměrně vysoké výtěžky produkovaného proteinu. Na druhou stranu je tento systém nevhodný pro

produkci proteinů vyžadujících post-translační modifikace [57]. V případě jaderné exprese často nedochází k tak velkým výtěžkům jako u chloroplastové exprese, ale mohou být produkovány proteiny vyžadující post-translační modifikace. Po úspěšné integraci genu do genomu chloroplastu nebo jádra je využito skutečnosti, že rostlinné buňky jsou totipotentní – pouze jedna buňka s integrovaným genem může dát vzniknout celé rostlině [58].

Stabilní exprese s využitím *A. tumefaciens* lze využít pouze pro jadernou expresi a tato metoda je založena na schopnosti bakterie vnášet do jádra rostlinné buňky specifickou oblast svého genomu, která může být náhodně integrována do jaderného genomu [59]. Výhodou této metody oproti metodě biolistické je menší pravděpodobnost tvorby tandemových genových inzertů a tedy menší pravděpodobnost transkripční inaktivace [58].

Agrobacterium tumefaciens

A. tumefaciens je půdní gram-negativní bakterie, která v přírodě napadá dvouděložné rostliny. Při infekci touto bakterií dochází často ke vzniku nádorů v rostlinných pletivech (tzv. crown gall disease). Vznik nádorů je způsoben bakteriální DNA (tzv. transferovou DNA neboli T-DNA), která obsahuje geny kódující rostlinné růstové hormony (auxiny a cytokininy) způsobující tvorbu nádorů a opinsynthasy tvořící opiny (kondenzační produkty aminokyselin a α -oxokyselin nebo sacharidů), které bakterii slouží jako zdroj uhlíku a dusíku. Běžně je T-DNA součástí bakteriálního Ti plazmidu, ze kterého je vyštěpena v přítomnosti rostlinných fenolických sloučenin indikujících poškození rostlinné buněčné stěny (například acetosyringon). Po vyštěpení je jedno vlákno T-DNA (tzv. T-vlákno) transportováno do jádra rostlinné buňky. K vyštěpení a transportu T-vlákna jsou nutné především tzv. *vir* geny, které jsou kódovány bakteriálním Ti plazmidem. Štěpení T-DNA probíhá v tzv. hraničních oblastech (25 bp sekvence ohraničující T-DNA) pomocí endonukleasy VirD2. Po vyštěpení a uvolnění T-vlákna (pomocí helikasy VirD1) zůstává endonukleasa VirD2 kovalentně navázána na 5' konci T-vlákna, které je

transportováno do cytoplazmy rostlinné buňky pomocí bakteriálního sekrečního systému typu IV. V cytoplazmě je T-vláknem obaleno proteinem VirE2 za vzniku T-komplexu. Prostřednictvím nukleárních lokalizačních signálů proteinů VirD2 a VirE2 je T-komplex transportován do jádra rostlinné buňky, kde dochází k extrachromozomální expresi a často také k náhodné integraci T-DNA do genomu. Přesný mechanismus integrace není znám [60].

Pro rostlinnou expresi se využívají laboratorně upravené kmeny *A. tumefaciens*. Tyto kmeny postrádají v Ti plazmidu oblast T-DNA, která je jim dodávána v podobě tzv. binárního vektoru. Binární vektor představuje plazmid, jehož klonovací místo je ohraničeno hraničními sekvencemi. DNA sekvence „transkripční promotor - gen kódující požadovaný protein – transkripční terminátor“ je tedy umístěna do oblasti ohraničené hraničními sekvencemi a představuje tak T-DNA. Jako transkripční promotor se nejčastěji používá konstitutivní promotor odvozený od CaMV (tzv. 35S promotor) a jako transkripční terminátor nejčastěji oktopinový, případně nopalínový transkripční terminátor odvozený od genu oktopinsynthasy, respektive nopalínsynthasy. Název binární vektor je odvozen od faktu, že plazmid obsahuje počátek replikace jak pro *A. tumefaciens* tak pro *Escherichia coli* [61].

Transientní rostlinná exprese

Selekce buněk s integrovaným genem a regenerace rostliny poskytující stabilní expresi je mnohdy zdoluhavý proces v důsledku screeningu a ověřování stabilní exprese daného proteinu v následujících generacích. Transientní exprese je oproti stabilní expresi mnohem rychlejší (v řádech dní oproti měsícům), méně náročná a velmi často poskytuje větší množství produkovaného proteinu [62]. Při transientní expresi se využívá *A. tumefaciens* a principem je vpravení genu kódujícího příslušný protein do jádra pouze některých rostlinných buněk (pouze buněk listů), kde dochází k přechodné extrachromozomální expresi – exprese z integrované DNA zde hraje malou roli (pravděpodobnost integrace DNA je velmi malá – asi 5%). Transientní exprese využívající

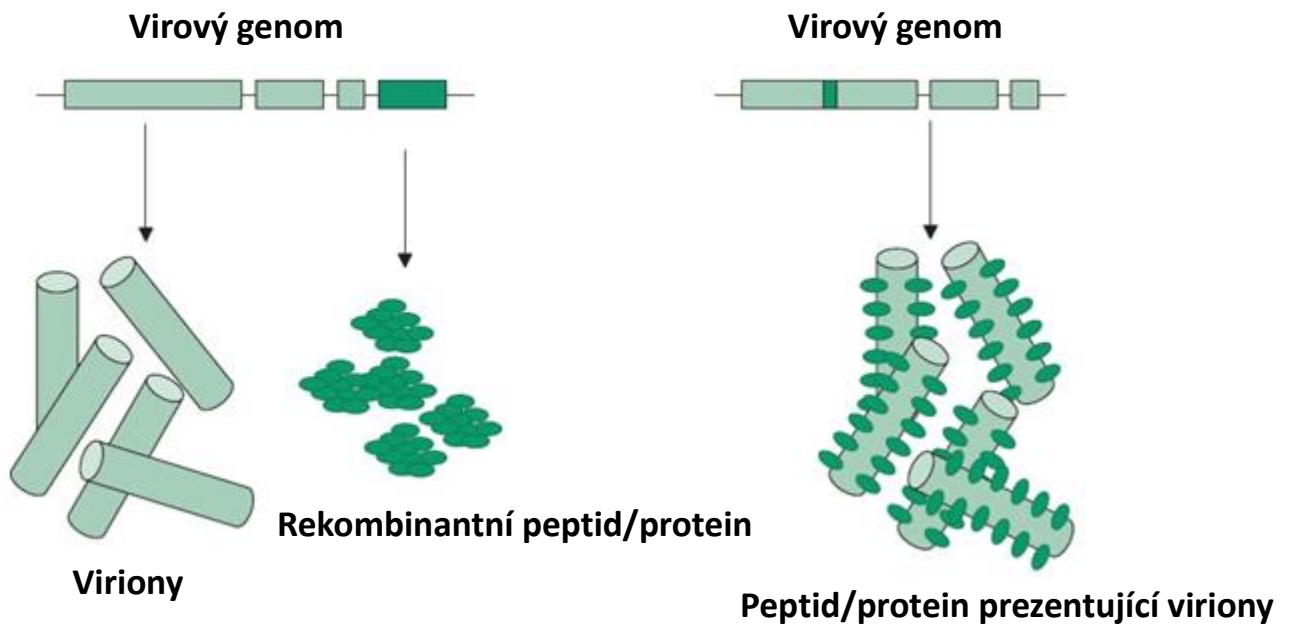
A. tumefaciens se označuje jako agroinfiltrace a v praxi jde o vpravení (injekčně nebo vakuově) bakteriální suspenze *A. tumefaciens* nesoucí binární vektor do mezibuněčných prostor listů (Obr. 4). Produkované proteiny je možné detekovat již několik dní (2-4) po agroinfiltraci a nejčastěji se při této metodě využívají rostlinné virové vektory [62].



Obr. 4 Metoda agroinfiltrace – transientní exprese zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) v rostlině *N. benthamiana* pomocí injekčního vpravení. Převzato z [63]

Transientní exprese pomocí rostlinných virových vektorů

Rostlinné viry představují vhodné kandidáty pro expresi rekombinantních peptidů/proteinů v rostlinách především díky své schopnosti reprodukovat se v rostlině do vysokých titerů a také díky schopnosti se v rostlině šířit. Exprese rekombinantních peptidů/proteinů pomocí rostlinných virů se nejčastěji provádí dvěma způsoby. Jedním ze způsobů je umístění čtecího rámce pro rekombinantní peptid/protein pod virový promotor a tvorba volného peptidu/proteinu, zatímco druhý způsob je založen na fúzi rekombinantního peptidu/proteinu s kapsidovým proteinem viru (Obr. 5, str. 29). Cílem fúze je připravit modifikovaný virus, který na svém povrchu nese rekombinantní peptid/protein, tzv. peptid/protein prezentující systém (například za účelem přípravy vakcín – tzv. antigen prezentující systém) [64].



Obr. 5 Znárodnění produkce rekombinantních peptidů/proteinů pomocí rostlinných virů
 Čtecí rámec pro peptid/protein (tmavě zeleně) může být do virového genomu vložen separátně nebo být součástí čtecího rámce virového kapsidového proteinu. V prvním případě vzniká v buňce rekombinantní peptid/protein, který není součástí virových částic, zatímco v druhém případě vznikají virové částice prezentující peptid/protein na svém povrchu (peptid/protein prezentující viriony). Obrázek převzat z [64] a upraven.

Vzhledem ke skutečnosti, že rostlinné virové genomy nejsou příliš velké – velikost nejčastěji využívaných virů TMV a PVX se pohybuje v rozmezí 6 až 7 kb – lze prostřednictvím molekulárně biologických technik připravit DNA odpovídající genomu viru, která je společně s rostlinným transkripčním promotorem a terminátorem ohraničena T-DNA hraničními sekvencemi a celý tento konstrukt je vložen do binárního vektoru. Takto připravený binární vektor se označuje jako rostlinný virový vektor, případně vektor odvozený od rostlinného viru. Následně se využívá metody agroinfiltrace,

při které se kombinuje rychlost a jednoduchost transientní exprese společně se schopností virů reprodukovat se do vysokých titrů [65].

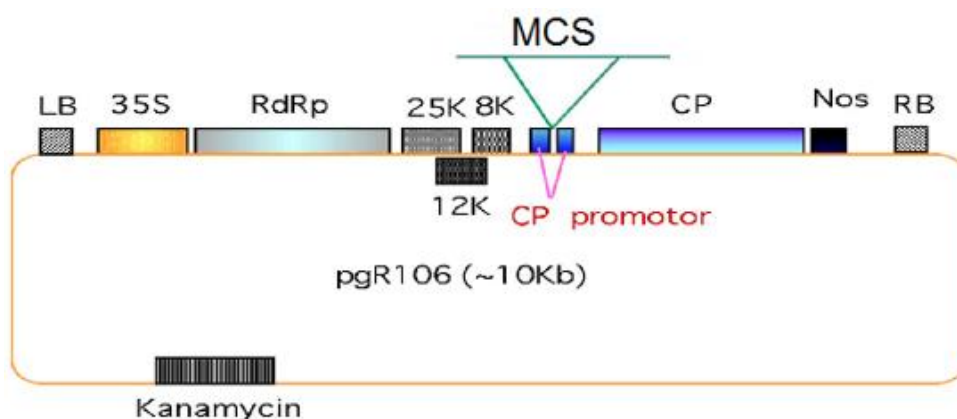
Pro rostlinou virovou expresi se nejčastěji využívají genomy odvozené od (+)ssRNA virů (například TMV, PVX nebo CMV), případně od geminivirů obsahujících cirkulární ssDNA (například virus žluté zakrslosti fazole; BeYDV; bean yellow dwarf virus) [66]. V případě geminivirů je nutné agroinfiltrací vpravit do buňky i expresní kazetu pro Rep protein, který zajišťuje vyštěpení virového ssDNA genomu z T-DNA, jeho následnou cirkularizaci a replikaci poskytující několik stovek episomů na buňku [67]. Virové vektory odvozené od geminivirů jsou záležitostí posledních několika let a na jejich vývoji a optimalizaci se stále pracuje. V současnosti se mnohem častěji používají virové vektory odvozené od (+)ssRNA virů, především pak od TMV a PVX.

Po vpravení T-DNA reprezentující genom (+)ssRNA viru do jádra buňky dochází k transkripci a vzniklý transkript, který je transportován do cytoplazmy, reprezentuje infekční virový genom. Vzhledem k faktu, že rostlinné (+)ssRNA viry se běžně do jádra nedostávají (jejich životní cyklus se odehrává v cytoplazmě) je často nutné virový genom optimalizovat například odstraněním kryptických míst pro splicing z důvodu bezproblémového transportu infekčního transkriptu do cytoplazmy [65].

Rostlinné virové vektory se podle své konstrukce rozdělují na první generaci a druhou generaci [68]. První generace rostlinných virových vektorů je založena na vložení čtecího rámce kódujícího požadovaný peptid/protein do virového genomu. Virový genom je tak rozšířen o nový čtecí rámeček, který může být umístěn pod samostatný virový promotor (nejčastěji promotor kapsidového proteinu) nebo může být ve fúzi s jiným virovým čtecím rámcem (nejčastěji ve fúzi s čtecím rámcem kapsidového proteinu). Příkladem takového vektoru je například pGR106 odvozený od PVX zobrazený na Obr. 6, str. 31 [69]. Druhá generace rostlinných virových vektorů, tzv. dekonstruované virové vektory, je mimo vložení čtecího rámce pro požadovaný peptid/protein založena na odstranění části virového genomu, která není nezbytná pro reprodukci viru. Například může jít o odstranění čtecího rámce kódujícího protein nutný pro přenos viru vektorem nebo odstranění čtecího rámce pro kapsidový protein v případě, že jej virus nepotřebuje pro šíření z buňky do buňky. K odstranění části virového genomu dochází nejčastěji za účelem zvýšení bezpečnosti expresního systému (vzniklé virové částice se nedokáží

přenášet svým vektorem, případně virové částice vůbec nevznikají) nebo z důvodu zvýšení exprese rekombinantního peptidu/proteinu (vektor se stává stabilnější). Příkladem může být například vektor pJL-TRBO odvozený od TMV, který ve svém genomu postrádá čtecí rámec pro kapsidový protein. Takto dekonstruovaný TMV vektor produkuje oproti první generaci větší množství rekombinantního peptidu/proteinu a zvyšuje bezpečnost expresního systému díky neschopnosti tvořit virové částice (šíří se pouze z buňky do buňky, nevznikají virové částice) [70].

Vzhledem k faktu, že viry TMV a PVX mohou koinfikovat rostlinnou buňku aniž by mezi sebou navzájem soutěžily, mohou být virové vektory odvozené od těchto virů využívány pro simultánní expresi dvou rekombinantních peptidů/proteinů (například pro produkci lehkého a těžkého řetězce protilátky). Příkladem může být systém magnICON vyvinutý německou společností Icon Genetics, který je založen na využití dekonstruovaných vektorů TMV a PVX. V obou případech dochází k odstranění kapsidových proteinů, následkem čehož dochází k větší stabilitě obou vektorů a k produkci větších množství rekombinantních peptidů/proteinů oproti systému založeném na první generaci vektorů PVX a TMV. Dále je zvýšena bezpečnost celého systému v důsledku toho, že nedochází k tvorbě virových částic [71, 72].



Obr. 6 Schématické znázornění rostlinného virového vektoru pGR106 odvozeného od PVX LB a RB - T-DNA hraniční sekvence, 35S – transkripční promotor odvozený od CaMV, RdRp – virová RNA polymerasa, 25K, 12K a 8K – trojice virových pohybových proteinů,

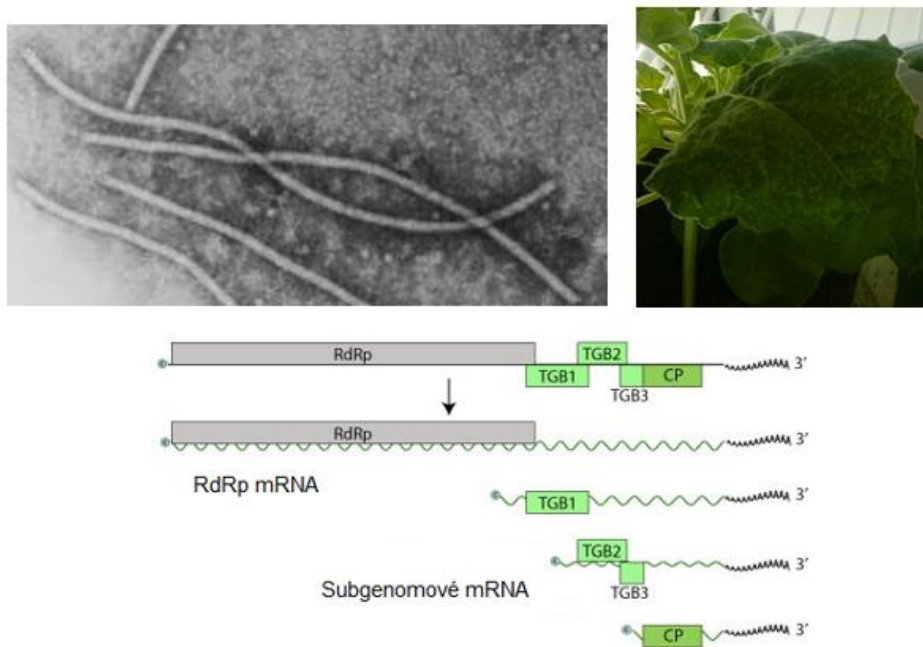
CP – kapsidový protein PVX, Nos – nopalinový transkripční terminátor (terminátor nopalinsynthasy), MCS – klonovací místo, CP promotor – promotor kapsidového proteinu PVX, Kanamycin – čtecí rámec pro neomycinfosfotransferasu II (zprostředkovává rezistenci na kanamycin). Převzato z [73] a upraveno.

X virus bramboru (PVX)

PVX je zástupcem rodu *Potexvirus* patřící do čeledi *Alphaflexiviridae*. Jde o vláknitý virus o průměrné délce 515 nm, průměru 13 nm a molekulové hmotnosti přibližně 3,5 MDa. Genetická informace představuje přibližně 6 % hmotnosti virionu a je tvořena (+)ssRNA o velikosti přibližně 6,5 kb. Obsahuje 5' čepičku a na 3' konci poly-A sekvenci (přibližně 20 A). Nepřekládaná oblast na 5' konci virové RNA (5' UTR; untranslated region) je dlouhá 84 nukleotidů, obsahuje enkapsidační signál, reguluje syntézu subgenomových RNA a její součástí je translační zesilovač (enhancer). 3' UTR virové RNA je dlouhá 76 nukleotidů a podílí se na regulaci replikace. Genom PVX kóduje pět proteinů: virovou RNA-dependentní RNA polymerasu (165 kDa), tři pohybové proteiny TGBp1, 2 a 3 (25, 12 a 8 kDa) a kapsidový protein PVX CP (25 kDa; 27-28 kDa v případě glykosylace). Virová polymerasa zajišťuje replikaci virového genomu, tvorbu 5' čepičky a tvorbu subgenomových mRNA, ze kterých jsou translatovány pohybové proteiny a PVX CP (Obr. 7, str. 34) [74]. TGBp1 je solubilní protein sloužící jako antagonist RNAi a má schopnost zvětšovat propustnost plazmodezmat. Obsahuje NTPasovou/RNA helikasovou proteinovou doménu, která má schopnost vázat RNA. Pohybové proteiny TGBp2 a TGBp3 jsou transmembránové proteiny asociované s membránou ER. TGBp1 je translatován z monocistronní subgenomové RNA, zatímco TGBp2 a TGBp3 jsou translatovány z bicistronní subgenomové RNA (Obr. 7, str. 34) [75]. PVX CP tvoří kapsidu viru (přibližně 1300 molekul PVX CP na virion) a je regulován fosforylací buněčnými Ser/Thr kinasami (například proteinkinasou C nebo kaseinkinasami 1 a 2). Při fosforylaci N-koncové oblasti PVX CP, která je bohatá na aminokyseliny Ser a Thr dochází k destabilizaci interakcí mezi PVX CP, což vede k postupnému rozvolnění kapsidy a obnažení virové RNA, která se tak stává translačně dostupnou [76]. Podobně vede k rozvolnění kapsidy i tvorba virionu s navázanými TGBp1 na monomery PVX CP v blízkosti 5' konce virové RNA (tzv. single-tailed particle) [77]. PVX CP je dále společně s pohybovými proteiny esenciální pro mezibuněčný a systémový transport PVX. Mezibuněčný transport PVX může zřejmě probíhat jak ve formě virionu, tak i ve formě ribonukleoproteinu (komplex virové RNA,

PVX CP a pohybových proteinů), zatímco systémový transport probíhá pouze ve formě virionu [78-80].

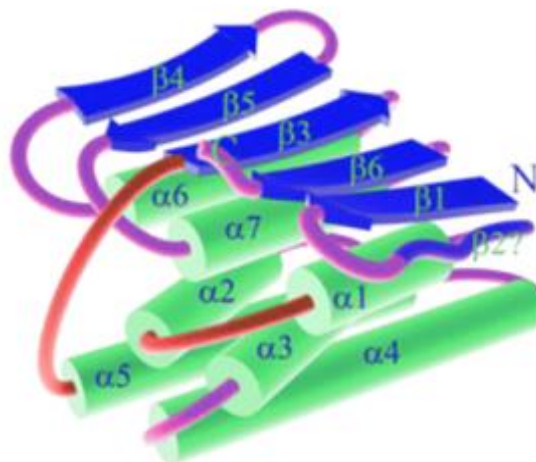
PVX není v přírodě přenášen vektory ani semeny, ale pouze mechanicky. Po jeho ulpění na dřevěný povrch nebo šaty zůstává infekční až 6 h. Virus může být v rostlinném extraktu inaktivován teplotou vyšší než 70 °C působící po dobu alespoň 10 min nebo použitím denaturačních činidel. Hostitelem jsou převážně rostliny z čeledi Lilkovitých (*Solanaceae*) - například Lilek bramboru (*Solanum tuberosum*) a Tabák selský (*Nicotiana rustica*). Symptomy jsou závislé na typu virového izolátu a odrůdě daného hostitele. Některé odrůdy bramboru obsahují dominantní R geny Nb, Nx, Rx1 nebo Rx2, jejichž proteinové produkty rozeznávají PVX CP a stimulují u těchto odrůd hypersenzitivní odpověď (Nb a Nx) nebo extrémní rezistenci (Rx1 a Rx2) [81, 82]. V případě rostlin postrádajících geny rezistence proti PVX se symptomy většinou projevují přítomností mozaiky na listech, jako je tomu v případě *N. benthamiana* na Obr. 7. Infekce PVX na bramborách, jako ekonomicky nejdůležitější komoditě ze všech hostitelů, se řadí mezi lehké virové choroby a obecně výnosové ztráty hlíz nepřekračují 20 % [1].



Obr. 7 Elektronmikroskopický snímek PVX, mozaika na listech *N. benthamiana* způsobená infekcí PVX, organizace genomu a expresní strategie PVX

RdRp – virová RNA-dependentní RNA polymerasa, TGB1, 2 a 3 – pohybové proteiny, CP – kapsidový protein. Z genomu PVX je nejprve translatována RdRp. Následně dochází k replikaci (není vyznačena) a tvorbě subgenomových mRNA. TGB3 vzniká zřejmě pročtením čtecího rámce pro TGB2. Obrázek převzat z [17], [83] a upraven.

PVX je často využíván pro prezentaci peptidů/proteinů na povrchu virionů i přes skutečnost, že trojrozměrná struktura PVX CP ve virionu či v roztoku není známa. Experimentálně bylo potvrzeno, že je možné fúzovat některé peptidy/proteiny s N- nebo C-koncem PVX CP, aniž by došlo k interferenci se skládáním virionů [84-86]. Tato strategie však není univerzální a je proto vhodné mít k dispozici i jiná místa, která mohou tolerovat přítomnost rekombinantních peptidů/proteinů. Nejnověji navržený strukturní model PVX CP ve virionu může být využit jako předloha pro hledání nových pozic pro vkládání rekombinantních peptidů/proteinů (Obr. 8) [87].



Obr. 8 Model zobrazující strukturní organizaci PVX CP ve virionu PVX

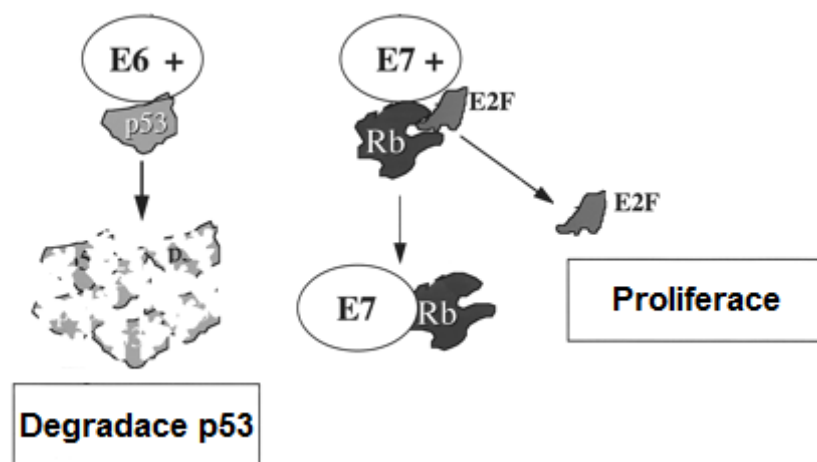
α = sekundární struktura α-helix, β = sekundární struktura β-skládaný list. Převzato z [87] a upraveno.

Lidské papilomaviry (HPV)

Papilomaviry jsou živočišné viry patřící do čeledi *Papillomaviridae*, které infikují širokou škálu hostitelů – například ptactvo, hlodavce, dobytek a člověka. Do skupiny lidských papilomavirů (HPV, z ang. human papillomavirus) patří přes 130 typů HPV [88]. Životní cyklus HPV probíhá v keratinocytech (buňkách, které jsou součástí pokožky a sliznic) a hlavní receptory pro vstup viru do bazálních buněk (z nichž se keratinocyty tvoří) představují integrinový komplex $\alpha 6\beta 4$ společně s proteoglykany obsahující heparansulfát [89]. Viriony jsou sférické, nebalené a jejich průměr činí přibližně 55 nm. Genom HPV je tvořen cirkulární dsDNA o velikosti přibližně 8 kb a kóduje nestrukturní proteiny E1, E2, E4, E5, E6 a E7 a dva strukturní proteiny L1 a L2. Virová transkripce probíhá pouze z jednoho vlákna a nejprve dochází k produkci nestrukturních proteinů. Proteiny E1 a E2 se společně podílejí na replikaci virového genomu. Protein E2 slouží jako transkripční regulátor, rozeznává replikační počátek virové DNA a interaguje s proteinem E1, který má helikasovou aktivitu a dále do místa replikačního počátku přitahuje buněčné replikační proteiny (například DNA polymerasu a SSB proteiny) [88]. Protein E4 se podílí na uvolňování virionů z buněk a protein E5 způsobuje snižování počtu MHC glykoproteinů třídy I na povrchu infikovaných buněk a podílí se tak na mechanismu úniku infikovaných buněk imunitnímu systému [88, 90]. Proteiny E6 a E7 představují onkoproteiny HPV. Onkogenní charakter proteinu E6 spočívá v jeho vazbě na buněčný protein p53, která vede k následné degradaci proteinu p53 proteasomem (Obr. 9, str. 37). Protein p53 patří mezi buněčné tumor-supresorové proteiny a podílí se na zastavení buněčného cyklu v jeho různých fázích (například aktivuje transkripci inhibitorů cyklin-dependentních kinas), případně hraje roli ve stimulaci apoptózy (aktivuje transkripci proapoptických proteinů). Onkoprotein E7 interaguje s buněčným proteinem pRb a přerušuje tak jeho interakci s transkripčními faktory E2F (Obr. 9, str. 37). Protein pRb je tumor-supresorový protein jehož funkce spočívá v regulaci transkripce vedoucí k produkci proteinů, které zajišťují přechod z G1 fáze buněčného cyklu do jeho S fáze (například regulace transkripce G1/S cyklinů). Protein pRb je v buňce běžně regulován fosforylací. V hypofosforylovaném stavu má schopnost vázat transkripční faktory E2F a zabraňuje tak přechodu buňky z G1

fáze buněčného cyklu do jeho S fáze. Pokud však dojde k fosforylaci pRb (například po stimulaci buňky mitogeny), dochází k jeho disociaci od transkripčních faktorů E2F a k přechodu buňky z G1 fáze buněčného cyklu do S fáze [91].

Strukturní proteiny L1 a L2 tvoří kapsidu viru. Protein L1 představuje hlavní kapsidový protein, zatímco L2 minoritní kapsidový protein (v kapsidě je ho přibližně desetkrát méně). Oba proteiny se podílí na vstupu viru do buňky a enkapsidaci virové DNA [88].



Obr. 9 Mechanismus působení virových onkoproteinů E6 a E7 v infikované buňce
Onkoprotein E6 váže buněčný tumor-supresorový protein p53 a cílí ho k degradaci. Protein p53 v buňce reguluje zastavení buněčného cyklu a aktivaci apoptózy.
Onkoprotein E7 váže buněčný protein pRb (na obrázku jako Rb), který běžně inhibuje transkripční aktivátory E2F aktivující transkripci proteinů nutných pro přechod buňky z G1 fáze do S fáze buněčného cyklu. Převzato z [92] a upraveno.

Projevy infekce HPV

Vzhledem k faktu, že papilomaviry ve svém genomu kódují onkoproteiny, které mají schopnost aktivovat S fázi buněčného cyklu, mají tyto viry schopnost podílet se na nádorovém bujení, jehož projevem jsou často jak benigní, tak i maligní nádory. HPV se podle tkáňové specifity rozděluje na kožní a slizniční. Kožní HPV infikují bazální buňky/keratinocyty kůže, jsou přenosné dotykem a nejčastěji způsobují benigní nádory ve formě kožních bradavic. Slizniční HPV infikují bazální buňky/keratinocyty sliznic, jsou sexuálně přenosné a vzhledem k faktu, že nejvíce postihují oblast genitálií, jsou často označovány jako genitální. Genitální HPV je nejčastější sexuálně přenosnou infekcí a během svého života prodělá tuto infekci až 80 % všech lidí. Ve velké většině případů je infekce HPV eliminována imunitním systémem, avšak přibližně ve 20 % případů virus imunitnímu systému uniká, v důsledku čehož dochází k symptomatickým projevům.

Genitální HPV mohou způsobovat benigní i maligní nádory a z tohoto hlediska se rozděluje na nízké a vysoce rizikové. Mezi nízké rizikové papilomaviry patří například typy 6 a 11 (HPV 6 a 11), které mají schopnost způsobovat především benigní nádory jako jsou genitální bradavice (tzv. kondylomata), případně papilomatóza hrtanu. Mezi vysoce rizikové HPV se řadí ty, které jsou ve vysoké míře spojeny se vznikem maligních nádorů. Patří sem například rakovina konečníku, rakovina penisu a rakovina děložního čípku, která sama o sobě představuje největší riziko co do počtu nakažení i úmrtí [88, 93, 94].

Rakovina (karcinom) děložního čípku je čtvrté nejčastější rakovinné onemocnění u žen a ve více než v 99 % případů je spojeno právě s infekcí HPV, především pak s typy 16 a 18 (asi 70 % všech případů) [88]. Celosvětově je každý rok diagnostikováno přibližně 500 000 nových případů rakoviny děložního čípku a na toto onemocnění ročně umírá asi 270 000 pacientů. Nejhuře jsou postiženy především rozvojové země z důvodu nedostačujícího či zcela chybějícího screeningového programu, který je založen na vyšetření cytologického stěru z děložního čípku. Na základě pravidelného screeningu lze včas odhalit prekancerózní léze, které lze následně ambulantně odstranit. Další obranu proti rakovině děložního čípku, ale také proti kondylomatům a rakovině konečníku, představují komerčně dostupné vakcíny proti infekci HPV [95].

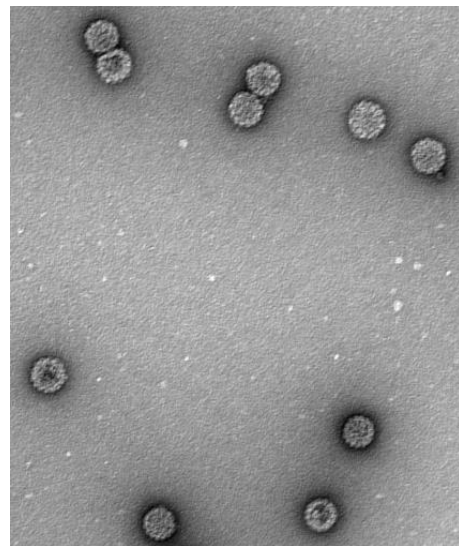
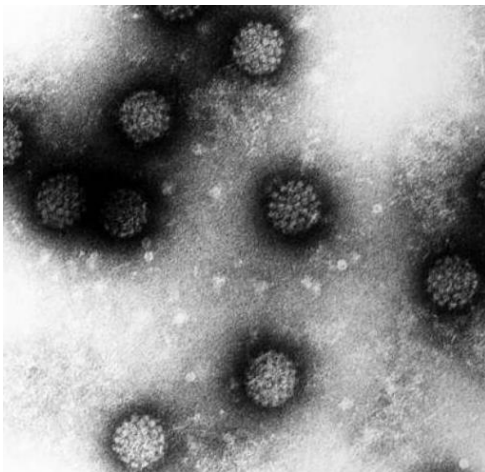
Vakcíny proti HPV

Doposud byly vyvinuty tři komerčně dostupné rekombinantní podjednotkové vakcíny proti HPV – Cervarix (GlaxoSmithKline), Gardasil/Silgard (Merck & Co.) a Gardasil 9 (Merck & Co.). Cervarix představuje bivalentní vakcínu poskytující ochranu proti HPV 16 a 18, Gardasil (v ČR znám jako Silgard) je tetravalentní vakcína poskytující ochranu proti HPV 6, 11, 16 a 18 a Gardasil 9 poskytuje ochranu proti HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 a 58. Všechny vakcíny tedy poskytují ochranu proti HPV typům nejčastěji způsobujících rakovinu děložního čípku (HPV 16 a 18), vakcína Gardasil navíc poskytuje ochranu proti HPV typům nejčastěji způsobujících kondylomata (HPV 6 a 11) a vakcína Gardasil 9 (oproti vakcíně Gardasil) poskytuje navíc ochranu proti dalším HPV typům způsobujících rakovinu děložního čípku a rakovinu konečníku (HPV 31, 33, 45, 52 a 58). Vakcíny mají preventivní účinek a jsou založeny na stimulaci protilátek proti kapsidovým proteinům L1, které při setkání s daným typem HPV zabraňují jeho vstupu do buňky a zajišťují jeho eliminaci imunitním systémem. Proteiny L1 jsou v případě vakcíny Cervarix produkovány hmyzími buňkami odvozených od *Trichoplusia ni*, zatímco v případě vakcín Gardasil a Gardasil 9 je expresní systém založen na kvasince *Saccharomyces cerevisiae*. Aktivní složkou všech vakcín jsou viru podobné částice (VLP), které L1 proteiny v obou expresních systémech tvoří (Obr. 10, str. 40) [96-98]. Vakcíny se aplikují injekčně ve třech dávkách a to nejlépe před začátkem pohlavního života.

V současné době je snaha vyvinout profylaktické vakcíny, které by chránily i před dalšími typy HPV. Tyto vakcíny se často v literatuře označují jako vakcíny druhé generace a mimo přístupu, který je totožný se současnými vakcínami - produkce L1 VLP, je dalším přístupem využití L2 proteinu, který na svém N-konci obsahuje konzervované epitopy stimulující protilátky schopné blokovat infekci širšího spektra typů HPV [99].

V případě již probíhající infekce jsou profylaktické vakcíny neúčinné a v těchto případech by v budoucnu měly pomáhat (léčit) terapeutické vakcíny. Cílem terapeutických vakcín by měla být především stimulace Th1 CD4+ T lymfocytů a CD8+ T lymfocytů, které jsou schopné eliminovat již infikované buňky.

Onkoproteiny E6 a E7, které jsou konstitučně exprimovány v prekancerózních lezích i samotných karcinomech jsou považovány za vhodné kandidáty pro přípravu terapeutických vakcín. Při výzkumu terapeutických vakcín je onkoprotein E7 používán častěji nežli onkoprotein E6 z důvodu, že je v prekancerózních lezích a karcinomech exprimován ve větším množství a je sekvenčně více konzervován. Onkoprotein E7 (přibližně 11 kDa) je sám o sobě velmi málo imunogenní a proto se při přípravě vakcín často fúzuje s imunogenními proteiny [100]. Vzhledem k tumorigennímu potenciálu onkoproteinu E7 jsou často při práci používány mutované verze tohoto onkoproteinu – neschopné nebo mající menší schopnost interagovat s proteinem pRb. Příkladem mutovaného E7 onkoproteinu je například E7GGG, který byl připraven záměnou tří aminokyselin (aspartátu, cysteinu a glutamátu) za aminokyselinu glycin (D21G, C24G a E26G). Tyto tři aminokyseliny se nacházejí v místě podílejícím se na interakci s pRb a po jejich záměně za glycin dochází k oslabení této interakce [101]. I přes pokračující výzkum a vývoj není doposud žádná terapeutická vakcína proti HPV na trhu.



Obr. 10 Elektronmikroskopické snímky HPV 16 (vlevo) a VLP (vpravo) odvozených od L1 proteinu HPV 16 (produkovaných v hmyzích buňkách Sf6). Převzato z [102, 103] a upraveno.

Dosavadní výzkum přípravy vakcín proti HPV v rostlinách

Rostliny jsou využívány za účelem přípravy jak profylatických, tak terapeutických vakcín proti HPV. Bylo prokázáno, že protein L1 má v rostlině schopnost tvořit VLP, které jsou svojí velikostí totožné s VLP produkovanými v bakulovirovém expresním systému (vakcína Cervarix) a dále bylo také prokázáno, že rostlinné L1 VLP mají schopnost u myší stimulovat protilátkovou odpověď [104-108].

Prvotní snahy o expresi proteinu L1 dosahovaly malých výtěžků než by bylo třeba pro efektivní výrobu vakcíny. Příklad může být stabilní exprese L1 HPV 16 v tabáku *N. tabacum* cv. Xanthi ve výtěžku 4 µg/kg čerstvých listů nebo transientní exprese pomocí virového vektoru odvozeného od TMV v listech tabáku *N. benthamiana* s výtěžkem 40 µg/kg čerstvých listů [106, 108]. Poměrně překvapivě byly optimalizací kodonů pro expresi v lidských buňkách výtěžky L1 HPV 16 (L1h) značně zvýšeny. Příkladem může být transientní exprese L1h pomocí virového vektoru odvozeného od TRV (tobacco rattle virus) v listech rajčete *Solanum lycopersicum* L. dosahující výtěžku 45 mg/kg čerstvých listů [107]. Doposud nejvyšší produkce L1h však bylo dosaženo stabilní expresí v chloroplastech s výtěžkem 3 g/kg čerstvých listů [109]. Ve fúzi s L1h byly produkovány i epitopy odvozené od L2 HPV 16. Příkladem může být transientní exprese pomocí nevirálního nereplikativního vektoru pTRAc. VLP byly produkovány ve výtěžku až 1,2 g/kg čerstvých listů a po naočkování myším měly schopnost stimulovat protilátky jak proti L1, tak proti L2 HPV 16 [110].

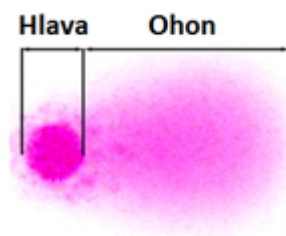
Za účelem přípravy terapeutické vakcíny proti HPV byl v rostlinách exprimován i virový onkoprotein E7. Nejvyššího množství onkoproteinu E7 HPV 16 bylo dosaženo jeho transientní expresí pomocí virového vektoru odvozeného od PVX v listech *N. benthamiana* a to ve výtěžku až 4 mg/kg čerstvých listů. Navíc takto produkováný onkoprotein E7 stimuloval u myší očkovaných hrubým rostlinným extraktem z listů buněčnou adaptivní imunitu a očkované myši byly také chráněny před vznikem nádorů po naočkování nádorovými buňkami [111, 112]. Onkoprotein E7 byl dále v rostlinách exprimován jako fúzní protein, především za účelem zvýšení jeho imunogenity. Příkladem může být fúze E7 a E7GGG HPV 16 s β -1,3-1,4-glukanasou (LicKM) bakterie *Clostridium thermocellum*. Oba konstrukty byly transientně exprimovány pomocí virového vektoru

odvozeného od TMV v listech *N. benthamiana* ve výtěžku přibližně 400 mg/kg čerstvých listů. Po jejich purifikaci a naočkování myším došlo ke stimulaci jak humorální tak buněčné adaptivní imunity a myši byly navíc chráněny před tvorbou nádorů po naočkování nádorovými buňkami [113, 114]. Příkladem snahy o přípravu kombinované vakcíny proti HPV představuje například stabilní jaderná exprese L1 HPV 16 ve fúzi s třemi epitopy E7 onkoproteinu a jedním epitopem E6 onkoproteinu v rajčeti *Solanum lycopersicum* L. Rostliny byly schopné produkovat VLP, které měly schopnost u myší stimulovat humorální i buněčnou adaptivní imunitu, avšak množství produkovaných VLP bylo velmi nízké (0,05 – 0,1 % celkové rozpustné bílkoviny) [115].

Kometová analýza

Tato metoda (z angl. comet assay) slouží pro zjištění celkového poškození buněčné DNA a to na úrovni jednotlivých buněk. Metoda je také označována jako gelová elektroforéza jednotlivých buněk, i když v principu nejsou elektroforéze podrobeny samotné buňky, ale pouze jejich DNA. Principem metody je rozdílná migrace neporušené genomové DNA (superhelixové DNA) a genomové DNA obsahující dvou- a/nebo jednořetězcové zlomy (relaxované DNA) v agarosovém gelu. Zatímco neporušená genomová DNA se v agarosovém gelu téměř nepohybuje, relaxovaná DNA migruje a tvoří obrazec připomínající svým tvarem kometu (Obr. 11). Stupeň poškození DNA je vyhodnocován na základě množství DNA v ohonu (z angl. tail) komety. Nejčastěji se používá délka ohonu (z angl. tail length), procentuální zastoupení DNA v ohonu (z angl. % tail DNA) nebo tzv. tail moment, který je definován jako procentuální zastoupení DNA v ohonu násobené délkou ohonu (Obr. 11). [116-118]

Předností kometové analýzy v porovnání s jinými metodami detekujícími poškození DNA (například PCR a průtoková cytometrie) je její snadné provedení a ekonomická nenáročnost. I z těchto důvodů je dnes kometová analýza široce využívána například pro účely stanovení účinků chemoterapeutik na nádorové buňky nebo pro posuzování protektivních účinků antioxidantů [119, 120] a v případě rostlinných buněk pro posouzení účinku polutantů nebo pro studium vlivu rostlinných patogenů na rostlinou DNA [121-124].



Obr. 11 Znárodnění separace genomové DNA obsahující řetězcové zlomy při kometové analýze. Hlava – hlava komety, Ohon – ohon komety (představuje stupeň poškození DNA) Obrázek převzat z [125] a upraven

2. Cíle práce

V předkládané disertační práci byl využit nejnovější strukturní model PVX CP ve virionu jako předloha pro nalezení nových inzerčních míst vhodných pro prezentaci antigenů na povrchu PVX a dále byl posouzen vliv infekce PVX na integritu hostitelské DNA. Hlavní cíle disertační práce jsou uvedeny níže:

- 1) Navržení inzerčních míst v PVX CP za účelem přípravy částic PVX prezentujících na svém povrchu epitop odvozený od E7 onkoproteinu HPV 16 (E7 epitop)
- 2) Vložení E7 epitopu fúzovaného s 6xHis nebo StrepII kotvou (inzerty 6xHis-E7, E7-6xHis, StrepII-E7 a E7-StrepII) do navržených inzerčních míst (A-G) v PVX CP
- 3) Expresse modifikovaných PVX CP v bakteriích *Escherichia coli* MC1061 za účelem posouzení tvorby viru podobných částic (VLP)
- 4) Transientní exprese modifikovaných PVX CP v rostlinách *Nicotiana benthamiana* a *Nicotiana benthamiana* HC-Pro pro vyhodnocení jejich exprese a tvorby virových částic prezentujících inzerty na svém povrchu
- 5) Purifikace modifikovaných virových částic z rostlin a jejich využití v imunologických studiích
- 6) Metodou kometové analýzy posoudit, zda u tabáku *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi dochází při infekci PVX k poškození hostitelské DNA

3. Materiál a metody

Roztoky

PBS – 0,14 M chlorid sodný (Lachema); 0,0027 M chlorid draselný (Lach-Ner); 0,0078 M dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Lach-Ner); 0,0015 M dihydrát dihydrogenfosforečnanu draselného (Lach-Ner)

PBST – PBS obsahující 1% (v/v) Tween 20 (Sigma-Aldrich)

10x MOPS (pH 7.0) – 0,4 M MOPS (Sigma-Aldrich); 0,1 M acetát sodný (Lach-Ner); 0,01 M EDTA (Lachema)

0,1 M fosfátový pufr (pH 8.0) – 0,086 M dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného; 0,014 M dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného (Lach-Ner)

0,05 M fosfátový pufr (pH 8.0) – 0,043 M dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného; 0,0070 M dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného

0,02 M fosfátový pufr (pH 7.2) – 0,01 M dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného; 0,01 M dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného

Vyvolávací roztok – 0,60 M bezvodý uhličitan sodný (Lach-Ner); 15 μ M pentahydrát thiosíranu sodného (Penta); 0,050% formaldehyd (37 %; Erba Lachema)

Bakterie

Escherichia coli Top10 (Life Technologies) – klonování

E. coli MC1061 (MoBiTec) – exprese modifikovaných PVX CP

E. coli BL21(DE3) (New England Biolabs) – exprese modifikovaných PVX CP

Agrobacterium tumefaciens GV3101 (laskavě poskytl RNDr. Karel J. Angelis, CSc., Ústav experimentální botaniky, Praha, Česká republika) – transientní exprese modifikovaných PVX CP v rostlinách

Plazmidy

pBSC/E7GGG – plazmid obsahující DNA sekvenci modifikovaného E7 onkoproteinu (E7GGG) odvozeného od HPV 16 (laskavě poskytl RNDr. Michal Šmahel, Ph.D., Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha, Česká republika) [101]

pMPM-A4 Ω (Novagen) - arabinosou inducibilní bakteriální expresní vektor použitý pro expresi v *E. coli* MC1061

pACYCDuet-1 (Novagen) – IPTG inducibilní bakteriální expresní vektor obsahující T7 promotor (kompatibilní s pETDuet-1 a vhodný pro koexpresi v *E. coli* BL21(DE3)) – obsahující v genomu T7 RNA polymerasu pod kontrolou lac promotoru

pETDuet-1 (Novagen) – IPTG inducibilní bakteriální expresní vektor obsahující T7 promotor (kompatibilní s pACYCDuet-1 a vhodný pro koexpresi v *E. coli* BL21(DE3))

pGR106 – binární vektor odvozený od PVX (laskavě poskytl Dr. D.C. Baulcombe, Sainsbury Laboratory, Norwich, Velká Británie)

Rostlinný materiál

Pro transientní expresi byly použity 6 týdnů staré rostliny *Nicotiana benthamiana* a *N. benthamiana* HC-Pro (transgenní *N. benthamiana* obsahující gen pro HC-Pro z A viru bramboru, který má funkci antagonisty RNAi; laskavě poskytl Dr. E. Savenkov, Department of Plant Biology, Sveriges Lantbruks-universitet, Uppsala, Švédsko). Rostliny byly kultivovány při 20 – 25 °C při osvětlení (16 h) a při 15 – 20 °C ve tmě (8 h).

Pro kometovou analýzu byly použity 6 týdnů staré rostliny heterozygotního tabáku (a_1^+/a_1 a_2^+/a_2) *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi, které jsou používaným bioindikátorem

somatických mutací [126, 127]. Rostliny byly kultivovány při 28 °C při osvětlení (16 h) a při 22 °C ve tmě (8 h).

E7 epitop

17 aminokyselinový peptid odvozený od E7 onkoproteinu HPV 16

E7₄₄₋₆₀ (QAEPDRAHYNIVTFCCCK): obsahuje imunodominantní epitop (QAEPD) stimulující u myši produkci protilátek, epitop E7₄₈₋₅₄ (DRAHYNI) stimulující u myši T-buněčný receptor CD4⁺ Th1 lymfocytů a epitop E7₄₉₋₅₇ (RAHYNIVTF) stimulující u myši T-buněčný receptor CD8⁺ T lymfocytů [128-131].

```
atgcatggagatacacctacattgcatgaatatatggttagatttgcaaccagagacaact 60
M H G D T P T L H E Y M L D L Q P E T T
ggctctctacgggttatgggcaattaaatgacagctcagaggaggaggatgaaatagatggt 120
G L Y G Y G Q L N D S S E E E D E I D G
ccagctggacaagcagaaccggacagagcccattacaatattgtaaccttttggtgcaag 180
P A G Q A E P D R A H Y N I V T F C C K
tgtgactctacgcttcggttgtgcggtacaaaagcacacacgtagacattcgtactttggaa 240
C D S T L R L C V Q S T H V D I R T L E
gacctgttaatgggcacactaggaattgtgtgccccatctgttctcagaaaccataa 297
D L L M G T L G I V C P I C S Q K P -
```

Obr. 12 DNA a aminokyselinová sekvence E7GGG proteinu (respektive E7 epitopu) odvozeného od HPV 16

Šedě jsou zobrazeny mutace E7GGG (D21G, C24G a E26G oproti E7 onkoproteinu HPV 16) a modře je zobrazena sekvence E7 epitopu [101].

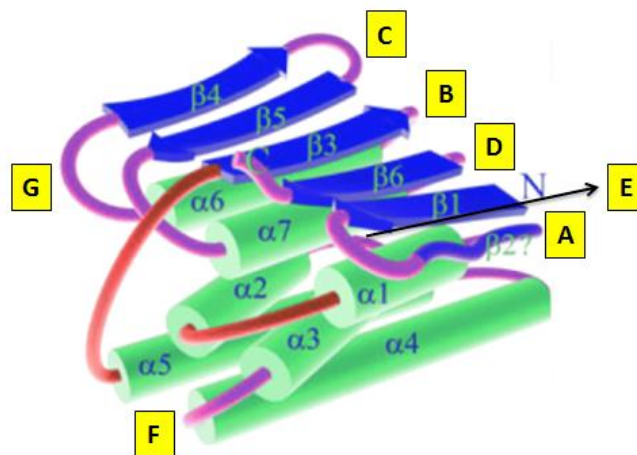
Příprava modifikovaných PVX CP pro expresi v *E. coli* MC1061 a rostlinách

DNA sekvence PVX CP byla získána z pGR106 metodou polymerázové řetězové reakce (PCR; Phusion High-Fidelity DNA polymerase; Thermo Scientific). Metodou PCR byla také získána DNA sekvence E7 epitopu (Obr. 12, str. 47) a to z pBSC/E7GGG. Pomocí PCR byl E7 epitop na jeho 5' nebo 3' konci fúzován s DNA sekvencí 6xHis kotvy nebo Strep II kotvy. Do sedmi míst v DNA sekvenci PVX CP (A, B, C, D, E, F a G), které podle strukturního modelu PVX CP odpovídají možným peptidovým povrchovým smyčkám (Obr. 13, str. 49), byly metodou SOE (splicing by overlap extension)-PCR vloženy konstrukty 6xHis-E7, E7-6xHis, StrepII-E7 a E7-StrepII (Obr. 14A, str. 50). Celkem tak vzniklo dvacet osm modifikovaných konstruktů PVX CP: PVX CP 6xHis-E7/E7-6xHis A/B/C/D/E/F/G a PVX CP StrepII-E7/E7-StrepII A/B/C/D/E/F/G. Všechny tyto konstrukty byly klonovány do expresního vektoru pMPM-A4 Ω pomocí endonukleas EcoRI a Sall. Vzniklé plazmidy byly metodou teplotního šoku transformovány do *E. coli* Top10 [132] a následně byly ověřeny sekvenací (GATC Biotech). Všechny modifikované konstrukty PVX CP, mimo PVX CP 6xHis-E7/E7-6xHis D a PVX CP StrepII-E7/E7-StrepII D, byly následně klonovány do vektoru pGR106 pomocí endonukleas ClaI a XhoI. Konstrukty PVX CP 6xHis-E7/E7-6xHis D a PVX CP StrepII-E7/E7-StrepII D nemohly být klonovány do vektoru pGR106 pomocí endonukleas ClaI a XhoI, neboť místo D se v PVX CP sekvenci nachází za restričními místy XhoI. Pro vložení 6xHis-E7/E7-6xHis a StrepII-E7/E7-StrepII do pGR106 (místa D v PVX CP) byla provedena SOE-PCR a výsledné konstrukty byly vloženy do pGR106 pomocí endonukleas XhoI a SpeI (Obr. 14B, str. 51).


```

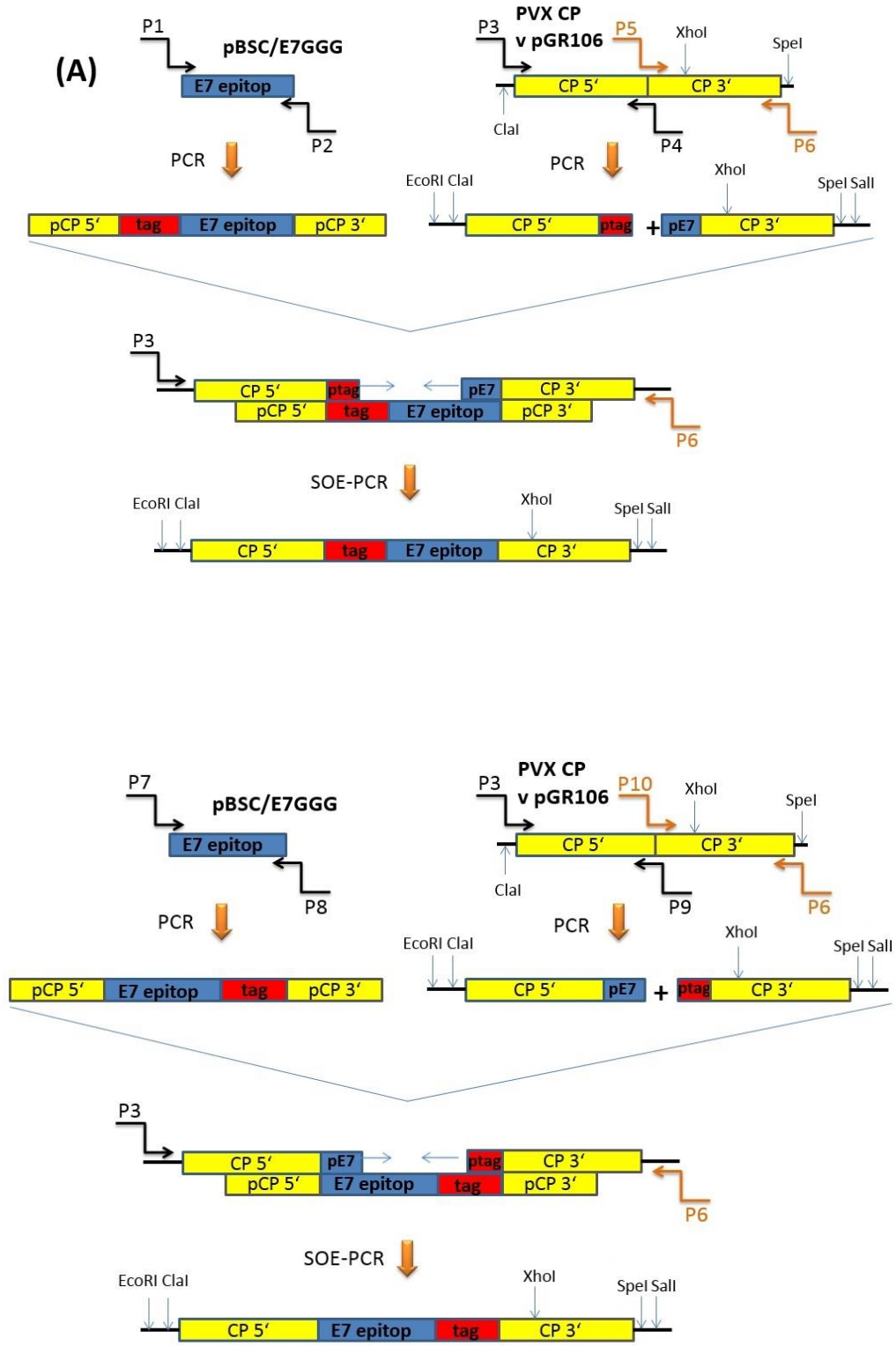
atgtcagcaccagctagcacaacacagcccataggggtcaactacctcaactaccacaaaa 60
M S A P A A S T T Q P I G S T T S T T T K
actgcaggcgcaactcctgcccacagcttcaggcctgttcactatcccggatggggatttc 120
T A G A T P A T A S G L F E T I P D G D F
tttagtacagcccgtgccatagtagccagcaatgctgtcgcaacaatgaggacctcagc 180
F S T A R A I V A S N F A V A T N E D L S
aagattgaggctatgttgaaggacatgaagggtgcccacagacactatggcacaggctgct 240
K I E A I W K D M K V P T D T M A Q A A
tgggacttagtcagacactgtgctgatgtaggatcatccgctcaaacagaaatgatagat 300
W D L V R H C A D V G S S A Q T E M I D
acaggtcccctattccaacggcatcagcagagctagactggcagcagcaattaaagaggtg 360
T G P Y S N G I S R A R L A A A I K E V
tgcacacttaggcaatgttgcgatgaagtatgccccagtggtatggaactggatgttaact 420
C T L R Q F C M K Y A P V V W B N W M L T
aacaacagtcaccctgctaactggcaagcacaaggtttcaagcctgagcacaaattcgct 480
N N S P P A N W Q A Q G F K P E H K G F A
gcattcgacttcttcaatggagtcaccaaccagctgcccattatgcccgaagaggggctc 540
A F D F F N G V T N P A A I C M P K E G L
atccggccaccgtctgaagctgaaatgaatgctgcccaactgctgcctttgtgaagatt 600
I R P P S E A E M N A A Q T A A F V K I
acaaaggccagggcacaatccaacgactttgccagcctagatgcagctgtcactcgaggt 660
T K A R A D Q S N D F A S L D A A V T R G
cgtatcactggaacaacaaccgctgaggctgtgtcactctaccaccaccataa 714
R I T G T T T A E A V V T L P P P -

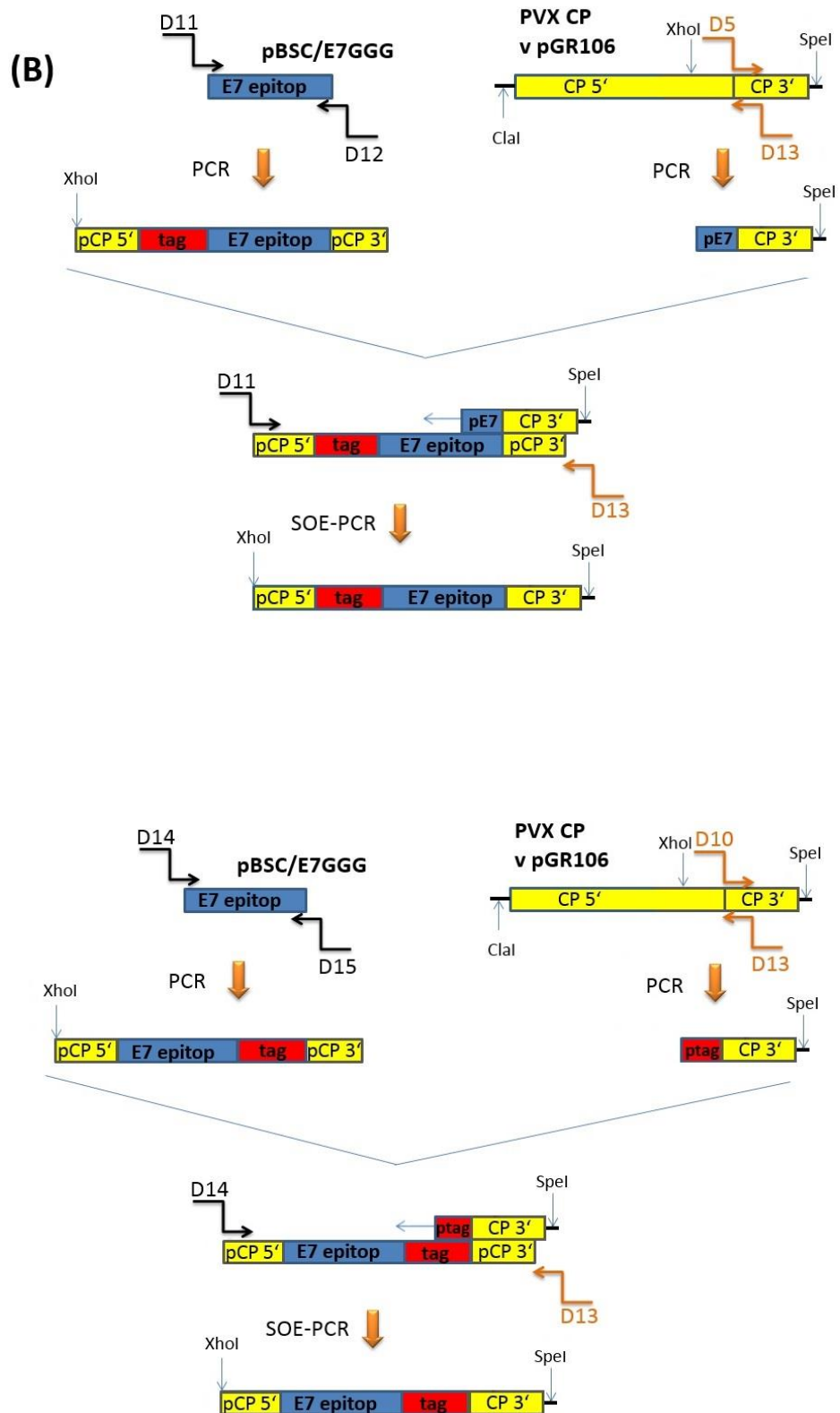
```



Obr. 13 Schématické zobrazení možných povrchových smyček A, B, C, D, E, F a G v DNA sekvenci a strukturním modelu PVX CP ve virionu [87]

V DNA sekvenci PVX CP smyčka A odpovídá pozici 70 – 75 nt, smyčka B pozici 460 – 471 nt, smyčka C pozici 577 – 585 nt, smyčka D pozici 664 – 684 nt, smyčka E pozici 157 – 165 nt, smyčka F pozici 214 – 216 a smyčka G pozici 529 – 555 nt. Červené šipky v DNA sekvenci PVX CP reprezentují oblasti, do kterých byly konstrukty 6xHis-E7/E7-6xHis a StrepII-E7/E7-StrepII vkládány metodou SOE-PCR. V proteinovém modelu PVX CP je smyčka A reprezentována aminokyselinami v pozici (od N-konce) 24 – 25, smyčka B v pozici 154 – 157, smyčka C v pozici 193 – 195, smyčka D v pozici 222 – 228, smyčka E v pozici 53 – 55, smyčka F v pozici 72 a smyčka G v pozici 177 – 185.





Obr. 14 Schématické znázornění přípravy modifikovaných PVX CP pomocí PCR a SOE-PCR za účelem jejich klonování do pMPPM-A4Ω a pGR106

Pro zjednodušení nejsou zobrazena místa A, B, C, D, E, F a G v PVX CP. **(A)** Příprava konstruktů PVX CP mající inzert v místě A, B, C, D, E, F nebo G za účelem jejich klonování do pMPPM-A4Ω pomocí endonukleas EcoRI a Sall a jejich následného klonování do pGR106 pomocí endonukleas ClaI a XhoI (kromě PVX CP mající inzert v místě D, které je lokalizováno za restriční místem XhoI). **(B)** Příprava konstruktů PVX CP mající inzert v místě D za účelem jejich klonování do pGR106 pomocí endonukleas XhoI a SpeI. Zakřivené šipky znázorňují primery (viz. Tab. 1, str. 63); CP - DNA sekvence PVX CP; pCP - parciální (neúplná) DNA sekvence PVX CP; tag - 6xHis nebo Strep II kotva; ptag - parciální DNA sekvence kotvy; E7 epitop - DNA sekvence E7 epitopu; pE7 - parciální DNA sekvence E7 epitopu; EcoRI, ClaI, Sall, XhoI a SpeI - restriční místa.

Expresse modifikovaných PVX CP v *E. coli* MC1061

Všech dvacet osm modifikovaných PVX CP: PVX CP 6xHis-E7/E7-6xHis A/B/C/D/E/F/G a PVX CP StrepII-E7/E7-StrepII A/B/C/D/E/F/G bylo exprimováno z pMPPM-A4Ω při dvou teplotách (22 °C a 37 °C) po dobu 2, 4 a 16 h od přidání induktoru (0,2% L-(+)-arabinoza; Sigma-Aldrich). Expresse probíhala v 50 ml LB média obsahujícího jako selekční marker antibiotikum karbenicilin (50 µg/ml; Duchefa Biochemie). Po uplynutí doby exprese byla bakteriální suspenze centrifugována při 5 000 x g po dobu 10 min při 4 °C a bakterie (sediment) byly lyzovány lysozymem (Ready-Lyse Lysozyme Solution; Epicentre) v přítomnosti nukleasy Benzonasa (Sigma-Aldrich). Následně byla centrifugací při 16 000 x g po dobu 10 min při 4 °C připravena rozpustná (supernatant) a nerozpustná frakce (nerozpustná frakce byla resuspendována v 1% SDS). Přítomnost modifikovaných PVX CP a VLP byla detekována metodou Western blot analýzy, respektive transmisní imunoelektronovou mikroskopií. PVX CP 6xHis-E7 A/B/C/D/E/F/G a PVX CP E7-6xHis A/B/C/D/E/F/G byly dále exprimovány v 50 ml LB média a to za podmínek, které odpovídaly podle výsledků předchozí Western blot analýzy největšímu množství (nejvýraznějšímu signálu) daného modifikovaného PVX CP a nepřítomnosti jeho degradačních produktů v rozpustné frakci. Rozpustné a nerozpustné frakce byly následně částečně přečištěny hustotní centrifugací přes sacharosový polštář (25% w/v) a koncentrace proteinů byla stanovena pomocí soupravy DC Protein Assay (Bio-Rad).

***In vitro* skládání virových částic z PVX RNA a modifikovaných PVX CP**

Proteiny PVX CP StrepII-E7 A/B/C/D/E/F/G a PVX CP E7-StrepII A/B/C/D/E/F/G byly izolovány pomocí afinitní chromatografie (Gravity flow Strep-Tactin Sepharose column; IBA GmbH) z rozpustných frakcí připravených z expresí v *E. coli* MC1061. Dále byly podrobeny Western blot analýze a jejich koncentrace byla stanovena pomocí soupravy DC Protein Assay (Bio-Rad). PVX RNA byla získána z purifikovaného PVX pomocí chloridu lithného [133]: k purifikovanému PVX (10 mM Tris-HCl, pH 7.5) byl přidán chlorid lithný (Sigma-Aldrich) tak, aby jeho výsledná koncentrace činila 3 M a směs byla umístěna do -20 °C a byla zde ponechána 24 h. Následně byla směs centrifugována při 18 000 x g po dobu 20 min při 4 °C, vzniklý sediment (RNA) byl třikrát promyt 70% (v/v) ethanolem (4 °C), rozpuštěn v 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) a uchován při -80 °C. Izolovaná PVX RNA byla podrobena denaturační agarosové elektroforéze a její koncentrace byla stanovena spektrofotometricky (NanoDrop 1000; Thermo Scientific).

Izolované bakteriální PVX CP StrepII-E7 A/B/C/D/E/F/G a PVX CP E7-StrepII A/B/C/D/E/F/G (v 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) byly smíchány s PVX RNA (v 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) v poměru 10 : 1 (w/w) a inkubovány 40 min při laboratorní teplotě. Stejným způsobem byly izolované proteiny inkubovány bez přítomnosti PVX RNA. Přítomnost virových částic nebo VLP byla následně ověřena transmisí imunoelektronovou mikroskopií.

Denaturační agarosová RNA elektroforéza

Byl připraven 0,8% agarosový gel v 1x MOPS pufru (viz. Roztoky, str. 45) obsahujícím 0,74% formaldehyd (37 %, Erba Lachema) společně s ethidium bromidem (Sigma-Aldrich) o koncentraci 0,5 µg/ml. K 5 µg PVX RNA bylo přidáno 10 µl denaturujícího mixu (65 µl 10x MOPS, 13 µl 37% formaldehydu a 22 µl formamidu – Promega) a směs byla inkubována při 55 °C po dobu 15 min. Vzorky byly smíchány s nanášecím pufrem (2x RNA Loading Dye; New England Biolabs) a byly nanášeny na agarosový gel. Jako elektroforetický pufr byl použit 1x MOPS. Pro vyhodnocení byl použit zobrazovací systém Gel DocTM XR (Bio-Rad).

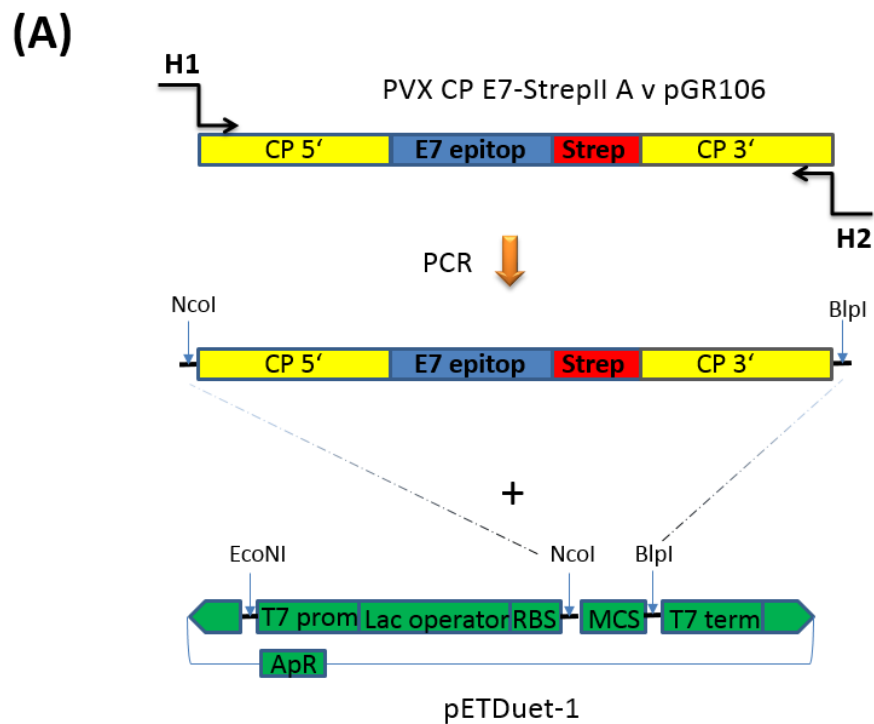
Příprava modifikovaných PVX CP pro expresi v *E. coli* BL21(DE3)

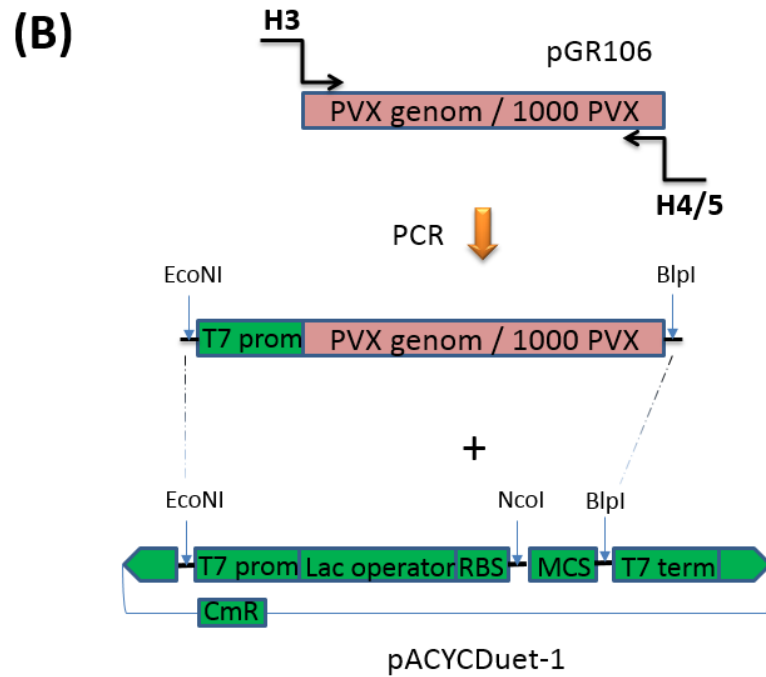
DNA sekvence PVX CP a genomu PVX byla získána z pGR106 metodou PCR (Phusion High-Fidelity DNA polymerase; Thermo Scientific). DNA sekvence PVX CP StrepII-E7 A a PVX CP E7-StrepII A byly získány z pMPM-A4 Ω (viz. str. 48) metodou PCR. Pomocí endonukleas NcoI a BlnI byla do vektoru pETDuet-1 vložena DNA sekvence odpovídající PVX CP StrepII-E7 A (StrepE7CP), PVX CP E7-StrepII A (E7StrepCP) nebo PVX CP (CP; Obr. 15A, str. 55) a pomocí endonukleas EcoNI a BlnI byla do vektoru pACYCDuet-1 vložena DNA sekvence odpovídající celému genomu PVX (genomPVX) nebo DNA sekvence odpovídající prvním 1000 nt genomu PVX (1000PVX; Obr. 15B, str. 56). Celkem tak vzniklo pět plazmidů: pACYCDuet-1(genomPVX), pACYCDuet-1(1000PVX), pETDuet-1(CP), pETDuet-1(StrepE7CP) a pETDuet-1(E7StrepCP). Plazmidy byly metodou teplotního šoku transformovány do *E. coli* Top10 [132] a následně byly ověřeny sekvenací (GATC Biotech).

Plazmidy pACYCDuet-1 (genomPVX) a pACYCDuet-1 (1000PVX) byly dále metodou teplotního šoku transformovány do *E. coli* BL21(DE3) [132] a z těchto buněk (nesoucích plazmidy pACYCDuet-1 (genomPVX) nebo pACYCDuet-1 (1000PVX)) byly následně připraveny buňky kompetentní: po dosažení OD₆₀₀ 0,35 - 0,4 (optická hustota; optical density; měřená při 600 nm) byla 100 ml bakteriální kultura umístěna na led a ponechána zde 30 min. Následně byla bakteriální kultura centrifugována při 3 000 x g po dobu 15 min při 4 °C a sediment byl resuspendován ve 20 ml 100 mM MgCl₂ (4 °C). Suspenze byla dále centrifugována při 2000 x g po dobu 15 min při 4 °C, sediment byl resuspendován ve 40 ml 100 mM CaCl₂ (4 °C) a suspenze byla ponechána na ledu po dobu 30 min. Následně byla suspenze centrifugována při 2 000 x g po dobu 15 min při 4 °C a sediment byl resuspendován ve 20 ml 85 mM CaCl₂ obsahujícího 15% (v/v) glycerol (4 °C). Vzniklá suspenze byla centrifugována při 1000 x g po dobu 15 min při 4 °C, sediment byl resuspendován v 500 μ l 85 mM CaCl₂ obsahujícího 15% (v/v) glycerol (4 °C) a vzniklé kompetentní buňky (suspenze) byly uchovány při -80 °C.

Do takto připravených kompetentních buněk byly metodou teplotního šoku [132] transformovány plazmidy pETDuet-1(CP), pETDuet-1(StrepE7CP) a pETDuet-1(E7StrepCP). Vzniklo tak šest bakteriálních kolonií *E. coli* BL21(DE3), kdy každá obsahovala transkripční plazmid pACYCDuet-1 (produkující PVX RNA - genomPVX nebo 1000PVX) a translační

plazmid pETDuet-1 (produkující PVX CP StrepII-E7 A, PVX CP E7-StrepII A nebo PVX CP). Stejným způsobem byly plazmidy pETDuet-1(CP), pETDuet-1(StrepE7CP) a pETDuet-1(E7StrepCP) transformovány do *E. coli* BL21(DE3) neobsahujících pACYCDuet-1.





Obr. 15 Schématické znázornění klonovací strategie pro přípravu **(A)** translačních vektorů pETDuet-1 (exprimujících PVX CP StrepII-E7 A, PVX CP E7-StrepII A nebo PVX CP) a **(B)** transkripčních vektorů pACYCDuet-1 (produkujících PVX RNA – genomová nebo prvních 1000 nt genomu). Pro zjednodušení je zobrazen pouze konstrukt PVX CP E7-StrepII A. Zakřivené šipky znázorňují primery (viz. Tab. 1, str. 63); CP 5' + CP 3' - DNA sekvence PVX CP; E7 epitop – DNA sekvence E7 epitopu; Strep – DNA sekvence StrepII kotvy; T7 prom = DNA sekvence T7 promotoru; Lac operator = DNA sekvence lac operátoru; RBS – Shine-Dalgarnova sekvence (sekvence rozpoznávaná malou podjednotkou bakteriálního ribozomu); MCS – mnohočetné klonovací místo; T7 term = DNA sekvence T7 terminátoru; ApR = DNA sekvence β -laktamasy (rezistence na ampicilin); CmR = DNA sekvence chloramfenikolacetyltransferasy (rezistence na chloramfenikol); NcoI, BlnI a EcoNI – restrikční místa.

Expresse modifikovaných PVX CP v *E. coli* BL21(DE3)

PVX CP StrepII-E7 A, PVX CP E7-StrepII A a PVX CP byly exprimovány z pETDuet-1(CP), pETDuet-1(StrepE7CP) a pETDuet-1(E7StrepCP) společně s PVX RNA z pACYCDuet-1(genomPVX) nebo pACYCDuet-1(1000PVX) při dvou teplotách (22 °C a 37 °C) po dobu 4 h od přidání induktoru (0,4 M IPTG; Sigma-Aldrich). Stejným způsobem byly exprimovány i PVX CP StrepII-E7 A, PVX CP E7-StrepII A a PVX CP z pETDuet-1(CP), pETDuet-1(StrepE7CP) a pETDuet-1(E7StrepCP) bez přítomnosti pACYCDuet-1(genomPVX) a pACYCDuet-1(1000PVX). Expresse probíhala v 50 ml LB média obsahujícího jako selekční marker antibiotika karbenicilin (50 µg/ml; Duchefa Biochemie) a chloramfenikol (34 µg/ml; SERVA Electrophoresis GmbH) nebo pouze antibiotikum karbenicilin (pro expresi bez přítomnosti pACYCDuet-1). Po uplynutí doby exprese byla bakteriální suspenze centrifugována při 5 000 x g po dobu 10 min při 4 °C a bakterie (sediment) byly lyzovány lysozymem (Ready-Lyse Lysozyme Solution; Epicentre). Následně byla centrifugací při 16 000 x g po dobu 10 min při 4 °C připravena rozpustná (supernatant) a nerozpustná cytoplazmatická bakteriální frakce (nerozpustná frakce byla resuspendována v 1% SDS). Přítomnost modifikovaných PVX CP byla detekována metodou Western blot analýzy a přítomnost modifikovaných virových částic nebo VLP byla detekována transmisní imunoelektronovou mikroskopií. Přítomnost PVX RNA v bakteriální suspenzi po ukončení exprese a v rozpustných cytoplazmatických frakcích byla detekována z celkové RNA (RNAzol®RT; Molecular Research Center) pomocí metody RT-PCR (reverzní transkripce spojená s PCR; M-MLV Reverse Transcriptase – Promega; GoTaq®DNA polymerase – Promega).

Transientní exprese modifikovaných PVX CP v rostlinách

Buňky *A. tumefaciens* byly metodou teplotního šoku (freeze/thaw shock method) [134] transformovány binárním vektorem pGR106 obsahující modifikovaný PVX CP. Bakterie byly následně kultivovány v LB médiu obsahujícím jako selekční marker antibiotikum kanamycin (25 µg/ml; SERVA Electrophoresis GmbH) při 28 °C po dobu 2 dní. Bakteriální kultury byly naředěny na OD₅₅₀ = 0,5 (optická hustota; optical density; měřená

při 550 nm) a jednotlivými suspenzemi byly injekčně (1 ml) agroinfiltrovány 6 týdnů staré rostliny *N. benthamiana* a *N. benthamiana* HC-Pro (vždy 10 rostlin). Infiltrovány byly vždy dva spodní listy v prvním nadzemním patře rostliny. Jako negativní kontrola byla použita *A. tumefaciens* neobsahující pGR106 a jako pozitivní kontrola *A. tumefaciens* nesoucí pGR106 obsahující nemodifikovaný PVX CP. Po agroinfiltraci byly rostliny kultivovány při 20 – 25 °C při osvětlení (16 h) a při 15 – 20 °C ve tmě (8 h). Z infiltrovaných a systémových (neinfiltrovaných) listů byly průběžně odebírány vzorky (4., 8., 12. a 16. den po infiltraci) za účelem detekce přítomnosti modifikovaných PVX CP (Western blot analýza) a přítomnosti modifikovaných virových částic (transmisní imunoelektronová mikroskopie). V případě nutného uchování vzorků pro pozdější analýzu nebo purifikaci byly listy uchovány v -80 °C.

Purifikace PVX a PVX E7-StrepII A z rostlin

Infikované listy byly homogenizovány v mixéru společně s 0,1 M fosfátovým pufrům (pH 8.0; viz. Roztoky, str. 45) a to v poměru 1 : 2 (w/v). Homogenát byl přefiltrován přes tři vrstvy gázy a dále byl centrifugován při 7 800 x g po dobu 20 min při 4 °C. K supernatantu byl přidán Triton X-100 (Sigma-Aldrich) tak, aby jeho výsledná koncentrace činila 1 % (w/v) a směs byla míchána (150 ot/min) při 4 °C po dobu 1 h. Směs byla následně centrifugována při 5 500 x g po dobu 20 min při 4 °C. K supernatantu byl přidán chlorid sodný (Lachema) do výsledné koncentrace 0,2 M, PEG 6000 (Sigma-Aldrich) do výsledné koncentrace 4 % (w/v) a směs byla míchána (150 ot/min) při 4 °C po dobu 1 h. Směs byla dále inkubována při pokojové teplotě po dobu 1 h a následně centrifugována při 7 800 x g po dobu 30 min při 4 °C. Vzniklý sediment byl resuspendován v 0,05 M fosfátovém pufru (pH 8.0; 1 ml pufru na 5 g použitých listů) a centrifugován při 7 800 x g po dobu 10 min při 4 °C. Supernatant byl podroben hustotní centrifugaci přes sacharosový polštář (30% w/v sacharosa (Lach-Ner) v 0,05 M fosfátovém pufru) při 27 000 ot/min po dobu 3 h při 4 °C (Beckman L7-55, rotor Ti 50.2). Sediment byl přes noc resuspendován za stálého míchání (200 ot/min) při teplotě 4 °C v 0,02 M fosfátovém pufru (pH 7.2) nebo 10 mM Tris-HCl (pH 7.5). Směs byla centrifugována při 2 000 x g po dobu 5 min při 4 °C a supernatant (purifikovaný virus) byl odebrán k analýze.

SDS-PAGE elektroforéza a Western blot analýza

K 30 μ l bakteriální rozpustné a nerozpustné frakce nebo purifikovaného viru z rostlin bylo přidáno 10 μ l vzorkového pufru 4x Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad) a 4 μ l TCEP (500 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine, pH 7.0; Sigma-Aldrich). Infiltrované a systémové listy byly rozetřeny v PBS (1 : 10 w/v) a vzniklá směs byla centrifugována při 10 000 x g po dobu 1 min při laboratorní teplotě. Následně bylo k 30 μ l supernatantu rostlinného extraktu přidáno 10 μ l vzorkového pufru 4x Laemmli Sample Buffer a 4 μ l TCEP. Vzorky (bakteriální frakce, rostlinné extrakty, purifikovaný virus) byly inkubovány 15 min při teplotě 90 °C a následně centrifugovány při 10 000 x g po dobu 30 s při laboratorní teplotě. Po rozdělení na SDS-PAGE elektroforéze (12% gel) byly proteiny přeneseny (polo-suchý přenos) na nitrocelulózovou membránu (0,2 μ m, Schleicher & Schuell Protran). Membrána byla následně 1 h blokována v 5% odtučněném mléce (Laktos) a přes noc inkubována s primární monoklonální myší protilátkou anti-His (GE Healthcare Life Sciences) nebo s primární monoklonální myší protilátkou anti-StepII tag (Qiagen) nebo s primární polyklonální králičí protilátkou anti-PVX CP (Prime Diagnostics). Všechny primární protilátky byly ředěny v PBST (1 : 1000 v/v). Po promytí membrány pomocí PBST (3 x 5 min) byla membrána 2 h inkubována se sekundární kozí polyklonální anti-myší protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatasou (Sigma-Aldrich) nebo se sekundární kozí polyklonální anti-králičí protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatasou (Sigma-Aldrich). Obě protilátky byly ředěny v PBST (1 : 30 000 v/v). Po opětovném promytí membrány pomocí PBST (3 x 5 min) byla přítomnost proteinů detekována pomocí chromogenního substrátu BCIP/NBT (Sigma-Aldrich).

Detekce glykoproteinů

Po ukončení SDS-PAGE elektroforézy byl gel za stálého třepání inkubován v 20% (w/v) kyselině trichloroctové (Lach-Ner) a to po dobu 30 min při laboratorní teplotě. Následně byl gel za stálého třepání inkubován v 1% (w/v) kyselině iodisté (Lach-Ner) po dobu 30 min při laboratorní teplotě. Gel byl promyt (4 x 5 min) směsí ethanol/voda (3 : 10 v/v). Následně byl gel za stálého třepání inkubován v 0,02% (w/v) pentahydrátu

thiosíranu sodného (Penta) po dobu 2 min při laboratorní teplotě. Gel byl promyt (3 x 20 s) destilovanou vodou a při laboratorní teplotě byl za stálého míchání inkubován 1 h v 0,2% (w/v) dusičnanu stříbrném (Lach-Ner) obsahujícím 0,05% (v/v) formaldehyd (37 %, Erba Lachema). Gel byl promyt (3 x 20 s) destilovanou vodou a byl ponořen do vyvolávacího roztoku (viz. Roztoky, str. 45). Pro ukončení vyvíjení byl gel zalit 10% (v/v) kyselinou octovou (Lach-Ner) [135].

Transmisní imunoelektronová mikroskopie

Niklová elektronmikroskopická síťka (Electron Microscopy Sciences; hustota ok 400 mesh, výška 62 μm) potažená 2% vrstvou formvaru (BDH Chemicals) byla položena na 20 μl vzorku (bakteriální frakce, rostlinný extrakt nebo purifikovaný virus). Po 30 min inkubaci při pokojové teplotě byla síťka promyta položením na 20 μl PBS (2 x 2 min). Síťka byla dále položena na 20 μl primární monoklonální myší protilátky anti-His (GE Healthcare Life Sciences) nebo primární monoklonální myší protilátky anti-StepII tag (Qiagen) nebo polyklonální králičí protilátky anti-PVX CP (Prime Diagnostics). Protilátky byly ředěny v PBS (1 : 1000 v/v) a síťka na nich byla inkubována při pokojové teplotě po dobu 30 min. Po promytí v PBS (2 x 2 min) byla síťka umístěna na 20 μl odpovídající sekundární protilátky: kozí polyklonální anti-myší protilátka konjugovaná s 10 nm částicemi zlata (Sigma-Aldrich) nebo kozí polyklonální anti-králičí protilátka konjugovaná s 5 nm částicemi zlata (Sigma-Aldrich). Protilátky byly ředěny v PBS (1 : 20 v/v) a síťka na nich byla inkubována při pokojové teplotě po dobu 30 min. Mimo tento postup bylo také provedeno dvojí značení ve schématu: myší protilátka anti-His/anti-StrepII tag – promytí – anti-myší protilátka s 10 nm částicemi zlata – promytí - králičí protilátka anti-PVX CP – promytí – anti-králičí protilátka s 5 nm částicemi zlata. Po promytí v PBS (2 x 2 min) byla síťka umístěna na 20 μl 4% (w/v) molybdenanu amonného (pH 7.0, Erba Lachema) obsahujícího 0,1% (w/v) trehalosu (SERVA Electrophoresis GmbH). Po pěti minutách inkubace při pokojové teplotě byla síťka umístěna do zásobníku na sítky a ponechána zaschnout. Mikroskopie byla provedena na transmisním elektronovém mikroskopu FEI Morgagni 268D (FEI, Oregon USA).

Kometová analýza

Šest týdnů staré rostliny *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi byly mechanicky infikovány extraktem připraveným z rostlin *N. tabacum* cv. Xanthi infikovaných PVX. Dva listy (čtvrtý a pátý od děložního listu) byly poprášeny karbidem křemičitým (velikost částic 600 mesh; Keyvest Belgium SA) a potřeny připraveným rostlinným extraktem (0,057 M hydrogenfosforečnan draselný (P-LAB), pH 8.0). Jako negativní kontrola byly rostliny *N. tabacum* cv. Xanthi potřeny rostlinným extraktem připraveným z neinfikovaných *N. tabacum* cv. Xanthi. Pro analýzu byly 3., 7., 10., 14., 17. a 21. den po mechanické infekci odebrány vzorky listů o velikosti přibližně 1,5 x 1 cm a to z oblasti u řapíku a z okrajové oblasti listu (vždy z mechanicky infikovaného listu a čtyř systémových listů – každý z jednoho vrchního rostlinného patra) a byla provedena kometová analýza.

Vzorek listu (přibližně 1,5 x 1 cm) byl v 250 μ l 400 mM Tris-HCl (pH 7.5; 4 °C) mechanicky narušen (nakrájen žiletkou) za účelem získání suspenze jednotlivých buněčných jader. Tři/čtyři mikroskopická podložní sklíčka byla potažena vrstvou 1% (m/v) agarosy (Cambrex) a na každé takto připravené podložní sklíčko bylo pipetováno 50 μ l suspenze buněčných jader a 50 μ l 1% nízkotající agarosy (v PBS; 37 °C; Cambrex). Tato směs byla promíchána pomocí mikropipety, byla překryta krycím sklíčkem a ponechána ztuhnout. Po ztuhnutí byla krycí sklíčka sejmuta a podložní sklíčka obsahující genomovou DNA imobilizovanou v agarose byla umístěna do nádoby (tanku) pro DNA horizontální elektroforézu obsahující vychlazený (4 °C) elektroforetický pufr o složení: 1 mM disodná sůl EDTA (Lachema), 300 mM hydroxid sodný (Lachema); pH \geq 13. Zde byly vzorky inkubovány 20 min a následně došlo k elektroforetické separaci, která probíhala po dobu 20 min při 0,74 V/cm a teplotě 4 °C. Po ukončení elektroforézy byla sklíčka třikrát promyta v 400 mM Tris-HCl (pH 7.5) a byla ponechána zaschnout při pokojové teplotě. Takto připravená sklíčka byla na 5 min ponořena do roztoku ethidium bromidu (20 μ g/ml; Sigma-Aldrich), následně ponořena do destilované vody (pro odstranění přebytku ethidium bromidu) a překryta krycím sklíčkem. Pro vyhodnocení byl využit fluorescenční mikroskop (BX 60, Olympus, Tokyo, Japonsko) s excitačním filtrem 546/10 nm a bariérovým filtrem 590 nm společně se softwarem Komet v. 3.1 (Kinetic Imaging,

Liverpool, UK). Pro stanovení stupně poškození DNA byl použit tzv. tail moment, který je definován jako procentuální zastoupení DNA v ohonu komety násobené délkou ohonu komety (viz. str. 43). Celkově bylo hodnoceno 50 náhodně vybraných buněk (resp. genomových DNA) na jeden vzorek (jedno podložní sklíčko), přičemž každý vzorek byl analyzován v triplikátu až kvadruplikátu (tři/čtyři podložní sklíčka pro jeden vzorek), což odpovídá 150 – 200 analyzovaným buňkám, resp. genomovým DNA. Statistické vyhodnocení naměřených hodnot provedl RNDr. Tomáš Gichner, DrSc (Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.) s použitím softwaru SigmaPlot 13 (Systat Software Inc.).

4. Výsledky

Vložení E7 epitopu do možných povrchových smyček PVX CP

Pro vložení E7 epitopu ve fúzi s 6xHis kotvou nebo Strep II kotvou do možných povrchových smyček PVX CP (A, B, C, D, E, F a G) pomocí metod PCR a SOE-PCR byla navržena klonovací strategie (Obr. 14, str. 50-51) a příslušné primery (Tab. 1). Všech 28 konstruktů, PVX CP 6xHis-E7/E7-6xHis A/B/C/D/E/F/G a PVX CP StrepII-E7/E7-StrepII A/B/C/D/E/F/G, bylo úspěšně připraveno a následně klonováno do bakteriálního expresního vektoru pMPM-A4 Ω . Konstrukty byly dále klonovány do vektoru pGR106.

Tab. 1 Primery pro přípravu konstruktů PVX CP. Primery odpovídají Obr. 14 a 15 (viz. str. 50-51 a 55-56). Pokud jsou u primeru uvedeny dvě sekvence, pak horní odpovídá konstruktů obsahujícímu 6xHis kotvu a spodní konstruktů obsahujícímu StrepII kotvu.

Primery	DNA sekvence (5'-3')
A1	CACAAAACTGCAGGCCATCATCACCATCACCACCAAGCAGAACCGGACAGA CACAAAACTGCAGGCTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAGCAAGCAGAACCGGACAGA
A2	TGTGGCAGGAGTTGCCTTGAACAAAAGGTTACAAT
A3	CATTCATTGAATTCATCGATATGTCAGCACCAGCTAG
A4	TGGTGATGATGGCCTGCAGTTTTTGTGG GTGGCTCCAGCCTGCAGTTTTTGTGG
A5	TTTTGTTGCAAGGCAACTCCTGCCACAG
A6	CATTGTCGACTTATGGTGGTGGTAGAG
B1	AGCACAAGGTTTCAAGCATCATCACCATCACCAC AGCACAAGGTTTCAAGTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAG
B2	GAATTTGTGCTCAGGCTTGAACAAAAGGTTACAA
B3	CATTCATTGAATTCATCGATATGTCAGCACCAGCTAG
B4	TGGTGATGATGCTTGAAACCTTGTGCTTG GTGGCTCCACTTGAAACCTTGTGCTTG
B5	CTTTTGTGCAAGCCTGAGCACAATTCGC
B6	CATTGTCGACTTATGGTGGTGGTAGAG
C1	AATGAATGCTGCCAACATCATCACCATCACCAC AATGAATGCTGCCAATGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAG
C2	CACAAAGGCAGCAGTCTTGAACAAAAGGTTACAA
C3	CATTCATTGAATTCATCGATATGTCAGCACCAGCTAG
C4	TGGTGATGATGTTGGGCAGCATTCAATTC GTGGCTCCATTGGGCAGCATTCAATTC
C5	TTTTGTTGCAAGACTGCTGCCTTTGTGAA

C6	CATTGTCGACTTATGGTGGTGGTAGAG
D1	AGGTCGTATCACTGGACATCATCACCATCACCAC AGGTCGTATCACTGGATGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAG
D2	CTCAGCGGTTGTTGTCTTGAACAAAAGGTTACAA
D3	CATTCATTGAATTCATCGATATGTCAGCACCAGCTAG
D4	TGGTGATGATGTCCAGTGATACGACCTC GTGGCTCCATCCAGTGATACGACCTC
D5	AACCTTTTGTGCAAGACAACAACCGCTGAGG
D6	GTATATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACATTGTCGACTTATGGTGGTGGTAGAG
A7	CACAAAACACTGCAGGCCAAGCAGAACCGGACAGA
A8	TGTGGCAGGAGTTGCGTGGTGATGGTGATGCTTGAACAAAAGGTTACAAT TGTGGCAGGAGTTGCCTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCACTTGAACAAAAGGTTACAAT
A9	GGTTCTGCTTGGCCTGCAGTTTTTGTGG
A10	CATCACCACGCAACTCCTGCCACAG AGTTCGAAAAGGCAACTCCTGCCACAG
B7	AGCACAAGGTTTTCAAGCAAGCAGAACCGGACAG
B8	GAATTTGTGCTCAGGGTGGTGATGGTGATGATG GAATTTGTGCTCAGGCTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCA
B9	GGTTCTCCTTGCTTGAACCTTGTGCTTG
B10	CCATCACCACCCTGAGCACAAATTCGC AGTTCGAAAAGCCTGAGCACAAATTCGC
C7	AATGAATGCTGCCCAACAAGCAGAACCGGACAG
C8	CACAAAGGCAGCAGTGTGGTGATGGTGATGATG CACAAAGGCAGCAGTCTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCA
C9	GGTTCTGCTTGTGGGCAGCATTCAATTC
C10	CCATCACCACACTGCTGCCTTTGTGAA AGTTCGAAAAGACTGCTGCCTTTGTGAA
D7	AGGTCGTATCACTGGACAAGCAGAACCGGACAG
D8	CTCAGCGGTTGTTGTGTGGTGATGGTGATGATG CTCAGCGGTTGTTGTCTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCA
D9	GGTTCTGCTTGTCCAGTGATACGACCTC
D10	TCATCACCATCACCACACAACAACCGCTGAGG AGTTCGAAAAGACAACAACCGCTGAGG
E1	AGCAATGCTGTGCGACATCATCACCATCACCACCAAGCAGAACCGGACAGA AGCAATGCTGTGCGCATGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAGCAAGCAGAACCGGACAGA
E2	TGAGGTCCTCATTTGTCTTGAACAAAAGGTTACAAT
E3	CATTCATTGAATTCATCGATATGTCAGCACCAGCTAG
E4	TGGTGATGATGTGCGACAGCATTGCTG GTGGCTCCATGCGACAGCATTGCTG
E5	CCTTTTGTGCAAGACAATGAGGACCTCAG
E6	CATTGTCGACTTATGGTGGTGGTAGAG
F1	GACATGAAGGTGCCCATCATCACCATCACCACCAAGCAGAACCGGACAGA GACATGAAGGTGCCCTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAGCAAGCAGAACCGGACAGA
F2	GTGCCATAGTGTCTGTCTTGAACAAAAGGTTACAAT
F3	CATTCATTGAATTCATCGATATGTCAGCACCAGCTAG

F4	TGGTGATGATGGGGCACCTTCATGTCC GTGGCTCCAGGGCACCTTCATGTCC
F5	CCTTTTGTGCAAGACAGACACTATGGCACA
F6	CATTGTCGACTTATGGTGGTGGTAGAG
G1	CATGCCCAAAGAGGGGGCATCATCACCATCACCACCAAGCAGAACCGGACAGA CATGCCCAAAGAGGGGTGAGGCCACCCGCAGTTCGAAAAGCAAGCAGAACCGGACAGA
G2	CGGTGGCCGGATGAGCTTGCAACAAAAGGTTACAAT
G3	CATTCATTGAATTCATCGATATGTCAGCACCAGCTAG
G4	GTGATGATGCCCTCTTTGGGCATG GCTCCACCCCTCTTTGGGCATG
G5	TTGCAAGCTCATCCGGCCACCG
G6	CATTGTCGACTTATGGTGGTGGTAGAG
E7	AGCAATGCTGTGCGACAAGCAGAACCGGACAGA
E8	TGAGGTCCTCATTTGTGTGGTGTGATGGTGTGATGCTTGCAACAAAAGGTTACAAT TGAGGTCCTCATTTGTCTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCACTTGCAACAAAAGGTTACAAT
E9	GGTTCTGCTTGTGCGACAGCATTGCTG
E10	CACCATCACACACAAATGAGGACCTCAG CGCAGTTCGAAAAGACAAATGAGGACCTCAG
F7	GACATGAAGGTGCCCAAGCAGAACCGGACAGA
F8	GTGCCATAGTGTCTGTGTGGTGTGATGGTGTGATGCTTGCAACAAAAGGTTACAAT GTGCCATAGTGTCTGTCTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCACTTGCAACAAAAGGTTACAAT
F9	GTTCTGCTTGGGGCACCTTCATGTCC
F10	ACCATCACACACAGACACTATGGCACA GCAGTTCGAAAAGACAGACACTATGGCACA
G7	CATGCCCAAAGAGGGGGCAAGCAGAACCGGACAGA
G8	CGGTGGCCGGATGAGGTGGTGTGATGGTGTGATGCTTGCAACAAAAGGTTACAAT CGGTGGCCGGATGAGCTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCACTTGCAACAAAAGGTTACAAT
G9	TTCTGCTTGCCCTCTTTGGGCATG
G10	ACCACCTCATCCGGCCACCG TTCGAAAAGCTCATCCGGCCACCG
D11	CATTCTCGAGGTCGTATCACTGGACATCATCACCATCACCACCAAGCAGAACC CATTCTCGAGGTCGTATCACTGGATGGAGGCCACCCGCAGTTCGAAAAGCAAGCAGAACC
D12	CCTCAGCGGTTGTTGTCTTGCAACAAAAGGTTACAATATTGTAATGGGCTC
D13	ACCCACTAGTTTTTTTTTTTTTATTATATTA
D14	CATTCTCGAGGTCGTATCACTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCC
D15	CCTCAGCGGTTGTTGTGTGGTGTGATGGTGTGATGCTTGCAAC CCTCAGCGGTTGTTGTCTTTTCGAACTGCGGGTGGCTTGCAAC
H1	AGGAGATATACCATGTCAGCACCAGCTAGCACAA
H2	GCTAGTTATTGCTCAGCTTATGGTGGTGGTAGAGTGA
H3	TATGCGACTCCTGCATTAGGAAATTAACGACTCACTATAGGAAAATAAACCATACACCAC
H4	GCTAGTTATTGCTCAGCGCTTCTTGCAAGTGTGAACT
H5	GCTAGTTATTGCTCAGCTTTTTTTTTTTTTTATTATATTATTCATACAATC

Expresie PVX CP 6xHis-E7/E7-6xHis v *E. coli* MC1061

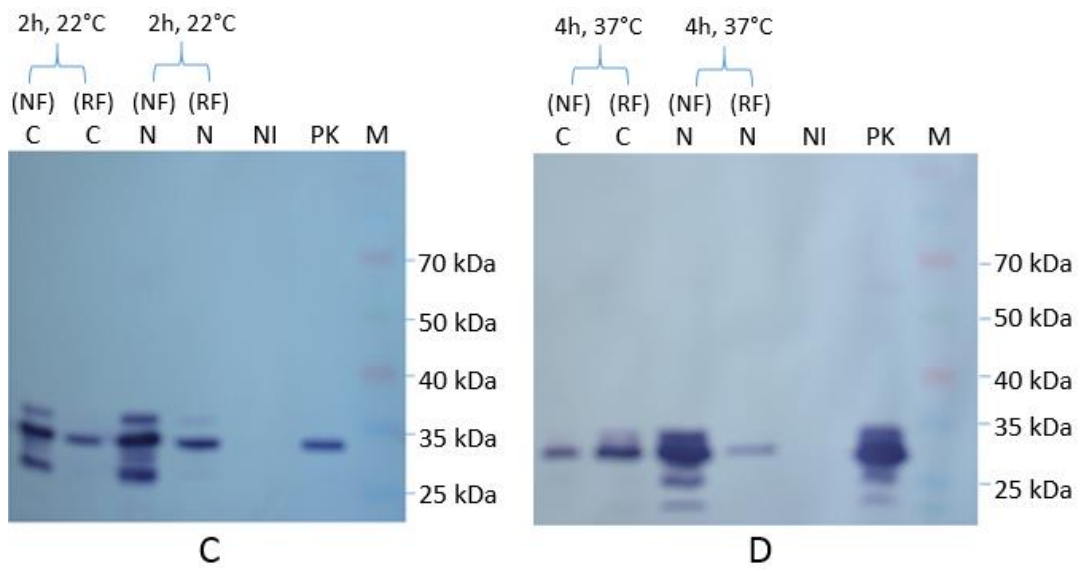
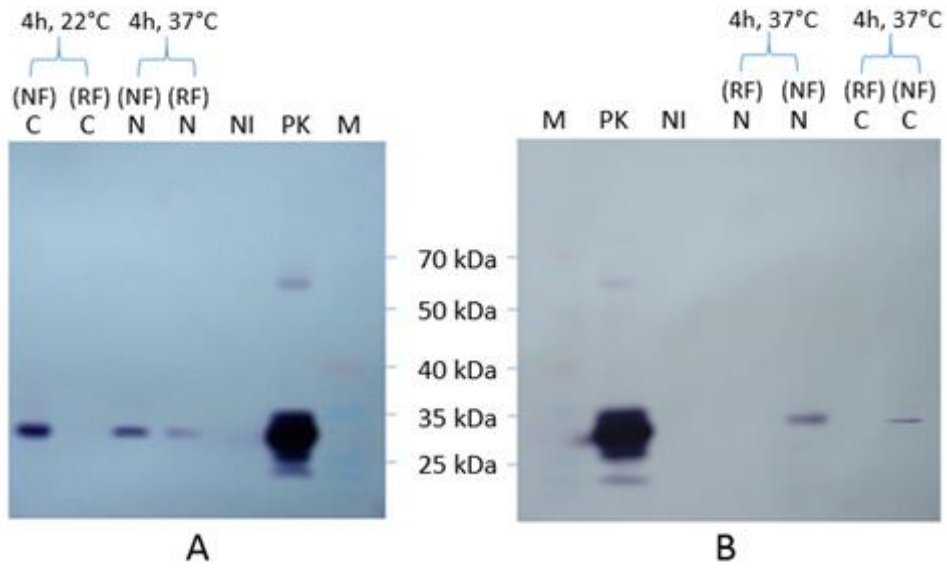
Za účelem posouzení rozpustnosti a schopnosti tvořit VLP v bakteriích byly PVX CP 6xHis-E7 A/B/C/D/E/F/G a PVX CP E7-6xHis A/B/C/D/E/F/G exprimovány v *E. coli* MC1061. Všechny konstrukty PVX CP v pMPM-A4 Ω byly úspěšně transformovány do *E. coli* MC1061 a následně byly exprimovány při dvou teplotách (22 °C a 37 °C) po dobu 2, 4 a 16 h od přidání induktoru (L-(+)-arabinoza). Z jednotlivých bakteriálních suspenzí byly připraveny rozpustné a nerozpustné frakce, které byly dále analyzovány pomocí Western blot analýzy a transmisní imunoelektronové mikroskopie [136].

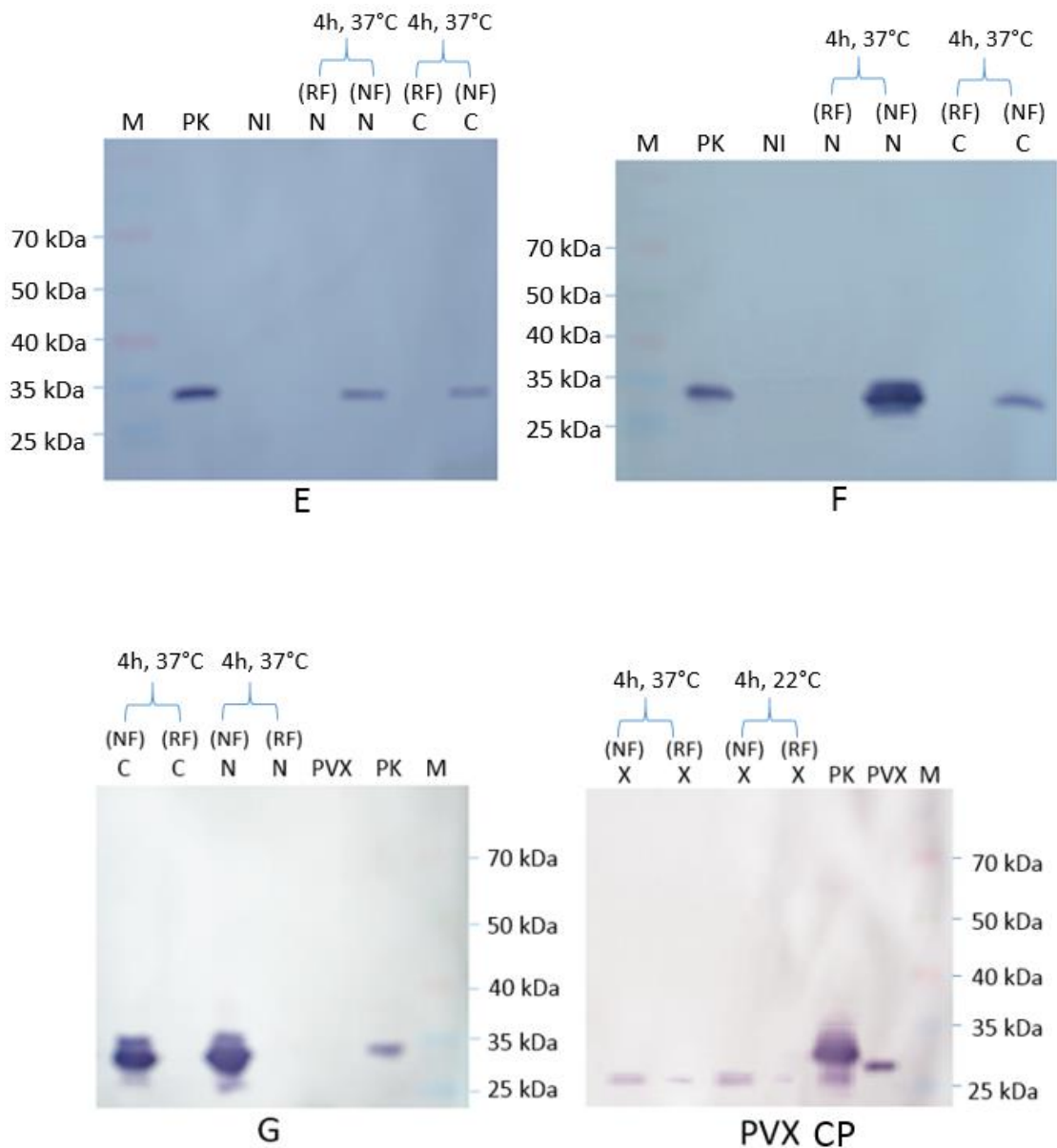
Na základě Western blot analýzy bylo zjištěno, že PVX CP 6xHis-E7 A/B/D/E/F/G a PVX CP E7-6xHis B/D/E/F/G (\approx 28 kDa) byly nejefektivněji (z hlediska množství a stupně degradace modifikovaných PVX CP v rozpustných frakcích) exprimovány při 37 °C s délkou indukce 4 h, PVX CP E7-6xHis A při teplotě 22 °C s délkou indukce 4 h a PVX CP 6xHis-E7 C společně s PVX CP E7-6xHis C při teplotě 22 °C s délkou indukce 2 h (Obr. 16, str. 68-69). Rozpustné a nerozpustné frakce připravené z expresí provedených za podmínek uvedených výše byly dále částečně přečištěny hustotní centrifugací přes sacharosový polštář (25% w/v) a byla stanovena celková koncentrace proteinů (Tab. 2, str. 71) [136]. Z Western blot analýzy je dále patrné, že různá topologie inzertu ovlivňuje rozpustnost modifikovaných PVX CP v *E. coli* MC1061. Zatímco PVX CP obsahující inzert vložený do pozic B, E, F a G je přítomen pouze v nerozpustné frakci (proteinové agregáty), PVX CP obsahující inzert vložený do pozic C a D je mimo nerozpustnou frakci přítomen také v rozpustné frakci – stejně jako v případě nemodifikovaného PVX CP (\approx 25 kDa). PVX CP obsahující inzert vložený do pozice A je dále důkazem toho, že nejen pozice, ale také uspořádání inzertu (6xHis-E7 vs. E7-6xHis) má vliv na rozpustnost produkovaného proteinu. Zatímco PVX CP 6xHis-E7 A je detekován v rozpustné frakci, PVX CP E7-6xHis A nikoli.

Z expresí při různých časech (2, 4 a 16 h) a teplotách (22 °C a 37 °C) bylo zjištěno, že doba exprese ovlivňuje nejen množství produkovaných proteinů, ale také stupeň jejich degradace (přítomnost modifikovaných PVX CP s menší molekulovou hmotností). Ve všech případech bylo prokázáno, že 16 h exprese vedla, oproti 2 a 4 h expresi, k poměrně značné degradaci modifikovaných PVX CP a to při obou teplotách exprese (data nejsou zobrazena). Dále pak bylo prokázáno, že rozdíl v čase a teplotě exprese

neovlivňoval přítomnost/nepřítomnost daného modifikovaného PVX CP v rozpustné a nerozpustné frakci.

Na základě provedené transmisní imunoelektronové mikroskopie bylo zjištěno, že žádný vzorek (rozpustné i nerozpustné frakce získané z expresí při obou teplotách a všech indukčních časech) nebyl pozitivní na přítomnost VLP odvozených od modifikovaných PVX CP. Ve všech získaných nerozpustných frakcích, stejně jako v rozpustných frakcích odvozených od exprese PVX CP, PVX CP 6xHis-E7/E7-6xHis C a PVX CP 6xHis-E7/E7-6xHis D byly detekovány pouze proteinové agregáty a v případě exprese PVX CP 6xHis-E7 A byly v rozpustných frakcích detekovány struktury (nejpravděpodobněji proteinové agregáty) připomínající VLP, které bylo možné označit jak protilátkou anti-His, tak protilátkou anti-PVX CP (Obr. 17, str. 71) [136].





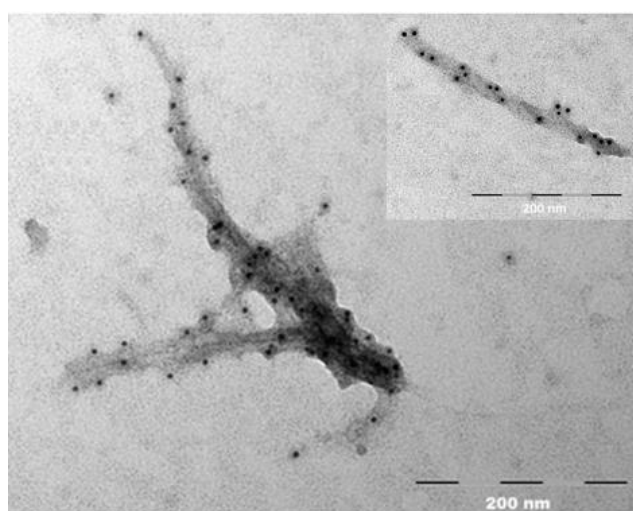
Obr. 16 Western blot analýza (12% gel) modifikovaných PVX CP produkovaných v *E. coli* MC1061. **A** – exprese PVX CP 6xHis-E7 A a PVX CP E7-6xHis A; **B** – PVX CP 6xHis-E7 B a PVX CP E7-6xHis B; **C** – exprese PVX CP 6xHis-E7 C a PVX CP E7-6xHis C; **D** – exprese PVX CP 6xHis-E7 D a PVX CP E7-6xHis D; **E** – exprese PVX CP 6xHis-E7 E a PVX CP E7-6xHis E; **F** – exprese PVX CP 6xHis-E7 F a PVX CP E7-6xHis F; **G** – exprese PVX CP 6xHis-E7 G a PVX CP E7-6xHis G; **PVX CP** – exprese nemodifikovaného PVX CP.

M – proteinový standard: Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific); **PK** – exprese PVX CP obsahující na N-konci 6xHis kotvu s epitopem L2 HPV 16

(pozitivní kontrola); **NI** – exprese bez přidání induktoru (negativní kontrola); **PVX** – purifikovaný PVX; **N (RF)** – rozpustná bakteriální frakce připravená z expresí PVX CP 6xHis-E7 A/B/C/D/E/F/G; **N (NF)** – nerozpustná bakteriální frakce připravená z expresí PVX CP 6xHis-E7 A/B/C/D/E/F/G; **C (RF)** – rozpustná bakteriální frakce připravená z expresí PVX CP E7-6xHis A/B/C/D/E/F/G; **C (NF)** – nerozpustná bakteriální frakce připravená z expresí PVX CP E7-6xHis A/B/C/D/E/F/G; **X (RF)** – rozpustná bakteriální frakce připravená z exprese nemodifikovaného PVX CP; **X (NF)** – nerozpustná bakteriální frakce připravená z exprese nemodifikovaného PVX CP. Šipky reprezentují dobu a teplotu jednotlivých expresí. **A, B, C, D, E, F, G** - proteiny byly značeny pomocí primární monoklonální myší protilátky anti-His (GE Healthcare Life Sciences) a sekundární kozí polyklonální anti-myší protilátky konjugované s alkalickou fosfatasou (Sigma-Aldrich). **PVX CP** – proteiny byly značeny pomocí primární polyklonální králičí protilátky anti-PVX CP (Prime Diagnostics) a sekundární kozí polyklonální anti-králičí protilátky konjugované s alkalickou fosfatasou (Sigma-Aldrich). Proteiny byly detekovány pomocí chromogenního substrátu BCIP/NBT (Sigma-Aldrich).

Tab. 2 Stanovení celkové koncentrace proteinů přítomných v bakteriálních rozpustných (RF) a nerozpustných frakcích (NF) částečně přečištěných přes sacharosový polštář (25% w/v). Koncentrace byla stanovena pomocí soupravy DC Protein Assay (Bio-Rad)

Exprese	Konstrukt	RF	NF
4 h, 37 °C	PVX CP-6xHisE7 A	0.3 mg	0.5 mg
4 h, 22 °C	PVX CP-E76xHis A	-	0.9 mg
4 h, 37 °C	PVX CP-6xHisE7 B	-	0.6 mg
4 h, 37 °C	PVX CP-E76xHis B	-	0.1 mg
2 h, 22 °C	PVX CP-6xHisE7 C	0.4 mg	0.9 mg
2 h, 22 °C	PVX CP-E76xHis C	0.3 mg	0.7 mg
4 h, 37 °C	PVX CP-6xHisE7 D	0.4 mg	0.2 mg
4 h, 37 °C	PVX CP-E76xHis D	0.2 mg	0.7 mg
4 h, 37 °C	PVX CP-E76xHis E	-	0.5 mg
4 h, 37 °C	PVX CP-6xHisE7 E	-	0,7 mg
4 h, 37 °C	PVX CP-E76xHis F	-	0,8 mg
4 h, 37 °C	PVX CP-6xHisE7 F	-	0,5 mg
4 h, 37 °C	PVX CP-E76xHis G	-	0,8 mg
4 h, 37 °C	PVX CP-6xHisE7 G	-	0,3 mg
4 h, 37 °C	PVX CP	0.1 mg	0,7 mg
4 h, 22 °C	PVX CP	0.1 mg	0,5 mg



Obr. 17 Transmisní imunoelektronová mikroskopie PVX CP 6xHis-E7 A produkovaných v *E. coli* MC1061 (rozpustná frakce získaná z exprese při 37 °C, doba trvání 4 h od přidání

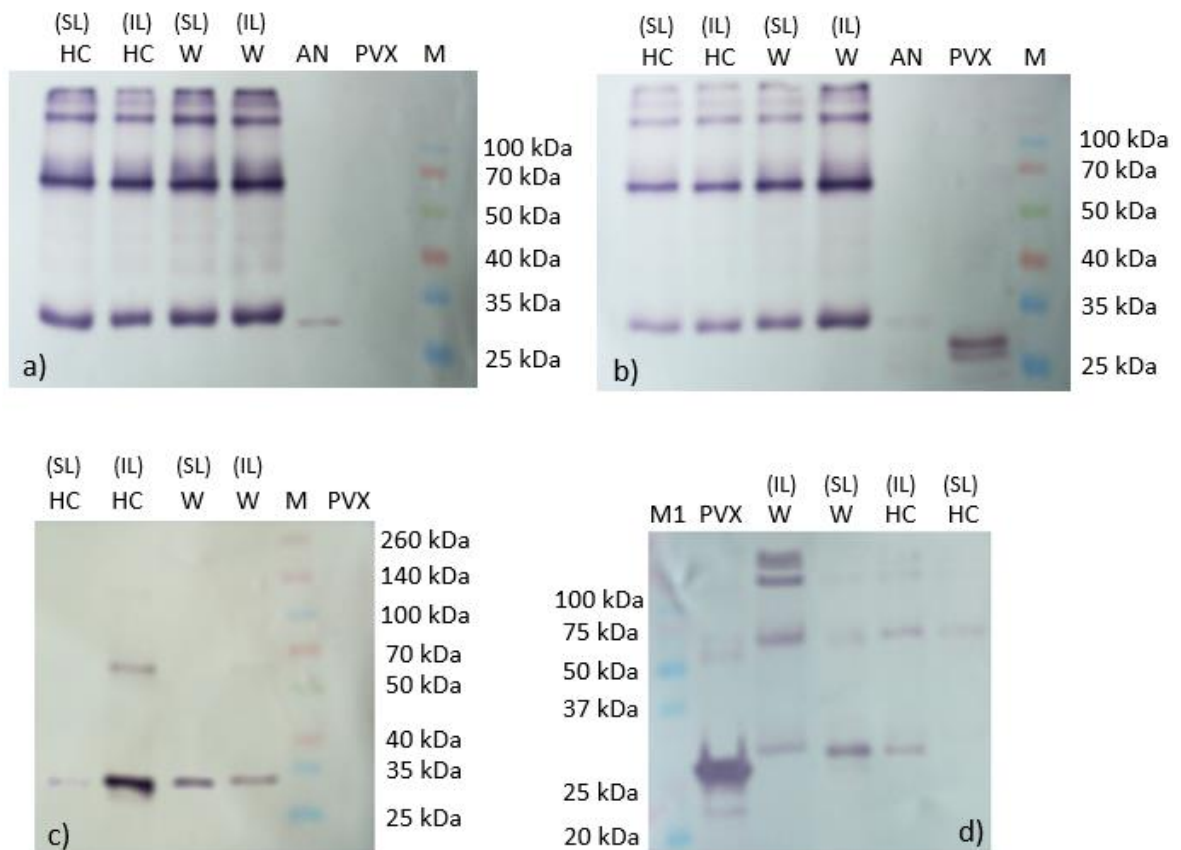
induktoru). Proteiny byly značeny pomocí primární monoklonální myší protilátky anti-His (GE Healthcare Life Sciences) a sekundární kozí polyklonální anti-myší protilátky konjugované s 10 nm zlatými částicemi (Sigma-Aldrich). Negativní barvení bylo provedeno 4% (w/v) molybdenanem amonným (Erba Lachema) obsahujícím 0,1% (w/v) trehalosu (SERVA Electrophoresis GmbH).

Transientní exprese PVX CP 6xHis-E7/E7-6xHis v rostlinách

Proteiny PVX CP 6xHis-E7/E7-6xHis A/B/C/D/E/F/G byly exprimovány v *N. benthamiana* a *N. benthamiana* HC-Pro pomocí binárního vektoru pGR106. Provedená Western blot analýza prokázala, že pouze PVX CP 6xHis-E7 A a PVX CP E7-6xHis A byly produkovány v *N. benthamiana* a v *N. benthamiana* HC-Pro, a to jak v inokulovaných, tak v systémových listech (Obr. 18, str. 73). Rostliny infikované PVX 6xHis-E7 A a PVX E7-6xHis A vykazovaly přibližně po 10ti dnech od agroinfiltrace mozaikové příznaky jako je tomu v případě infekce PVX (Obr. 7, str. 34) [137].

Transmisní imunoelektronovou mikroskopií provedenou z rostlinného extraktu nebyly detekovány virové částice ani proteinové agregáty. Pro homogenizaci rostlinného materiálu (při laboratorní teplotě nebo po rozetření v tekutém dusíku) byly použity pufry o různých složení a pH (0,05 M fosfátový pufr o pH 6.8, pH 7.0 a pH 7.3; 0,1 M Tris-HCl o pH 8.0 a pH 8.3), avšak ani přes tuto snahu nebyly virové částice ani proteinové agregáty detekovány. Snaha o zakoncentrování virových částic, ani snaha o jejich přímou purifikaci nebyla úspěšná. V případě postupu pro zakoncentrování virových částic z rostlinného extraktu (PEG Virus Precipitation Kit; GenWay Biotech, Inc.) bylo možné Western blot analýzou detekovat PVX CP 6xHis-E7 A i PVX CP E7-6xHis A, avšak pomocí transmisní imunoelektronové mikroskopie částice nebo agregáty detekovány nebyly. V případě purifikace (purifikační schéma pro PVX) byly PVX CP 6xHis-E7 A a PVX CP E7-6xHis A detekovány pouze do okamžiku, než byl zaveden centrifugační krok při 27 000 ot/min po dobu 3 h při 4 °C (Beckman L7-55, rotor Ti 50.2).

Zbylé modifikované PVX CP byly v rostlinách detekovány pouze v inokulovaných listech a to pouze pomocí protilátky anti-PVX CP (výsledky Western blot analýzy nejsou uvedeny). Rostliny nevykazovaly jakékoli symptomy a transmisní imunoelektronová mikroskopie neprokázala přítomnost virových částic [137].



Obr. 18 Western blot analýza (10% gel) PVX CP 6xHis-E7 A (a, b) a PVX CP E7-6xHis A (c, d) produkovaných v *N. benthamiana* (W) a *N. benthamiana* HC-Pro (HC). Rostliny byly analyzovány 10 dní po agroinfiltraci

M – proteinový standard: Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific); **M1** – proteinový standard: Precision Plus Protein Dual Xtra Standards (Bio-Rad); **a)** PVX – purifikovaný PVX; AN – bakteriální PVX CP 6xHis-E7 A; W (IL) – inokulované listy *N. benthamiana* infikované PVX 6xHis-E7 A; W (SL) – systémové listy *N. benthamiana* infikované PVX 6xHis-E7 A; HC (IL) – inokulované listy

N. benthamiana HC-Pro infikované PVX 6xHis-E7 A; HC (SL) – systémové listy *N. benthamiana* HC-Pro infikované PVX 6xHis-E7 A. Proteiny byly značeny pomocí primární monoklonální myší protilátky anti-His (GE Healthcare Life Sciences) a sekundární kozí polyklonální anti-myší protilátky konjugované s alkalickou fosfatasou (Sigma-Aldrich); **b**) stejné vzorky a uspořádání jako v případě a). Proteiny byly značeny pomocí primární polyklonální králičí protilátky anti-PVX CP (Prime Diagnostics) a sekundární kozí polyklonální anti-králičí protilátky konjugované s alkalickou fosfatasou (Sigma-Aldrich); **c**) PVX – purifikovaný PVX; W (IL) – inokulované listy *N. benthamiana* infikované PVX E7-6xHis A; W (SL) – systémové listy *N. benthamiana* infikované PVX E7-6xHis A; HC (IL) – inokulované listy *N. benthamiana* HC-Pro infikované PVX E7-6xHis A; HC (SL) – systémové listy *N. benthamiana* HC-Pro infikované PVX E7-6xHis A. Proteiny byly značeny pomocí primární monoklonální myší protilátky anti-His (GE Healthcare Life Sciences) a sekundární kozí polyklonální anti-myší protilátky konjugované s alkalickou fosfatasou (Sigma-Aldrich); **d**) stejné vzorky a uspořádání jako v případě c). Proteiny byly značeny pomocí primární polyklonální králičí protilátky anti-PVX CP (Prime Diagnostics) a sekundární kozí polyklonální anti-králičí protilátky konjugované s alkalickou fosfatasou (Sigma-Aldrich). Proteiny byly detekovány pomocí chromogenního substrátu BCIP/NBT (Sigma-Aldrich).

Expresí PVX CP StrepII-E7/E7-StrepII v *E. coli* MC1061

Vzhledem k předešlým výsledkům získaným z expresí PVX CP 6xHis-E7/E7-6xHis v rostlinách, které ukázaly, že proteiny PVX CP 6xHis-E7 A a PVX CP E7-6xHis A jsou přítomny v inokulovaných i systémových listech bez přítomnosti (respektive možnosti detekce) virových částic, byla navržena hypotéza, zda přítomnost 6xHis kotvy nemůže ovlivňovat stabilitu virových částic. Za tímto účelem byla ve všech konstruktech PVX CP zaměněna 6xHis kotva (HHHHHH) za StrepII kotvu (WSHPQFEK).

Stejně jako v případě PVX CP 6xHis-E7/E7-6xHis byly PVX CP StrepII-E7/E7-StrepII (\approx 28 kDa) exprimovány v *E. coli* MC1061. Všechny konstrukty PVX CP v pMPM-A4 Ω byly

úspěšně transformovány do *E. coli* MC1061 a následně byly exprimovány při dvou teplotách (22 °C a 37 °C) po dobu 2, 4 a 16 h od přidání induktoru (L-(+)-arabinoza). Z jednotlivých bakteriálních suspenzí byly připraveny rozpustné a nerozpustné frakce, které byly dále analyzovány pomocí Western blot analýzy a transmisní imunoelektronové mikroskopie.

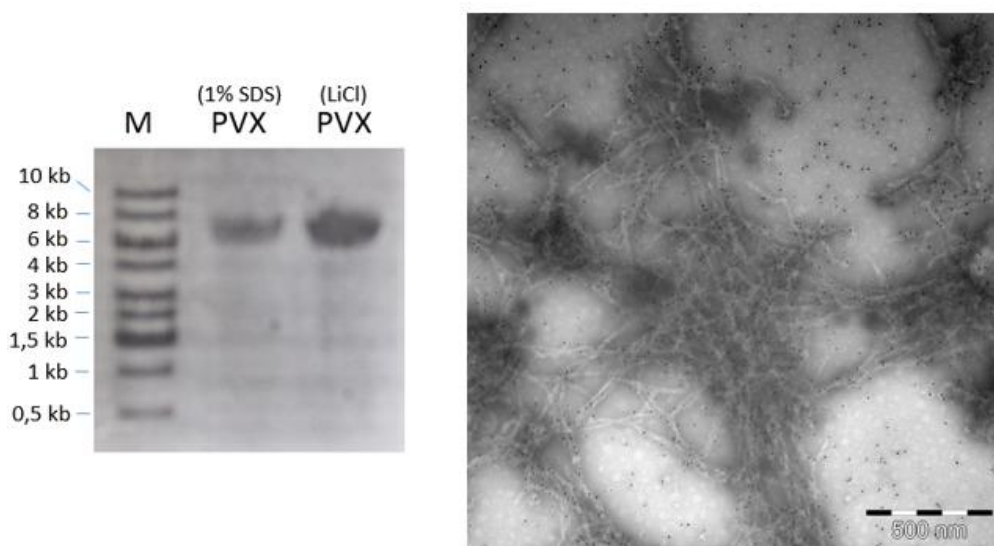
Výsledky Western blot analýzy (nejsou uvedeny) prokázaly, že všechny modifikované PVX CP byly detekovány pomocí protilátky anti-PVX CP i protilátky anti-StrepII tag v rozpustné i nerozpustné frakci. Změna kotvy tedy má vliv na rozpustnost modifikovaných PVX CP (proteiny PVX CP E7-6xHis A a PVX CP 6xHis-E7/E7-6xHis B/E/F/G byly detekovány pouze v nerozpustné frakci). Stejně jako v případě exprese PVX CP 6xHis-E7/E7-6xHis bylo prokázáno, že 16 h exprese vedla, oproti 2 a 4 h expresi, k degradaci modifikovaných PVX CP, a že rozdíl v čase a teplotě exprese neovlivňoval přítomnost/nepřítomnost daného modifikovaného PVX CP v rozpustné a nerozpustné frakci.

Transmisní imunoelektronová mikroskopie prokázala, že žádný vzorek (rozpustné i nerozpustné frakce získané z expresí při obou teplotách a všech indukčních časech) nebyl pozitivní na přítomnost VLP odvozených od modifikovaných PVX CP.

***In vitro* skládání virových částic z PVX RNA a PVX CP StrepII-E7/E7-StrepII**

Bakteriálně exprimované PVX CP StrepII-E7 A/B/C/D/E/F/G a PVX CP E7-StrepII A/B/C/D/E/F/G byly izolovány z rozpustných frakcí (připravených z exprese v *E. coli* MC1061) pomocí afinitní chromatografie (Gravity flow Strep-Tactin Sepharose column; IBA GmbH) za účelem posouzení jejich schopnosti tvořit virové částice v přítomnosti PVX RNA (izolované z purifikovaného PVX).

Na základě provedené transmisní imunoelektronové mikroskopie bylo zjištěno, že v přítomnosti PVX RNA ($\approx 6,5$ kb) tvoří virové částice pouze proteiny PVX CP StrepII-E7 A a PVX CP E7-StrepII A (Obr. 19) a že v nepřítomnosti PVX RNA nedochází k tvorbě VLP.



Obr. 19 Formaldehydová denaturační agarosová elektroforéza PVX RNA a *in vitro* skládání virových částic z bakteriálních PVX CP StrepII-E7 A a PVX RNA

M – standard: 0,5-10 kb RNA ladder (Life Technologies); **PVX (1% SDS)** – purifikovaný PVX s 1% SDS inkubovaný po dobu 10 min při 70 °C (referenční vzorek); **PVX (LiCl)** – PVX RNA izolovaná z purifikovaného PVX pomocí 3 M chloridu lithného podle [133]. Detekce RNA byla provedena pomocí ethidium bromidu (Sigma-Aldrich).

Částice značeny primární monoklonální myší protilátkou anti-StrepII tag (Qiagen) a sekundární kozí polyklonální anti-myší protilátkou konjugovanou s 10 nm zlatými částicemi (Sigma-Aldrich). Negativní barvení provedeno 4% (w/v) molybdenem amonným (Erba Lachema) obsahujícím 0,1% (w/v) trehalosu (SERVA Electrophoresis GmbH).

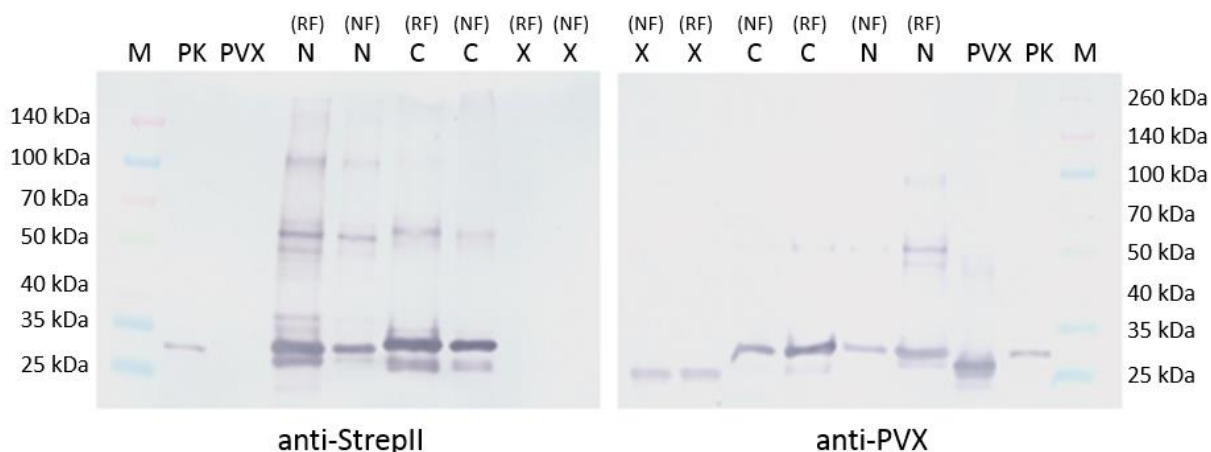
Expresse PVX CP StrepII-E7/E7-StrepII A v *E. coli* BL21(DE3)

Vzhledem k faktu, že izolované PVX CP StrepII-E7 A a PVX CP E7-StrepII A produkované v *E. coli* MC1061 mají *in vitro* schopnost v přítomnosti PVX RNA tvořit virové částice, byla navržena hypotéza, zda by k produkci virových částic nemohlo docházet přímo v bakteriální buňce (tedy bez potřeby proteiny izolovat afinitní chromatografií a bez potřeby izolovat PVX RNA z purifikovaného PVX). Za tímto účelem byly proteiny PVX CP, PVX CP StrepII-E7 A a PVX CP E7-StrepII A exprimovány společně s PVX RNA sekvencí odpovídající prvním 1000 nt genomu PVX (1000PVX) nebo s PVX RNA sekvencí odpovídající genomu PVX (genomPVX) v *E. coli* BL21(DE3) při dvou teplotách (22 °C a 37 °C) a třech indukčních časech (2, 4 a 16 h). Za stejných podmínek byly dále proteiny PVX CP, PVX CP StrepII-E7 A a PVX CP E7-StrepII A exprimovány samostatně - tedy bez přítomnosti transkripčního vektoru pACYCDuet-1 tvořícího PVX RNA.

Po ukončení exprese byla metodou RT-PCR detekována PVX RNA v celkové RNA izolované z bakterií obsahující translační (pETDuet-1) i transkripční vektor (pACYCDuet-1), avšak nebyla detekována v celkové RNA izolované z bakterií obsahující pouze translační vektor (data nezobrazena). Stejných výsledků bylo dosaženo i při detekci PVX RNA v jednotlivých rozpustných frakcích.

Na základě Western blot analýzy bylo prokázáno, že proteiny PVX CP, PVX CP StrepII-E7 A a PVX CP E7-StrepII A byly detekovány v rozpustné i nerozpustné frakci (Obr. 20, str. 78) při obou teplotách a všech indukčních časech exprese, bez ohledu na to, zda současně docházelo či nedocházelo k tvorbě PVX RNA.

Po provedení transmisní imunoelektronové mikroskopie bylo zjištěno, že virové částice ani VLP odvozené od PVX CP, PVX CP StrepII-E7 A nebo PVX CP E7-StrepII A nebylo možno detekovat ani v rozpustných, ani v nerozpustných frakcích (získaných z expresí při obou teplotách a všech indukčních časech) a to bez ohledu na to, zda současně s kapsidovými proteiny docházelo či nedocházelo k produkci PVX RNA.



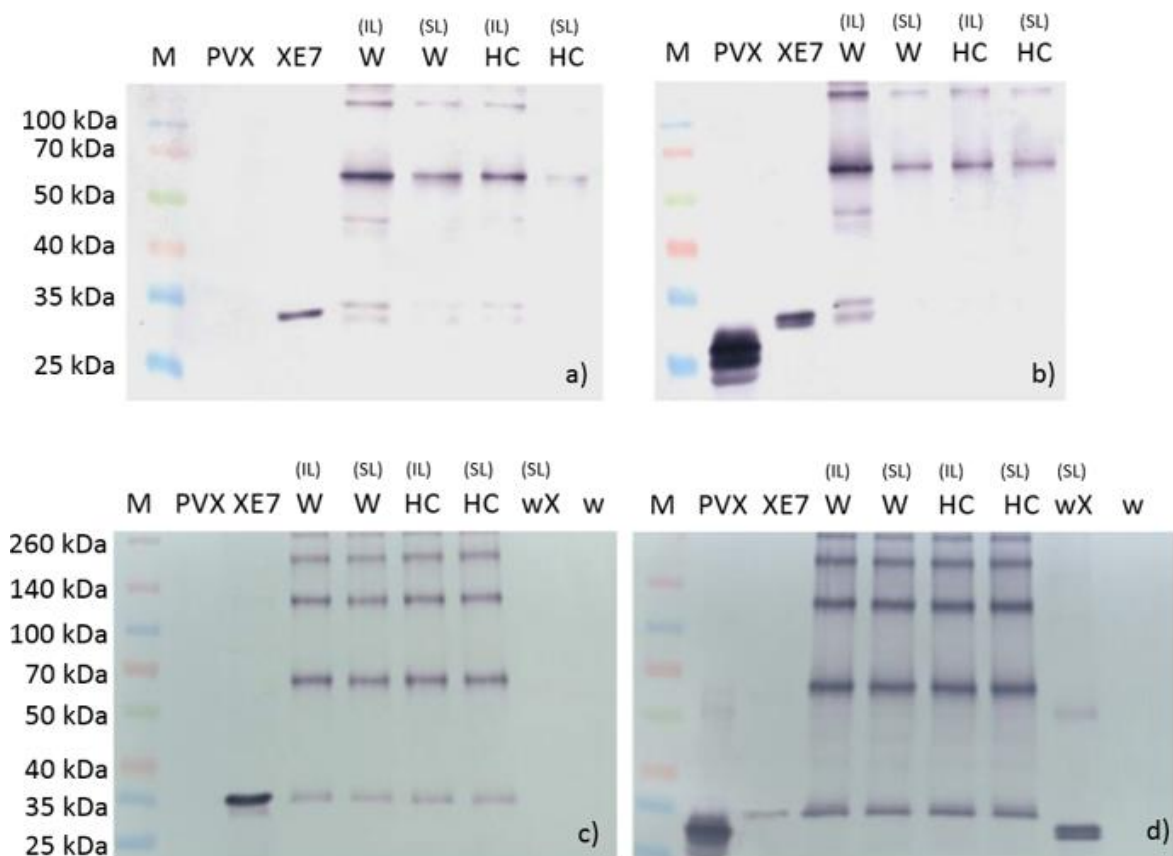
Obr. 20 Western blot analýza (10% gel) modifikovaných PVX CP produkovaných v *E. coli* BL21 (DE3) – exprese při 37 °C, doba trvání 4 h od přidání induktoru

M – proteinový standard: Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific); **PK** – pozitivní kontrola (PVX CP StrepII-E7 D produkovaný v *E. coli* MC1061); **PVX** – purifikovaný PVX; **N (RF)** – rozpustná frakce připravená z expresí PVX CP StrepII-E7 A; **N (NF)** – nerozpustná frakce připravená z expresí PVX CP StrepII-E7 A; **C (RF)** – rozpustná frakce připravená z expresí PVX CP E7-StrepII A; **C (NF)** – nerozpustná frakce připravená z expresí PVX CP E7-StrepII A. **X (RF)** – rozpustná frakce připravená z expresí PVX CP; **X (NF)** - nerozpustná frakce připravená z expresí PVX CP.

Anti-StrepII - proteiny byly značeny pomocí primární monoklonální myší protilátky anti-StrepII tag (Qiagen) a sekundární kozí polyklonální anti-myší protilátky konjugované s alkalickou fosfatase (Sigma-Aldrich); **anti-PVX** – proteiny byly značeny pomocí primární polyklonální králičí protilátky anti-PVX CP (Prime Diagnostics) a sekundární kozí polyklonální anti-králičí protilátky konjugované s alkalickou fosfatase (Sigma-Aldrich). Proteiny byly detekovány pomocí chromogenního substrátu BCIP/NBT (Sigma-Aldrich).

Transientní exprese PVX CP StrepII-E7/E7-StrepII v rostlinách

PVX CP StrepII-E7/E7-StrepII A/B/C/D/E/F/G byly exprimovány v *N. benthamiana* a *N. benthamiana* HC-Pro pomocí binárního vektoru pGR106. Výsledky Western blot analýzy ukázaly, že pouze PVX CP StrepII-E7 A a PVX CP E7-StrepII A byly detekovány v inokulovaných i systémových listech *N. benthamiana* a *N. benthamiana* HC-Pro (Obr. 21, str. 80). Rostliny vykazovaly přibližně po 10ti dnech od agroinfiltrace mozaikové příznaky (Obr. 22, str. 81) a výsledky transmisní imunoelektronové mikroskopie prokázaly přítomnost virových částic, které byly detekovány jak protilátkou anti-PVX CP, tak protilátkou anti-StrepII tag (Obr. 23, str. 82). Ostatních dvanáct modifikovaných PVX CP bylo možné detekovat pouze v inokulovaných listech a to pouze pomocí protilátky anti-PVX CP (výsledky Western blot analýzy nejsou uvedeny). Rostliny nevykazovaly jakékoli symptomy a transmisní imunoelektronová mikroskopie neprokázala přítomnost virových částic [137].



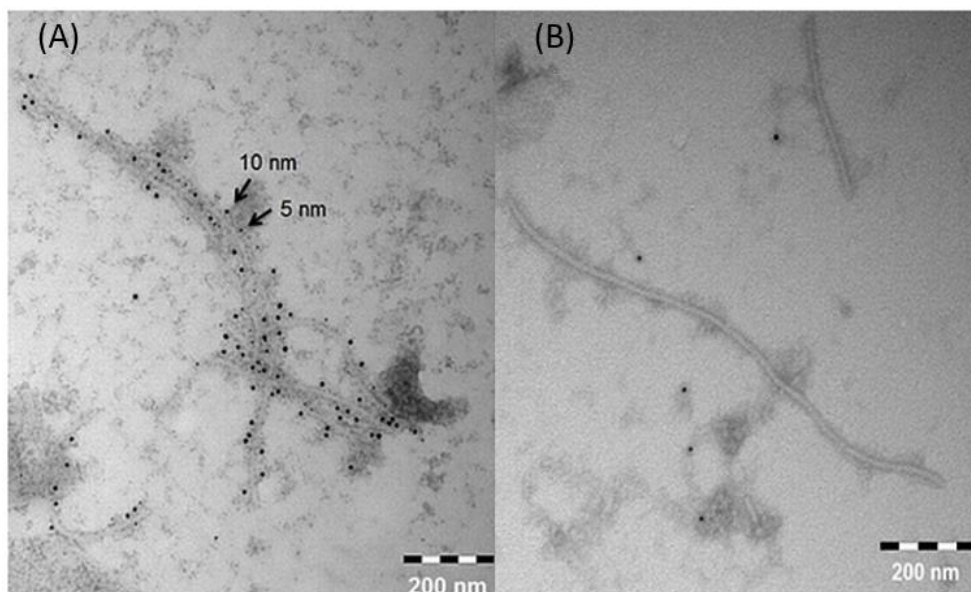
Obr. 21 Western blot analýza (10% gel) PVX StrepII-E7 A (a, b) a PVX E7-StrepII A (c, d) produkovaných v *N. benthamiana* (W) a *N. benthamiana* HC-Pro (HC). Rostliny byly analyzovány 15 dní po agroinfiltraci

M – proteinový standard: Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific); **a)** PVX – purifikovaný PVX; XE7 - purifikovaný PVX E7-StrepII A; W (IL) – inokulované listy *N. benthamiana* infikované PVX StrepII-E7 A; W (SL) – systémové listy *N. benthamiana* infikované PVX StrepII-E7 A; HC (IL) – inokulované listy *N. benthamiana* HC-Pro infikované PVX StrepII-E7 A; HC (SL) – systémové listy *N. benthamiana* HC-Pro infikované PVX StrepII-E7 A. Proteiny byly značeny pomocí primární monoklonální myší protilátky anti-StrepII tag (Qiagen) a sekundární kozí polyklonální anti-myší protilátky konjugované s alkalickou fosfatase (Sigma-Aldrich); **b)** stejné vzorky a uspořádání jako v případě a). Proteiny byly značeny pomocí primární polyklonální králičí protilátky anti-PVX CP (Prime Diagnostics) a sekundární kozí polyklonální anti-králičí protilátky konjugované s alkalickou fosfatase

(Sigma-Aldrich); **c**) PVX – purifikovaný PVX; XE7 - purifikovaný PVX E7-StrepII A; W (IL) – inokulované listy *N. benthamiana* infikované PVX E7-StrepII A; W (SL) – systémové listy *N. benthamiana* infikované PVX E7-StrepII A; HC (IL) – inokulované listy *N. benthamiana* HC-Pro infikované PVX E7-StrepII A; HC (SL) – systémové listy *N. benthamiana* HC-Pro infikované PVX E7-StrepII A; wX – systémové listy *N. benthamiana* infikované PVX; w – zdravá (neinfikovaná) *N. benthamiana*. Proteiny byly značeny pomocí primární monoklonální myší protilátky anti-StrepII tag (Qiagen) a sekundární kozí polyklonální anti-myší protilátky konjugované s alkalickou fosfatase (Sigma-Aldrich); **d**) stejné vzorky a uspořádání jako v případě c). Proteiny byly značeny pomocí primární polyklonální králičí protilátky anti-PVX CP (Prime Diagnostics) a sekundární kozí polyklonální anti-králičí protilátky konjugované s alkalickou fosfatase (Sigma-Aldrich). Proteiny byly detekovány pomocí chromogenního substrátu BCIP/NBT (Sigma-Aldrich).



Obr. 22 Mozaika tabáku *N. benthamiana* způsobená infekcí PVX StrepII-E7 A
Fotka systémového listu byla pořízena 15 dní po agroinfiltraci *N. benthamiana*. Stejně symptomy byly pozorovány i v případě infekce PVX E7-StrepII A.



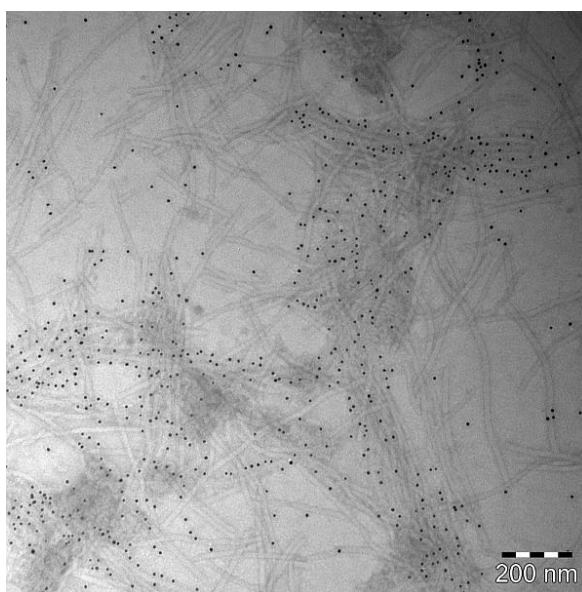
Obr. 23 Transmisní imunoelektronová mikroskopie virionů PVX E7-StrepII A

(A) Rostlinný extrakt z *N. benthamiana* infikované PVX E7-StrepII A. Virové částice jsou dvojité značeny: pomocí primární monoklonální myší protilátky anti-StrepII tag (Qiagen) a sekundární kozí polyklonální anti-myší protilátky konjugované s 10 nm zlatými částicemi (Sigma-Aldrich) + pomocí primární polyklonální králičí protilátky anti-PVX CP (Prime Diagnostic) a sekundární kozí polyklonální anti-králičí protilátky konjugované s 5 nm zlatými částicemi (Sigma-Aldrich). **(B)** Rostlinný extrakt z *N. benthamiana* infikované PVX (negativní kontrola). Značení bylo provedeno pomocí primární monoklonální myší protilátky anti-StrepII tag (Qiagen) a sekundární kozí polyklonální anti-myší protilátky konjugované s 10 nm zlatými částicemi (Sigma-Aldrich). Vzorky byly barveny 4% (w/v) molybdenem amonným (Erba Lachema) obsahujícím 0,1% (w/v) trehalosu (SERVA Electrophoresis GmbH).

Purifikace PVX E7-StrepII A

Virové částice PVX E7-StrepII A byly úspěšně purifikovány (Obr. 24 a 25, str. 83 a 84). Částice PVX E7-StrepII A byly purifikovány podle purifikačního protokolu PVX a výtěžky purifikace činily 25 mg/kg čerstvých listů *N. benthamiana* a 20 mg/kg čerstvých listů *N. benthamiana* HC-Pro. Výtěžky purifikací byly měřeny na základě celkové koncentrace proteinů v purifikátu (DC Protein Assay Kit; Bio-Rad) a v porovnání s výtěžky purifikace PVX, které činily 100-120 mg/kg čerstvých listů *N. benthamiana*, je výtěžek purifikace PVX E7-StrepII A přibližně 5-6x menší. V případě PVX StrepII-E7 A se virové částice purifikovat nepodařilo.

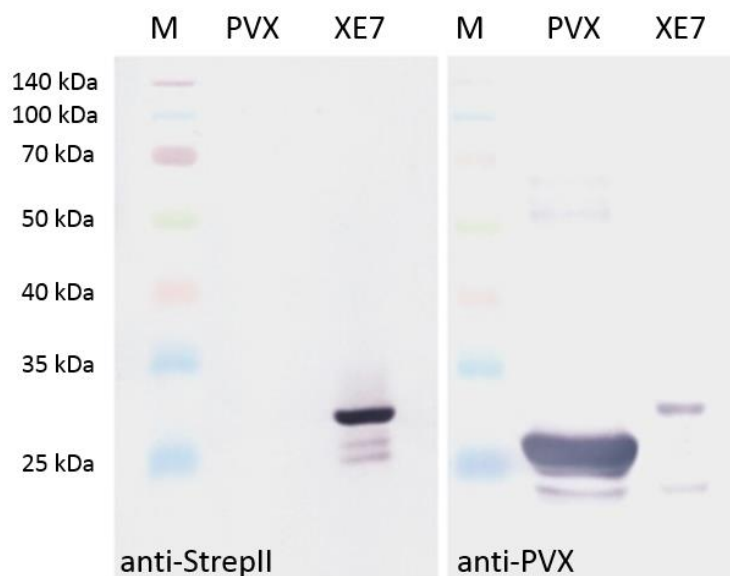
Purifikovaný PVX E7-StrepII A byl dále charakterizován z hlediska přítomnosti glykosylace. Bylo prokázáno, že ke glykosylaci PVX CP dochází i v případě přítomnosti inzertu E7-StrepII (Obr. 26, str. 85). Z purifikovaného PVX E7-StrepII A byla dále izolována celková RNA (RNAzol®RT; Molecular Research Center) a metodou RT-PCR (M-MLV Reverse Transcriptase – Promega; GoTaq®DNA polymerase – Promega) byla potvrzena přítomnost sekvence odpovídající E7-StrepII.



Obr. 24 Transmisní imunoelektronová mikroskopie purifikovaného PVX E7-StrepII A

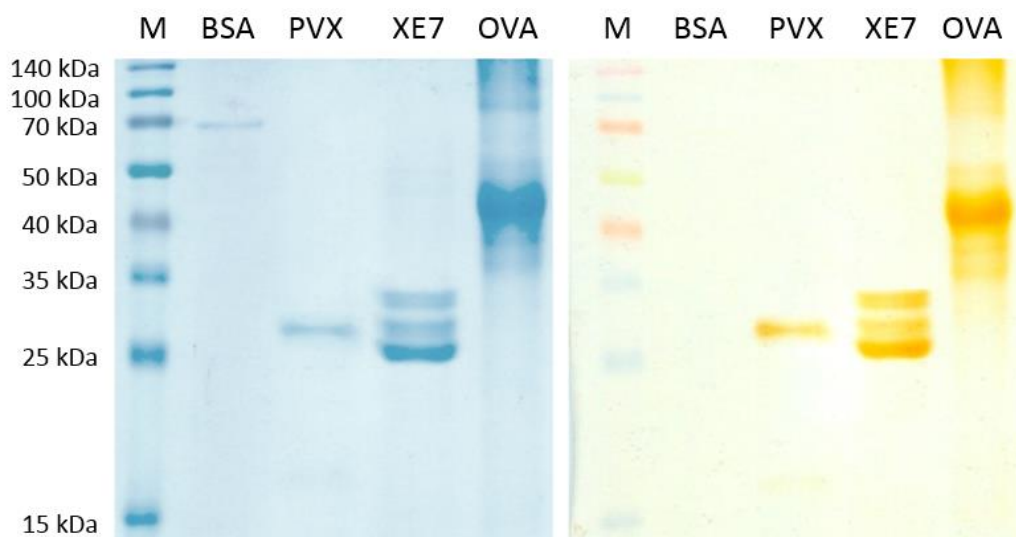
Virové částice byly purifikovány z *N. benthamiana* infikované PVX E7-StrepII A. Virové částice byly značeny pomocí primární monoklonální myší protilátky anti-StrepII tag

(Qiagen) a sekundární kozí polyklonální anti-myší protilátky konjugované s 10 nm zlatými částicemi (Sigma-Aldrich). Vzorek byl barven 4% (w/v) molybdenanem amonným (Erba Lachema) obsahujícím 0,1% (w/v) trehalosu (SERVA Electrophoresis GmbH).



Obr. 25 Western blot analýza (10% gel) purifikovaného PVX E7-StrepII A

M – proteinový standard: Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific); **PVX** – purifikovaný PVX (referenční vzorek); **XE7** – purifikovaný PVX E7-StrepII A. **anti-StrepII** - proteiny byly značeny primární monoklonální myší protilátkou anti-StrepII tag (Qiagen) a sekundární kozí polyklonální anti-myší protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatase (Sigma-Aldrich), **anti-PVX** – proteiny byly značeny primární polyklonální králičí protilátkou anti-PVX CP (Prime Diagnostics) a sekundární kozí polyklonální anti-králičí protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatase (Sigma-Aldrich). Proteiny byly detekovány pomocí chromogenního substrátu BCIP/NBT (Sigma-Aldrich).



Obr. 26 SDS-PAGE (10% gel) purifikovaného PVX a PVX E7-StrepII A a barvení glykoproteinů [135]

M – proteinový standard: Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific); **BSA** – bovinní sérový albumin (negativní kontrola pro barvení glykoproteinů); **PVX** – purifikovaný PVX; **XE7** – purifikovaný PVX E7-StrepII A; **OVA** – ovalbumin (pozitivní kontrola pro barvení glykoproteinů).

Imunizace myší purifikovaným PVX E7-StrepII A

Pro posouzení, zda jsou purifikované částice PVX E7-StrepII A schopné stimulovat myší adaptivní imunitu (T lymfocyty a B lymfocyty), byly myši C57BL/6 H-2^b (Charles River, Germany) subkutánně imunizovány purifikovaným PVX E7-StrepII A. Experimentální provedení a zpracování výsledků imunizace provedl RNDr. Michal Šmahel, Ph.D. (Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha, Česká republika).

Skupina myší (tři jedinci) byla třikrát v intervalu dvou týdnů subkutánně imunizována purifikovaným PVX E7-StrepII A (vždy po 0,5 mg purifikátu; celkem 1,5 mg na myš). Stejným způsobem byla purifikovaným PVX imunizována druhá skupina myší (negativní kontrola). Dalším skupinám myší bylo společně s daným purifikátem (PVX nebo

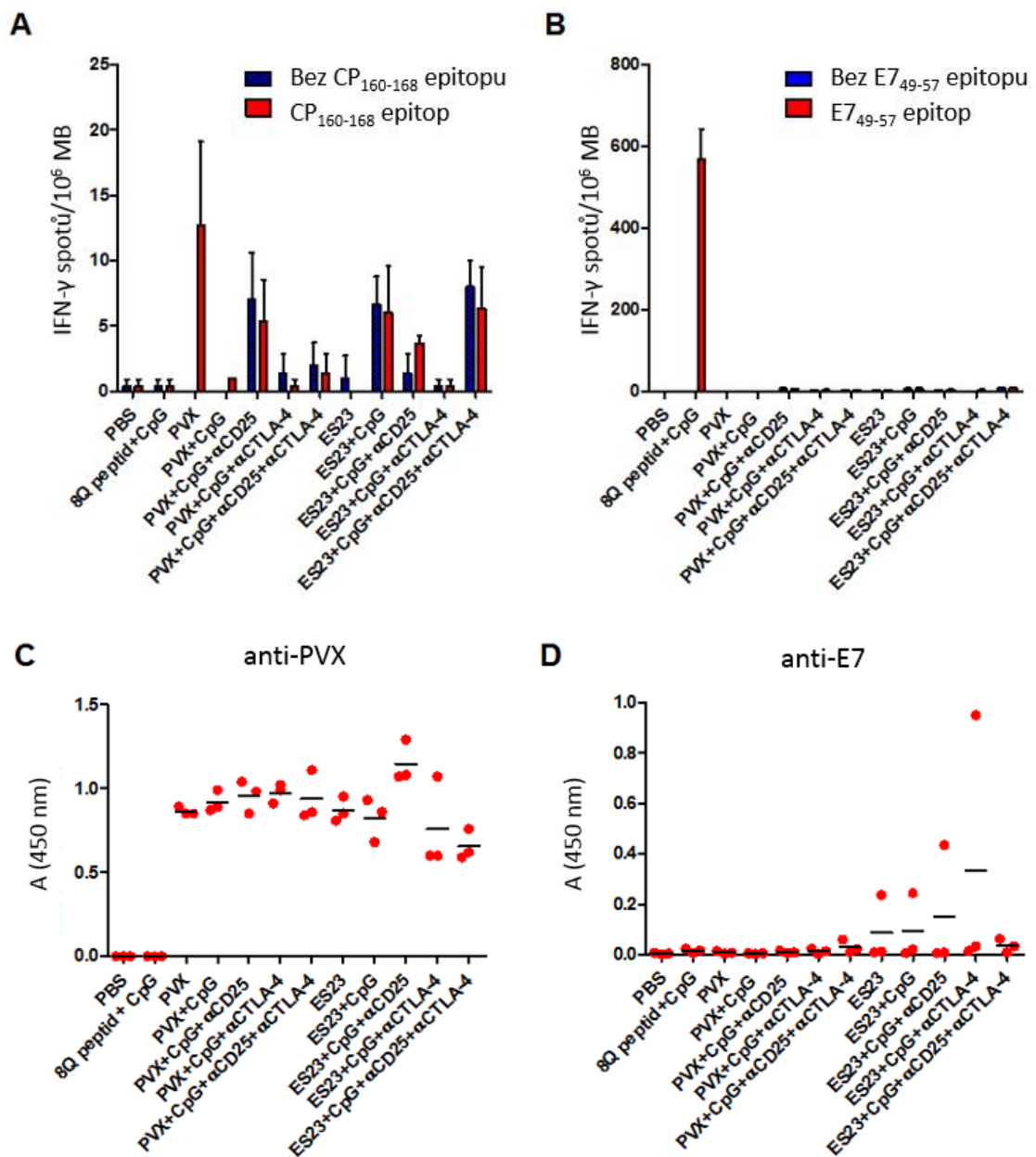
PVX E7-StrepII A) inokulováno i adjuvans CpG ODN (CpG oligodeoxynukleotidy; stimulují TLR9 – Toll-like receptor 9 exprimovaný především na plazmacytoidních dendritických buňkách a B lymfocytech, což vede k produkci CD4⁺ Th1 T lymfocytů a protilátek) [138, 139], protilátka proti α CD25 (inhibuje funkci IL-2 receptoru, což vede k omezení produkce regulačních T lymfocytů, které způsobují potlačení imunitní odpovědi) [140, 141] a/nebo protilátka proti CTLA-4 receptoru (inhibuje funkci CTLA-4 receptoru, což vede k podpoře aktivace CD8⁺ T lymfocytů) [142, 143]. Jako pozitivní kontrola pro stimulaci CD8⁺ T lymfocytů a CD4⁺ Th1 lymfocytů (hlavní zdroje interferonu gama; INF- γ) byla použita inokulace myši 8Q peptidem odvozeným od E7 onkoproteinu HPV 16 (E7₄₄₋₆₂; QAEPDRAHYNIVTFCKCD), který obsahuje epitop (E7₄₈₋₅₄; DRAHYNI) stimulující u myši T-buněčný receptor CD4⁺ Th1 lymfocytů a epitop (E7₄₉₋₅₇; RAHYNIVTF) stimulující u myši T-buněčný receptor CD8⁺ T lymfocytů [128-131]. Dva týdny po poslední imunizaci byly získány z myších splenocytů mononukleární buňky (MB; monocyty a lymfocyty). Mononukleární buňky byly přes noc inkubovány s peptidem odvozeným od PVX CP (CP₁₆₀₋₁₆₈; AAFDFFFNGV – vybrán na základě *in silico* analýzy; software NetCTLpan 1.1; jako kandidát pro stimulaci myších CD8⁺ T lymfocytů), s epitopem E7₄₉₋₅₇ nebo bez přítomnosti těchto epitopů (negativní kontrola). Následně byla metodou ELISPOT (enzyme-linked immunosorbent spot) detekována produkce INF- γ mononukleárními buňkami (Obr. 27A a B, str. 88). Dále pak byly z myších sér metodou ELISA detekovány protilátky proti PVX (anti-PVX) a proti E7GGG onkoproteinu HPV 16 (anti-E7; Obr. 27C a D, str. 88).

Na základě výsledků metody ELISPOT lze konstatovat, že PVX a PVX E7-StrepII A jsou schopny u myši stimulovat CD4⁺ Th1 a CD8⁺ T lymfocyty velmi slabě, až zanedbatelně. Také snaha podpořit stimulaci těchto T lymfocytů pomocí adjuvans (CpG ODN), deplecí regulačních T lymfocytů (protilátka proti α CD25) a inhibicí imunosupresivního receptoru CD8⁺ T lymfocytů (protilátka proti CTLA-4) nevedla k signifikantní aktivaci CD4⁺ Th1 a CD8⁺ T lymfocytů (respektive produkci INF- γ). V případě peptidu CP₁₆₀₋₁₆₈ lze konstatovat, že samotný PVX má velmi slabou schopnost stimulovat aktivaci CD4⁺ Th1 a CD8⁺ T lymfocytů (respektive produkci INF- γ).

Z výsledků metody ELISA je patrné, že samostatně inokulované PVX i PVX E7-StrepII A jsou schopné u myši stimulovat produkci protilátek proti PVX CP. Stejně

tomu tak je i v případě jejich kombinací s CpG ODN, α CD25 a α CTLA-4. Signál (absorbance) odpovídající přítomnosti protilátek proti E7GGG onkoproteinu (respektive E7 epitopu) byl detekován v jednom ze tří vzorků (myší) v případě imunizace PVX E7-StrepII A (a jeho kombinací s CpG ODN, CpG ODN + α CD25 a CpG + α CTLA-4), avšak tyto hodnoty nemohou být vzhledem k malému počtu vzorků (myší) považovány za relevantní. V případě imunizace PVX (a jeho kombinací s CpG ODN, α CD25 a α CTLA-4) protilátky proti E7GGG onkoproteinu detekovány nebyly.

Z uvedených výsledků lze učinit závěr, že PVX E7-StrepII A má u myší schopnost stimulovat protilátky proti PVX CP, avšak stimulace protilátek proti E7GGG onkoproteinu (respektive E7 epitopu) nelze vzhledem k malému počtu vzorků jednoznačně interpretovat. Z hlediska stimulace myších CD4+ Th1 a CD8+ T lymfocytů nedosahuje imunizace PVX E7-StrepII A významných výsledků.



Obr. 27 Imunogenita PVX a PVX E7-StrepII A (ES23) u myši měřena metodami ELISPOT (**A**, **B**) a ELISA (**C**, **D**). PBS – pufr PBS (Phosphate Buffered Saline); 8Q peptid – peptid E7₄₄₋₆₂ (44-62 AMK) odvozený od onkoproteinu E7 HPV16; CpG - adjuvans CpG ODN, αCD25 – protilátka proti IL-2 receptoru; αCTLA-4 - protilátka proti CTLA-4 receptoru; CP₁₆₀₋₁₆₈ – epitop odvozený od PVX CP (160-168 AMK), E7₄₉₋₅₇ – epitop (49-57 AMK) odvozený od E7 onkoproteinu HPV 16; ani-PVX – detekce protilátek proti PVX; anti-E7 – detekce protilátek proti E7GGG onkoproteinu HPV 16.

Kometová analýza

Kometovou analýzou bylo zjištěno, že infekce PVX poškozuje hostitelskou DNA rostlin *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. Poškození DNA bylo patrné jak u buněk mechanicky infikovaných listů, tak buněk systémových listů, přičemž stupeň poškození DNA byl největší u buněk mechanicky infikovaných listů a v případě systémových listů s jejich vzrůstající vzdáleností od mechanicky infikovaných listů klesal (Tab. 3, str. 90). Dále bylo zjištěno, že stupeň poškození hostitelské DNA vzrůstal s délkou kultivace infikovaných rostlin, a že buněčná DNA z oblasti řapíku (A) byla více poškozena, nežli buněčná DNA z koncové oblasti listu (B; Tab. 3, str. 90) [144].

Stupeň poškození DNA (procentuální zastoupení DNA v ohonu komety násobené délkou ohonu komety) u neinfikovaných rostlin se po celý čas pohyboval mezi 2 a 4 μm , zatímco v případě mechanicky infikovaných listů stupeň poškození DNA třetí den po infekci činil $6 \pm 0,8 \mu\text{m}$ a čtrnáctý den po infekci $75 \pm 1,6 \mu\text{m}$. Další dny (17. a 21.) po infekci nebylo možné mechanicky infikované listy analyzovat z důvodu jejich odumření. V případě systémových listů byla nejvíce poškozena DNA u systémového listu prvního vrchního rostlinného patra (počítáno od mechanicky infikovaného listu; tzv. 1. systémový list) a u dalších systémových listů v pořadí (2., 3. a 4. systémový list) mělo poškození buněčné DNA snižující se tendenci (Tab. 3, str. 90) [144].

Pro posouzení, zda stupeň poškození DNA v buňkách systémových listů souvisí s množstvím PVX v těchto listech, byly dvě rostliny *N. tabacum* cv. Xanthi infikovány PVX a byl stanoven stupeň poškození DNA společně s množstvím PVX v 1., 2., 3. a 4. systémovém listu (Tab. 4, str. 90). Pro vyjádření množství PVX v jednotlivých systémových listech byla použita metoda PTA-ELISA (provedla paní Renata Hadámková; Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i., Laboratoř virologie). Z naměřených dat vyplynulo, že stupeň poškození DNA v buňkách systémových listů odráží množství PVX přítomné v těchto listech [144].

Tab. 3 Analýza stupně poškození buněčné DNA rostliny *N. tabacum* cv. Xanthi infikované PVX. Stupeň poškození DNA je udáván jako průměr naměřených tzv. tail momentů (procentuální zastoupení DNA v ohonu komety násobené délkou ohonu komety) \pm směrodatná odchylka průměru (μm); vzorek = 150 – 200 analyzovaných genomových DNA. Pro určení statistických významností byla použita hladina významnosti $p < 0,05$. **A** = vzorek odebrán v oblasti řapíku; **B** = vzorek odebrán z koncové oblasti listu; * = statisticky významná hodnota; ++ = buněčná DNA nemohla být izolována z důvodu odumřelých listů; + = pro získání DNA byl použit celý list (z důvodu jeho malé velikosti). 1. systémový list - list prvního vrchního rostlinného patra (počítáno od mechanicky infikovaného listu)

Počet dní po infekci	Neinfikovaná rostlina	Mechanicky infikovaný list	1. systémový list		2. systémový list		3. systémový list		4. systémový list	
		A	A	B	A	B	A	B	A	B
3	2 \pm 0.5	6 \pm 0.8*	6 \pm 0.7*	3 \pm 0.4	3 \pm 0.5	4 \pm 0.3	4 \pm 0.5 ⁺	---	---	---
7	4 \pm 0.4	19 \pm 1.7*	10 \pm 1.1*	5 \pm 0.5	4 \pm 0.4	4 \pm 0.5	4 \pm 0.7	4 \pm 0.6	---	---
10	4 \pm 0.4	38 \pm 3.4*	25 \pm 0.9*	11 \pm 1.4*	12 \pm 1.2*	9 \pm 1.1*	8 \pm 0.8*	4 \pm 0.5	4 \pm 0.5	4 \pm 0.4
14	4 \pm 0.2	75 \pm 1.6*	35 \pm 3.8*	23 \pm 1.4*	22 \pm 1.4*	15 \pm 1.4*	12 \pm 1.0*	8 \pm 0.7*	7 \pm 1.1	4 \pm 0.6
17	3 \pm 0.4	++	43 \pm 1.8*	35 \pm 1.8*	34 \pm 2.1*	19 \pm 1.4*	15 \pm 1.8*	9 \pm 1.0*	7 \pm 1.2	6 \pm 1.0
21	3 \pm 0.4	++	41 \pm 1.5*	29 \pm 1.9*	19 \pm 1.0*	15 \pm 0.9*	16 \pm 1.3*	12 \pm 1.2*	10 \pm 1.2*	5 \pm 0.4

Tab. 4 Porovnání stupně poškození buněčné DNA systémových listů *N. tabacum* cv. Xanthi třetí týden po mechanické infekci PVX s množstvím PVX v těchto listech. Vzorky byly odebrány v oblasti řapíku. Vzorek = 150 – 200 analyzovaných genomových DNA. Stupeň poškození DNA je udáván jako průměr naměřených tzv. tail momentů (procentuální zastoupení DNA v ohonu komety násobené délkou ohonu) \pm směrodatná odchylka průměru (μm); Infekce PVX – rostliny infikované PVX; Zdravá – neinfikovaná rostlina; PTA-ELISA – detekce PVX metodou PTA-ELISA (absorbance při 405 nm); 1. systémový list - list prvního vrchního rostlinného patra (počítáno od mechanicky infikovaného listu)

	Stupeň poškození DNA / μm		PTA-ELISA / A (405 nm)	
	Infekce PVX	Zdravá	Infekce PVX	Zdravá
1. systémový list	46,1 \pm 4,2	4,8 \pm 0,8	1,32 \pm 0,07	0
2. systémový list	32,8 \pm 2,1	4,9 \pm 0,2	1,02 \pm 0,06	0
3. systémový list	17,5 \pm 1,3	4,1 \pm 0,5	0,66 \pm 0,08	0
4. systémový list	15,0 \pm 2,3	4,0 \pm 0,4	0,24 \pm 0,01	0

5. Diskuse

Expres modifikovaných PVX CP v bakteriích

Výsledky expresí PVX CP 6xHis-E7/E7-6xHis A/B/C/D/E/F/G a PVX CP StrepII-E7/E7-StrepII A/B/C/D/E/F/G v *E. coli* MC1061 ukazují, že ve srovnání s 6xHis kotvou, užití StrepII kotvy přispívá ke zvýšení rozpustnosti exprimovaných proteinů. Zejména se jedná o konstrukty PVX CP modifikovaných v místech B, E, F a G, kde v případě konstruktů obsahujících 6xHis kotvu dochází pouze k produkci nerozpustných proteinových agregátů (Obr. 16, str. 68-69), zatímco v případě konstruktů obsahujících StrepII kotvu jsou proteiny produkovány i v solubilní formě. Negativní vliv 6xHis kotvy na rozpustnost rekombinantních proteinů produkovanych v *E. coli* byl v případě některých proteinů již popsán [145, 146] a toto snížení rozpustnosti proteinů v přítomnosti 6xHis kotvy může být vysvětleno například přítomností slabého pozitivního náboje, kterého histidin ($pI = 7.59$) při fyziologickém pH (7.2 – 7.4) nabývá.

Rozpustnost exprimovaných proteinů v bakteriích může být ovlivněna, mimo jiné, rychlostí produkce exprimovaných proteinů [147]. V našem případě jsme pro ovlivnění rychlosti produkce proteinů využili expresi při nižší teplotě (22 °C), než je standardní teplota exprese (37 °C) pro použité kmeny *E. coli*. Při nižších teplotách exprese dochází k redukci tvorby proteinových agregátů v důsledku snížení rychlosti proteosyntézy a kinetiky skládání proteinů a v některých případech také dochází ke snížení aktivity proteas teplotního šoku (heat shock proteases), které jsou indukovány při nadměrné produkci proteinů v *E. coli* [147, 148]. V našem případě můžeme mluvit pouze o kvalitativním porovnání přítomnosti proteinů v rozpustné/nerozpustné frakci a z tohoto pohledu nedochází při snížení teploty exprese (z 37 °C na 22 °C) ke změně přítomnosti/nepřítomnosti daného modifikovaného PVX CP v rozpustné/nerozpustné frakci.

Tvorba VLP a virových částic v bakteriích

Na základě předchozích studií bylo prokázáno, že PVX CP exprimovaný v *E. coli* má schopnost při inkubaci s PVX RNA (skládání *in vitro*) tvořit virové částice, avšak nemá schopnost tvořit VLP [149, 150]. Tato skutečnost však nutně nevylučuje tvorbu VLP odvozených od modifikovaných PVX CP v *E. coli*, jak bylo ukázáno v naší laboratoři [86]. Proto byla přítomnost VLP odvozených od PVX CP 6xHis-E7/E7-6xHis A/B/C/D/E/F/G a PVX CP StrepII-E7/E7-StrepII A/B/C/D/E/F/G exprimovaných v *E. coli* MC1061 ověřena pomocí transmisní imunoelektronové mikroskopie.

Pouze v případě exprese PVX CP 6xHis-E7 A byly v rozpustných frakcích detekovány proteinové agregáty připomínající VLP, které bylo možné značit primární monoklonální myší protilátkou anti-His i primární polyklonální králičí protilátkou anti-PVX CP (Obr. 17, str. 71) [136].

Zatímco PVX CP produkovaný v *E. coli* nemá schopnost v bakteriích tvořit VLP, v přítomnosti PVX RNA (*in vitro* skládání) dochází k tvorbě virových částic [150]. Této skutečnosti bylo využito v případě PVX CP StrepII-E7/E7-StrepII A/B/C/D/E/F/G, kde byla transmisní imunoelektronovou mikroskopií potvrzena přítomnost virových částic odvozených od PVX CP StrepII-E7 A a od PVX CP E7-StrepII A (Obr. 19, str. 76).

Vzhledem k faktu, že při *in vitro* skládání je pro tvorbu částic vyžadována purifikace jak bakteriálně produkovaných proteinů PVX CP, tak purifikace PVX RNA z PVX (případně její *in vitro* transkripce), byla navržena hypotéza, zda není možné produkovat virové částice odvozené od PVX v bakteriích ko-exprimujících PVX CP i PVX RNA. Pro expresi byly použity buňky *E. coli* BL21(DE3) nesoucí translační plazmid pETDuet-1 (exprimující PVX CP, PVX CP StrepII-E7 A nebo PVX CP E7-StrepII A) a transkripční vektor pACYCDuet-1 (produkující PVX RNA nebo prvních tisíc nukleotidů PVX RNA – enkapsidační signál je pravděpodobně lokalizován na prvních 300 nukleotidech [7, 150]). Na základě transmisní imunoelektronové mikroskopie bylo potvrzeno, že v tomto bakteriálním systému nemá schopnost PVX CP (i PVX CP StrepII-E7 A a PVX CP E7-StrepII A) tvořit virové částice ani VLP. Tato skutečnost může být způsobena faktem, že bakteriálně produkovaná PVX RNA postrádá 5' čepičku (5' cap structure), neboť nedávný výzkum *in vitro* skládání virových částic odvozených od bakteriálně produkovaného PVX CP prokázal, že pro tvorbu virových částic je nutná pouze přítomnost 5' čepičky a nezáleží na sekvenci obalované RNA [151].

Transientní exprese modifikovaných PVX CP v rostlinách

Western blot analýzou vzorků rostlinných extraktů byly detekovány nejen monomerní formy PVX CP 6xHis-E7/E7-6xHis A a PVX CP StrepII-E7/E7-StrepII A, ale také jejich oligomery (Obr. 18 a 21, str. 73 a 80) [137]. Tato skutečnost je překvapující vzhledem ke skutečnosti, že SDS-PAGE byla provedena v redukujícím prostředí. Tyto oligomerní formy proteinů nebylo možné odstranit ani přidáním nadbytku (10% v/v oproti 5% v/v) redukčního činidla (TCEP nebo 2-merkptoethanol). Za možné vysvětlení lze považovat přítomnost většího množství proteinů obsahujících cystinové můstky v rostlinném extraktu (například thioredoxiny a glutaredoxiny [152]), s kterými redukční činidlo přednostně reaguje, případně skutečnost, že jsou rostlinné viry v rostlině často asociovány s intracelulárními membránami ve formě replikačních komplexů, které nemusely být za použitých denaturačních podmínek (teplota, složení vzorkového pufru) plně separovány na jednotlivé složky [25, 153]. Obdobné oligomerní struktury jsou přítomny i při analýze vzorků představujících rostlinné extrakty připravené z PVX infikovaných rostlin. S největší pravděpodobností by bylo možné oligomerní struktury odstranit optimalizací vzorkového pufru (například zvýšením koncentrace SDS, dalším zvýšením koncentrace redukčního činidla nebo použitím močoviny jako denaturačního činidla), nicméně vzhledem k faktu, že rostlinné extrakty byly použity pouze pro prokázání přítomnosti/nepřítomnosti modifikovaných PVX CP a vzhledem ke skutečnosti, že tyto oligomerní struktury nejsou přítomny v purifikovaných PVX a PVX E7-StrepII A (Obr. 25, str. 84), nebyla optimalizace vzorkového pufru prováděna.

Tvorba modifikovaných PVX v rostlinách

Transmisní imunoelektronovou mikroskopií bylo prokázáno, že i když jsou proteiny PVX CP 6xHis-E7 A a PVX CP E7-6xHis A přítomny v inokulovaných i systémových listech (Obr. 18, str. 73), není možné v rostlinách detekovat virové částice [137]. Vzhledem ke skutečnosti, že systémový transport PVX vyžaduje tvorbu virových částic [80], lze učinit závěr, že virové částice PVX CP 6xHis-E7 A a PVX CP E7-6xHis A v rostlině

vznikají, avšak jsou velmi nestabilní - rozpadají se při přípravě vzorků na transmisní imunoelektronovou mikroskopii a také při snaze o jejich purifikaci.

Zatímco v případě transientní exprese PVX CP 6xHis-E7 A a PVX CP E7-6xHis A virové částice detekovány nebyly, po záměně 6xHis kotvy za StreptII kotvu již detekovány byly (Obr. 23, str. 82) [137]. Je tedy zřejmé, že StreptII kotva v místě A neovlivňuje negativně stabilitu virových částic, jako je tomu v případě přítomnosti 6xHis kotvy v místě A. Obě kotvy jsou v molekulární biologii běžně používány z důvodu jejich malé interference se skládáním fúzovaného proteinu, avšak tento efekt musí být vždy experimentálně ověřen. Vliv His kotvy (6xHis nebo 10xHis kotvy) na produkci virových částic odvozených od PVX CP byl doposud studován pouze u bakteriálně produkovaných PVX CP na základě *in vitro* skládání s PVX RNA. Výsledky těchto dvou studií ukazují, že zatímco přítomnost 10xHis kotvy na N-konci PVX CP (společně s Myc kotvou) neinterferuje s tvorbou virových částic *in vitro* [150], tak samotná přítomnost 6xHis kotvy na N-konci PVX CP zabraňuje tvorbě virových částic *in vitro* [154].

Při našem experimentu byl poprvé posouzen vliv 6xHis kotvy na interferenci se skládáním virových částic, případně na stabilitu virových částic v rostlině. Z výsledků (nahrazení kotvy 6xHis kotvou StreptII) lze říci, že právě přítomnost 6xHis kotvy v místě A je zdrojem nestability virových částic [137].

Imunogenita PVX E7-StreptII A

Jednou z výhod peptid prezentujícího systému založeného na rostlinném viru je jeho schopnost efektivně dopravovat peptidy (například epitopy) do dendritických buněk. Tato skutečnost je způsobena vlastností dendritických buněk preferenčně fagocytovat částice o velikosti virů (přibližně 20 – 500 nm) [155, 156]. Samotný epitop se navíc na virové částici vyskytuje v několika stech až tisících kopiích (podle počtu kopií kapsidového proteinu viru) a rostlinný virus tak může sloužit jako platforma pro doručení epitopů (obecně antigenů) do dendritických buněk - hlavních antigen prezentujících buněk imunitního systému [157, 158]. Tento efekt byl u modifikovaných rostlinných virů (například TMV, CPMV, PVX, CMV a BeYDV) již několikrát experimentálně potvrzen na zvířatech a to jak při injekčním, intranasálním, tak i orálním podání [159]. V případě

použití modifikovaného PVX byla u myší stimulována nejen humorální [160], ale také buněčná adaptivní imunita [161].

V našem případě byl purifikovaný PVX E7-StreptII A podáván myším subkutánně a to jak samostatně, tak i v kombinaci s dalšími imunomodulačními látkami (Obr. 27, str. 88). Purifikované virové částice, ať už samotné nebo v kombinaci s imunomodulátory, neměly bohužel schopnost aktivovat CD4+ Th1 a CD8+ T lymfocyty (Obr. 27B, str. 88). Nedochozí tedy ke stimulaci CD8+ T lymfocytů, které hrají podstatnou roli v odstranění buněk infikovaných HPV. Vzhledem k faktu, že přesné molekulární mechanismy účinku vakcín (tedy proč určitá vakcína funguje, zatímco jiná nikoli) nejsou detailně známy, je v současnosti vývoj vakcín stále nesnadný. Ze stejného důvodu je obtížné získané výsledky i diskutovat. Je možné, že za neschopnost stimulace T lymfocytů specifických vůči E7 epitopu může přítomnost nevhodného adjuvans (CpG ODN), samotného epitopu v kombinaci s PVX, případně aplikace malého množství purifikovaného viru, nicméně bez dalších studií a obecně pochopení molekulárního mechanismu funkce vakcín není možné tento výsledek diskutovat bez větších spekulací.

Stimulace plazmocytů produkujících protilátky rozeznávající E7 epitop (respektive E7GGG onkoprotein HPV 16) byla potvrzena vždy pouze u jedné ze tří myší (Obr. 27D, str. 88) a není proto možné data jednoznačně interpretovat. Pro potvrzení či vyvrácení přítomnosti protilátek bude nutné provést opakované imunologické studie s větším souborem myší. Stimulace CD4+ Th1 a CD8+ T lymfocytů rozpoznávající CP₁₆₀₋₁₆₈ epitop byla slabě detekována u samostatně inokulovaného PVX (Obr. 27A, str. 88), zatímco u ostatních vzorků byla pozitivní i odpovídající negativní kontrola (inkubace MB bez CP₁₆₀₋₁₆₈ epitopu). Celkově jsou naměřené hodnoty velmi nízké a je tedy možné říci, že stimulace CD4+ Th1 a CD8+ T lymfocytů rozeznávající CP₁₆₀₋₁₆₈ epitop není signifikantní.

Kometová analýza

Výsledky kometové analýzy provedené na rostlinách *N. tabacum* cv. Xanthi infikovaných PVX prokázaly, že infekce PVX způsobuje poškození rostlinné DNA, a že stupeň tohoto poškození odpovídá množství PVX (Tab. 3 a 4, str. 90) [144].

Mechanismus, kterým dochází v důsledku infekce PVX k poškození rostlinné DNA není znám a hypoteticky může být přímý nebo nepřímý. Přímým mechanismem je myšlena například přímá interakce mezi PVX (resp. jeho částí, například proteinem) a buněčným proteinem (v jádru nebo cytoplazmě), která vede k poškození rostlinné DNA a to molekulárními dráhami, které nejsou součástí obranného mechanismu rostliny. V případě nepřímého mechanismu by pak docházelo k poškození rostlinné DNA v důsledku obranné reakce rostliny (například prostřednictvím reaktivních kyslíkových intermediátů).

I když není možné ani jeden navrhovaný mechanismus potvrdit nebo vyvrátit, bylo publikováno, že v případě infekce *Arabidopsis thaliana* bakterií *Pseudomonas fluorescens* právě obranná odpověď rostliny zabraňuje vzniku/opravuje vzniklé dvouřetězcové zlomy v rostlinné DNA [124].

6. Závěr

Rostlinné viry byly objeveny před více než 120 lety a mimo roli patogenů zastávají v současnosti, především díky rozvoji biochemie a molekulární biologie, i důležitou roli v biotechnologii. Jedním z nejzajímavějších a publikačně nejzastoupenějších využití rostlinných virů je příprava vakcín. I přesto, že se začátek výzkumu na tomto poli datuje do roku 1993, kdy byl v rostlinných protoplastech připraven CPMV nesoucí na svém povrchu epitop viru slintavky a kulhavky [162], do širšího povědomí se využití rostlinných virů pro produkci vakcín dostalo až v roce 2014. V souvislosti s tehdy masivně probíhající epidemií Eboly v Západní Africe, se pozornost médií zaměřila na experimentální terapeutickou vakcínu ZMapp, jejíž účinnou složkou jsou tři monoklonální protilátky produkované v rostlinách *N. benthamiana* pomocí virových vektorů odvozených od TMV a PVX [163, 164].

Hlavní téma předkládané disertační práce se zabývá využitím PVX jako antigen prezentujícího systému s cílem nalezení nových míst v PVX CP, které by byly vhodné pro vkládání antigenů za účelem jejich prezentace na povrchu částic PVX. Na základě strukturního modelu PVX CP ve virionu (Obr. 13, str. 49) bylo vybráno celkem sedm pozic (A, B, C, D, E, F a G), do kterých byl vložen E7 epitop ve fúzi s 6xHis nebo StrepII kotvou. E7 epitop byl použit díky své schopnosti stimulovat myší buněčnou adaptivní imunitu [128-131], která by v kombinaci s antigen prezentujícím systémem PVX mohla vést k přípravě terapeutické vakcíny proti HPV 16.

Dalším cílem disertační práce bylo metodou kometové analýzy posoudit, zda u tabáku *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi dochází při infekci PVX k poškození hostitelské DNA.

Nejdůležitější poznatky, kterých bylo v průběhu řešení disertační práce dosaženo jsou uvedeny níže:

1) Expresse modifikovaných PVX CP v bakteriích

Všechny modifikované PVX CP bylo možné úspěšně exprimovat v *E. coli* MC1061 a produkce těchto proteinů tedy nebyla pro bakterie toxická.

Při expresi modifikovaných PVX CP v *E. coli* MC1061 bylo prokázáno, že záměna 6xHis kotvy za StrepII kotvu ovlivňuje (zvyšuje) rozpustnost produkovaných proteinů.

Žádný z modifikovaných PVX CP neměl schopnost tvořit VLP. Pouze v případě PVX CP 6xHis-E7 A byly detekovány struktury připomínající VLP.

Bylo potvrzeno, že pouze PVX CP s inzertem StrepII-E7 nebo E7-StrepII vloženým do místa A (pozice mezi 24. a 25. AMK v PVX CP) tvoří v přítomnosti PVX RNA virové částice prezentující inzert na svém povrchu.

2) Expese modifikovaných PVX CP v rostlinách

Pouze PVX CP s inzerty vloženými do místa A bylo možné produkovat v *N. benthamiana* i *N. benthamiana* HC-Pro a to jak v inokulovaných, tak v systémových listech.

PVX CP s inzerty vloženými do míst B, C, D, E, F a G byly v průběhu exprese degradovány a byly detekovány pouze v inokulovaných listech - bez přítomnosti inzertu.

Bylo prokázáno, že 6xHis kotva ovlivňuje stabilitu virových částic. Při expresi PVX CP 6xHis-E7 A a PVX CP E7-6xHis A nebylo možné detekovat virové částice, avšak po nahrazení 6xHis kotvy za StrepII kotvu byly virové částice detekovány.

Virové částice PVX StrepII-E7 A a PVX E7-StrepII A bylo možné značit protilátkou rozeznávající PVX CP i protilátkou rozeznávající StrepII kotvu, což indikuje přítomnost inzertu na povrchu částic.

Uspořádání inzertu (StrepII-E7 vs. E7-StrepII) ovlivňuje stabilitu produkovaných virových částic při jejich purifikaci. Zatímco virové částice PVX E7-StrepII A bylo možné z rostlin purifikovat ve výtěžku 20 – 25 mg/kg čerstvých listů, virové částice PVX StrepII-E7 A nebylo možné purifikovat z důvodu jejich nestability.

Purifikované virové částice PVX E7-StrepII A nemají schopnost u myší stimulovat buněčnou adaptivní imunitu. Stimulace protilátek rozeznávající E7 epitop byla detekována pouze u některých myší.

3) Poškození rostlinné DNA při infekci PVX

Kometovou analýzou provedenou na rostlinách *N. tabacum* cv. Xanthi infikovaných PVX bylo prokázáno, že infekce PVX způsobuje poškození rostlinné DNA, a že stupeň tohoto poškození odpovídá množství PVX.

Shrnutí

Byla nalezena nová pozice v PVX CP (místo A), která je vhodným kandidátem pro vkládání antigenů za účelem přípravy PVX antigen prezentujících systémů (experimentálních vakcín). Místo A je v sekvenci PVX CP lokalizováno mezi 24. a 25. aminokyselinou.

Infekce PVX v případě rostliny *N. tabacum* cv. Xanthi způsobuje poškození hostitelské DNA a stupeň tohoto poškození odpovídá množství PVX.

7. Literatura

- [1] Dědič, P. *Hlavní virové choroby bramboru v ČR*; Havlíčkův Brod: Výzkumný ústav bramborářský, 2014.
- [2] Garcia, J. A.; Glasa, M.; Cambra, M.; Candresse, T. Plum pox virus and sharka: a model potyvirus and a major disease. *Mol Plant Pathol* **2014**, *15*, 226–241.
- [3] Scholthof, K. B.; Mirkov, T. E.; Scholthof, H. B. Plant virus gene vectors: biotechnology applications in agriculture and medicine. *Genet Eng (N Y)* **2002**, *24*, 67–85.
- [4] Hefferon, K. L. Plant virus expression vectors set the stage as production platforms for biopharmaceutical proteins. *Virology* **2012**, *433*, 1–6.
- [5] Yusibov, V. M.; Mamedov, T. G. Plants as an Alternative System for Expression of Vaccine Antigens. *Proceeding of ANAS (Biological Sciences)* **2010**, *65*, 195–200.
- [6] Namba, K.; Pattanayek, R.; Stubbs, G. Visualization of protein-nucleic acid interactions in a virus. Refined structure of intact tobacco mosaic virus at 2.9 Å resolution by X-ray fiber diffraction. *J Mol Biol* **1989**, *208*, 307–325.
- [7] Verchot-Lubicz, J.; Ye, C. M.; Bamunusinghe, D. Molecular biology of potexviruses: recent advances. *J Gen Virol* **2007**, *88*, 1643–1655.
- [8] Riechmann, J. L.; Lain, S.; Garcia, J. A. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J Gen Virol* **1992**, *73*, 1–16.
- [9] Canto, T.; Prior, D. A.; Hellwald, K. H.; Oparka, K. J.; Palukaitis, P. Characterization of cucumber mosaic virus. IV. Movement protein and coat protein are both essential for cell-to-cell movement of cucumber mosaic virus. *Virology* **1997**, *237*, 237–248.
- [10] Lin, T.; Chen, Z.; Usha, R.; Stauffacher, C. V.; Dai, J. B.; Schmidt, T.; Johnson, J. E. The refined crystal structure of cowpea mosaic virus at 2.8 Å resolution. *Virology* **1999**, *265*, 20–34.

- [11] Lu, G.; Zhou, Z. H.; Baker, M. L.; Jakana, J.; Cai, D.; Wei, X.; Chen, S.; Gu, X.; Chiu, W. Structure of double-shelled rice dwarf virus. *J Virol* **1998**, *72*, 8541–8549.
- [12] Best, R. J. Tomato Spotted Wilt Virus. *Adv Virus Res* **1968**, *13*, 65–146.
- [13] Kormelink, R.; Haan, P.; Meurs, C.; Peters, D.; Goldbach, R. The nucleotide sequence of the M RNA segment of tomato spotted wilt virus, a bunyavirus with two ambisense RNA segments. *J Gen Virol* **1992**, *73*, 2795–2804.
- [14] Suzuki, N. Molecular analysis of the rice dwarf virus genome. *Semin Virol* **1995**, *6*, 89–95.
- [15] Burns, T. M.; Harding, R. M.; Dale, J. L. The genome organization of banana bunchy top virus: analysis of six ssDNA components. *J Gen Virol* **1995**, *76*, 1471–1482.
- [16] AAAS.org. <http://news.sciencemag.org/2002/04/diverse-viruses-may-have-common-ancestor> (cit. 16. březen 2015).
- [17] PRG. http://prgdb.crg.eu/wiki/Species:Potato_virus_X (cit. 16. březen 2015)
- [18] Plant Viruses Online. <http://pvo.bio-mirror.cn/images/a6.jpg> (cit. 16. březen 2015)
- [19] ProMusa. <http://www.promusa.org/Banana+streak+viruses> (cit. 16. březen 2015)
- [20] ICTVdB. <http://ictvdb.bio-mirror.cn/Images/Milne/gemini2.htm> (cit. 16. březen 2015)
- [21] Andret-Link, P.; Fuchs, M. Transmission specificity of plant viruses by vectors. *J Plant Pathol* **2005**, *87*, 153–165.
- [22] Sacristán, S.; Díaz, M.; Fraile, A.; García-Arenal, F. Contact Transmission of Tobacco Mosaic Virus: a Quantitative Analysis of Parameters Relevant for Virus Evolution. *J Virol* **2011**, *85*, 4974–4981.
- [23] Johansen, E.; Edwards, M. C.; Hampton, R. O. Seed Transmission of Viruses: Current Perspectives. *Annu Rev Phytopathol* **1994**, *32*, 363–386.
- [24] Card, S. D.; Pearson, M. N.; Clover, R. G. Plant pathogens transmitted by pollen. *Australas Plant Path* **2007**, *36*, 455–461.

- [25] Caranta, C., Aranda, M. A., Tepfer, M., Lopez-Moya, J. J., Eds. *Recent Advances in Plant Virology*, 1st ed.; Caister Academic Press: UK, 2011.
- [26] Nikan, J. Assessment of some potato cultivars and genotypes for resistance to potato leafroll virus. *JPPS* **2014**, *1*, 44–53.
- [27] Miyazaki, N.; Nakagawa, A.; Iwasaki, K. Life cycle of phyto-reoviruses visualized by electron microscopy and tomography. *Front Microbiol* **2014**, *4*:306 doi: 10.3389/fmicb.2013.00306
- [28] Lucas, W. J. Plant viral movement proteins: Agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology* **2006**, *344*, 169–184.
- [29] Melcher, U. The ‘30K’ superfamily of viral movement proteins. *J Gen Virol* **2000**, *81*, 257–266.
- [30] Navarro, J. A.; Genovés, A.; Climent, J.; Saurí, A.; Martínez-Gil, L.; Mingarro, I.; Pallás, V. RNA-binding properties and membrane insertion of Melon necrotic spot virus (MNSV) double gene block movement proteins. *Virology* **2006**, *356*, 57–67.
- [31] Morozov, S. Y.; Solovyev, A. G. Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. *J Gen Virol* **2003**, *84*, 1351–1366.
- [32] Rojas, M. R.; Zerbini, F. M.; Allison, R. F.; Gilbertson, R. L.; Lucas, W. J. Capsid Protein and Helper Component-Proteinase Function as Potyvirus Cell-to-Cell Movement Proteins. *Virology* **1997**, *237*, 283–295.
- [33] Voinnet, O. RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet* **2001**, *17*, 449–459.
- [34] Pooggin, M.; Shivaprasad, P. V.; Veluthambi, K.; Hohn, T. RNAi targeting of DNA virus in plants. *Nat Biotechnol* **2003**, *21*, 131–132.
- [35] Hutvagner, G.; Zamore, P. D. RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev* **2002**, *12*, 225–232.

- [36] Carthew, R. W.; Sontheimer, E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **2009**, *136*, 642–655.
- [37] Sarkies, P.; Miska, E. A. Small RNAs break out: the molecular cell biology of mobile small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2014**, *15*, 525–535.
- [38] Burgyán, J.; Havelda, Z. Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci* **2011**, *16*, 265–272.
- [39] Ronde, D.; Butterbach, P.; Kormelink, R. Dominant resistance against plant viruses. *Front Plant Sci* **2014**, *5*, 1–17.
- [40] Iakimova, E. T.; Michalczuk, L.; Woltering, E. J. Hypersensitive cell death in plants – its mechanisms and role in plant defence against pathogens. *J Fruit Ornament Plant Res* **2005**, *13*, 135–158.
- [41] Conrath, U. Systemic Acquired Resistance. *Plant Signal Behav* **2006**, *1*, 179–184.
- [42] Sansregret, R.; Dufour, V.; Langlois, M.; Daayf, F.; Dunoyer, P.; Voinnet, O.; Bouarab, K. Extreme Resistance as a Host Counter-counter Defense against Viral Suppression of RNA Silencing. *PLoS Pathog* **2013**, *9*, 1–14.
- [43] Soosaar, J. L.; Burch-Smith, T. M.; Dinesh-Kumar, S. P. Mechanisms of plant resistance to viruses. *Nat Rev Microbiol* **2005**, *3*, 789–798.
- [44] Truniger, V.; Aranda, M. A. Recessive resistance to plant viruses. *Adv Virus Res* **2009**, *75*, 119–159.
- [45] Zhang, D. Plant seed-derived human transferrin: expression, characterisation and applications. *OA Biotechnology* **2013**, *2*, 1–6.
- [46] Krishnan, A., Susan L. W. TrypZean™: An Animal-Free Alternative to Bovine Trypsin. *Biotechnol Agric For* **2014**, *68*, 43–63.
- [47] Grabowski, G. A.; Golembo, M.; Shaaltiel, Y. Taliglucerase alfa: an enzyme replacement therapy using plant cell expression technology. *Mol Genet Metab* **2014**, *112*, 1–8.

- [48] Gomord, V.; Fitchette, A.; Menu-Bouaouiche, L.; Saint-Jore-Dupas, C.; Plasson, C.; Michaud, D.; Faye, L. Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. *Plant Biotechnol J* **2010**, *8*, 564–587.
- [49] Bardor, M.; Faveeuw, C.; Fitchette, A. C.; Gilbert, D.; Galas, L.; Trottein, F.; Faye, L.; Lerouge, P. Immunoreactivity in mammals of two typical plant glyco-epitopes, core alpha(1,3)-fucose and core xylose. *Glycobiology* **2003**, *13*, 427–434.
- [50] Tekoah, Y.; Tzaban, S.; Kizhner, T.; Hainrichson, M.; Gantman, A.; Golembo, M.; Aviezer, D.; Shaaltiel, Y. Glycosylation and functionality of recombinant β -glucocerebrosidase from various production systems. *Biosci Rep* **2013**, *33*, 771–781.
- [51] Lee, J. S.; Ha, T. K.; Lee, S. J.; Lee, G. M. Current state and perspectives on erythropoietin production. *Appl Microbiol Biotechnol* **2012**, *95*, 1405–1416.
- [52] Strasser, R.; Stadlmann, J.; Schähs, M.; Stiegler, G.; Quendler, H.; Mach, L.; Glössl, J.; Weterings, K.; Pabst, M.; Steinkellner, H. Generation of glyco-engineered *Nicotiana benthamiana* for the production of monoclonal antibodies with a homogeneous human-like N-glycan structure. *Plant Biotechnol J* **2008**, *6*, 392–402.
- [53] Jez, J.; Castilho, A.; Grass, J.; Vorauer-Uhl, K.; Sterovsky, T.; Altmann, F.; Steinkellner, H. Expression of functionally active sialylated human erythropoietin in plants. *Biotechnol J* **2013**, *8*, 371–382.
- [54] Strasser, R. Engineering of human-type O-glycosylation in *Nicotiana benthamiana* plants. *Bioengineered* **2013**, *4*, 191–196.
- [55] Garabagi, F.; McLean, M. D.; Hall, J. C. Transient and Stable Expression of Antibodies in *Nicotiana* Species. *Methods Mol Biol* **2012**, *907*, 389–408.
- [56] Kikkert, J. R.; Vidal, J. R.; Reisch, B. I. Stable transformation of plant cells by particle bombardment/biolistics. *Methods Mol Biol* **2005**, *286*, 61–78.
- [57] Scotti, N.; Rigano, M. M.; Cardi, T. Production of foreign proteins using plastid transformation. *Biotechnol Adv* **2012**, *30*, 387–397.

- [58] Wang, A., Ma, S., Eds. *Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects*, 1st ed.; Springer: New York, 2012.
- [59] Lacroix, B.; Li, J.; Tzfira, T.; Citovsky, V. Will you let me use your nucleus? How *Agrobacterium* gets its T-DNA expressed in the host plant cell. *Can J Physiol Pharmacol* **2006**, *84*, 333–345.
- [60] Nester, E. W. *Agrobacterium*: nature's genetic engineer. *Front Plant Sci* **2015**, *5*:00730 doi: 10.3389/fpls.2014.00730
- [61] Lee, L. Y.; Gelvin, S. B. T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiol* **2008**, *146*, 325–332.
- [62] Chen, Q.; Lai, H.; Hurtado, J.; Stahnke, J.; Leuzinger, K.; Dent, M. Agroinfiltration as an Effective and Scalable Strategy of Gene Delivery for Production of Pharmaceutical Proteins. *Adv Tech Biol Med* **2013**, *1*, 1–21.
- [63] Sol Genomics Network. <http://www.sgn.cornell.edu/community/feature/200801.pl> (cit. 16. březen 2015)
- [64] Yusibov, V.; Rabindran, S.; Commandeur, U.; Twyman, R. M.; Fischer, R. The Potential of Plant Virus Vectors for Vaccine Production. *Drugs R D* **2006**, *7*, 203–217.
- [65] Gleba, Y.; Klimyuk, V.; Marillonnet, S. Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Curr Opin Biotechnol* **2007**, *18*, 134–141.
- [66] Hefferon, K. Plant Virus Expression Vector Development: New Perspectives. *Biomed Res Int* **2014**, *2014*:785382 doi: 10.1155/2014/785382
- [67] Hefferon, K. L. DNA Virus Vectors for Vaccine Production in Plants: Spotlight on Geminiviruses. *Vaccines* **2014**, *2*, 642–653.
- [68] Gleba, Y.; Marillonnet, S.; Klimyuk, V. Engineering viral expression vectors for plants: the 'full virus' and the 'deconstructed virus' strategies. *Curr Opin Plant Biol* **2004**, *7*, 182–188.

- [69] Cerovska, N.; Moravec, T.; Hoffmeisterova, H.; Plchova, H.; Synkova, H.; Polakova, I.; Duskova, M.; Smahel, M. Expression of a recombinant Human papillomavirus 16 E6GT oncoprotein fused to N- and C-termini of Potato virus X coat protein in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **2013**, *113*, 81–90.
- [70] Lindbo, J. A. TRBO: A High-Efficiency Tobacco Mosaic Virus RNA-Based Overexpression Vector. *Plant Physiol* **2007**, *145*, 1232–1240.
- [71] Gleba, Y.; Klimyuk, V.; Marillonnet, S. Magniffection—a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine* **2005**, *23*, 2042–2048.
- [72] Giritch, A.; Marillonnet, S.; Engler, C.; Eldik, G.; Botterman, J.; Klimyuk, V.; Gleba, Y. Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors. *PNAS* **2006**, *103*, 14701–14706.
- [73] University of Cambridge. <http://www.plantsci.cam.ac.uk/research/davidbaulcombe/methods/vigs> (cit. 18. března 2015)
- [74] Verchot-Lubicz, J.; Ye, C.; Bamunusinghe, D. Molecular biology of potexviruses: recent advances. *J Gen Virol* **2007**, *88*, 1643–1655.
- [75] Solovyev, A. G.; Kalinina, N. O.; Morozov, S. Y. Recent advances in research of plant virus movement mediated by triple gene block. *Front Plant Sci* **2012**, *3*, 1–8.
- [76] Karpova, O. V.; Arkhipenko, M. V.; Zayakina, O. V.; Nikitin, N. A.; Kiselyova, O. I.; Kozlovsky, S. V.; Rodionova, N. P.; Atabekov, J. G. Regulation of RNA translation in potato virus X RNA-coat protein complexes: The key role of the N-terminal segment of the protein. *Mol Biol (Mosk)* **2006**, *40*, 628–634.
- [77] Karpova, O. V.; Zayakina, O. V.; Arkhipenko, M. V.; Sheval, E. V.; Kiselyova, O. I.; Poljakov, V. Y.; Yaminsky, I. V.; Rodionova, N. P.; Atabekov, J. G. Potato virus X RNA-mediated assembly of singletailed ternary ‘coat protein–RNA–movement protein’ complexes. *J Gen Virol* **2006**, *87*, 2731–2740.

- [78] Santa Cruz, S.; Roberts, A. G.; Prior, D. A. M.; Chapman, S.; Oparka, K. J. Cell-to-Cell and Phloem-Mediated Transport of Potato Virus X: The Role of Virions. *Plant Cell* **1998**, *10*, 495–510.
- [79] Lough, T. J.; Netzler, N. E.; Emerson, S. J.; Sutherland, P.; Carr, F.; Beck, D. L.; Lucas, W. J.; Forster, R. L. S. Cell-to-cell movement of potexviruses: evidence for a ribonucleoprotein complex involving the coat protein and first triple gene block protein. *Mol Plant Microbe Interact* **2000**, *13*, 962–974.
- [80] Betti, C.; Lico, C.; Maffi, D.; D'Angeli, S.; Altamura, M. M.; Benvenuto, E.; Faoro, F.; Baschieri, S. Potato virus X movement in *Nicotiana benthamiana*: new details revealed by chimeric coat protein variants. *Mol Plant Pathol* **2012**, *13*, 198–203.
- [81] Santa Cruz, S.; Baulcombe, D. Analysis of potato virus X coat protein genes in relation to resistance conferred by the genes *Nx*, *Nb* and *Rxl* of potato. *J Gen Virol* **1995**, *76*, 2057–2061.
- [82] Bendahmane, A.; Querci, M.; Kanyuka, K.; Baulcombe, D. Agrobacterium transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the *Rx2* locus in potato. *Plant J* **2000**, *21*, 73–81.
- [83] ViralZone. http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/272.html
(cit. 18. března 2015)
- [84] Uhde, K.; Fischer, R.; Commandeur, U. Expression of multiple foreign epitopes presented as synthetic antigens on the surface of Potato virus X particles. *Arch Virol* **2005**, *150*, 327–340.
- [85] O'Brien, G.; Bryant, C.; Voogd, C.; Greenberg, H.; Gardner, R.; Bellamy, A. Rotavirus VP6 expressed by PVX vectors in *Nicotiana benthamiana* coats PVX rods and also assembles into virus-like particles. *Virology* **2000**, *270*, 444–453.
- [86] Plchova, H.; Moravec, T.; Hoffmeisterova, H.; Folwarczna, J.; Cerovska, N. Expression of Human papillomavirus 16 E7_{ggg} oncoprotein on N- and C-terminus of Potato virus X coat protein in bacterial and plant cells. *Protein Expr Purif* **2011**, *77*, 146–152.

- [87] Lukashina, E.; Badun, G.; Fedorova, N.; Ksenofontov, A.; Nemykh, M.; Serebryakova, M.; Mukhamedzhanova, A.; Karpova, O.; Rodionova, N.; Baratova, L.; Dobrov, E. Tritium planigraphy study of structural alterations in the coat protein of Potato virus X induced by binding of its triple gene block 1 protein to virions. *FEBS J* **2009**, *276*, 7006–7015.
- [88] Doorbar, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* **2006**, *110*, 525–541.
- [89] Letian, T.; Tianyu, Z. Cellular receptor binding and entry of human papillomavirus. *Virology* **2010**, *7*, 1–7.
- [90] Campo, M. S.; Graham, S. V.; Cortese, M. S.; Ashrafi, G. H.; Araibi, E. H.; Dornan, E. S.; Miners, K.; Nunes, C.; Man, S. HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. *Virology* **2010**, *407*, 137–142.
- [91] Wise-Draper, T. M.; Wells, S. I. Papillomavirus E6 and E7 proteins and their cellular targets. *Front Biosci* **2008**, *13*, 1003–1017.
- [92] El Mzibri, M.; Benbacer, L.; Amrani, M.; Attaleb, M.; Khyatti, M.; Ennaji, M. M.; Ameziane El Hassani, R. *Evaluation of p53, p16INK4a and E-Cadherin Status as Biomarkers for Cervical Cancer Diagnosis, Topics on Cervical Cancer With an Advocacy for Prevention*, 1st ed.; INTECH Open Access Publisher, 2012.
- [93] Juckett, G.; Hartman-Adams, H. Human Papillomavirus: Clinical Manifestations and Prevention. *Am Fam Physician* **2010**, *82*, 1209–1214.
- [94] Anic, G. M.; Giuliano, A. R. Genital HPV infection and related lesions in men. *Prev Med* **2011**, *53*, S36–S41.
- [95] Sushma, M.; Vamsikrishna, B.; Babu, M.; Mohanraj, R. A Review on Role of Human Papilloma Virus(HPV) In Cervical Cancer. *PharmaTutor* **2014**, *2*, 21–30.
- [96] Siddiqui, M. A.; Perry, C. M. Human Papillomavirus Quadrivalent (types 6, 11, 16, 18) Recombinant Vaccine (Gardasil®). *Drugs* **2006**, *66*, 1263–1271.
- [97] Monie, A.; Hung, C.; Roden, R.; Wu, T. Cervarix: a vaccine for the prevention of HPV 16, 18-associated cervical cancer. *Biologics* **2008**, *2*, 107–113.

- [98] Cuzick, J. Gardasil 9 joins the fight against cervix cancer. *Expert Rev Vaccines* **2015**
doi:10.1586/14760584.2015.1051470
- [99] Tyler, M.; Tumban, E.; Chackerian, B. Second-generation prophylactic HPV vaccines: successes and challenges. *Expert Rev Vaccines* **2014**, *13*, 247–255.
- [100] Khallouf, H.; Grabowska, A. K.; Riemer, A. B. Therapeutic Vaccine Strategies against Human Papillomavirus. *Vaccines* **2014**, *2*, 422–462.
- [101] Smahel, M.; Sima, P.; Ludvikova, V.; Vonka, V. Modified HPV16 E7 Genes as DNA Vaccine against E7-Containing Oncogenic Cells. *Virology* **2001**, *281*, 231–238.
- [102] NBC News. <http://www.nbcnews.com/health/health-news/hpv-found-two-thirds-americans-survey-inds-n109846> (cit. 18. březen 2015)
- [103] Wei, L.; Chu, M.; Zhang, Q.; Wang, Y.; Shang, Q.; Zhang, Y.; Zhang, G. Interleukin-12 gene adjuvant increases the immunogenicity of virus-like particles of human papillomavirus type 16 regional variant strain. *Braz J Infect Dis* **2014**, *18*, 65–70.
- [104] Maclean, J.; Koekemoer, M.; Olivier, A. J.; Stewart, D.; Hitzeroth I. I.; Rademacher, T.; Fischer, R.; Williamson, A. L.; Rybicki, E. P. Optimization of human papillomavirus type 16 (HPV-16) L1 expression in plants: comparison of the suitability of different HPV-16 L1 gene variants and different cell-compartment localization. *J Gen Virol* **2007**, *88*, 1460-1469.
- [105] Biemelt, S.; Sonnewald, U.; Gaimbacher, P.; Willmitzer, L.; Müller, M. Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants. *J Virol* **2003**, *77*, 9211-9220.
- [106] Varsani, A.; Williamson, A. L.; Rose, R. C.; Jaffer, M.; Rybicki, E. P. Expression of Human papillomavirus type 16 major capsid protein in transgenic *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. *Arch Virol* **2003**, *148*, 1771–1786.
- [107] Šmídková, M.; Müller, M.; Thönes, N.; Puiko, K.; Angelisová, P.; Velemínský J.; Angelis K. J. Transient expression of human papillomavirus type 16 virus-like particles

in tobacco and tomato using a tobacco rattle virus expression vector. *Biol Plantarum* **2010**, *54*, 451-460.

[108] Varsani, A.; Williamson, A. L.; Stewart, D.; Rybicki, E. P. Transient expression of Human papillomavirus type 16 L1 protein in *Nicotiana benthamiana* using an infectious tobamovirus vector. *Virus Res* **2006**, *120*, 91-96.

[109] Fernández-San Millán, A.; Ortigosa, S. M.; Hervás-Stubbs, S.; Corral-Martínez, P.; Seguí-Simarro, J. M.; Gaétan, J.; Coursaget, P.; Veramendi, J. Human papillomavirus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Plant Biotechnol J* **2008**, *6*, 427-44.

[110] Pineo, C. B.; Hitzeroth, I. I.; Rybicki, E. P. Immunogenic assessment of plant-produced human papillomavirus type 16 L1/L2 chimaeras. *Plant Biotechnol J* **2013**, *11*, 964-975.

[111] Franconi, R.; Di Bonito, P.; Dibello, F.; Accardi, L.; Müller, A.; Cirilli, A.; Simeone, P.; Doní, G.; Venuti, A.; Giorgi, C. Plant-derived human papillomavirus 16 E7 oncoprotein induces immune response and specific tumor protection. *Cancer Res* **2002**, *62*, 3654-3658.

[112] Franconi, R.; Massa, S.; Illiano, E.; Mullar, A.; Cirilli, A.; Accardi, L.; Di Bonito, P.; Giorgi, C.; Venuti, A. Exploiting the plant secretory pathway to improve the anticancer activity of a plant-derived HPV16 E7 vaccine. *Int J Immunopathol Pharmacol* **2006**, *19*, 187-197.

[113] Musiychuk, K.; Stephenson, N.; Bi, H.; Farrance, C. E.; Orozovic, G.; Brodelius, M.; Brodelius, P.; Horsey, A.; Ugulava, N.; Shamloul, A. M.; Mett, V.; Rabindran, S.; Streatfield, S. J.; Yusibov V. A launch vector for the production of vaccine antigens in plants. *Influenza Other Respir Viruses* **2007**, *1*, 19-25.

[114] Massa, S.; Franconi, R.; Brandi, R.; Müller, A.; Mett, V.; Yusibov, V.; Venuti, A. Anti-cancer activity of plant-produced HPV16 E7 vaccine. *Vaccine* **2007**, *25*, 3018-3021.

- [115] Paz De la Rosa, G.; Monroy-García, A.; Mora-García, M.L.; Reynaga Peña, C.G.; Hernández-Montes, J.; Weiss-Steider B.; Gómez Lim, M. A. An HPV 16 L1-based chimeric human papillomavirus-like particles containing a string of epitopes produced in plants is able to elicit humoral and cytotoxic T-cell activity in mice. *Virology* **2009**, *6*:2 doi: 10.1186/1743-422X-6-2
- [116] Ostling, O.; Johanson, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* **1984**, *123*, 291–298.
- [117] Collins, A. R.; Oscoz, A. A.; Brunborg, G.; Gaivão, I.; Giovannelli, L.; Kruszewski, M.; Smith, C. C.; Stetina, R. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* **2008**, *23*, 143–151.
- [118] Azqueta, A.; Collins, A. R. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch Toxicol* **2013**, *87*, 949–968.
- [119] Apostolou, P.; Toloudi, M.; Kourtidou, E.; Mimikakou, G.; Vlachou, I.; Chatziioannou, M.; Papisotiriou, I. Use of the comet assay technique for quick and reliable prediction of in vitro response to chemotherapeutics in breast and colon cancer. *J Biol Res (Thessalon)* **2014**, *21*:14 doi: 10.1186/2241-5793-21-14
- [120] Gunasekarana, V.; Raj, G. V.; Chand, P. A comprehensive review on clinical applications of comet assay. *J Clin Diagn Res* **2015**, *9*, 1–5.
- [121] Gichner, T. DNA damage induced by indirect and direct acting mutagens in catalase-deficient transgenic tobacco. Cellular and acellular Comet assays. *Mutat Res* **2003**, *535*, 187–193.
- [122] Gichner, T.; Znidar, I.; Wagner, E. D.; Plewa, M. J. The use of higher plants in the comet assay. *The Comet Assay in Toxicology*; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2009; Chapter 4, pp 98–119.
- [123] Procházková, D.; Wilhelmová, N.; Pavlíková, D.; Száková, J.; Gichner, T. Zinc induces DNA damage in tobacco roots. *Biol Plant* **2013**, *57*, 783–787.

- [124] Song, J.; Bent, A. F. Microbial Pathogens Trigger Host DNA Double-Strand Breaks Whose Abundance Is Reduced by Plant Defense Responses. *PLoS Pathog* **2014**, *10*:1004226 doi: 10.1371/journal.ppat.1004226
- [125] CELL BIOLABS, INC. <http://www.cellbiolabs.com/comet-assay-kits-3-well> (cit. 18. březen 2015)
- [126] Dulieu, H. L.; Dalebroux, M. A. Spontaneous and induced reversion rates in a double heterozygous mutant of *Nicotiana tabacum* var. xanthi n.c. — Dose-response relationship. *Mutat Res* **1975**, *30*, 63–69.
- [127] Gichner, T.; Plewa, M. J. Induction of somatic DNA damage as measured by single cell gel electrophoresis and point mutation in leaves of tobacco plants. *Mutat Res* **1998**, *401*, 143–152.
- [128] Tindle, R. W.; Fernando, G. J.; Sterling, J. C.; Frazer, I. H. A "public" T-helper epitope of the E7 transforming protein of human papillomavirus 16 provides cognate help for several E7 B-cell epitopes from cervical cancer-associated human papillomavirus genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, *88*, 5887–5891.
- [129] Feltkamp, M. C.; Smits, H. L.; Vierboom, M. P.; Minnaar, R. P.; de Jongh, B. M.; Drijfhout, J. W.; ter Schegget, J.; Melief, C. J.; Kast, W. M. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *Eur. J. Immunol* **1993**, *23*, 2242–2249.
- [130] Indrová, M.; Reinis, M.; Bubeník, J.; Jandlová, T.; Bieblová, J.; Vonka, V.; Velek, J. Immunogenicity of dendritic cell-based HPV16 E6/E7 peptide vaccines: CTL activation and protective effects. *Folia Biol. (Prague)* **2004**, *50*, 184–193.
- [131] Pokorna, D.; Cerovska, N.; Smahel, M.; Moravec, T.; Ludvikova, V.; Mackova, J.; Synkova, H.; Duskova, M.; Hozak, P.; Veleminsky, J. DNA vaccines based on chimeric potyvirus-like particles carrying HPV16 E7 peptide (aa 44-60). *Oncol Rep* **2005**, *14*, 1045–1053.

- [132] Van Die, I. M.; Bergmans, H. E. N.; Hoekstra, W. P. M. Transformation in *Escherichia coli*: Studies on the Role of the Heat Shock in Induction of Competence. *J Gen Microbiol* **1983**, *129*, 663–670.
- [133] Nemykh, M. A.; Efimov, A. V.; Novikov, V. K.; Orlov, V. N.; Arutyunyan, A. M.; Drachev, V. A.; Lukashina, E. V.; Baratova, L. A.; Dobrov, E. N. One more probable structural transition in potato virus X virions and a revised model of the virus coat protein structure. *Virology* **2008**, *373*, 61–71.
- [134] Weigel, D.; Glazebrook, J. Transformation of agrobacterium using the freeze-thaw method. *Cold Spring Harb Protoc* **2006**, *7*, 1031–1036.
- [135] Dubray, G.; Bezard, G. A highly sensitive periodic acid-silver stain for 1,2-diol groups of glycoproteins and polysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **1982**, *119*, 325–329.
- [136] Vaculik, P.; Plchova, H.; Moravec, T.; Cerovska, N. New positions for peptide presentation in Potato virus X capsid protein. *Open Life Sciences* **2015**, *10*, 133–141.
- [137] Vaculik, P.; Plchova, H.; Moravec, T.; Hoffmeisterova, H.; Cerovska, N.; Smahel, M. Potato virus X displaying the E7 peptide derived from human papillomavirus type 16: a novel position for epitope presentation. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **2015**, *120*, 671–680.
- [138] Kumagai, Y.; Takeuchi, O.; Akira, S. TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. *Adv Drug Deliv Rev* **2008**, *60*, 795–804.
- [139] Bode, C.; Zhao, G.; Steinhagen, F.; Kinjo, T.; Klinman, D. M. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines* **2011**, *10*, 499–511.
- [140] Létourneau, S.; Krieg, C.; Pantaleo, G.; Boyman, O. IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. *J Allergy Clin Immunol* **2009**, *123*, 758–762.
- [141] Létourneau, S.; van Leeuwen, E. M.; Krieg, C.; Martin, C.; Pantaleo, G.; Sprent, J.; Surh, C. D.; Boyman, O. IL-2/anti-IL-2 antibody complexes show strong biological activity

by avoiding interaction with IL-2 receptor alpha subunit CD25. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 2171–2176.

[142] Brunner, M. C.; Chambers, C. A.; Chan, F. K.; Hanke, J.; Winoto, A.; Allison, J. P. CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation. *J Immunol* **1999**, *162*, 5813–5820.

[143] Peggs, K. S.; Quezada, S. A.; Korman, A. J.; Allison, J. P. Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* **2006**, *18*, 206–213.

[144] Cerovska, N.; Plchova, H.; Vaculik, P.; Moravec, T.; Gichner, T. Potato virus X induces DNA damage in leaf nuclei of the host plant *Nicotiana tabacum* L. var. xanthi. *Biol Plant* **2014**, *58*, 783–787.

[145] Woestenenk, E. A.; Hammarström, M.; van den Berg, S.; Härd, T.; Berglund, H. His tag effect on solubility of human proteins produced in *Escherichia coli*: a comparison between four expression vectors. *J Struct Funct Genomics* **2004**, *5*, 217–229.

[146] Gopal, G. J.; Kumar, A. Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Protein J* **2013**, *32*, 419–425.

[147] Schumann, W.; Ferreira, L. C. S. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Genet Mol Biol* **2004**, *27*, 442–453.

[148] Chesshyre, J. A.; Hipkiss, A. R. Low temperatures stabilize interferon α -2 against proteolysis in *Methylophilus methylotrophus* and *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **1989**, *31*, 158–162.

[149] Kaftanova, A. S.; Kiselev, N. A.; Novikov, V. K.; Atabekov, J. G. Structure of products of protein reassembly and reconstruction of potato virus X. *Virology* **1975**, *67*, 283–287.

[150] Kwon, S. J.; Park, M. R.; Kim, K. W.; Plante, C. A.; Hemenway, C. L.; Kim, K. H. cis-Acting sequences required for coat protein binding and in vitro assembly of Potato virus X. *Virology* **2005**, *334*, 83–97.

- [151] Petrova, E. K.; Nikitin, N. A.; Protopopova, A. D.; Arkhipenko, M. V.; Yaminsky, I. V.; Karpova, O. V.; Atabekov, J. G. The role of the 50-cap structure in viral ribonucleoproteins assembly from potato virus X coat protein and RNAs. *Biochimie* **2013**, *95*, 2415–2422.
- [152] Meyer, Y.; Siala, W.; Bashandy, T.; Riondet, C.; Vignols, F.; Reichheld, J. P. Glutaredoxins and thioredoxins in plants. *Biochim Biophys Acta* **2008**, *1783*, 589–600.
- [153] Romero-Brey, I.; Bartenschlager, R. Membranous Replication Factories Induced by Plus-Strand RNA Viruses. *Viruses* **2014**, *6*, 2826–2857.
- [154] Zayakina, O.; Arkhipenko, M.; Smirnov, A.; Rodionova, N.; Karpova, O.; Atabekov, J. Restoration of potato virus X coat protein capacity for assembly with RNA after His-tag removal. *Arch Virol* **2009**, *154*, 337–341.
- [155] Fifis, T.; Gamvrellis, A.; Crimeen-Irwin, B.; Pietersz, G. A.; Li, J.; Mottram, P.; McKenzie, I. F. C.; Plebanski, M. Size-Dependent Immunogenicity: Therapeutic and Protective Properties of Nano-Vaccines against Tumors. *J Immunol* **2004**, *173*, 3148–3154.
- [156] Gamvrellis, A.; Leong, D.; Hanley, J. C.; Xiang, S. D.; Mottram, P.; Plebanski, M. Vaccines that facilitate antigen entry into dendritic cells. *Immunol Cell Biol* **2004**, *82*, 506–516.
- [157] Rossi, M.; Young, J. W. Human Dendritic Cells: Potent Antigen-Presenting Cells at the Crossroads of Innate and Adaptive Immunity. *J Immunol* **2005**, *175*, 1373–1381.
- [158] Ueno, H.; Schmitt, N.; Klechevsky, E.; Pedroza-Gonzalez, A.; Matsui, T.; Zurawski, G.; Oh, S.; Fay, J.; Pascual, V.; Banchereau, J.; Palucka, K. Harnessing human dendritic cell subsets for medicine. *Immunol Rev* **2010**, *234*, 199–212.
- [159] Rybicki, E. P. Plant-based vaccines against viruses. *Viol J* **2014**, *11*:205 doi: 10.1186/s12985-014-0205-0
- [160] Marusic, C.; Rizza, P.; Lattanzi, L.; Mancini, C.; Spada, M.; Belardelli, F.; Benvenuto, E.; Capone, I. Chimeric plant virus particles as immunogens for inducing murine and human immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **2001**, *75*, 8434–8439.

- [161] Lico, C.; Mancini, C.; Italiani, P.; Betti, C.; Boraschi, D.; Benvenuto, E.; Baschieri, S. Plant-produced potato virus X chimeric particles displaying an influenza virus-derived peptide activate specific CD8⁺ T cells in mice. *Vaccine* **2009**, *27*, 5069–5076.
- [162] Usha, R.; Rohll, J. B.; Spall, V. E.; Shanks, M.; Maule, A. J.; Johnson, J. E.; Lomonosoff, G. P. Expression of an animal virus antigenic site on the surface of a plant virus particle. *Virology* **1993**, *197*, 366–374.
- [163] Giritch, A.; Marillonnet, S.; Engler, C.; van Eldik, G.; Botterman, J.; Klimyuk, V.; Gleba, Y. Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors. *PNAS* **2006**, *103*, 14701–14706.
- [164] Qiu, X.; Wong, G.; Audet, J.; Bello, A.; Fernando, L.; Alimonti, J. B.; Fausther-Bovendo, H.; Wei, H.; Aviles, J.; Hiatt, E.; Johnson, A.; Morton, J.; Swope, K.; Bohorov, O.; Bohorova, N.; Goodman, C.; Kim, D.; Pauly, M. H.; Velasco, J.; Pettit, J.; Olinger, G. G.; Whaley, K.; Xu, B.; Strong, J. E.; Zeitlin, L.; Kobinger, G. P. Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature* **2014**, *514*, 47–53.

Přílohy 1-3

1) ***Potato virus X* induces DNA damage in leaf nuclei of the host plant *Nicotiana tabacum* L. var. *xanthi*.**

Cerovska, N.; Plchova, H.; **Vaculik, P.**; Moravec, T.; Gichner, T.
Biologia Plantarum **2014**, *58*, 783–787.

2) **New positions for peptide presentation in *Potato virus X* capsid protein.**

Vaculik, P.; Plchova, H.; Moravec, T.; Cerovska, N.
Open Life Sciences **2015**, *10*, 133–141.

3) ***Potato virus X* displaying the E7 peptide derived from *human papillomavirus* type 16: a novel position for epitope presentation.**

Vaculik, P.; Plchova, H.; Moravec, T.; Hoffmeisterova, H.; Cerovska, N.; Smahel, M.
Plant Cell, Tissue and Organ Culture **2015**, *120*, 671–680.

BRIEF COMMUNICATION

Potato virus X* induces DNA damage in leaf nuclei of the host plant *Nicotiana tabacum* L. var. *xanthiN. CEROVSKA¹, H. PLCHOVA^{1*}, P. VACULIK^{1,2}, T. MORAVEC¹, and T. GICHNER¹*Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic,**Rozvojova 313, CZ-16502 Prague, Czech Republic¹**Faculty of Science, Charles University in Prague, Albertov 6, CZ-12843 Prague 2, Czech Republic²***Abstract**

We employed the comet assay (single cell gel electrophoresis) to evaluate induced DNA damage in nuclei isolated from tobacco leaves (*Nicotiana tabacum* var. *xanthi*) inoculated with *Potato virus X* (PVX). The highest DNA damage, expressed by the tail moment value, was observed in the inoculated leaves and decreased in the 1st to 4th systemic leaves. DNA damage increased with the time after the inoculation (from day 3 to day 21) and was higher in nuclei isolated from a part of the leaf at the petiole compared to nuclei isolated from the leaf tip. A Pearson moment correlation ($r = 0.94$) between the induced DNA damage and the PVX titres expressed by ELISA absorbance values was observed. The PVX infection did not induce a significant increase in the rate of somatic mutations evaluated by appearance of dark green, yellow, and double green/yellow sectors on the heterozygous pale green leaves of *N. tabacum* var. *xanthi*.

Additional key words: Comet assay, ethyl methanesulphonate, single cell gel electrophoresis, somatic mutations.

Potato virus X (PVX) is a member of the genus *Potexvirus*, family *Flexiviridae*. PVX is frequently used as model to study the molecular mechanisms controlling virus replication and movement (Batten *et al.* 2003, Atabekov *et al.* 2007, Verchot-Lubicz *et al.* 2007). PVX forms filamentous particles of about 515 nm in length and 13 nm in diameter (Sonenberg *et al.* 1978). The particle consists of a 6.4 kb long positive sense single-stranded genomic RNA which is capped and polyadenylated. Approximately 1 300 copies of the PVX coat protein (XCP) encapsidate the viral RNA. XCP is also necessary for cell-to-cell and systemic movement in host plants (Verchot-Lubicz 2005). The viral genomic RNA contains a 84 nucleotide (nt) long 5'-untranslated region (UTR) followed by five open reading frames

coding for 165 kDa replicase, triple gene block proteins TGBp1, TGBp2, and TGBp3 involved in virus movement, a 25 kDa coat protein (CP), and 72 nt long 3'-UTR (Huisman *et al.* 1988, Skryabin *et al.* 1988). A successful infection by PVX requires counteracting host defences as well as intimate interactions between the viral genomes/genome-encoded products and host cellular factors including host transcriptional, translational, and macromolecular trafficking machineries.

The objective of this study was to determine whether PVX induces 1) DNA damage in nuclei, evaluated by the comet assay, and 2) mutations on leaves, evaluated by the somatic mutation assay, in PVX inoculated tobacco leaves as well as in the 1st to 4th systemic leaves.

The alkaline version of the single cell electrophoresis

Submitted 6 March 2014, last revision 4 June 2014, accepted 11 June 2014.

Abbreviations: EMS - ethyl methanesulphonate; TM - tail moment; PT-ELISA - plate-trapped ELISA; PVX - *Potato virus X*; ROS - reactive oxygen species; TM - tail moment.

Acknowledgements: The authors wish to thank Mrs R. Hadamkova and D. Cibochova, the Institute of Experimental Botany, Prague, the Czech Republic, for their excellent technical assistance. This research was supported by grant No. P501/12/1761 of the Czech Science Foundation, OPPK CZ.2. 16/3.1.00/24014 of the City of Prague, and grant No. 631412 of the Charles University Grant Agency.

* Corresponding author; fax: (+420) 225106875, e-mail: plchova@ueb.cas.cz

This publication is dedicated to the memory of Mrs. Dagmar Cibochová.

assay (comet assay) can quantitatively measure DNA damage, including single strand breaks, double strand breaks, alkali labile sites (primarily apurinic and apyrimidinic sites), incomplete excision repair sites, and DNA crosslinks (Tice *et al.* 2000). Although this technique has been primarily applied to animal cells, the adaptation of the comet assay to plant tissues (Koppen and Verschaeve 1996, Gichner and Plewa 1998, Gichner *et al.* 2009, Procházková *et al.* 2013) significantly extends its utility in basic and applied studies in environmental mutagenesis.

The comet assay detects acute DNA damage in nuclei of leaf and root cells shortly after the treatment. By contrast, the leaf primordial cells within the apical meristem are the target cells of the somatic mutations (Dulieu and Dalebroux 1975).

Mutations are induced in these primordial cells and as the leaf grows, division of the mutant cells leads to development of individual clones of cells that appear as dark green, yellow, and green/yellow sectors on yellow-green leaves of the heterozygous *Nicotiana tabacum* var. *xanthi*. Thus, the earliest time when somatic mutation frequency can be evaluated on newly formed leaves is about one to two weeks after treatment. The tested line of *N. tabacum* var. *xanthi* has been demonstrated to be very sensitive to ionizing radiation (Ptacek *et al.* 2001), and various kinds of chemical mutagens (Dulieu and Dalebroux 1975, Gichner *et al.* 1999).

Seeds (a_1^+/a_1 ; a_2^+/a_2) of the double heterozygous tobacco (*Nicotiana tabacum* L. var. *xanthi*) used in the somatic mutation assay were generated by controlled genetic crossings according to Dulieu and Dalebroux (1975). Tobacco plants were cultivated in plastic pots (a diameter of 7 cm and a depth of 9 cm) filled with 150 cm³ of soil (Chernozem, pH 7.2) at day/night temperatures of 28/22 °C, a relative humidity of 60 %, a 16-h photoperiod, and an irradiance of 150 μmol m⁻² s⁻¹.

The 4th or 5th leaf, counted from cotyledons, of 5- to 6-week-old tobacco seedlings was inoculated with PVX (strain UK3) obtained from frozen infected leaves.

The leaves dusted with carborundum powder were rubbed with a suspension of virus infected tissue in 0.057 M K₂HPO₄, pH 8.0. As negative control, healthy leaves were treated only with 0.057 M K₂HPO₄, pH 8.0. The plants were further cultivated as described above.

The comet assay and the image analysis using a fluorescence microscope and a computerized image-analysis system were performed according to Procházková *et al.* (2013). The frequency of dark green, yellow, and green/yellow twin sectors (Dulieu and Dalebroux 1975) were scored using a stereomicroscope on inoculated and 1st to 4th systemic leaves 3 weeks after the PVX inoculation. The mutation frequency was expressed as the mean number of sectors (dark green, yellow and green/yellow) *per* leaf. For each experiment, eight seedlings were inoculated and each treatment was repeated twice. Plate-trapped (PT) ELISA was done as described previously (Cеровска *et al.* 2008).

Data were analyzed using the statistical and graphical functions of *SigmaPlot 8.0* and *SigmaStat 3.0* (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). In case a significant ($P < 0.05$) *F*-value was obtained in one-way ANOVA, the Dunnett's multiple comparison test between the treated and control groups was conducted. Differences between two groups were statistically evaluated by the paired *t*-test.

In 3 or 4 d intervals, a small piece of leaf tissue (about 1.5 cm²) was taken near the petiole or tip of the inoculated leaf and of the 1st to 4th systemic leaves. In the control plants, DNA damage, expressed by tail moment (TM) values, varied from 2 to 4 μm. The inoculation of the tobacco leaves with PVX led to serious damage as expressed by crinkled leaves that finally led to leaf lethality. DNA damage detected in the nuclei of the inoculated leaves increased with the time after inoculation. At day 3, a TM value was 6 ± 0.8 μm compared to 75 ± 1.6 μm at day 14. Due to severe leaf damage, leaf nuclei could not be isolated at day 17. In the 1st systemic leaf, there was a similar increase in a value of TM depending on the time after inoculation. This increase was higher when the leaf nuclei were isolated

Table 1. DNA damage expressed by average median tail moment values [μm] in leaf nuclei of *Nicotiana tabacum* var. *xanthi* following inoculation with PVX. Nuclei were isolated from a small part of leaf (about 1.5 cm²) at the petiole (A) or at the leaf tip (B) at different time periods after inoculation. ⁺ - leaf too small, the whole leaf used for the isolation of nuclei, ⁺⁺ - nuclei could not be isolated due to severe leaf damage. Means ± SE, $n = 150 - 200$, * - values significantly different ($P \leq 0.05$) from the control.

Time after inoculation [d]	Control	Inoculated leaf	1 st systemic leaf		2 nd systemic leaf		3 rd systemic leaf		4 th systemic leaf	
			A	A	B	A	B	A	B	A
3	2 ± 0.5	6 ± 0.8*	6 ± 0.7*	3 ± 0.4	3 ± 0.5	4 ± 0.3	4 ± 0.5 ⁺	---	---	---
7	4 ± 0.4	19 ± 1.7*	10 ± 1.1*	5 ± 0.5	4 ± 0.4	4 ± 0.5	4 ± 0.7	4 ± 0.6	---	---
10	4 ± 0.4	38 ± 3.4*	25 ± 0.9*	11 ± 1.4*	12 ± 1.2*	9 ± 1.1*	8 ± 0.8*	4 ± 0.5	4 ± 0.5	4 ± 0.4
14	4 ± 0.2	75 ± 1.6*	35 ± 3.8*	23 ± 1.4*	22 ± 1.4*	15 ± 1.4*	12 ± 1.0*	8 ± 0.7*	7 ± 1.1	4 ± 0.6
17	3 ± 0.4	++	43 ± 1.8*	35 ± 1.8*	34 ± 2.1*	19 ± 1.4*	15 ± 1.8*	9 ± 1.0*	7 ± 1.2	6 ± 1.0
21	3 ± 0.4	++	41 ± 1.5*	29 ± 1.9*	19 ± 1.0*	15 ± 0.9*	16 ± 1.3*	12 ± 1.2*	10 ± 1.2*	5 ± 0.4

Table 2. DNA damage expressed by average median tail moment (TM) values [μm] in leaf nuclei, and absorbance values evaluated by the ELISA method in leaves of *Nicotiana tabacum* var. *xanthi* three weeks after inoculation with PVX. For the comet assay and ELISA analysis, a small part of leaf (about 1.5 cm^2) at the petiole was used. Means \pm SE, for TM values $n = 150 - 200$, for ELISA absorbance values $n = 2$.

Leaves	TM	ELISA absorbance values		
	PVX	control leaves	PVX	control leaves
1 st systemic leaf	46.1 \pm 4.2	4.8 \pm 0.8	1.32 \pm 0.07	0
2 nd systemic leaf	32.8 \pm 2.1	4.9 \pm 0.2	1.02 \pm 0.06	0
3 rd systemic leaf	17.5 \pm 1.3	4.1 \pm 0.5	0.66 \pm 0.08	0
4 th systemic leaf	15.0 \pm 2.3	4.0 \pm 0.4	0.24 \pm 0.01	0

from the leaf petiole (denoted as A in Table 1) compared to that at the leaf tip (denoted as B in Table 1). DNA damage in the 2nd, 3rd, and 4th systemic leaves was markedly lower when compared to the inoculated and the 1st systemic leaf.

Further, the tobacco leaves were inoculated with PVX and after cultivation of the treated seedlings for 3 weeks, the comet and PT-ELISA assays were performed from a piece of leaf at the petiole. DNA damage correlated with the quantity of PVX measured by PT-ELISA. DNA damage in the inoculated leaf could not be evaluated three weeks after the PVX inoculation due to severe damage to the nuclei. DNA damage in the 1st systemic leaf expressed by a TM value was $46.1 \mu\text{m}$ and an ELISA absorbance value was 1.32 (Table 2). In the 4th systemic leaf, a TM value decreased significantly to $15.0 \mu\text{m}$ and an ELISA absorbance to 0.24.

Table 3. Frequency of somatic mutations (a number of mutant sectors *per* leaf) in leaves of *Nicotiana tabacum* var. *xanthi* after inoculation of seedlings with PVX and three-week cultivation in soil. Means \pm SE, $n = 16$, * - values significantly different ($P < 0.05$) from the control. For comparison, the effect of EMS is shown.

Evaluated leaves	Mutant sectors <i>per</i> leaf
Control leaves	1.6 \pm 0.3
1 st systemic leaf	1.5 \pm 0.3
2 nd systemic leaf	1.5 \pm 0.2
3 rd systemic leaf	1.9 \pm 0.4
4 th systemic leaf	1.4 \pm 0.4
3 mM EMS for 24 h	16.0 \pm 0.6*

Frequency of somatic mutant sectors *per* leaf scored on the 1st to 4th systemic leaves 3 weeks after inoculation with PVX ranged from 1.4 ± 0.4 to 1.9 ± 0.4 *per* leaf. This was not significantly different from the control value (Table 3). Mutation frequency on the inoculated leaf could not be evaluated due to the severe damage of the leaf. After the application of 3 mM EMS for 24 h on roots of tobacco seedlings followed by 14 d cultivation of the seedlings in a Hoagland solution, frequency of

somatic mutations *per* leaf reached a value of 16.0 ± 0.6 (Fig. 1 Suppl.) that was significantly different from the control value (1.6 ± 0.3).

Generally, two explanations for the DNA damaging effect of PVX on nuclei of the host tobacco plants can be suggested: 1) PVX directly reacted with DNA of host nuclei, and 2) PVX directly or indirectly produced metabolites that caused DNA damage in nuclei of the host plant.

Viruses or their genomic nucleic acids are capable to enter the animal or human cell membrane and to react directly with DNA or with DNA repair machineries of the host cell (Weitzman *et al.* 2010, Turnell and Grand 2012). At present, two main strategies for plant virus cell-to-cell movement are known: 1) the viral genome moves in the form of intact virions, and 2) the viral nucleic acids are trafficked through plasmodesmata in the form of a nucleoprotein complex (NPC; Ritzenthaler 2011).

Nuclear import and export are crucial processes for any eukaryotic cell, as they govern substrate exchange between the nucleus and the cytoplasm. Proteins involved in the nuclear transport network are generally conserved among eukaryotes, from yeast and fungi to animals and plants. Various pathogens, including some plant viruses, need to enter the host nucleus to gain access to its replication machinery or to integrate their DNA into the host genome. The newly replicated viral genomes then need to exit the nucleus to spread among host cells. To gain the ability to enter and exit the nucleus, these pathogens encode proteins that recognize cellular nuclear transport receptors and utilize host nuclear import and export pathways (Krichevsky *et al.* 2006). Other proteins of cytoplasmically replicating viruses were also found in the cell nucleus (Carrington *et al.* 1991, Li and Carrington 1993, Anindya and Savithri 2004, Ryabov *et al.* 2004, Vetter *et al.* 2004, Gao *et al.* 2012). Viral proteins that are imported into the host cell nucleus participate in the transport of viral genomes. Nuclear import of viral proteins is also involved in other stages of viral infection cycle, such as suppression of a RNA silencing defense response of the host plant (Krichevsky *et al.* 2006).

The mutational analysis of PVX TGBp3 by Ju *et al.*

(2008) demonstrated that wild-type and mutant TGBp3:GFP fusions are degraded by the 26S proteasome. In PVX infected cells, the TGBp3:GFP fusion is also seen in the nucleoplasm indicating that events during PVX infection trigger entry into the nucleus. The mutational analysis failed to identify a nuclear targeting domain. Mutations inhibiting a TGBp3 association with endoplasmic reticulum (ER) and inhibiting virus movement do not block the TGBp3:GFP presence in the nucleoplasm. A mutation disrupting the N-terminal transmembrane domain of TGBp3 causes the fusion to accumulate in the nucleus indicating that nuclear import is regulated by ER interactions. Thus, the direct reaction of PVX or its genomic particles with nuclear DNA of the tobacco host cannot be excluded.

The predominant reactive oxygen species (ROS) detected in plant-pathogen interactions are the superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical (Mehdy 1994). Among these ROS, H₂O₂ was demonstrated to induce DNA damage in tobacco leaf nuclei and in tobacco cell cultures as evaluated by the comet assay (Stavreva and Gichner 2002, Gichner 2003, Cvjetko *et al.* 2014). Although direct effects of H₂O₂ on nuclei were shown, it is possible that H₂O₂ also triggers a signal-transduction cascade contributing to nuclear damage (Termini 2000).

References

- Anindya, R., Savithri, H.S.: Potyviral NIa proteinase, a proteinase with novel deoxyribonuclease activity. - *J. Biol. Chem.* **279**: 32159-32169, 2004.
- Atabekov, J., Dobrov, E., Rodionova, N.: *Potato virus X*: structure, disassembly and reconstitution. - *Mol. Plant Pathol.* **8**: 667-675, 2007.
- Batten, J.S., Yoshinari, S., Hemengway, C.: *Potato virus X*: a model system for virus replication, movement and gene expression. - *Mol. Plant Pathol.* **4**: 125-131, 2003.
- Boyko, A., Kovalchuk, I.: Genetic and epigenetic effects of plant-pathogen interactions: an evolutionary perspective. - *Mol. Plant* **4**: 1014-1023, 2011.
- Carrington, J.C., Freed, D.D., Leinicke, A.J.: Bipartite signal sequence mediates nuclear translocation of the plant potyviral NIa protein. - *Plant Cell* **3**: 953-962, 1991.
- Cerovska, N., Hoffmeisterova, H., Pecenkova, T., Moravec, T., Synkova, H., Plchova, H., Veleminsky, J.: Transient expression of HPV16 E7 peptide (aa 44-60) and HPV16 L2 peptide (aa 108-120) on chimeric potyvirus-like particles using *Potato virus X*-based vector. - *Protein Exp. Purification* **58**: 154-161, 2008.
- Cvjetko, P., Balen, B., Peharec Štefanić, P., Debogović, L., Pavlica, M., Klobučar, G.I.V.: Dynamics of heat-shock induced DNA damage and repair in senescent tobacco plants. - *Biol. Plant.* **58**: 71-79, 2014.
- Dulieu, H.L., Dalebroux, M.A.: Spontaneous and induced reversion rates in a double heterozygous mutant of *Nicotiana tabacum* var. *xanthi* n.c. - dose-response relationship. - *Mutat. Res.* **30**: 63-69, 1975.
- Dulieu, H.L.: Somatic variations on a yellow mutant in *Nicotiana tabacum* (*a*₁⁺/*a*₁; *a*₂⁺/*a*₂) II. Reciprocal genetic events occurring in leaf cells. - *Mutat. Res.* **28**: 69-77, 1975.
- Gao, R., Liu, P., Wong S.M.: Identification of a plant viral RNA genome in the nucleus. - *PLoS ONE* **7**: e48736, 2012.
- Gichner, T.: DNA damage induced by indirect and direct acting mutagens in catalase-deficient transgenic tobacco. Cellular and acellular Comet assays. - *Mutat. Res.* **535**: 187-193, 2003.
- Gichner, T., Plewa, M.J.: Induction of somatic DNA damage as measured by single cell gel electrophoresis and point mutation in leaves of tobacco plants. - *Mutat. Res.* **401**: 143-152, 1998.
- Gichner, T., Ptacek, O., Stavreva D.A., Plewa, M.J.: Comparison of DNA damage in plants as measured by single cell gel electrophoresis and somatic leaf mutations induced by monofunctional alkylating agents. - *Environ. Mol. Mutagen.* **35**: 279-286, 1999.
- Gichner, T., Znidar, I., Wagner, E.D., Plewa, M.J.: The use of higher plants in the comet assay. - In Dhawan, A., Anderson, D. (ed.): *The Comet Assay in Toxicology*. Pp. 98-119. Royal Society of Chemistry, Cambridge 2009.
- Huisman, M.J., Linthorst, H.J.M., Bol, J.F., Cornelissen, B.J.C.: The complete nucleotide sequence of *Potato virus X* and its homologies at the amino acid level with various plus-stranded RNA viruses. - *J. Gen. Virol.* **69**: 1789-1798, 1988.
- Ju, H.J., Ye, C.M., Verchot-Lubicz, J.: Mutational analysis of PVX TGBp3 links subcellular accumulation and protein turnover. - *Virology* **375**: 103-117, 2008.
- Koppen, G., Verschaeve, L.: The alkaline comet test on plant cells: a new genotoxicity test for DNA strand breaks in

- Vicia faba* root cells. - *Mutat. Res.* **360**: 193-200, 1996.
- Kovalchuk, I., Kovalchuk, O., Kalck, V., Boyko, V., Filkowski, J., Heinlein, M., Hohn, B.: Pathogen-induced systemic plant signal triggers DNA rearrangements. - *Nature* **423**: 760-762, 2003.
- Krichevsky, A., Kozlovsky, S.V., Gafni, Y., Citovsky, V.: Nuclear import and export of plant virus proteins and genomes. - *Mol. Plant Pathol.* **7**: 131-146, 2006.
- Li, X.H., Carrington, J.C.: Nuclear transport of tobacco etch potyviral RNA-dependent RNA polymerase is highly sensitive to sequence alterations. - *Virology* **193**: 951-958, 1993.
- Lucht, J.M., Mauch-Mani, B., Steiner, H.Y., Metraux, J.P., Ryals, J., Hohn, B.: Pathogen stress increases somatic recombination frequency in *Arabidopsis*. - *Natur. Genet.* **30**: 311-314, 2002.
- Mehdy, M.C.: Active oxygen species in plant defense against pathogens. - *Plant Physiol.* **105**: 467-472, 1994.
- Procházková, D., Wilhelmová, N., Pavlíková, D., Száková, J., Gichner, T.: Zinc induces DNA damage in tobacco roots. - *Biol. Plant.* **57**: 783-787, 2013.
- Ptacek, O., Stavreva D.A., Kim, J.K., Gichner, T.: Induction and repair of DNA damage as measured by the Comet assay and the yield of somatic mutations in gamma-irradiated tobacco seedlings. - *Mutat. Res.* **491**: 17-23, 2001.
- Ritzenthaler, C.: Parallels and distinctions in the direct cell-to-cell spread of the plant and animal viruses. - *Curr. Opin. Virol.* **1**: 403-409, 2011.
- Ryabov, E.V., Kim, S.H., Taliansky, M.: Identification of a nuclear localization signal and nuclear export signal of the umbraviral long-distance RNA movement protein. - *J. gen. Virol.* **85**: 1329-1333, 2004.
- Skryabin, K.G., Kraev, A.S., Morozov, S.Y., Rozanov, M.N., Chernov, B.K., Lukasheva, L.I., Atabekov, J.G.: The nucleotide sequence of *Potato virus X* RNA. - *Nucl. Acids Res.* **16**: 10929-10930, 1988.
- Sonenberg, N., Shatkin, A.J., Riccardi, R.P., Rubin, M., Goodman, R.M.: Analysis of terminal structures of RNA from potato virus X. - *Nucl. Acids Res.* **5**: 2501-2521, 1978.
- Stavreva, D.A., Gichner, T.: DNA damage induced by hydrogen peroxide in cultured tobacco cells is dependent on the cell growth stage. - *Mutat. Res.* **514**: 147-152, 2002.
- Termini, J.: Hydroperoxide-induced DNA damage and mutations. - *Mutat. Res.* **450**: 107-124, 2000.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F.: Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. - *Environ. mol. Mutagen.* **35**: 206-221, 2000.
- Turnell, A.S., Grand, R.J.: DNA viruses and the cellular DNA-damage response. - *J. gen. Virol.* **93**: 2076-2097, 2012.
- Verchot-Lubicz, J.: A new cell-to-cell transport model for potexviruses. - *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**: 283-290, 2005.
- Verchot-Lubicz, J., Ye, C.M., Bamunusinghe, J.: Molecular biology of potexviruses: recent advances. - *J. gen. Virol.* **88**: 1643-1655, 2007.
- Vetter, G., Hily, J.M., Klein, E., Schmidlin, L., Haas, M., Merkle, T., Gilmer, D.: Nucleo-cytoplasmic shuttling of the beet necrotic yellow vein virus RNA-3-encoded p25 protein. - *J. gen. Virol.* **85**: 2459-2469, 2004.
- Weitzman, M.D., Lilley, C.E., Chaurushiya, M.S.: Genomes in conflict: maintaining genome integrity during virus infection. - *Annu. Rev. Microbiol.* **64**: 61-81, 2010.
- Yao, Y., Bilichak, A., Golubov, A., Kovalchuk, I.: Local infection with oilseed rape mosaic virus promotes genetic rearrangements in systemic *Arabidopsis* tissue. - *Mutat. Res.* **709-710**: 7-14, 2011.

Research Article

Open Access

Petr Vaculik, Helena Plchova, Tomas Moravec, Noemi Cerovska*

New positions for peptide presentation in *Potato virus X* capsid protein

Abstract: *Potato virus X* (PVX) is widely used as a peptide presentation system in plant biotechnology, mostly for transient expression of desired peptides fused to the N-terminus of its capsid protein (CP). Here we describe testing/investigation of new positions for peptide presentation based on seven putative surface loops of PVX CP. We performed bacterial expression of fourteen different PVX CPs modified by the insertion of the epitope derived from the E7 oncoprotein (E7 epitope) of *Human papillomavirus* type 16 fused with His tag. The expression from vector pMPM-A4 Ω in *Escherichia coli* MC1061 was performed to evaluate the capacity of the PVX CP platform to tolerate the insertion of E7 epitope fused with His tag in the seven putative surface loops. The immunological characteristics of expressed epitopes were assessed by Western blot using both anti-PVX CP and anti-His antibodies and by immunoelectron microscopy.

Keywords: Bacterial expression, *Potato virus X*, *Human papillomavirus*, E7 oncoprotein

DOI 10.1515/biol-2015-0019

Received April 23, 2014; accepted December 11, 2014

1 Introduction

Presentation of peptides on virus particles is a promising strategy for the development of peptide-based vaccines. Currently, the development of peptide-based vaccines is limited because the need of suitable strong adjuvants [1,2]. The peptide presentation system based on plant

viruses represents potentially a promising new delivery and adjuvant system mainly for the following reasons: (i) the capsid of plant virus represents a scaffold exposing desired epitopes to the immune system in an abundant and organized manner and can serve as an adjuvant by itself, (ii) plant viruses are not infectious to animals, lowering the safety risk associated with their deployment, and (iii) scalability [3,4].

Human papillomavirus (HPV) infection is one of the most common sexually transmitted infections worldwide. Infection by high risk HPVs is causally associated with cervical cancer, which represents the second most common cancer among women (after breast cancer) [5]. The most common oncogenic HPV genotypes are 16 and 18, together causing approximately 70 % of all cervical cancers, while HPV 16 alone causing 50 % of all cervical cancers [6]. The E7 oncoprotein plays an important role in both malignant transformation and in the maintenance of the transformed state of HPV infected cells. This represents a promising target for immunotherapy because the E7 oncoprotein is expressed in all cervical tumors and in precancerous lesions [7]. The main known role of E7 oncoprotein in virus cycle is to prevent cell death by binding tumor-suppressor protein Rb (pRb), resulting in the dissociation of pRB from E2F-family transcription factors and the premature cell progression into the S phase of the cell cycle which leads to uncontrollable cell division [8].

Potato virus X (PVX) belongs to the order *Tymovirales*, family *Alphaflexiviridae* and genus *Potexvirus*. It is a filamentous, positive single stranded RNA (+ssRNA) virus. Virus particles are about 515 nm long and have about 13 nm in diameter. The PVX genome is capped, has a poly(A) tail and encodes five open reading frames (viral replicase, three movement proteins belonging to the triple-gene block family and capsid protein - approximately 1 300 CP subunits per virion) [9]. The PVX CP can be used for presentation by direct or indirect fusion of a desired protein or peptide to the N-terminus [10-12]. Recently, it has been also shown that the C-terminus of PVX CP can be used for protein presentation [13]. However, the

*Corresponding author: **Noemi Cerovska:** Institute of Experimental Botany, v. v. i., The Academy of Sciences of the Czech Republic, Rozvojova 313, 165 02 Prague 6, Czech Republic, E-mail: cerovska@ueb.cas.cz

Petr Vaculik, Helena Plchova, Tomas Moravec: Institute of Experimental Botany, v. v. i., The Academy of Sciences of the Czech Republic, Rozvojova 313, 165 02 Prague 6, Czech Republic

Petr Vaculik: Faculty of Science, Charles University in Prague, Albertov 6, 128 43 Prague 2, Czech Republic

presentation of proteins/peptides this way is limited due to their isoelectric point, tryptophan content and perhaps their conformation which can influence the formation and stability of modified viral particles [14]. The E7 oncoprotein from HPV 16 is an attractive candidate for anti-cancer therapeutic vaccine development. The effort to express this epitope is related to previous work on the expression of mutated E6 and E7 oncoproteins of HPV 16 using a PVX-based expression vector [15-18].

The latest model representing the PVX CP tertiary structure in a virion predicts loops, which are likely exposed on the virion surface (Fig. 1) [19]. These putative surface loops could be promising candidates for new positions to present proteins or peptides. To examine this hypothesis, we decided to insert an epitope derived from the E7 oncoprotein (E7 epitope; amino acids 44-60; QAEPDRAHYNIVTFCKK) of *Human papillomavirus* type 16 (HPV 16) fused with 6xHis tag into these loops.

2 Methods

2.1 DNA constructs

The PVX CP sequence was amplified by PCR from the binary vector pGR106 (kindly provided by Dr. D.C. Baulcombe, Department of Plant Science, University of Cambridge, United Kingdom). The E7 epitope sequence was prepared by PCR from vector pBSC-E7ggg (kindly provided by M. Smahel, IHBT Prague, Czech Republic). The cloning

strategy and primers were designed for creating fourteen different constructs of PVX CP in pMPM-A4 Ω (Fig. 2A, 2B; Table 1) [20]. The nucleotide sequences of short peptides comprising 6xHis tag fused either to the 5' or 3' terminus of the E7 epitope (6xHisE7 and E76xHis, respectively) were inserted by splicing the overlap extension (SOE) PCR [21] into seven putative PVX CP surface exposed loops: 66/67 nt (region of predicted loop A: 67-72 nt), 459/460 nt (region of predicted loop B: 457-468 nt), 576/577 nt (region of predicted loop C: 574-582 nt), 669/670 nt (region of predicted loop D: 661-681 nt), 159/160 (region of predicted loop E: 154-162 nt), 213/214 (region of predicted loop F: 211-213 nt) and 534/535 (region of predicted loop G: 526-552 nt) [19].

2.2 Expression of modified PVX CP proteins in *E. coli*

Each construct in pMPM-A4 Ω , an arabinose-inducible expression vector, was expressed in *E. coli* MC1061. We performed an optimization of expression at two different temperatures (22°C and 37°C) and three different durations of expression (2, 4 and 16 h after the induction). To estimate the production of fusion proteins PVX CP-6xHisE7 and PVX CP-E76xHis in bacteria, the cells were lysed and separated into soluble and insoluble fractions. The fractions were subjected to polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE) and subsequently Western blot analysis was performed.

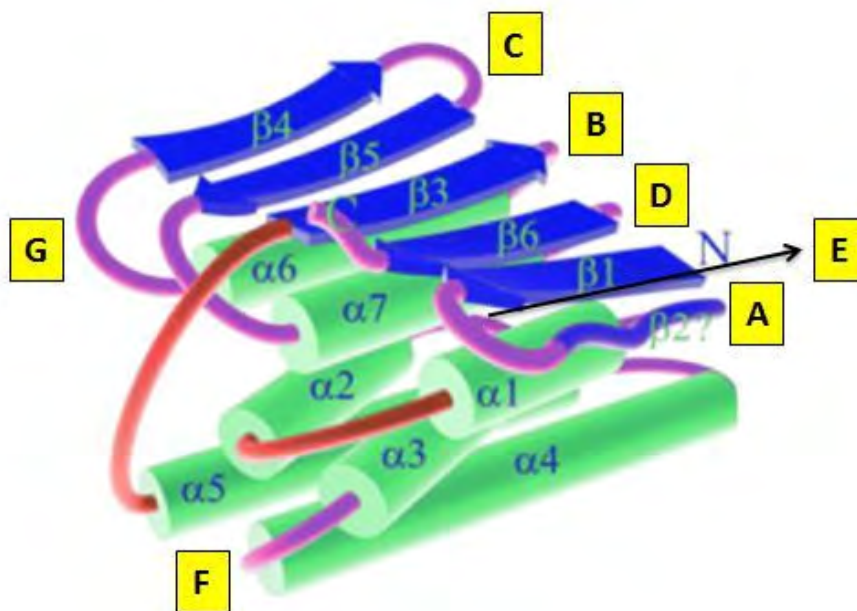


Fig. 1: Predicted structure of PVX CP in a virion[15]. Positions of loops A, B, C, D, E, F and G are indicated.

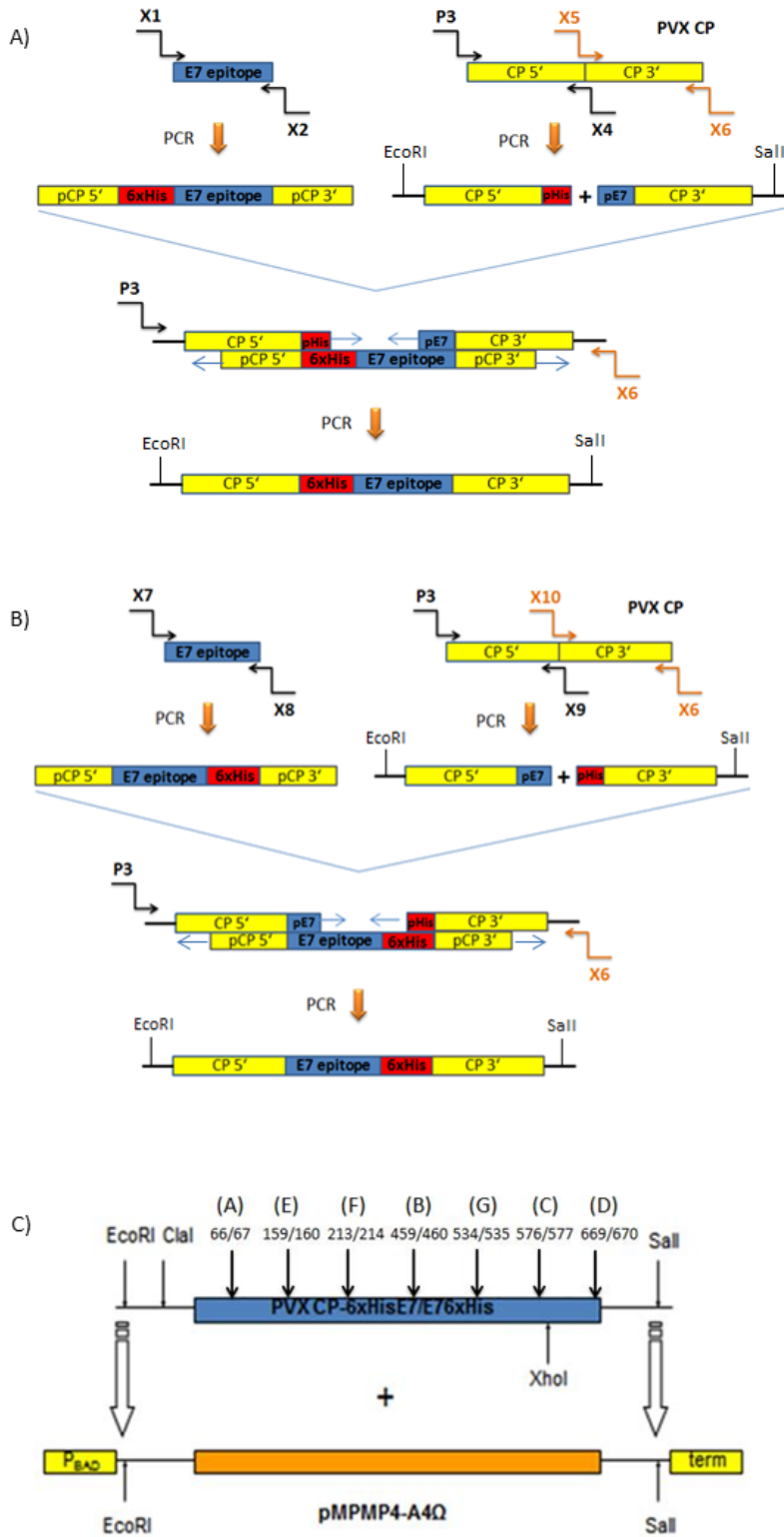


Fig. 2: Schematic illustration of cloning strategy: (A) PVX CP modified with 6xHisE7. (B) PVX CP modified with E76xHis. (C) Restriction cloning into pMPPM-A4Ω. pCP - partial capsid protein; P_{BAD} - arabinose promoter; term - transcription terminator. Restriction sites EcoRI and Sall, and putative surface loops A, B, C, D, E, F and G are indicated.

A) PVX CP modified with 6xHisE7 B) PVX CP modified with E76xHis C) Restriction cloning into pMPPM-A4Ω

Table 1: Deoxyribonucleotides used for preparation of fusion constructs in pMPM-A4Ω.

Prime	Sequence (5'-3')
rs	
(Xn) [*]	
A1	CACAAAACTGCAGGCCATCATCACCATCACCACCAAGCAGAACCGGAC AGA
B1	AGCACAAGGTTTCAAGCATCATCACCATCACCAC
C1	AATGAATGCTGCCAACATCATCACCATCACCAC
D1	AGGTCGTACTGACATCATCACCATCACCAC
E1	AGCAATGCTGTCGACATCATCACCATCACCACCAAGCAGAACCGGACA GA
F1	GACATGAAGGTGCCCATCATCACCATCACCACCAAGCAGAACCGGACA GA
G1	CATGCCAAAGAGGGGCATCATCACCATCACCACCAAGCAGAACCGGAC AGA
A2	TGTGGCAGGAGTTGCTTGAACAAAAGGTTACAAT
B2	GAATTTGTGCTCAGGCTTGAACAAAAGGTTACAA
C2	CACAAAGGCAGCAGTCTTGAACAAAAGGTTACAA
D2	CTCAGCGTTGTTGCTTGAACAAAAGGTTACAA
E2	TGAGGTCCTATTGTCTTGAACAAAAGGTTACAAT
F2	GTGCCATAGTGTCTGCTTGAACAAAAGGTTACAAT
G2	CGGTGGCCGGATGAGCTTGAACAAAAGGTTACAAT
P3	CATTCATTGAATTCATCGATATGTCAGCACCAGCTAG
A4	TGGTGATGATGGCCTGCAGTTTTTGTGG
B4	TGGTGATGATGCTTGAACCTTGTGCTTG
C4	TGGTGATGATGTTGGGCAGCATTATTTC
D4	TGGTGATGATGTCCAGTGATACGACCTC
E4	TGGTGATGATGTGCGACAGCATTGCTG
F4	TGGTGATGATGGGGCACCTTCATGTCC
G4	GTGATGATGCCCCCTTTGGGCATG
A5	TTTTGTTGCAAGGCAACTCTGCCACAG
B5	CTTTTGTGCAAGCCTGAGCACAAATTCGC
C5	TTTTGTTGCAAGACTGCTGCCTTTGTGAA
D5	AACCTTTTGTGCAAGACAACAACCGCTGAGG
E5	CCTTTTGTGCAAGACAAATGAGGACCTCAG
F5	CCTTTTGTGCAAGACAGACACTATGGCACA
G5	TTGCAAGCTCATCCGGCCACCG
A6	CATTGTCGACTTATGGTGGTGGTAGAG
B6	CATTGTCGACTTATGGTGGTGGTAGAG
C6	CATTGTCGACTTATGGTGGTGGTAGAG
D6	GTATATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATTGTCGACTTATGGT GGTGGTAGAG
E6	CATTGTCGACTTATGGTGGTGGTAGAG
F6	CATTGTCGACTTATGGTGGTGGTAGAG
G6	CATTGTCGACTTATGGTGGTGGTAGAG
A7	CACAAAACTGCAGGCCAAGCAGAACCGGACAGA
B7	AGCACAAGGTTTCAAGCAAGCAGAACCGGACAG
C7	AATGAATGCTGCCAACCAAGCAGAACCGGACAG

continued **Table 1:** Deoxyribonucleotides used for preparation of fusion constructs in pMPM-A4Q.

Prime	Sequence (5'-3')
D7	AGGTCGTACTGACAAAGCAGAACCGGACAG
E7	AGCAATGCTGTCGCACAAGCAGAACCGGACAGA
F7	GACATGAAGGTGCCCAAGCAGAACCGGACAGA
G7	CATGCCCAAAGAGGGGCAAGCAGAACCGGACAGA
A8	TGTGGCAGGAGTTGCGTGGTGATGGTGATGATGCTTGCAACAAAAGGTTA CAAT
B8	GAATTTGTGCTCAGGGTGGTGATGGTGATGATG
C8	CACAAAGGCAGCAGTGTGGTGATGGTGATGATG
D8	CTCAGCGGTTGTTGTGGTGATGGTGATGATG
E8	TGAGGCTCCATTTGTGGTGATGGTGATGATGCTTGCAACAAAAGGTT ACAAT
F8	GTGCCATAGTCTGTGGTGATGGTGATGATGCTTGCAACAAAAGGTT ACAAT
G8	CGGTGGCCGGATGAGGTGGTGATGGTGATGATGCTTGCAACAAAAGGTT ACAAT
A9	GGTTCTGCTTGGCCTGCAGTTTTTGTGG
B9	GGTTCTCCTTGCTTGAACCTTGTGCTTG
C9	GGTTCTGCTTGTGGGACAGCATTTCATTC
D9	GGTTCTGCTTGTCCAGTGATACGACCTC
E9	GGTTCTGCTTGTGCGACAGCATTGCTG
F9	GTTCTGCTTGGGGCACCTTCATGTCC
G9	TTCTGCTTGCCCTCTTTGGGCATG
A10	CATCACCACGCAACTCCTGCCACAG
B10	CCATCACCACCTGAGCACAAATTCGC
C10	CCATCACCACACTGCTGCCTTTGTGAA
D10	TCATCACCATCACCACACAACAACCGTGAGG
E10	CACCATCACCACACAAATGAGGACCTCAG
F10	ACCATCACCACACAGACTATGGCACA
G10	ACCACCTCATCCGGCCACCG

* An, Bn, Cn, Dn, En, Fn and Gn are deoxyribonucleotides used for insertion into loop A, B, C, D, E, F and G respectively

2.3 Preparation of soluble and insoluble fractions

The bacterial soluble and insoluble fractions were prepared according to Cerovska et al., 2003 [23]. Sediments containing insoluble proteins (denatured proteins and protein bodies) were solubilized with 1% SDS. Samples for SDS-PAGE were prepared from purified soluble and insoluble fractions and detection of fusion proteins was performed by Western blot analysis. Protein concentration in each soluble and insoluble fraction was determined by DC Protein Assay kit (Bio-Rad). The purity of pelleted capsid protein was estimated from Coomassie blue stained gel.

2.4 SDS-PAGE and Western blot analysis

Samples for SDS-PAGE were prepared according to a previously published protocol [24]. Proteins separated by SDS-PAGE were electroblotted to a nitrocellulose membrane (Protran 0.2 µm, Schleicher & Schuell) in a semidry system (OMNI-TRANS apparatus, Omnibio Brno, Czech Republic) [25]. After electroblotting, the membrane was blocked in 5% nonfat dry milk for 1 h. Incubation was performed overnight with the primary mouse anti-His antibody (1:3,000 in PBS, GE Healthcare Life Sciences). After washing, the secondary goat anti-mouse IgG (anti whole molecule, 1:30,000 in PBS, Sigma-Aldrich) conjugated to alkaline phosphatase was added. Visualization was performed according to Sambrook et al. [26].

2.5 Immunoelectron microscopy

Immunoelectron microscopy was performed according to Cerovska *et al.*, 2008 [17]. Briefly, modified viral proteins were immunostained either by mouse monoclonal anti-6xHis antibody (GE Healthcare Life Sciences, dilution 1:1,000 in PBS, 30 min) or by rabbit polyclonal anti-PVX-CP antibody (PrimeDiagnostics, dilution 1:1,000 in PBS, 30 min) followed by washing the grids and detection with respective gold conjugate (goat anti-mouse 10 nm Au, goat anti-rabbit 5 nm Au, both Sigma, 1:20 in PBS). In a set of experiments the viral proteins were decorated with both antibodies simultaneously. After additional washing the samples were stained with 2% ammonium molybdate (pH 7.0). Electron microscopy was carried out either on the JEM 1010 transmission electron microscope (Jeol, Japan, facility of Biology Centre of Academy of Sciences, Ceske Budejovice, kindly performed by Dr. Synkova, IEB AS CR, Prague) or on FEI Morgagni 268D (FEI, Oregon USA) at IEB, Prague.

3 Results

3.1 Insertion of the E7 epitope into the seven putative surface exposed loops of the PVX CP

Both experimental epitopes (E7-6xHis and 6xHis E7) were inserted by SOE PCR in all seven loops creating a total of 14 constructs (Fig. 2). Primers designed for this purpose are listed in Table 1. Each construct was cloned into the bacterial expression vector pMPM-A4 Ω using restriction sites EcoRI and Sall (Fig. 2C). The resulting plasmids were named PVX CP-6xHisE7 (A, B, C, D, E, F and G) and PVX CP-E76xHis (A, B, C, D, E, F and G).

Our objective was to evaluate the capacity of the PVX CP platform to tolerate insertion of E7 epitope fused with His tag in the seven different positions. We used the His tag to simplify verification of peptide presence by antibodies.

Insertions were made at seven specific sites in the PVX CP taking into consideration the bioinformatic prediction of the PVX CP structure based on tritium planigraphy [15, 27]. Thereby, fusions were made in the seven different loops connecting α -helices and β -strands of PVX CP which are assumed to be located on the exterior part of the molecule.

The first loop A (amino acids AT) was located between the putative β 2-strand and α 1-helix, the second one B (amino acids KPEH) between β 3-strand and α 6-helix, the third one C (amino acids QTA) between β 4-strand and β 5-strand, the fourth one D (amino acids ITGTTTA)

between α 7-helix and β 6-strand. The fifth loop E (amino acids VAT) was located between α 2-helix and α 3-helix, the sixth loop F (amino acid P) between α 3-helix and α 4-helix, the seventh loop G (amino acids KEGLIRPPS) between α 6-helix and β 4 strand.

All mentioned constructs were transformed into *Escherichia coli* (*E. coli*) strain MC1061 by heat-shock method [22] and verified by sequencing.

Optimization of expression was performed. To illustrate the results, the immunoblots for four loops (A,B,C,D) are depicted in Fig. 3.

The optimal conditions for high yields of protein expression were determined using a volume of 50 ml LB. PVX CPs containing 6xHisE7 in the loops A, B, D, E, F and G and PVX CPs containing E76xHis in the loops B, D, E, F and G were most efficiently expressed at 37 °C (4 h induction with 0.2% arabinose). Alternatively, PVX CP containing 6xHisE7 in the loop C was expressed at 22 °C (2 h induction with 0.2% arabinose) and PVX CPs containing E76xHis in loop A and C were expressed at 22 °C (4 h and 2 h induction with 0.2% arabinose, respectively). Results from the optimization showed that conditions for high yields of proteins depend on the orientation of His tag relative to E7 epitope only in the loop A (4 h and 37 °C for 6xHisE7 and 4 h and 22 °C for E76xHis). As shown in Fig. 3, all insoluble fractions contained the expressed PVX-CP fusion proteins. On the contrary, only soluble fractions of constructs with modified loop A (PVX CP-6xHisE7) and loop C and D (both PVX CP-6xHisE7 and PVX CP-E76xHis) contained detectable levels of heterologous proteins. As shown in Table 2, the lowest levels of expression were detected in the soluble fraction of construct with modified loop D (PVX CP-E76xHis) and in the insoluble fraction of construct with modified loop B (PVX CP-E76xHis).

In conclusion, the best expression results were obtained in the loop A, in which the both fusion proteins were expressed, and after purification through sucrose cushion, the resulting products were without any degradation. On the contrary, expression in other loops resulted in proteins prone to degradation, most probably due to disruption of their proper three-dimensional structure.

3.2 Evaluation of immunological properties of expressed constructs

The immunoreactivity of fusion proteins was first verified by Western blot. All fusion constructs were efficiently recognized by both anti-PVX and anti-His antibodies. The same antibodies were used to decorate fusion proteins in transmission electron microscopy. From the examined

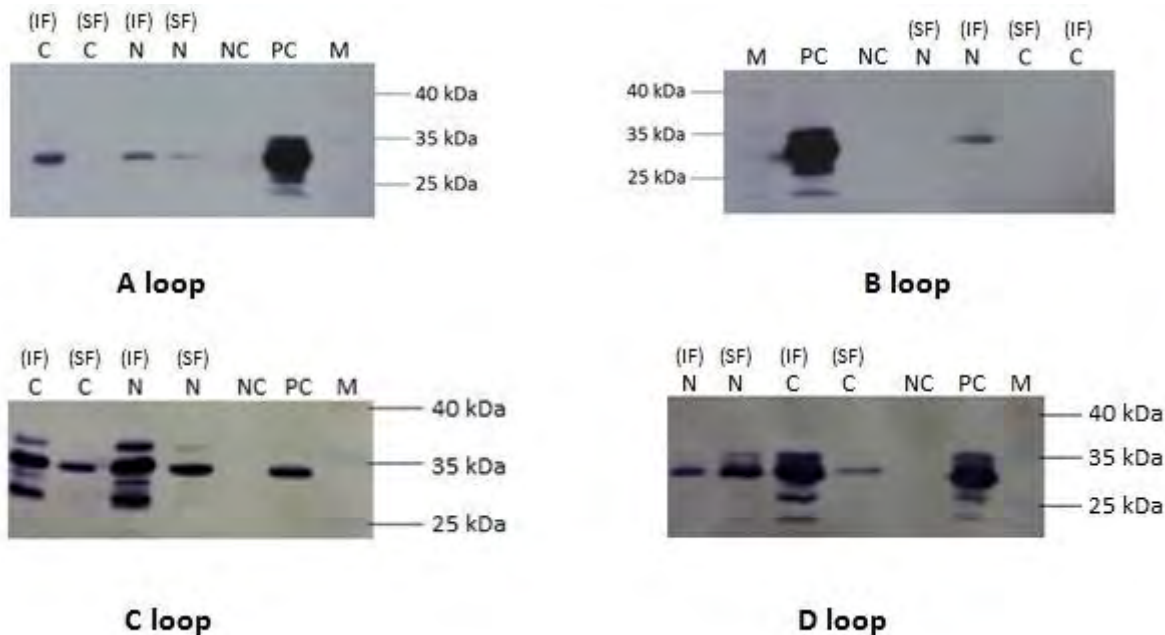


Fig. 3: Expression of PVX CP-6xHisE7/E76xHis in *E. coli* MC1061. Western blot analysis of fusion proteins purified on sucrose cushion (25%): PVX CP-6xHisE7 (N) and PVX CP-E76xHis (C) located in four different surface loops (A, B, C and D) in soluble (SF) and insoluble (IF) fractions. M = marker Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder 10– 260 kDa (Fermentas), PC = positive controls (induced expression of PVX CP-E76xHis in loop D in 10 ml LB for expressions in the loops A, B and D and induced expression of PVX CP-6xHisE7 in loop C for expressions in the look C, which were obtained from preliminary experiments), NC = negative control (noninduced expression in 10 ml LB). All samples were loaded in a volume of 10 μ l, marker 5 μ l. Proteins were immunochemically stained with mouse anti-His antibody (GE Healthcare Life Sciences) and anti-mouse IgG (whole molecule) – Alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich).

Table 2: Total amount of proteins in soluble (SF) and insoluble (IF) bacterial cytoplasmic fractions (expression in 50 ml LB) purified on sucrose cushion (25%).

Expression	Loop	SF	IF
4 h, 37 °C	PVX CP-6xHisE7 A	0.3 mg	0.5 mg
4 h, 22 °C	PVX CP-E76xHis A	-	0.9 mg
4 h, 37 °C	PVX CP-6xHisE7 B	-	0.6 mg
4 h, 37 °C	PVX CP-E76xHis B	-	0.1 mg
2 h, 22 °C	PVX CP-6xHisE7 C	0.4 mg	0.9 mg
2 h, 22 °C	PVX CP-E76xHis C	0.3 mg	0.7 mg
4 h, 37 °C	PVX CP-6xHisE7 D	0.4 mg	0.2 mg
4 h, 37 °C	PVX CP-E76xHis D	0.2 mg	0.7 mg
4 h, 37 °C	PVX CP-E76xHis E	-	0.5 mg
4 h, 37 °C	PVX CP-6xHisE7 E	-	0,7 mg
4 h, 37 °C	PVX CP-E76xHis F	-	0,8 mg
4 h, 37 °C	PVX CP-6xHisE7 F	-	0,5 mg
4 h, 37 °C	PVX CP-E76xHis G	-	0,8 mg
4 h, 37 °C	PVX CP-6xHisE7 G	-	0,3 mg
4 h, 37 °C	PVX CP	0.1 mg	0,7 mg
4 h, 22 °C	PVX CP	0.1 mg	0,5 mg

constructs, only fusions carrying the 6xHisE7 epitope inserted in loop A (PVX-CP-6xHisE7 A) form aggregates of modified PVX with no regular structures accessible to antibody binding on their surface. Even after thorough observation of the grids, we were unable to find similar units for other constructs. This agrees with the results obtained by SDS-PAGE, where only the fusion proteins in the loop A were proteolytically stable, whereas other expressed constructs were degraded and showed significant instability.

4 Discussion

The main objective of our study was to evaluate the capacity of the PVX CP platform to tolerate insertion of E7 epitope fused with His tag in the seven different positions. We used the fusion proteins labeled with the His tag to simplify verification of peptide presence because of lack of specific anti-E7 antibodies. Insertions of labeled epitopes were made at the seven specific sites in the PVX CP taking into consideration the bioinformatic prediction of the PVX CP structure based on tritium planigraphy [15,27]. Thereby, fusions were made in the seven different loops connecting α -helices and β -strands of PVX CP which are assumed to be located on the exterior part of the molecule (Fig. 1).

The engineering of *Papaya mosaic virus* (PapMV), another member of the family *Flexiviridae* in genus *Potexvirus* has been recently described [28]. PapMV CP was expressed in *Escherichia coli* and showed to self assemble into nucleocapsid like particles (NLPs). Twenty percent of the purified protein was found as NLPs of 50 nm in length and 80% was found as a multimer of 450 kDa (20 subunits) arranged in a disk. [28]. Two new tested insertion sites in CP led to the production of recombinant proteins capable of assembly into PapMV nanoparticles [29].

Unlike PapMV, PVX, even though it belongs to the same family and genus, was not able to form particles without the presence of RNA. Recently, the PVX assembly was found to be initiated at the 5' terminus of genomic RNA, where the cap structure is an important condition for virus assembly [30]. Since bacteria are not able to create the cap structure, it is very unlikely that regular VLPs would be formed upon expression in bacteria. This was also confirmed by our results. During TEM observation of engineered PVX CP fusion proteins, viral nanoparticles were not detected, only aggregates of modified PVX CP with no regular structures.

Our laboratory has previously confirmed that the PVX CP had the ability to present heterologous proteins fused

to the N- or C-terminus of PVX CP [17,31,32]. However, this approach was not always successful and optimization of the topology of inserted proteins or peptides in PVX CP was necessary. Finding new positions inside the PVX CP for protein/peptide presentation showed a new approach to heterologous protein expression. We plan to apply our results concerning the new positions within PVX CP to design improved systems for transient expression in hosts enabling cap creation.

Acknowledgments: We acknowledge the skilled technical assistance of Mrs. R. Hadamkova and D. Cibochova.

Conflict of interest: Authors declare that this research was supported by the grant No. P501/12/1761 of the Czech Science Foundation, OPVK CZ.2.16/3.1.00/24014 of the City of Prague and grant No. 631412 of the Charles University Grant Agency.

References

- [1] Canizares M.C., Nicholson L., Lomonosoff G.P., Use of viral vectors for vaccine production in plants, *Immunol Cell Biol.*, 2005, 83, 263–270
- [2] Purcell A.W., McCluskey J., Rossjohn J., More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2007, 6, 404–414
- [3] Hefferon K.L., Plant virus expression vectors set the stage as production platforms for biopharmaceutical proteins, *Virology*, 2012, 433, 1–6
- [4] Yusibov V., Rabindran S., Commandeur U., Twyman R.M., Fischer R., The potential of plant virus vectors for vaccine production, *Drugs in R&D.*, 2006, 7, 203–217
- [5] Montgomery K., Bloch J.R., The human papillomavirus in women over 40: implications for practice and recommendations for screening, *J. Am. Acad. Nurse Pract.*, 2010, 22, 92–100
- [6] Cutts F.T., Franceschi S., Goldie S., Castellsague X., de Sanjose S., Garnett G., et al., Human papillomavirus and HPV vaccines: a review, *B World Health Organ.*, 2007, 85, 719–726
- [7] zur Hausen H., Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application, *Nat. Rev. Cancer.*, 2002, 2, 342–350
- [8] Bellacchio E., Paggi M., Understanding the targeting of the RB family proteins by viral oncoproteins to defeat their oncogenic machinery, *J. Cell Physiol.*, 2013, 228, 285–291
- [9] Verchot-Lubicz J., Ye C.M., Bamunusinghe D., Molecular biology of potexviruses: recent advances, *J. Gen. Virol.*, 2007, 88, 1643–1655
- [10] Uhde K., Fischer R., Commandeur U., Expression of multiple foreign epitopes presented as synthetic antigens on the surface of Potato virus X particles, *Arch. Virol.*, 2005, 150, 327–340
- [11] O'Brien G.J., Bryant C.J., Voogd C., Greenberg H.B., Gardner R.C., Bellamy A.R., Rotavirus VP6 expressed by PVX vectors in

- Nicotiana benthamiana* coats PVX rods and also assembles into virus-like particles, *Virology*, 2000, 270, 444–453
- [12] Luke G., Escuin H., De Felipe P., Ryan M., 2A to the fore - research, technology and applications, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 2010, 26, 223–260
- [13] Plchova H., Moravec T., Hoffmeisterova H., Folwarczna J., Cerovska N., Expression of Human papillomavirus 16 E7ggg oncoprotein on N- and C-terminus of Potato virus X coat protein in bacterial and plant cells, *Protein Expres. Purif.*, 2011, 77, 146–52
- [14] Lico C., Capuano F., Renzone G., Donini M., Marusic C., Scaloni A., et al., Peptide display on Potato virus X: molecular features of the coat protein-fused peptide affecting cell-to-cell and phloem movement of chimeric virus particles, *J. Gen. Virol.*, 2006, 87, 3103–3112
- [15] Fehrmann F., Laimins L.A., Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation, *Oncogene*, 2003, 22, 5201–5207
- [16] Franconi R., Di Bonito P., Dibello F., Accardi L., Muller A., Cirilli A., et al., Plant-derived human papillomavirus 16 E7 oncoprotein induces immune response and specific tumor protection, *Cancer Res.*, 2002, 62, 3654–3658
- [17] Cerovska N., Hoffmeisterova H., Pecenkova T., Moravec T., Synkova H., Plchova H., et al., Transient expression of HPV16 E7 peptide (aa 44-60) and HPV16 L2 peptide (aa 108-120) on chimeric potyvirus-like particles using Potato virus X-based vector, *Protein Expres. Purif.*, 2008, 58, 154–161
- [18] Cerovska N., Moravec T., Hoffmeisterova H., Plchova H., Synkova H., Polakova I., et al., Expression of a recombinant Human papillomavirus 16 E6GT oncoprotein fused to N- and C-termini of Potato virus X coat protein in *Nicotiana benthamiana*, *Plant Cell Tiss. Org.*, (in press), DOI: 10.1007/s11240-012-0253-3
- [19] Lukashina E., Badun G., Fedorova N., Ksenofontov A., Nemykh M., Serebryakova M., et al., Tritium planigraphy study of structural alterations in the coat protein of Potato virus X induced by binding of its triple gene block 1 protein to virions, *FEBS J.*, 2009, 276, 7006–7015
- [20] Mayer M., A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript, *Gene*, 1995, 163, 41–46
- [21] Warrens A., Jones M., Lechler R., Splicing by overlap extension by PCR using asymmetric amplification: an improved technique for the generation of hybrid proteins of immunological interest, *Gene*, 1997, 186, 29–35
- [22] Cerovska N., Moravec T., Rosecka P., Dedic P., Filigarova M., Production of Polyclonal Antibodies to a Recombinant Coat Protein of Potato mop-top virus, *J. Phytopathol.*, 2003, 151, 195–200
- [23] Westermeier R., *Electrophoresis in Practise: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations*, 4th ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2005
- [24] Hirano H., Watanabe T., Microsequencing of proteins electro-transferred onto immobilizing matrices from polyacrylamide gel electrophoresis: application to an insoluble protein, *Electrophoresis*, 1990, 11, 573–580
- [25] Sambrook J., Russell D.W., *Molecular Cloning - a laboratory manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001
- [26] Lukashina E., Ksenofontov A., Fedorova N., Badun G., Mukhamedzhanova A., Karpova O., et al., Analysis of the role of the coat protein N-terminal segment in *Potato virus X* virion stability and functional activity, *Mol. Plant Pathol.*, 2012, 13, 38-45
- [27] Van Die I.M., Bergmans H.E.N., Hoekstra W.P.M., Transformation in *Escherichia coli*: Studies on the Role of the Heat Shock in Induction of Competence, *J. Gen. Microbiol.*, 1983, 129, 663–670
- [28] Tremblay M.H., Majeau N., Laliberte-Gagne M.E., Lecours K., Morin H., Duvignaud J.B., et al., Effect of mutations K97A and E128A on RNA binding and self assembly of papaya mosaic potexvirus coat protein, *FEBS J.*, 2006, 273, 14–25
- [29] Rioux G., Babin C., Majeau N., Leclerc D., Engineering of Papaya Mosaic Virus (PapMV) nanoparticles through fusion of the HA11 peptide to several putative surface – exposed sites. *Plos One.*, (in press), DOI: 10.1371/journal.pone0031925
- [30] Petrova E.K., Nikitin N.A., Protopopova A.D., Archipenko M.V., Yaminsky I.V., Karppova O.V., et al., The role of the 5'-cap structure in viral ribonucleoproteins assembly from potato virus X coat protein and RNAs. *Biochimie*, 2013, 95, 2415-2422
- [31] Cerovska N., Hoffmeisterova H., Moravec T., Plchova H., Folwarczna J., Synkova H., et al., Transient expression of Human papillomavirus type 16 L2 epitope fused to N- and C-terminus of coat protein of Potato virus X in plants, *J. Bioscience.*, 2012, 37, 125–133
- [32] Hoffmeisterova H., Moravec T., Plchova H., Folwarczna J., Cerovska N., The influence of the N- and C- terminal modifications of Potato virus X coat protein on virus properties, *Biol. Plantarum.*, 2012, 56, 775–779

Potato virus X displaying the E7 peptide derived from *human papillomavirus* type 16: a novel position for epitope presentation

Petr Vaculik · Helena Plchova · Tomas Moravec ·
Hana Hoffmeisterova · Noemi Cerovska ·
Michal Smahel

Received: 14 March 2014 / Accepted: 27 September 2014
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

Abstract *Potato virus X* (PVX) is widely used as a peptide presentation system in plant biotechnology, mostly by fusion of desired peptides to the N-terminus of its capsid protein (CP). Considering that some epitopes can interfere with the stability and/or self-assembly of PVX CP when fused to its N-terminus, we evaluated four other possible sites for fusion using the E7 epitope derived from *human papillomavirus* type 16 with different tags. We prepared eight different PVX CP constructs modified with the E7 epitope fused with the 6xHis tag in both orientations (6xHis-E7, E7-6xHis), cloned them into the PVX-based vector pGR106 and expressed them transiently in *Nicotiana benthamiana* plants. Only the fusion site located after amino acid 23 led to systemic infection of plants and the production of recombinant proteins, but no viral particles were detected. When we replaced the 6xHis with StrepII tag, the modified virus infected plants systemically, expressed proteins assembled into viral particles and the epitopes were located on the particle surface. The results of this study indicate that the new position within the PVX CP can be used for peptide presentation on the surface of PVX

particles and is promising for PVX based production of therapeutic compounds in plants.

Keywords *Potato virus X* · *Human papillomavirus* · *Nicotiana benthamiana* · E7 oncoprotein · Transient expression

Introduction

Plant viruses are considered as potential safe platforms for animal and human vaccine preparation, as well as delivery systems for therapeutic agents and contrast dyes in animal and human therapy (Jokerst et al. 2011; Lico et al. 2013). The main advantages of plant viruses for this purpose are their biodegradability, non-infectivity and non-toxicity to animal and human cells, as well as their scalability in plants. To develop an epitope vaccine, an antigen of interest is displayed on the surface of virus by its genetic fusion to capsid protein (CP) (Canizares et al. 2005). These displaying systems are sometimes called protein/peptide presentation systems and those based on plant viruses are good candidates for producing cost-effective vaccines in plants, particularly for the needs of developing countries (Hefferon 2013).

Human papillomaviruses (HPVs) constitute a large group of DNA viruses of about 140 types belonging to family *Papillomaviridae*. HPVs represent one of the most common sexually transmitted infections worldwide. HPVs are divided into low-risk HPVs (e.g., the causative agent of genital warts) and high-risk HPVs (e.g., the causative agent of cervical cancer). Among high-risk HPVs, the most common genotypes are HPV 16 and 18, together causing approximately 70 % of cervical cancers. HPV 16 alone is particularly important in light of the fact that it causes

P. Vaculik · H. Plchova · T. Moravec · H. Hoffmeisterova ·
N. Cerovska (✉)
Institute of Experimental Botany AS CR, v. v. i., Rozvojova 313,
165 02 Prague 6, Czech Republic
e-mail: cerovska@ueb.cas.cz

P. Vaculik
Faculty of Science, Charles University in Prague, Albertov 6,
128 43 Prague 2, Czech Republic

M. Smahel
Department of Experimental Virology, Institute of Hematology
and Blood Transfusion, U Nemocnice 1, 12820 Prague 2,
Czech Republic

50 % of cervical cancers (zur Hausen 2002; Montgomery and Bloch 2010). The E7 oncoprotein, a nonstructural protein of HPVs, plays an important role in both malignant transformation and the maintenance of the transformed state of HPV infected cells and represents a promising target for immunotherapy, because it is expressed in all cervical tumors and precancerous lesions. Several studies involving different approaches to generation of HPV oncoproteins have been performed in this field (e.g. Pozzi et al. 2009; Radaelli et al. 2012). The issue of vaccination against HPV, with an emphasis on antigens produced in plants, is summarized in Giorgi et al. (2010).

Potato virus X (PVX) belongs to the order *Tymovirales*, family *Alphaflexiviridae* and genus *Potexvirus*. It is a filamentous, positive single-stranded RNA virus. Virus particles are about 515 nm long and 13 nm in diameter. The PVX genome is capped, has a poly(A) tail and encodes five open reading frames (viral replicase, three movement proteins belonging to the triple-gene block family and CP (approximately 1,300 CP subunits per virion) (Verchot-Lubicz et al. 2007). PVX is widely used as a peptide/protein presentation system in plant biotechnology. The presented antigens are mostly fused to the N-terminus of CP (O'Brien et al. 2000; Uhde et al. 2005; Massa et al. 2008; Morgenfeld et al. 2009). We have shown previously that the C-terminus of PVX CP can also be used for antigen display (Plchova et al. 2011; Cerovska et al. 2012, 2013).

However, this fusion strategy is not versatile, as some epitopes might interfere with the stability and/or self-assembly of PVX CP. Therefore, we aimed at finding other fusion sites in the PVX CP that can tolerate the fusion with the E7 epitope derived from HPV 16 and various tags. We tested four new sites of fusion by the insertion of the E7 epitope with a tag into PVX CP and evaluated the ability of modified PVX to infect plants systemically, to assemble into viral particles and to display the epitopes on their surface.

Materials and methods

Preparation of DNA constructs

Primers (Table 1) were designed to fuse the E7 epitope (amino acids 44-60; QAEPDRAHYNIVTFCCCK) to either the 6xHis or StrepII tag in two orientations [6xHis-E7 (HE), E7-6xHis (EH), StrepII-E7 (SE) and E7-StrepII (ES)], and to insert these fusions into the putative PVX CP surface loops I2, I8, I10 and I12 (Fig. 1) after the amino acids 23, 154, 193 and 224 by SOE (splicing by overhang extension)-PCR (Fig. 2). The PVX CP sequences were amplified by PCR from the binary vector pGR106 (kindly provided by D.C. Baulcombe, The Sainsbury Laboratory,

Norwich, United Kingdom). The E7 epitope sequence was prepared by PCR from the plasmid pBSC/E7GGG (Smahel et al. 2001). The constructs were subsequently cloned into the bacterial expression vector pMPM-A4 Ω using restriction sites EcoRI and SalI. The resulting plasmids were transformed (by heat-shock method) (Van Die et al. 1983) into *Escherichia coli* strain Top10 (Life Technologies) and after their isolation checked for sequence accuracy. All constructs except for HE224 and EH224 were then sub-cloned from pMPM-A4 Ω into the binary vector pGR106 using restriction sites ClaI and XhoI, and checked for sequence accuracy. The constructs HE224 and EH224 were cloned directly into the pGR106 vector using XhoI and SpeI restriction sites (Fig. 2).

Plant transient expression

For plant transient expression, we used two different genotypes of *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*): wild-type genotype (W) and *N. benthamiana* carrying a gene coding for the silencing-suppressor protein HC-Pro derived from *Potato virus A* (HC; kindly provided by E. Savenkov, Department of Plant Biology, Sveriges Lantbruks-universitet, Uppsala, Sweden). All plants were grown in controlled conditions (20–25 °C day, 15–20 °C night, 16 h photoperiod).

The plasmids pGR106 carrying the individual constructs were isolated from *E. coli* and transformed into *Agrobacterium tumefaciens* (strain GV3101 carrying the helper plasmid pSoup) by the freeze/thaw method (Wise et al. 2006). Bacteria containing these plasmids were selected on LB-agar plates with 25 μ g/ml kanamycin. Bacterial suspension for agroinfiltration of plants was prepared by growing bacteria for 2 days in LB medium containing 25 μ g/ml kanamycin at 28 °C. Ten plants per group were inoculated at the four-leaf stage. The infection of host plants was performed by infiltration using a 1 ml hypodermic syringe (Hoffmeisterova et al. 2008). *A. tumefaciens* carrying non-modified pGR106 was used as a positive control for agroinfiltration of each *N. benthamiana* genotype. The experiments were performed in triplicate.

SDS-PAGE and western blot analysis

4 μ l TCEP (500 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine, pH 7.0, Sigma-Aldrich) and 10 μ l 4 \times Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad) were added to 30 μ l of purified virus or leaf extract prepared by extraction from 1 g of leaf tissue in 10 ml of PBS using a mortar and pestle. Samples were incubated for 15 min at 90 °C, centrifuged at 10 000 g for 30 s and loaded on 12 % polyacrylamide gel containing SDS (Westermeier 2005).

Table 1 Oligonucleotides used for preparation of constructs

Name (Xn)	5'–3' Sequence	Construct	Vector
Z3	CATTCATTGAATTCATCGATATGTCAGCACCAGCTAG	All	pMPM-A4 Ω
Z6	CATTGTCGACTTATGGTGGTGGTAGAG		
A1	CACAAAACTGCAGGCCATCATCACCATCACCACCAAGCAGAACCGGACAGA	HE23	
A2	TGTGGCAGGAGTTGCCTTGCAACAAAAGGTTACAAT		
A4	TGGTGATGATGGCCTGCAGTTTTTGTGG		
A5	TTTTGTTGCAAGGCAACTCCTGCCACAG		
A7	CACAAAACTGCAGGCCAAGCAGAACCGGACAGA	EH23	
A8	TGTGGCAGGAGTTGCGTGGTGATGGTGATGATGCTTGCAACAAAAGGTTACAAT		
A9	GGTCTGCTTGGCCTGCAGTTTTTGTGG		
A10	CATCACCACGCAACTCCTGCCACAG		
B1	AGCACAAGGTTTCAAGCATCATCACCATCACCAC	HE154	
B2	GAATTTGTGCTCAGGCTTGCAACAAAAGGTTACAA		
B4	TGGTGATGATGCTTGAAACCTTGTGCTTG		
B5	CTTTGTTGCAAGCCTGAGCACAAATTCGC		
B7	AGCACAAGGTTTCAAGCAAGCAGAACCGGACAG	EH154	
B8	GAATTTGTGCTCAGGTTGGTGATGGTGATGATG		
B9	GGTCTGCTTGGCTTGAAACCTTGTGCTTG		
B10	CCATCACCACCCTGAGCACAAATTCGC		
C1	AATGAATGCTGCCAACATCATCACCATCACCAC	HE193	
C2	CACAAAGGCAGCAGTCTTGCAACAAAAGGTTACAA		
C4	TGGTGATGATGTTGGCAGCATTCAATTC		
C5	TTTTGTTGCAAGACTGCTGCCTTTGTGAA		
C7	AATGAATGCTGCCAACAAAGCAGAACCGGACAG	EH193	
C8	CACAAAGGCAGCAGTGTGGTGATGGTGATGATG		
C9	GGTCTGCTTGTGGGCAGCATTCAATTC		
C10	CCATCACCACACTGCTGCCTTTGTGAA		
Y1	AAAAACTGCAGGCTGGAGCCACCCGACAGTTTCGAAAAGCAAGCAGAACCGGACAGA	SE23	
Y2	Same as A2		
Y4	GGGTGGCTCCAGCCTGCAGTTTTTGTGG		
Y5	Same as A5		
Y7	Same as A7	ES23	
Y8	TGTGGCAGGAGTTGCCTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCACTTGCAACAAAAGGTTACAAT		
Y9	Same as A9		
Y10	CAGTTCGAAAAGGCAACTCCTGCCACAG		
D11	CATTCTGAGGTTCGTATCACTGGACATCATCACCATCACCACCAAGCAGAACC	HE224	pGR106
D12	CCTCAGCGTTGTTGTCTTGCAACAAAAGGTTACAATATTGTAATGGGCTC		
D13	AACCTTTTGTGCAAGACAACAACCGCTGAGG		
Z14	ACCCACTAGTTTTTTTTTTTTTATTTATATTA	HE224, EH224	
D14	CATTCTGAGGTTCGTATCACTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCC	EH224	
D15	CCTCAGCGTTGTTGTGTGGTGATGGTGATGATGCTTGCAAC		
D16	TCATCACCATCACCACACAACAACCGCTGAGG		

The proteins separated by SDS-PAGE were electroblotted to a nitrocellulose membrane (0.2 μ m, Schleicher & Schuell Protran) in a semi-dry system (OMNI-TRANS apparatus, Omnibio Brno, Czech Republic). After

electroblotting, the membrane was incubated in 5 % nonfat dry milk in PBST (PBS + 0.1 % Tween 20) for 1 h. For detection of fusion proteins, the primary mouse anti-His antibody (GE Healthcare Life Sciences, dilution 1:3,000 in

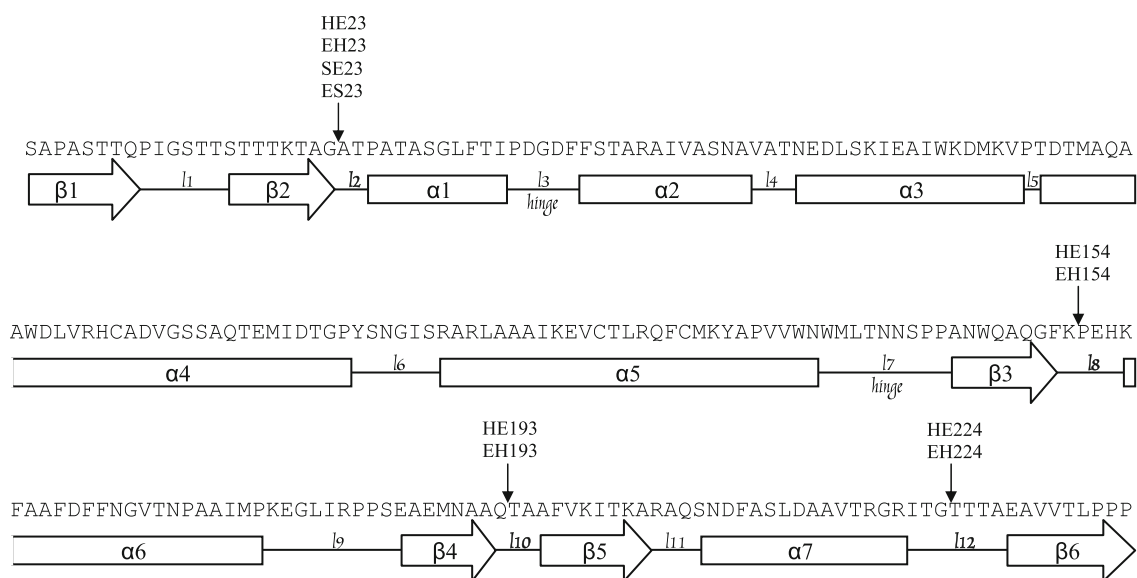


Fig. 1 PVX CP amino acid sequence with secondary structure element prediction (Lukashina et al. 2009). Fusion sites are indicated by arrows. α α -helices, β β -strands, l loops

PBST), anti-StrepII tag antibody (Qiagen, dilution 1:1,000 in PBST) or primary rabbit polyclonal anti-PVX CP antibody (Prime Diagnostics, dilution 1:1,000 in PBS) was added and the membrane was incubated overnight. Subsequently, the membrane was washed 3×5 min in PBST and the secondary anti-mouse IgG (whole molecule)-alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich, dilution 1:30,000 in PBST) or secondary anti-rabbit IgG (whole molecule)-alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich, dilution 1:30,000 in PBST) conjugate was added. After 2 h incubation, the membrane was washed 3×5 min in PBST and visualization was performed by the reaction with chromogenic alkaline phosphatase substrate (BCIP/NBT, Sigma Aldrich).

Immunoelectron microscopy

Nickel grids with 2 % Formvar support layer were floated on 20 μ l droplets of purified virus or leaf extract (1 g of leaf tissue extracted in 10 ml PBS using a mortar and pestle and centrifuged at 11,000 g for 1 min). The grids were washed 2×2 min with 20 μ l PBS, and virus particles were immunostained by primary mouse anti-His antibody (GE Healthcare Life Sciences, dilution 1:1,000 in PBS for 40 min), monoclonal anti-StrepII tag antibody (Qiagen, dilution 1:500 in PBS, 30 min) or rabbit polyclonal anti-PVX CP antibodies (Prime Diagnostics, dilution 1:1,000 in PBS, 30 min). The grids were washed again with PBS (2×2 min, 20 μ l) and secondary gold-conjugated antibodies were added: anti-mouse IgG (whole molecule)-Gold 10 nm colloidal gold antibodies or anti-rabbit IgG (whole molecule)-Gold 5 nm antibodies (both Sigma-Aldrich,

dilution 1:20 in PBS). In some experiments, the virus particles were decorated with both antibodies simultaneously. After additional washing with PBS (2×2 min, 20 μ l), the samples were stained with a 20- μ l droplet of 4 % (w/v) ammonium molybdenate plus 0.1 % trehalose (w/v) for 5 min. As a negative control for decoration with mouse monoclonal anti-StrepII tag antibody, the wild-type PVX was used. Electron microscopy was carried out on FEI Morgagni 268D (FEI, Oregon USA).

Virus purification

Agroinfiltrated plants were harvested after typical mosaic symptoms were observed (Fig. 3)—roughly 2 weeks after agroinfiltration. To ensure that modified virus particles were produced in plants, we observed the harvested leaves by immunoelectron microscopy. Subsequently, the PVX purification protocol was followed (Techniques in Plant Virology 1997).

Results

Insertion of the E7 peptide into four putative surface loops of the PVX CP

The E7 oncoprotein of HPV 16 is an attractive candidate for the development of an anti-cancer therapeutic vaccine. Our effort to express the E7 epitope in plants using a PVX vector is related to our previous research on the expression of mutated E6 and E7 oncoproteins of HPV 16 in plants (Plchova et al. 2011; Cerovska et al. 2008, 2013). To test

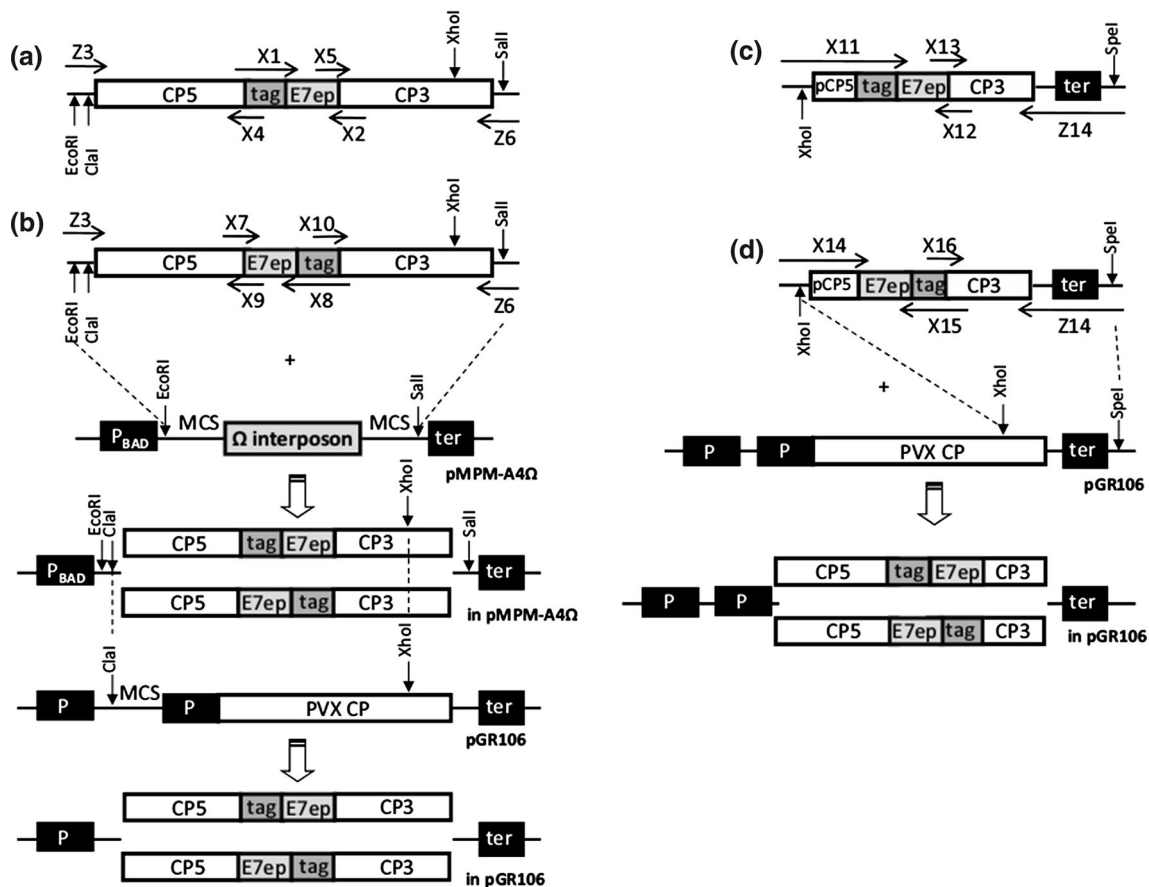


Fig. 2 SOE PCR strategy for preparation of constructs. **a** Cloning strategy of the E7 peptide carrying the tag at its N-terminus after amino acids 23, 154 and 193 in PVX CP into the pMPM-A4 Ω and pGR106 vectors. **b** Cloning strategy of the E7 epitope carrying the tag at its C-terminus after the amino acids 23, 154 and 193 into the pMPM-A4 Ω and pGR106 vectors. **c** Cloning strategy of the E7 epitope carrying the tag at its N-terminus after the amino acid 224 in PVX CP directly into the pGR106 vector. **d** Cloning strategy of the

E7 epitope carrying the tag at its C-terminus after the amino acid 224 in PVX CP directly into the pGR106 vector. Restriction sites and primers used are indicated. X1-X16 are oligonucleotides A, B, C, D and Y with respective number (Xn) summarized in Table 1. Oligonucleotides Z3, Z6 and Z14 are directly indicated. *ptag* partial sequence of tag, *pE7* partial sequence of the E7 epitope, *pCP* partial sequence of PVX CP, *P* promoter, *ter* terminator

the model as a template for designing new insertion sites for antigen presentation, we used the 17 aa peptide derived from the E7 oncoprotein (amino acids 44–60; QA-EPDRAHYNIVTFCKK) containing immunodominant epitopes for B and T cells (Pokorna et al. 2005) fused with a tag on its N- or C-terminus. We first used the 6xHis tag, then the StrepII tag. The tags were used for both detection of antigen production and evaluation of antigen presentation on the surface of PVX particles, as no antibodies recognizing the E7 peptide were available. The three-dimensional structure of PVX CP in a virion was recently studied by tritium planigraphy (Nemykh et al. 2008; Lukashina et al. 2009). Although the model provides only limited accuracy, it is possible to use it as a template for designing new insertion sites in PVX CP for antigen presentation. Fusions with the E7 peptide and tag were performed at four putative PVX CP surface loops *l2*, *l8*, *l10*

and *l12* (Fig. 1) after the amino acids 23, 154, 193 and 224 by SOE-PCR (Fig. 2). The following constructs were prepared: the E7 peptide fused with 6xHis tag either at its N- or C-terminus and inserted at position 23 (HE23, EH23), 154 (HE154, EH154), 193 (HE193, EH193) or 224 (HE224, EH224) and the E7 peptide fused with StrepII tag either at its N- or C-terminus and inserted at position 23 (SE23, ES23).

Expression of modified PVX CP in *N. benthamiana* plants and the formation of virus particles

Western blot analysis showed that recombinant proteins carrying the inserted E7 peptide with the 6xHis tag at positions 154 (HE154, EH154), 193 (HE193, EH193) and 224 (HE224, EH224) were not expressed in *N. benthamiana*. Recombinant proteins harbouring inserts after amino



Fig. 3 *N. benthamiana* (wild-type) plant infected with the ES23 construct. The photo was taken 15 days after agroinfiltration. The other genotype, HC showed the same mosaic symptom

acid 23 (HE23, EH23) were expressed both in inoculated and uninoculated leaves (data not shown), which indicated cell-to-cell and systemic movement in plants. However, as observed by immunoelectron microscopy, we were not able to detect the assembly of the HE23 and EH23 into recombinant virus particles even in extracts prepared from inoculated and systemically infected leaves before their purification. We therefore replaced the 6xHis tag with the StrepII tag and prepared constructs SE23 and ES23, as described previously. The typical mosaic symptoms of PVX infection were observed in both *N. benthamiana* genotypes (W and HC) after plant agroinfiltration as in the case of constructs HE23 and EH23 (Fig. 3). The two recombinant proteins, SE23 and ES23, were expressed both in inoculated and uninoculated leaves of both *N. benthamiana* genotypes (Fig. 4), again indicating the ability of coat protein to support both cell-to-cell and systemic movement in plants.

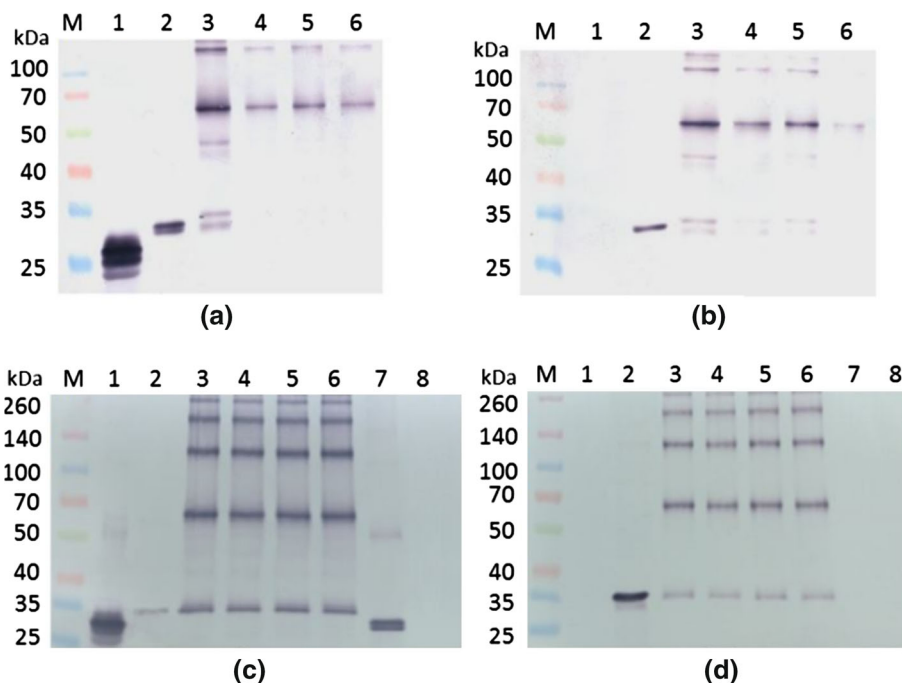


Fig. 4 Western blot analysis of the SE23 and ES23 proteins expressed 15 days after agroinfiltration in *N. benthamiana* plants. **a** Western blot analysis of SE23 immunochemically stained with primary rabbit anti-PVX CP antibodies (Prime Diagnostics) and secondary anti-rabbit IgG (whole molecule)—Alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich). *M* Marker Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder 10–260 kDa, Thermo Scientific; *1* purified PVX; *2* purified ES23 viral particles; *3* W-inoculated leaves; *4* W-systemic leaves; *5* HC-inoculated leaves; *6* HC-systemic leaves. **b** Western blot analysis of SE23 immunochemically stained with primary mouse monoclonal anti-StrepII tag antibody (Qiagen) and secondary anti-mouse IgG (whole molecule)—Alkaline phosphatase (Sigma-

Aldrich). **c** Western blot analysis of ES23 immunochemically stained with primary rabbit anti-PVX CP antibodies (Prime Diagnostics) and secondary anti-rabbit IgG (whole molecule)—Alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich). *M* Marker Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder 10–260 kDa, Thermo Scientific; *1* purified PVX; *2* purified ES23 viral particles; *3* W-inoculated leaves; *4* W-systemic leaves; *5* HC-inoculated leaves; *6* HC-systemic leaves; *7* W-systemic leaves infected with PVX; *8* Noninfected healthy W (negative control). **d** Western blot analysis of ES23 immunochemically stained with primary mouse monoclonal anti-StrepII tag antibody (Qiagen) and secondary anti-mouse IgG (whole molecule)—Alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich)

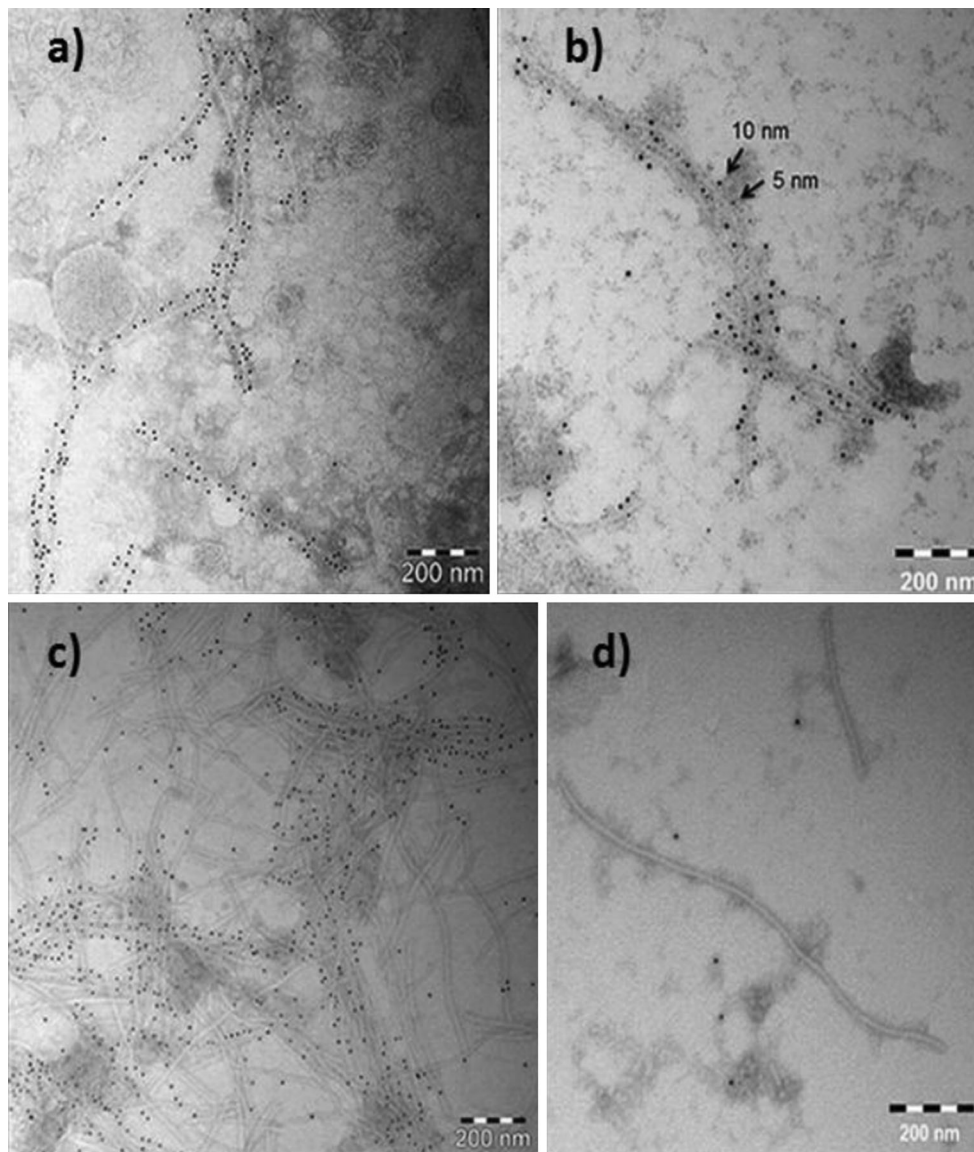


Fig. 5 Immunoelectron microscopy of the ES23 viral particles stained with 4 % ammonium molybdate. **a** The ES23 viral particles decorated with primary mouse monoclonal anti-StrepII tag antibody (Qiagen) and secondary anti-mouse IgG (whole molecule)-Gold 10 nm colloidal gold antibodies (Sigma-Aldrich). **b** The ES23 viral particles decorated with both primary mouse anti-StrepII tag antibody (Qiagen) followed by secondary anti-mouse IgG (whole molecule)-Gold 10 nm colloidal gold antibodies (Sigma-Aldrich) and primary rabbit anti-PVX CP antibodies (Prime Diagnostics) followed by

secondary anti-rabbit IgG (whole molecule)-Gold 5 nm antibodies (Sigma-Aldrich). **c** The purified ES23 viral particles decorated with primary mouse monoclonal anti-StrepII tag antibody (Qiagen) and secondary anti-mouse IgG (whole molecule)-Gold 10 nm colloidal gold antibodies (Sigma-Aldrich). **d** Negative control wild-type PVX particles decorated with primary mouse monoclonal anti-StrepII tag antibody (Qiagen) and secondary anti-mouse IgG (whole molecule)-Gold 10 nm colloidal gold antibodies (Sigma-Aldrich)

As it is apparent from the Fig. 4c and d the CP-multimers are present even in extracts from plants inoculated with wild type PVX, albeit at much lower levels. It is known that also E7 oncoprotein makes SDS PAGE resistant oligomers during expression in animal cells (Dantur et al. 2009). It is possible that the binding of E7 epitope changed the chemical properties of PVX CP and increased

its ability to make such resistant oligomers. Purified virus preparations did not contain these multimeric structures.

We performed immunoelectron microscopy using antibodies against PVX CP, StrepII tag or both antigens to evaluate the formation of modified viral particles and the accessibility of the StrepII tag on the surface of the recombinant particles. The SE23 and ES23 proteins formed

viral particles and the particles were efficiently recognized both by anti-PVX CP and anti-StrepII tag antibodies. As the SE23 and ES23 particles appeared identical under the microscope, only the ES23 particles are shown (Fig. 5a, b). PVX particles were used as a negative control, because they do not bind anti-StrepII tag antibodies (Fig. 5c). The SE23 and ES23 viral particles were then purified. At first, a routinely used purification scheme for PVX was utilized (Techniques in Plant Virology 1997). Based on this scheme, we could purify only ES23 virus particles, whereas the scheme was not applicable to SE23 particles. Therefore another purification scheme for PVX was likewise unsuccessful (Foster and Taylor 1998).

Purified ES23 virus particles were again viewed using immunoelectron microscopy. The particles were labeled by anti-StrepII antibodies (Fig. 5d) suggesting that the StrepII tag and most probably also the E7 peptide, as it is located closer to the N-terminus of PVX CP, were present on the surface of the recombinant viral particles and accessible for possible interaction with the immune system.

Discussion

Despite the high efficacy of prophylactic HPV vaccines in protection against infection, they do not have a therapeutic effect against preexisting infection. Therefore, there is a strong need to develop a therapeutic HPV vaccine. As viral oncoproteins E6 and E7, which are involved both in the malignant transformation of cells and in the maintenance of the transformed state, are constitutively expressed in all HPV-infected cells, they are ideal target antigens for the development of therapeutic vaccines (Monie et al. 2007). With a view to producing vaccines and other therapeutics affordable for developing countries, we examined plant expression systems as potential candidates. One way to combine fast and cost-effective plant transient expression with the ability of plant viruses to serve as safe antigen displaying systems is to produce recombinant viruses carrying surfaced-exposed antigens in plants. As a platform for this purpose, *Cowpea mosaic virus* (icosahedral), *Cucumber mosaic virus* (icosahedral), *Tobacco mosaic virus* (rod-shaped), and *Potato virus X* (filamentous) have been used (Bendahmane et al. 1999; Uhde et al. 2005; Zhao and Hammond 2005; Smith et al. 2006; Nuzzaci et al. 2007; Sainsbury et al. 2010).

Our group has used plant viral vectors based on PVX (pGR106) for transient expression of whole proteins or epitopes derived from the structural proteins and oncoproteins of HPV16 (Plchova et al. 2011; Cerovska et al. 2008, 2012, 2013). During these studies we had problems with the stability of expressed proteins, regardless of whether they were subcloned into the multiple cloning site

of pGR106, or as fusions with the N- or C-terminus of PVX CP in the same vector. This led us to propose a new approach for transient expression of antigens from pGR106 based on their internal location in predicted surface loops of PVX CP.

In this study we tested four different insertion sites located in four putative surface oriented loops of PVX CP using HPV16 E7-derived peptide fused with the 6xHis or StrepII tag either at its N- or C- terminus; then we evaluated the ability of the resulting recombinant proteins to form virus particles with the surface exposed fused peptide. Only one site close to the N-terminus of PVX CP tolerated the insertion. This was the position after amino acid 23 of PVX CP. The other three insertions did not result in recombinant proteins. The insertions at positions 154 and 193 were located in putative surface loops connecting the α -helices and β -strands (β 3, α 6, β 4, β 5 and α 7) belonging to the RNA-recognition motif (Lukashina et al. 2012). The insertion at position 224 was located 13 aa from the C-terminus of PVX CP. Virus particles from PVX CP lacking C-terminal 10 or 18 aa have been reported to be unable to bind TGBp1 and be translationally activated (Zayakina et al. 2008). This could explain the lack of expression of our constructs with inserts in these positions. Moreover, deletion of PVX CP C-terminal 18 aa has led to inhibition of cell-to-cell movement (Fedorkin et al. 2001).

Recombinant proteins with insertions at position 23 (HE23, EH23, SE23 and ES23) were expressed in inoculated and uninoculated leaves of *N. benthamiana* plants. However, only ES23 led to the formation of virus particles that presented the inserted peptide at their surface and could be purified. This suggests that the location of the tag also plays a role in virus particle stability. If proteins HE23 and EH23 formed virus particles as they were produced after inoculation, these particles may have been unstable during the purification procedure.

The N-terminus of PVX CP resides on the surface of virus particles (Baratova et al. 1992a, b) and can be used for antigen display. However, several criteria concerning the antigen amino acid sequence (isoelectric point, charge, tryptophan and serine/threonine content) must be fulfilled to ensure genetic stability, correct assembly of virus particles, and viral cell-to-cell and systemic movement (Lico et al. 2006; Uhde-Holzem et al. 2007). Our previous attempts to express the E7 peptide as an N-terminal fusion with PVX CP failed and resulted in the loss of the peptide sequence. Here we have shown that this peptide can be expressed together with the StrepII tag as an internal part of PVX CP. The recombinant peptide is surface exposed on stable viral particles and does not negatively influence the virus life cycle. In conclusion, this work revealed a novel internal position in PVX CP which can be used for peptide presentation.

Acknowledgments This research was supported by the Grant No. P501/12/1761 of the Czech Science Foundation, CZ.2. 16/3.1.00/24014 from the European Regional Development Fund, Operational Programme Prague-Competitiveness and Grant No. 631412 of the Charles University Grant Agency. We acknowledge the skilled technical assistance of Mrs. R. Hadamkova and D. Cibochova.

References

- Baratova LA, Grebenshchikov NI, Dobrov EN, Gedrovich AV, Kashirin IA, Shishkov AV, Efimov AV, Järvekülg L, Radavsky YuL, Saarma M (1992a) The organization of Potato virus X coat proteins in virus particles studied by tritium planigraphy and model building. *Virology* 188:175–180
- Baratova LA, Grebenshchikov NI, Shishkov AV, Kashirin IA, Radavsky JL, Järvekülg L, Saarma M (1992b) The topography of the surface of potato virus X: tritium planigraphy and immunological analysis. *J Gen Virol* 73:229–235
- Bendahmane M, Koo M, Karrer E, Beachy R (1999) Display of epitopes on the surface of tobacco mosaic virus: impact of charge and isoelectric point of the epitope on virus-host interactions. *J Mol Biol* 290:9–20
- Canizares M, Nicholson L, Lomonossoff G (2005) Use of viral vectors for vaccine production in plants. *Immunol Cell Biol* 83:263–270
- Cerovska N, Hoffmeisterova H, Pecenkova T, Moravec T, Synkova H, Plchova H, Veleminsky J (2008) Transient expression of HPV16 E7 peptide (aa 44–60) and HPV16 L2 peptide (aa 108–120) on chimeric potyvirus-like particles using Potato virus X-based vector. *Protein Expr Purif* 58:154–161
- Cerovska N, Hoffmeisterova H, Moravec T, Plchova H, Folwarczna J, Synkova H, Ryslava H, Ludvikova V, Smahel M (2012) Transient expression of human papillomavirus type 16 L2 epitope fused to N- and C-terminus of coat protein of *Potato virus X* in plants. *J Biosci* 37:125–133
- Cerovska N, Moravec T, Hoffmeisterova H, Plchova H, Synkova H, Polakova I, Duskova M, Smahel M (2013) Expression of a recombinant human papillomavirus 16 E6GT oncoprotein fused to N- and C-termini of Potato virus X coat protein in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 113:81–90
- Dantur K, Alonso L, Castano E, Morelli L, Centeno-Crowley JM, Vighi S, de Prat-Gay G (2009) Cytosolic accumulation of HPV16 E7 oligomers supports different transformation routes for the prototypic viral oncoprotein: the amyloid-cancer connection. *Int J Cancer* 125:1902–1911
- Fedorkin ON, Solovyev AG, Yelina NE, Zamyatnin AA Jr, Zinovkin RA, Mäkinen K, Schiemann J, Morozov S (2001) Cell-to-cell movement of potato virus X involves distinct functions of the coat protein. *J Gen Virol* 82:449–458
- Foster G, Taylor S (1998) *Plant virology protocols: from virus isolation to transgenic resistance*. Humana Press, New Jersey
- Giorgi C, Franconi R, Rybicki EP (2010) Human papillomavirus vaccines in plants. *Expert Rev Vaccines* 9:913–924
- Hefferon K (2013) Plant-derived pharmaceuticals for the developing world. *Biotechnol J* 8:1193–1202
- Hoffmeisterova H, Cerovska N, Moravec T, Plchova H, Folwarczna J, Veleminsky J (2008) Transient expression of fusion gene coding for the HPV-16 epitopes fused to the sequence of potyvirus coat protein using different means of inoculation of *Nicotiana benthamiana* and *Brassica rapa*, cv. *Rapa* plants. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 94:261–267
- Jokerst J, Lobovkina T, Zare R, Gambhir S (2011) Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine (Lond)* 6:715–728
- Lico C, Capuano F, Renzone G, Donini M, Marusic C, Scaloni A, Benvenuto E, Baschieri S (2006) Peptide display on Potato virus X: molecular features of the coat protein-fused peptide affecting cell-to-cell and phloem movement of chimeric virus particles. *J Gen Virol* 87:3103–3112
- Lico C, Schoubben A, Baschieri S, Blasi P, Santi L (2013) Nanoparticles in biomedicine: new insights from plant viruses. *Curr Med Chem* 20:3471–3487
- Lukashina E, Badun G, Fedorova N, Ksenofontov A, Nemykh M, Serebryakova M, Mukhamedzhanova A, Karpova O, Rodionova N, Baratova L, Dobrov E (2009) Tritium planigraphy study of structural alterations in the coat protein of *Potato virus X* induced by binding of its triple gene block 1 protein to virions. *FEBS J* 276:7006–7015
- Lukashina E, Ksenofontov A, Fedorova N, Badun G, Mukhamedzhanova A, Karpova O, Rodionova N, Baratova L, Dobrov E (2012) Analysis of the role of the coat protein N-terminal segment in *Potato virus X* virion stability and functional activity. *Mol Plant Pathol* 13:38–45
- Massa S, Simeone P, Muller A, Benvenuto E, Venuti A, Franconi R (2008) Antitumor activity of DNA vaccines based on the human papillomavirus-16 E7 protein genetically fused to a plant virus coat protein. *Hum Gene Ther* 19:354–364
- Monie A, Hung CF, Wu TC (2007) Preventive and therapeutic HPV vaccines. *Curr Opin Investig Drugs* 8:1038–1050
- Montgomery K, Bloch J (2010) The human papillomavirus in women over 40: implications for practice and recommendations for screening. *J Am Acad Nurse Pract* 22:92–100
- Morgenfeld M, Eugenia Segretin M, Wirth S, Lentz E, Zelada A, Mentaberry A, Gissmann L, Bravo-Almonacid F (2009) Potato virus X coat protein fusion to human papillomavirus 16 E7 oncoprotein enhance antigen stability and accumulation in tobacco chloroplast. *Mol Biotechnol* 43:243–249
- Nemykh MA, Efimov AV, Novikov VK, Orlov VN, Arutyunyan AM, Drachev VA, Lukashina EV, Baratova LA, Dobrov EN (2008) One more probable structural transition in potato virus X virions and a revised model of the virus coat protein structure. *Virology* 373:61–71
- Nuzzaci M, Piazzolla G, Vitti A, Lapelosa M, Tortorella C, Stella I, Natilla A, Antonaci S, Piazzolla P (2007) Cucumber mosaic virus as a presentation system for a double hepatitis C virus-derived epitope. *Arch Virol* 152:915–928
- O'Brien G, Bryant C, Voogd C, Greenberg H, Gardner R, Bellamy A (2000) Rotavirus VP6 expressed by PVX vectors in *Nicotiana benthamiana* coats PVX rods and also assembles into virus-like particles. *Virology* 270:444–453
- Plchova H, Moravec T, Hoffmeisterova H, Folwarczna J, Cerovska N (2011) Expression of human papillomavirus 16 E7 oncoprotein on N- and C-terminus of Potato virus X coat protein in bacterial and plant cells. *Protein Expr Purif* 77:146–152
- Pokorna D, Cerovska N, Smahel M, Moravec T, Ludvikova V, Mackova J, Synkova H, Duskova M, Hozak P, Veleminsky J (2005) DNA vaccines based on chimeric potyvirus-like particles carrying HPV16 E7 peptide (aa 44–60). *Oncol Rep* 14:1045–1053
- Pozzi E, Basavecchia V, Zanotto C, Pacchioni S, Morghen CDG, Radaelli A (2009) Construction and characterization of recombinant fowlpox viruses expressing human papilloma virus E6 and E7 oncoproteins. *J Virol Methods* 158:184–189
- Radaelli A, Morghen CDG, Zanotto C, Pacchioni S, Bissa M, Franconi R, Massa S, Paolini F, Muller A, Venuti A (2012) A prime/boost strategy by DNA/fowlpox recombinants expressing a mutant E7 protein for the immunotherapy of HPV-associated cancers. *Virus Res* 170:44–52
- Sainsbury F, Cañizares M, Lomonossoff G (2010) Cowpea mosaic virus: the plant virus-based biotechnology workhorse. *Annu Rev Phytopathol* 48:437–455

- Smahel M, Sima P, Ludvikova V, Vonka V (2001) Modified HPV16 E7 genes as DNA vaccine against E7-containing oncogenic cells. *Virology* 281:231–238
- Smith M, Lindbo J, Dillard-Telm S, Brosio P, Lasnik A, McCormick A, Nguyen L, Palmer K (2006) Modified tobacco mosaic virus particles as scaffolds for display of protein antigens for vaccine applications. *Virology* 348:475–488
- Techniques in Plant Virology (1997) CIP training manual, protocols for the purification of plant viruses. [http://cipotato.org/training/Materials/PVTechs/Fasc5.2\(99\).pdf](http://cipotato.org/training/Materials/PVTechs/Fasc5.2(99).pdf)
- Uhde K, Fischer R, Commandeur U (2005) Expression of multiple foreign epitopes presented as synthetic antigens on the surface of *Potato virus X* particles. *Arch Virol* 150:327–340
- Uhde-Holzem K, Fischer R, Commandeur U (2007) Genetic stability of recombinant potato virus X virus vectors presenting foreign epitopes. *Arch Virol* 152:805–811
- Van Die IM, Bergmans HEN, Hoekstra WPM (1983) Transformation in *Escherichia coli*: studies on the role of the heat shock in induction of competence. *J Gen Microbiol* 129:663–670
- Verchot-Lubicz J, Ye C, Bamunusinghe D (2007) Molecular biology of potexviruses: recent advances. *J Gen Virol* 88:1643–1655
- Westermeier R (2005) Electrophoresis in practise: a guide to methods and applications of DNA and protein separations, 4th edn. Wiley-VCH, Weinheim
- Wise A, Liu Z, Binns A (2006) Three methods for the introduction of foreign DNA into *Agrobacterium*. *Methods Mol Biol* 343:43–54
- Zayakina O, Arkhipenko M, Kozlovsky S, Nikitin N, Smirnov A, Susi P, Rodionova N, Karpova O, Atabekov J (2008) Mutagenic analysis of *Potato virus X* movement protein (TGBp1) and the coat protein (CP): in vitro TGBp1-CP binding and viral RNA translation activation. *Mol Plant Pathol* 9:37–44
- Zhao Y, Hammond R (2005) Development of a candidate vaccine for Newcastle disease virus by epitope display in the Cucumber mosaic virus capsid protein. *Biotechnol Lett* 27:375–382
- zur Hausen H (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2:342–350