UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Studijní obor: Biologie
Studijní program: Biologie

Daniel Kroupa

Vektory odvozené od viru mozaiky tabáku a jejich použití pro expresi proteinů v rostlinách

Viral vectors based on tobacco mosaic virus for the expression of recombinant proteins in plants

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Tomáš Moravec, Ph.D.

Katedra experimentální biologie rostlin

Praha 2017

Poděkování:

Chtěl bych tímto poděkovat svému školiteli Mgr. Tomáši Moravci, Ph.D. za odbornou pomoc, cenné rady, vstřícný a trpělivý přístup.

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, 18.8.2017

…..…….. Daniel Kroupa

Abstract (cz):

V průběhu několika posledních desetiletí se rostlinné viry a vektory odvozené z nich staly nejen nedílnou součástí práce v laboratořích, ale začaly se i komerčně využívat pro tvorbu vakcín, léčiv, enzymů a jiných proteinů/peptidů. Jedním z nejčastěji používaných virů pro expresi heterologních proteinů je virus tabákové mozaiky. V této práci bych se rád zaměřil na rostlinné viry a na vektory z nich odvozené. Chtěl bych je porovnat s dalšími používanými expresními systémy v rostlinách a popsat, jak by jejich výhody mohly být dále využívány a zkombinovány s metodami moderního klonování.

Klíčová slova: virový vektor, exprese, virus tabákové mozaiky, rostlinné expresní systémy, Golden-gate klonování

Abstract (eng):

Over the past few decades, plant viruses and vectors derived from them have become not only an integral part of the work in laboratories, but also began to be used commercially for the production of vaccines, drugs, enzymes and other proteins / peptides. One of the most commonly used viruses for the expression of heterologous proteins is tobacco mosaic virus. In this work, I would like to focus on plant viruses and vectors derived therefrom. Compare it with other expression systems used in plants and describe how their benefits could be further used and combined with modern methods of cloning.

Key words: viral vector, expression, Tobacco mosaic virus, plant expression systems, Golden gate cloning

Obsah:

Rostlinné viry

Viry jsou vnitrobuněční parazité mikroskopických rozměrů. Vždy obsahují nukleovou kyselinu (RNA nebo DNA) a ochranný obal (kapsid) skládající se z jednotek plášťového proteinu (kapsomer). Nukleová kyselina může být jednovláknová nebo dvouvláknová, lineární i kruhová. Rostliny jsou nejčastěji napadány ssRNA viry, méně častěji ssDNA viry a jen velmi zřídka dsRNA. dsDNA viry se u vyšších rostlin nevyskytují, jen u jednobuněčných řas. Nejjednodušší z virů mohou obsahovat nukleovou kyselinu pro kódování pouze čtyř proteinů, zatímco nejsložitější mohou kódovat několik stovek proteinů. Translace, transkripce i replikace virů probíhá jen v buňkách hostitele. Jsou totiž plně závislé na hostitelovo enzymatickém aparátu. Viry dále nedokáží akumulovat volnou energii a nejsou funkčně aktivní mimo buňky hostitele. Nedají se proto považovat za živé organismy. (Agrios, 2005)

Viry jsou rostlinnými patogeny a způsobují často vážné choroby neboli virózy. Mezi nejvýznamnější onemocnění v Evropě patří virus svinutky brambor (PLRV), Y virus bramboru (PVY) (Dědič, 2014) a virus šárky švestky (Garcia, Glasa, Cambra, & Candresse, 2014).

Díky výzkumu se dnes na viry nepohlíží jen jako na patogeny. Mají totiž velké využití v biotechnologiích. Využívají se například pro produkci rekombinantních proteinů v rostlinách a tak zvanému „Molekular farming“ (Yusibov, Rabindran, Commandeur, Twyman, & Fischer, 2006).

Morfologie a taxonomie virů

Velikost virů se většinou pohybuje mezi 20-500nm. Existuje množství kritérií, podle kterých byl vytvořen virový taxonomický strom obsahující tyto kategorie: čeleď, rod, druh, kmen, izolát. Taxonomie virů se neustále mění podle nových poznatků a úpravy v systému publikuje International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) vždy jednou během několika let. (Carstens, King, Adams, & Lefkowitz, 2012)

Ze nejdůležitější z kritérií pro taxonomické uspořádání jsou považovány vlastnosti nukleové kyseliny a obalových proteinů. Podle uspořádání kapsidy můžeme rozeznávat viry vláknité, oválné, kruhovité, tyčinkovité nebo nepravidelné. Většina virů je obalena pouze jedním kapsidovým proteinem, ale existují i viry s kapsidou tvořenou více obalovými proteiny. Za zmínku v tomto případě stájí virus mozaiky vigny (CPMV). Na rozdíl od většiny v laboratoři běžně používaných virů je CPMV obalen dvěma druhy obalových proteinů. (Wellink & Van Kammen, 1989)

U některých virů je kapsida navíc chráněna lipidovou dvouvrstvou, takovýmto virům říkáme viry obalené. (Lucas, 2010)

Co se týče vlastností genetické informace, můžeme viry rozdělit podle druhu nukleové kyseliny a podle toho, zda je genom segmentovaný nebo nesegmentovaný.

Životní cyklus rostlinných virů

Životní cyklus virů, jakožto rostlinných parazitů se skládá ze dvou základních fází. První fází je množení viru a jeho šíření v rostlinných pletivech, zatímco druhou fází je přenos viru z rostliny na rostlinu.

Množení viru a šíření v rostlině

Po vstupu do buňky dochází k uvolnění nukleové kyseliny z bílkovinného obalu a zahájí se replikační funkce viru. Ty se liší podle toho, v jaké formě má daný virus uloženou genetickou informaci.

U (+)ssRNA virů dochází k translaci a k vytvoření negativního vlákna. To pak slouží jako templát pro tvorbu vláken pozitivních. Zatímco u (-)ssRNA musí virus nejdříve využít své vlastní polymerázy pro vytvoření pozitivního vlákna. (Banerjee, 1987)

dsDNA viry vytvářejí v jádře minichromozomy, ze kterých je transkribována RNA. Ta se transportuje do cytoplasmy nebo je pomocí reverzní transkripce přepsána na dsDNA.

U ssDNA virů proniká ssDNA do jádra buňky, kde je dosyntetizováno druhé vlákno. Vzniká tak minichromozom, který je replikován a exprimuje plášťový protein, který obaluje vznikající ssDNA. (Monsalve-Fonnegra, Argüello-Astorga, & Rivera-Bustamante, 2002)

Šíření viru po rostlině probíhá na dvou základních úrovních. Na krátkou vzdálenost (z buňky do buňky) a na dlouhou vzdálenost (z orgánu do orgánu).

Na krátkou vzdálenost se šíří viriony hlavně pomocí plasmodesmat. Těmi se může virus šířit ve formě RNA, nukleoproteinových komplexů nebo celých viroplazmat, což jsou struktury odvozené od endoplasmatického retikula, ve kterých probíhá proces replikace viru. (Osman & Buck, 1996) Plasmodesmata však nejsou vždy pro šíření viru dostatečně široká a proto existuje u virů několik strategií, jak tomuto transportu pomoci. Příkladem těchto strategií je například rozšíření plasmodesmat pomocí movement proteinu (Howard, Heppler, Krishnamurthy, Payton, & Verchot-Lubicz, 2004), vzniku proteinového kanálku (Kasteel, Wellink, Goldbach, & Van Lent, 1997) nebo vytvoření komplexu s movement proteinem, který je menší než virová částice (Beachy & Heinlein, 2000).

Šíření na dlouhou vzdálenost probíhá hlavně skrze floém. Při šíření na dlouhou vzdálenost se virus může vyskytovat, ale i množit ve většině částí rostliny. Některé z částí bývají zpravidla nenapadeny. Příkladem jsou apikální meristémy, které bývají napadeny jen velmi zřídka. Je to pravděpodobně zapříčiněno rychlostí dělení a nepřítomnosti vodivých pletiv.

Přenos viru z rostliny na rostlinu

Pro přenos mezi rostlinami bývá důležité mechanické narušení buněčné stěny a plasmatické membrány. Samotný virus není z pravidla takového narušení schopen a proto využívá většina virů

k tomuto účelu vektory čili přenašeče. Přenašečem může být hmyz, hlíst, houba, ale i parazitická rostlina. (Andret-Link & Fuchs, 2005)

Podle vztahu vektoru a viru můžeme rozdělit viry na neperzistentní a perzistentní.

Neperzistentní viry se vážou na ústní ústrojí přenašeče a nedochází k šíření ani množení viru ve vektoru. Virus může být přenesen na novou rostlinu již během několika minut, ale schopnost přenosu vektor časem ztratí.

Perzistentní viry mohou být vektorem přeneseny až během několika hodin či dnů. Virus se totiž ve vektoru šíří a někdy i množí. Jakmile virus přejde do těla přenašeče, je přenašeč schopen šířit virus po zbytek svého života a může být přenosný i na jeho potomstvo. (Musil, Kvíčala, & Lešková, 1981)

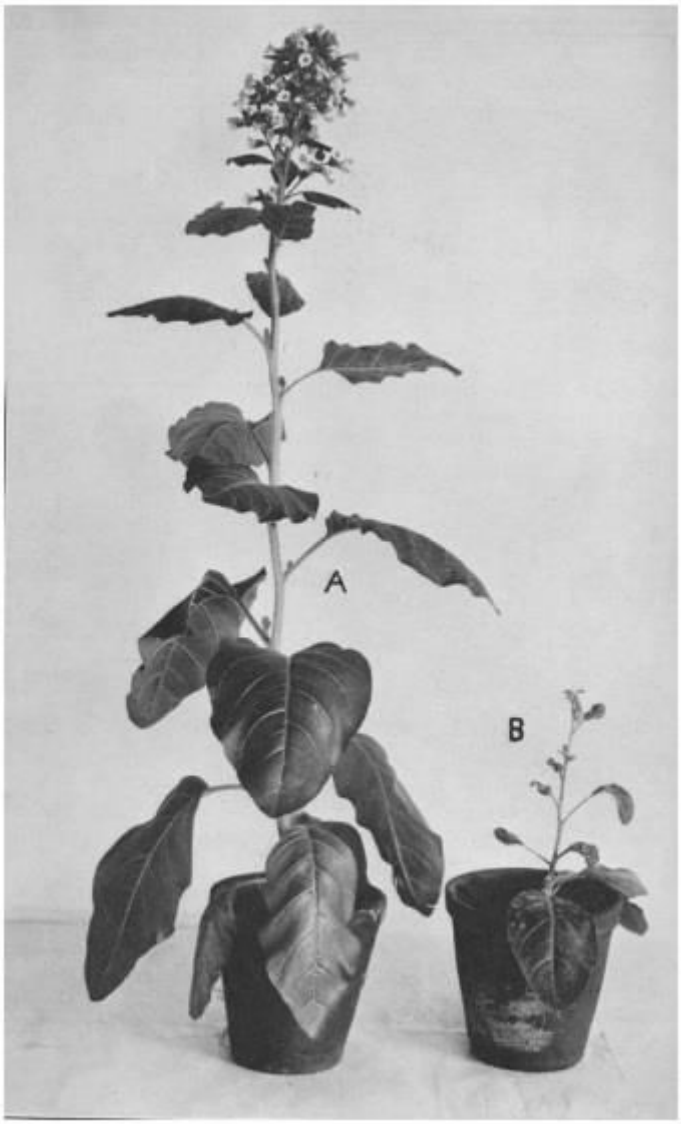
Viry, které nejsou přenášeny vektory se do buňky mohou dostávat pasivně. Pasivní cestou může být například mechanický kontakt poraněných částí rostliny a pomocí zahradnického náčiní, vegetativní rozmnožování rostlin, ale také prostřednictvím semen nebo pylu. (Johansen, Edwards, & Hampton, 1994)

Virus tabákové mozaiky

Virus tabákové mozaiky (TMV) je nejdéle známým druhem viru a dá se považovat za nejprozkoumanější virus vůbec. Má jednoduchou tyčinkovou strukturu a jeho genom je uložen v (+)ssRNA. Taxonomicky ho řadíme mezi Virgaviridae, rod Tobamovirus.

TMV stál u samého počátku virologie, za který můžeme považovat rok 1892, kdy Holanďan Martinus Beijerink publikoval svou práci. Provedl pokus, při kterém extrahoval šťávu z nakažené rostliny a procedil ji velmi jemným filtrem, tím by neměly projít žádné částice dosahující velikosti bakterií. Tuto šťávu použil k infikování dalších rostlin. A jelikož rostliny infikované takto získanou tekutinou vykazovaly známky nakažení stejným patogenem, usoudil, že se musí jednat o částice menší než jsou bakterie. O šťávě hovořil jako o „contagious living fluid.“ Což by se dalo přeložit jako nakažlivá žijící tekutina a pro její popsání použil slovo „virus“ (Z latiny „jed“). (Beijerinck, 1898)

Virus mozaiky tabáku má mnoho vlastností, díky kterým je ideálním modelovým organismem. Nakažené rostliny produkují takové množství TMV, že inkluzní tělíska krystalických virionů jsou v infikovaných listech viditelná pod elektronovým mikroskopem. Pro přenos TMV není nutný hmyz, ani žádný jiný vektor. Přenáší se pouhým kontaktem poraněných míst. Virus zabraňuje v rostlině rozvoji chloroplastů a tím způsobuje rostlinnou zakrnělost (viz. obr. 1) a typický mozaikový vzor na listech (viz. obr. 2).



Obr. 1: (A) Zdravá rostlina
(B) Rostlina nakažená TMV
Převzato (Allard, 1914)

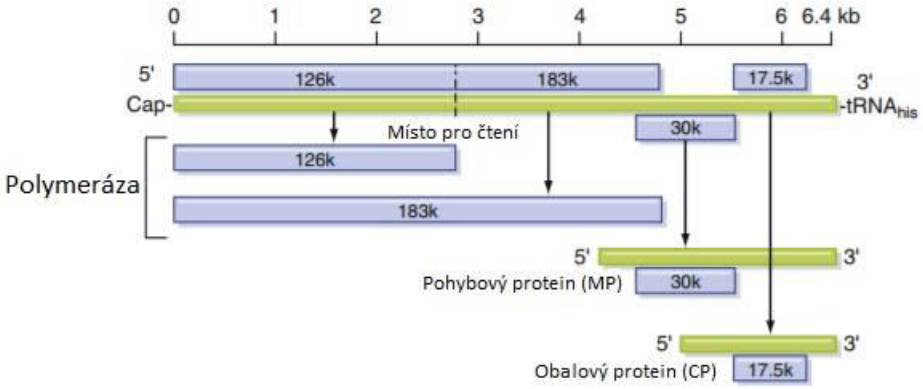
TMV je navíc silně stabilní virus, který v in vitro podmínkách vydrží životaschopný velice dlouho. Například čištěný virus může při teplotě 5°C vydržet až 50 let. Jeho stabilita vyplývá z hustoty virových částic. (Scholthof, 2003)

V historii existuje mnoho objevů, ke kterým se došlo za pomoci viru tabákové mozaiky. TMV byl prvním z rostliny chemicky vypurifikovaným virem (Bawden, Pirie, Bernal, & Fankuchen, 1936), byl to první virus vizualizovaný v elektronovém mikroskopu (Kausche, Pfankuch, & Ruska, 1939), RNA TMV byla použita při pokusech dokazujících, že nukleové kyseliny jsou nositelkami genetické informace a že pouhá RNA stačí k infikování rostliny virem (Fraenkel-Conrat, 1956) a u TMV byl poprvé v historii osekvenován celý genom (Goelet, a další, 1982)

Obr. 2: Mozaikový vzor na listu mladé rostliny
Převzato a upraveno (Bagley, 2001)

Genom TMV

Genom mozaiky tabáku je dlouhý přibližně 6,4kb. Nese genetickou informaci pro 4 polypeptidy. A to pro polymerázu, která je kódována dvěma otevřenými čtecími rámci, pohybový protein (MP) a obalový protein (CP). Na 5‘ konci je methylová čepička. Na 3‘ konci najdeme 204 nukleotidů dlouhou 3’NTR oblast, která nekóduje žádný protein a postrádá poly(A) sekvenci. (Zaitlin, 1999) (Sleat, a další, 1987) (Cann, 2012)

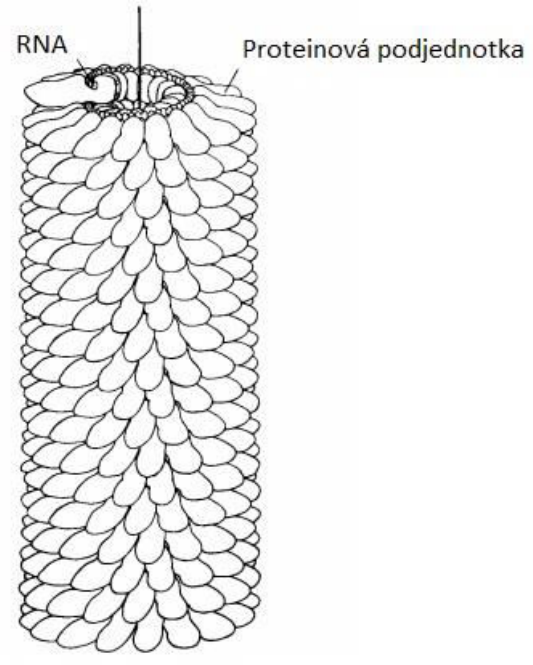


Obr. 3: Genom TMV
Převzato a upraveno (Cann, 2012)

Virová částice TMV a její assembly

Virové částice TMV mají jednoduchý tyčinkovitý tvar o délce přibližně 300nm a průměru 18nm. Uvnitř se nachází centrální otvor o průměru 4nm. Nukleová kyselina je helikálně stočená uvnitř proteinového obalu s průměrem 6-8nm. (Lauffer, 1944)

Na RNA jsou navázané proteinové podjednotky, které mají stejně stočenou strukturu jako nukleová kyselina. (Klug A. , 1979) (viz obr. 4) Virová částice obsahuje RNA o délce 6395 nukleotidů a na každé tři nukleotidy se váže jedna proteinová podjednotka. To odpovídá přibližnému počtu 2130 podjednotek na jednu virovou částici (Butler P. J., 1999)



Obr. 4: Struktura TMV částice
Převzato a upraveno (Caspar, 1963)

Virová částice vzniká během procesu assembly neboli sbalování. Během tohoto procesu spolu interaguje virová RNA a podjednotky obalového proteinu (CP).

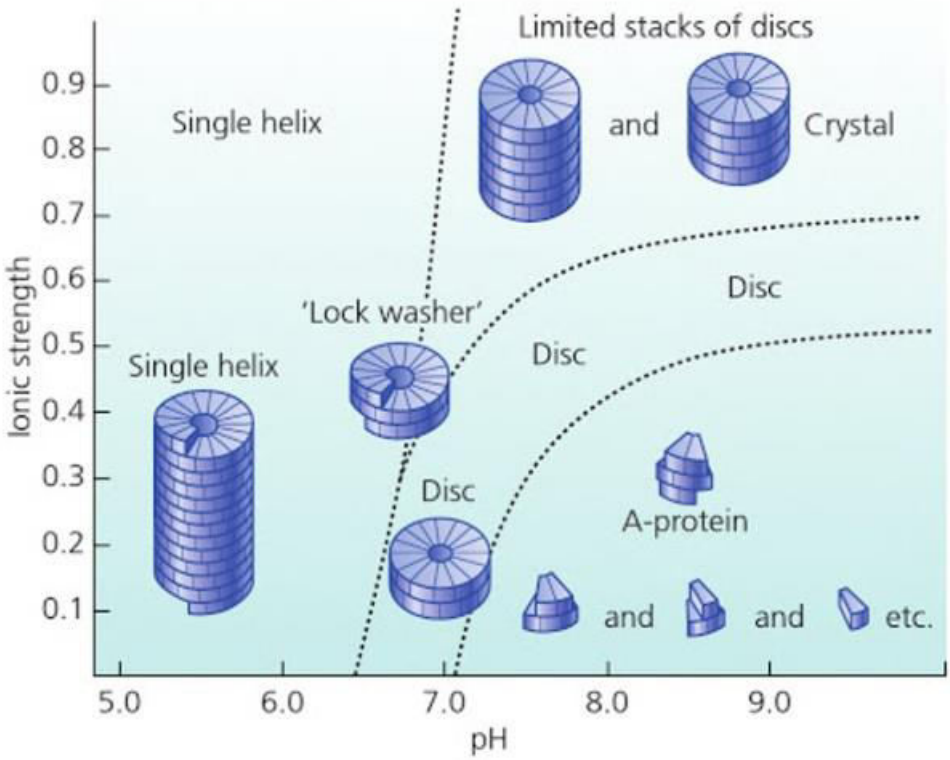
Pro zahájení procesu assembly je zásadní, aby z proteinových podjednotek vznikly tzv. 20S disky. Každý disk je tvořen 17 podjednotkami a proces jejich vzniku je závislý na hodnotě pH prostředí.

Ideální pH pro tvorbu 20S disků je neutrální. Kolem hodnoty pH 7 se přibližně 80% CP nachází ve formě 20S disků. Zbylých 20% bývá rozptýleno ve formě 4S agregátů (A-proteinů) (Butler, Bloomer, & Finch, 1992) V mírně zásaditém prostředí převažují menší shluky A-proteinů. V prostředí mírně kyselém se CP shlukují do formy single helixu. (viz. obr 5) (Klug A. , 1999) Na rozmezí největšího výskytu single helixu a 20S disků se dá najít struktura známá jako lock washer. Přestože se volné lock

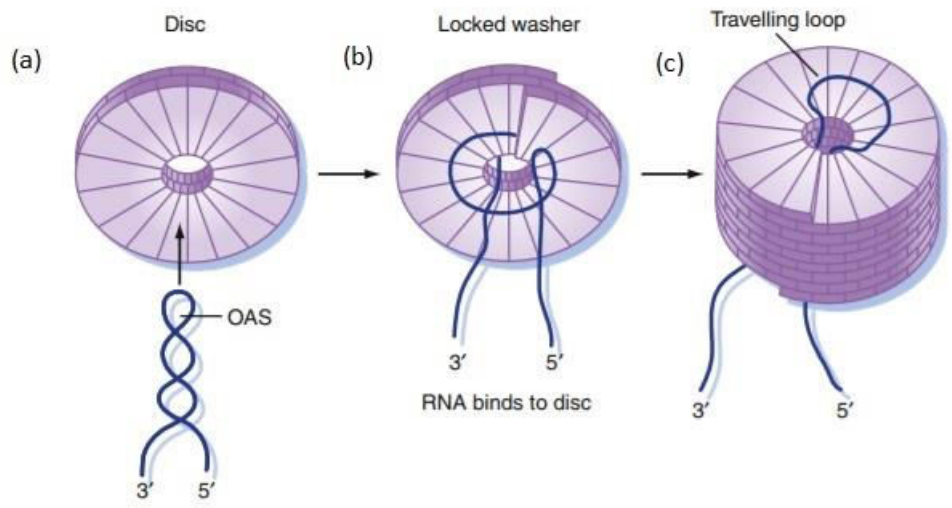
washer struktury na samotném assembly nepodílejí, mohou se z nich složit virus like partikles, které neobsahují RNA a nemají proto definovanou délku. (Butler & Klug, 1978)

RNA tabákové mozaiky má poblíž svého 3‘ konce origin of assembly(OAS). OAS je orientován ve směru 3‘→ 5‘ a je dlouhý přibližně 300 nukleotidů. Vytváří vlásenkovitou strukturu, na které najdeme charakteristickou sekvenci AAGAAGUCG. Tato sekvence hraje důležitou roli během iniciace assembly. Je totiž jako první rozeznávána při vazně disků na RNA. (Turner, Joyce, & Butler, 1988) (Zimmern, 1977)

Vzniklá vlásenka je vtahována do centrálního otvoru 20S disku. Oba konce RNA vyčnívají z centrální dutiny na stejné straně (viz obr. 6). Prodlužování probíhá na obou koncích RNA, jen s rozdílnou rychlostí. Připojování proteinových disků je rychlejší na 5‘ konci. Po navázání změní každý 20S disk svou konformaci na lock washer formu, která umožňuje těsné navázání disku na vznikající částici. Růst částice se zastaví až ve chvíli, kdy je celá částice obalena proteiny. (Dimmock, Easton, & Leppard, 2016) (Butler P. J., 1999)



Obr. 5: Diagram znázorňující shlukování podjednotek obalového proteinu v závislosti na pH. Vykreslené hranice znázorňují při jakých podmínkách se objevují větší druhy agregátů. Neznamená to však, že by všechny menší druhy v tomto okamžiku zcela vymizely.
Převzato (Dimmock, Easton, & Leppard, 2016)



Obr. 6: Model assembly TMV částice.
(a) Vtahování vlásenky do centrálního otvoru prvního disku.
(b) Začlenění RNA mezi vrstvy obalových proteinů a změna konformace disku.
(c) 5‘ konec RNA prochází zpět centrálním otvorem, vytváří tak travelling loop, na kterou se v rychlém sledu váží další disky. (Váží se i na 3‘ konec, jen pomaleji)
Převzato a upraveno (Cann, 2012)

Rostlinné expresní systémy

Rostlinné expresní systémy mají oproti jiným dnes využívaný systémům mnoho nesporných výhod. Za jednu z výhod můžeme určitě považovat cenu. Ta je oproti jiným systémům velmi nízká hlavně kvůli nákladům na kultivaci rostlin. Rostlinám totiž stačí přísun základních minerálů, světla a vody pro všechny požadované biologické funkce. Rostliny dokáží produkovat poměrně velké množství rekombinantních proteinů za relativně krátkou dobu. Produkují velké množství biomasy a proto jsou vhodné i pro molekulární farmaření v polním měřítku. (Fischer & Emans, 2000)

Další výhodou je jistě fakt, že rostlinné buňky jsou na rozdíl od bakteriálních buněk eukaryotní a proto u nich existují důležité post-translační modifikace (glykosylace, fosforylace atd). I když zde je důležité zmínit, že ne všechny post-translační modifikace rostlin jsou totožné s modifikacemi živočišnými. Například N-glykosylace probíhající v endoplasmatickm retikulu je totožná u některých rostlin i živočichů, ale následná N-glykosylace v Golgiho aparátu již vede k jiným vzorcům.
V některých případech rozdíl v glykosylaci nemění vlastnosti produktu a není proto překážkou. (Vaquero, a další, 1999) Pokud by ale překážkou byla, existují dnes rostliny s upravenými post-translačními drahami. Příkladem je například stabilně geneticky modifikovaná rostlina N. benthamiana ΔXF, jejíž N- glykosylační dráha byla upravena tak, aby N-glykany glykoproteinů neobsahovaly specifické rostlinné sacharidové zbytky beta 1,2 -xylózu a alfa1,3 fukózu. (Strasser, a další, 2008)

Při produkci rekombinantních proteinů v prokaryotech je potřeba odstranit i stopová množství endotoxinů pocházející z buněčných stěn bakterií. Ty totiž mohou způsobovat velmi nebezpečné odpovědi imunitního systém. Množství eukaryotních proteinů se navíc v bakteriích produkuje v denaturovaných formách. Odstraňování endotoxinů i zpracování denaturovaných forem proteinů jsou velmi nákladné procesy, kterým by se dalo předejít nahrazením prokaryotních expresních systémů systémy rostlinnými. (Chen, Casini, Harrison, & Garcea, 2001) U rostlin se nemusíme bát přítomnosti savčích patogenů (například virů) ani toxinů.

Překážkou pro používání všech expresních systémů je vždy nákladná purifikace. Její cena je sice u většiny využívaných systémů podobná, ale výhodou rostlin v otázce purifikace by mohla být exprese rekombinantních proteinů v jedlých částech rostliny. Ty by pak mohly být podávány orálně bez potřeby dalšího složitého zpracování. Takto připravená biofarmaceutika by mohla být distribuována ve formě semen, hlíz a plodů. Velmi by pomohla při skladování produktů nebo při převozu a podávání léčiv v rozvojových zemích. (Sala, a další, 2003)

Již dnes se využívá rostlinných expresních systémů pro produkci některých na trhu dostupných farmaceutik. Například v Kanadě produkovaný hirudin, protein pijavic zabraňující srážení krve (Giddings, Allison, Brooks, & Carter, 2000), dále pak Taliglucerasa alfa, lék pro léčbu Gaucherovy choroby produkovaný v buněčné suspenzi mrkve (Grabowski, Golembo, & Shaaltiel, 2014), TrypZean, rekombinantní bovinní trypsin produkovaný v kukuřici (Krishnan & Susan, 2014) nebo ZMapp, kombinace tří protilátek produkovaných v Nicotiana benthamiana, které slouží jako medikament proti Ebole. (Chen & Davis, The potential of plants as a system for the development and production of human biologics, 2016)

Aby se mohly rostlinné expresní systémy využívat v širším měřítku, je potřeba vyřešit otázku bezpečnosti. Veřejnost má strach z úniku transgenních organismů do přírody, ale i z dopadu na lidské zdraví. K úniku celé transgenní rostliny do přírody může dojít skrze vegetativní rozmnožování, ale i po úniku transgenního pylu nebo semen. Při takovém úniku by mohlo dojít ke zkřížení GMO s příbuznými druhy. Existuje dnes množství zkoumaných postupů, jak se s tímto problémem vypořádat a vytvořit co nejbezpečnější GMO. Mezi zkoumané metody dnes patří například využívání genové nekompatibility, samčí sterility, kontroly dormance, rostlinné autogamie nebo sebevražedných genů. (Stoger, a další, 2002) Bezpečný pyl by se dal zajistit transformací plastidového genomu namísto genomu jaderného. Při plastidové transformaci nehrozí riziko úniku transgenního pylu, protože semiautonomní organely se u většiny druhů dědí jen maternálně. (Daniell, Datta, Varma, Gray, & Lee, 1998) Jedním z dopadů na lidské zdraví při konzumaci geneticky modifikovaných plodin by mohly být nepřiměřené alergické reakce. Je velice těžké předpovědět, zda bude protein alergenem na základě struktury nebo uspořádání aminokyselin. I přes přísné testování každého geneticky modifikovaného organismu se vždy může najít pár jedinců, kteří budou na nové látky alergičtí. Na druhou stranu, metody genetického inženýrství (Například gene silencing) by se daly využít pro blokaci alergenů v rostlinách. (Weil, 2005)

Existují dva základní druhy exprese proteinů v rostlinách. A to exprese stabilní a transientní. (Garabagi, McLean, & Hall, 2012)

Stabilní rostlinná exprese

Pro vytvoření stabilního expresního systému je nejdříve nutné modifikovat genom rostliny a to vložením genu pro požadovaný proteinu do genomu jádra nebo plastidu rostlinné buňky. Z takto transformované buňky je posléze pomocí technik tkáňových kultur vypěstována celá transgenní rostlina. Pokud začleněný gen zůstane v genomu rostliny, je pak předáván na potomky dle genetických zákonů. Nevýhodou stabilní exprese oproti transientní je délka celého procesu, během kterého je potřeba připravit transgenní rostlinu.

Existují dva základní druhy stabilních rostlinných expresí. A to exprese jaderná a plastidová.

Plastidová exprese má oproti jaderné několik výhod. V rostlině se nachází většinou velké množství plastidů a proto může být po správném namnožení transformovaných plastidů očekávána silnější exprese. Exprimované proteiny se kumulují v plastidech, díky tomu se dají produkovat i proteiny pro rostliny toxické. U plastidů je gen vkládán vždy do stejných míst a téměř u nich nedochází ke gene silencingu. Zatímco při vkládání do jádra se gen začleňuje náhodným způsobem. (Scotti, Rigano, & Cardi, 2012) Plastidová exprese je také bezpečnější, protože transformované plastidy se dědí jen maternálně, což má za následek bezpečný pyl neobsahující transgenní plastidy. (Daniell, Datta, Varma, Gray, & Lee, 1998) Nevýhodou plastidové exprese je naprostá nepřítomnost eukaryotních post-translačních modifikací proteinů. Nehodí se proto pro produkci proteinů, které tyto modifikace vyžadují. Příprava plastidové exprese je bohužel velmi náročná. Je potřeba vyselektovat buňku, která bude mít jen transformované chloroplasty. Wild-type plastidy se totiž v buňce množí rychleji a buňka časem ztratí schopnost exprimovat chtěný protein. (Daniell, Khan, & Allison, 2002)

Existují dva nejpoužívanější postupy, jak připravit transgenní rostlinu pro stabilní expresi. Metoda Biolistická nebo metoda využívající Agrobacterium tumefaciens.

Biolistická metoda je vhodná pro vnášení genu do jaderného, ale i plastidového genomu. Metoda se provádí tak, že se genetický materiál nechá absorbovat na kovové částice (nejčastěji zlaté nebo wolframové) a těmito částicemi je pomocí genové pistole bombardována rostlinná buňka. DNA se v buňce z částic uvolní a může se začlenit do genomu. Posléze probíhá selekce buněk, do kterých se správně začlenil požadovaný gen a ty se následně kultivují. (Maenpaa, Gonzalez, Ahlandsberg, & Jansson, 1999) (Kikkert, Vidal, & Reisch, 2005)

Metoda využívající A. tumefaciens je vhodná jedině pro expresi jadernou. Samotná A. tumefaciens je gram-negativní bakterie vyskytující se v půdě. Jako rostlinný patogen napadající dvouděložné rostliny je známá od počátku 20. století, ale pro genové inženýrství se využívá jen posledních 30 let. Bakterie obsahuje T-DNA (transfer), která se během infekčního procesu začlení do jaderného genomu rostlinné buňky. T-DNA je součástí Ti-plasmidu. V napadené buňce je po vyštěpení z Ti-plasmidu dopravena do jádra, kde se může náhodně integrovat do jaderného genomu buňky. V přírodě způsobuje T-DNA zvýšenou expresi růstových hormonů (Auxiny a cytokininy), což má za následek růst nádorů. (Chilton, a další, 1977) Během vytváření požadovaného systému se nejprve připraví modifikovaná bakterie, do jejíhož T-DNA se vloží požadovaný gen. Těmito modifikovanými bakteriemi se posléze infikuje rostlina, do jejíhož genomu se T-DNA zakomponuje na náhodné místo. Z každé infikované buňky se může následně vypěstovat celá transgenní rostlina. Kvůli různým začleněním do genomu rostlin může vznikat různé množství variabilních linií s různým stupněm exprese. (Schilperoort & Hooykaas, 1992) (Nester, 2014)

Pro práci v laboratoři se používají upravené kmeny A. tumefaciens. Mimo jiných modifikací v Ti plasmidu těmto kmenům chybí oblast T-DNA. Ta je jim dodávána ve formě binárního vektoru. (Lee & Gelvin, 2008)

Transientní rostlinná exprese

Příprava transgenních rostlin pro stabilní expresi je často velmi zdlouhavý proces. Oproti tomu je transientní neboli přechodná exprese mnohem rychlejší, méně náročná a často produkuje i větší množství požadovaného proteinu.

Existují dva využívané postupy pro přípravu transientní rostlinné exprese. A to agroinfiltrace a využití virových vektorů.

Při agroinfiltraci se gen pro požadovaný protein vkládá do jader jen některých buněk v rostlině. Mechanicky se to provádí tak, že se vpravuje suspenze A. tumefaciens nesoucí binární vektor do mezibuněčných prostor listů. V nich dochází k přechodné extrachromozomální expresi. Integrace do DNA má velmi malou pravděpodobnost a proto exprese z ní nehraje téměř žádnou roli. Metoda způsobuje v rostlině vysoký stupeň exprese požadovaného proteinů za poměrně krátkou dobu, není ale moc vhodná pro komerční využívání, jelikož k gene silencingu dochází již po několika dnech. (Chen, a další, 2013)

Virové vektory

Rostlinné viry jsou díky svým vlastnostem vhodné pro tvorbu virových vektorů. Díky rychlosti jejich životního cyklu se dá spolehnout i na poměrně rychlou proteinovou expresi. Viry se dovedou v rostlině šířit a exprese proto neprobíhá jen v mechanicky vybraných buňkách. Další výhodou je určitě široký okruh hostitelů, který nám dovoluje využití stejného konstruktu pro expresi v různých rostlinných druzích. Díky schopnosti některých virů koinfikovat rostlinnou buňku, aniž by mezi sebou kompetitovaly, můžeme využít virové vektory pro expresi dvou proteinů v jedné rostlině. Příkladem může být exprese lehkého a těžkého řetězce protilátky. Tento způsob má mnohem větší výtěžky než kdyby byly oba proteiny exprimovány pomocí vektorů odvozených od stejného viru. (Verch, Yusibov, & Koprowski, 1998)

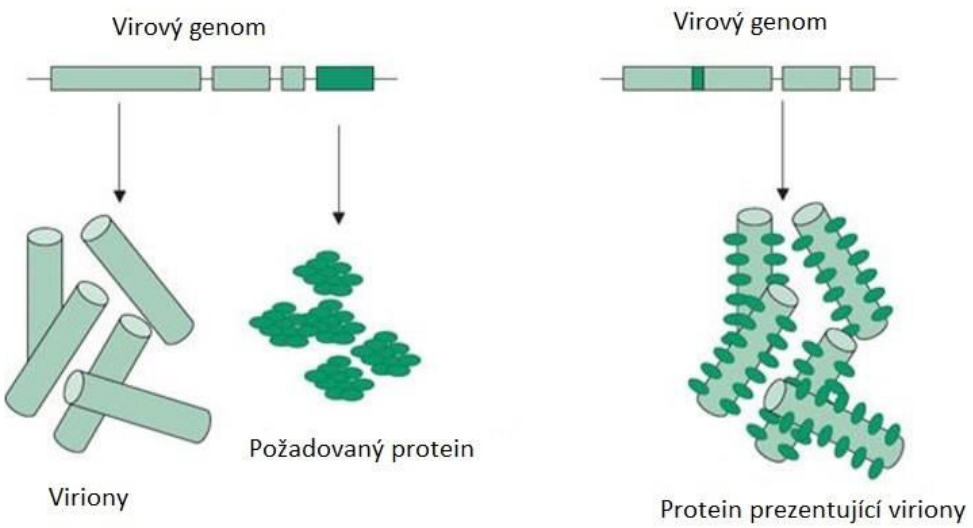
Pro expresi pomocí virových vektorů v rostlinách se nejčastěji využívají genomy odvození od (+)ssRNA virů (TMV, CMV atd.), i když se v posledních letech pracuje na virových vektorech odvozených od ssDNA virů, hlavně gemivirů. U gemivirů je ale problém (mimo jiného) s vyštěpením ssDNA z T-DNA. Proto je nutné do buněk vpravovat agroinfiltací také expresní kazetu pro Rep protein, který vyštěpení zajistí. (Hefferon, 2014)

Podle konstrukce rozdělujeme virové vektory na vektory první a druhé generace.

Vektory první generace

Exprese pomocí virových vektorů první generace (strategie „full virus“) je založena na vložení genu pro požadovaný protein do genomu jinak neupraveného viru. Existují dvě možnosti jak exprimovat protein pomocí vektorů první generace. Buď se čtecí rámec pro požadovaný protein umístí pod virový promotor a nebo se umístí do genu pro obalový protein. Pokud je čtecí rámec umístěn separátně, vzniká při expresi samotný protein. V druhém případě vznikají virové částice prezentující protein na svém povrchu (viz obr. 7). Takto připravené viriony jsou často označovány jako chiméry. Protein/peptid prezentující částice jsou využitelné jako potencionální nové vakcíny a to z toho důvodu, že přítomnost antigenů na povrchu může zvýšit imunogenitu organismu. (Yusibov, Rabindran, Commandeur, Twyman, & Fischer, 2006)

..



Obr. 7: Možné exprese rekombinantních proteinů pomocí virových vektorů první generace
Převzato a upraveno (Yusibov, Rabindran, Commandeur, Twyman, & Fischer, 2006)

Pro samotné infikování rostliny se použije enkapsidovaný virion nebo in vitro připravená virová RNA smíchaná s karbidem křemíku. Ten slouží jako brusný materiál a při nanášení na list způsobuje drobná poranění, kterými se může virus dostat do rostliny. Příprava a provedení infekce je finančně a technicky náročné. Virové vektory první generace ale vytvářejí funkční částice a tak se dá využít i již infikovaného pletiva pro infekci dalších rostlin a tím snížit náklady.

Virové vektory první generace mají několik nevýhod, které vedly ke vzniku virových vektorů druhé generace. I když se viry v rostlinném systému šíří, neinfikují všechny buňky a tím se snižují potencionální výnosy. Silným omezením pro vektory první generace je maximální velikost inzertů. Pokud je inzert moc velký, dojde většinou ke ztrátě části nebo celého transgenu. (Avesani, a další, 2007) Stejné omezení platí i při vkládání inzertu do genu pro CP. Velké inzerty zde mohou způsobit

špatné sbalování virových částic. A jelikož je zachována schopnost tvořit virové částice, jsou vektory první generace nebezpečné kvůli možnému úniku do přírody. (Gleba Y. K., 2007)

Vektory druhé generace

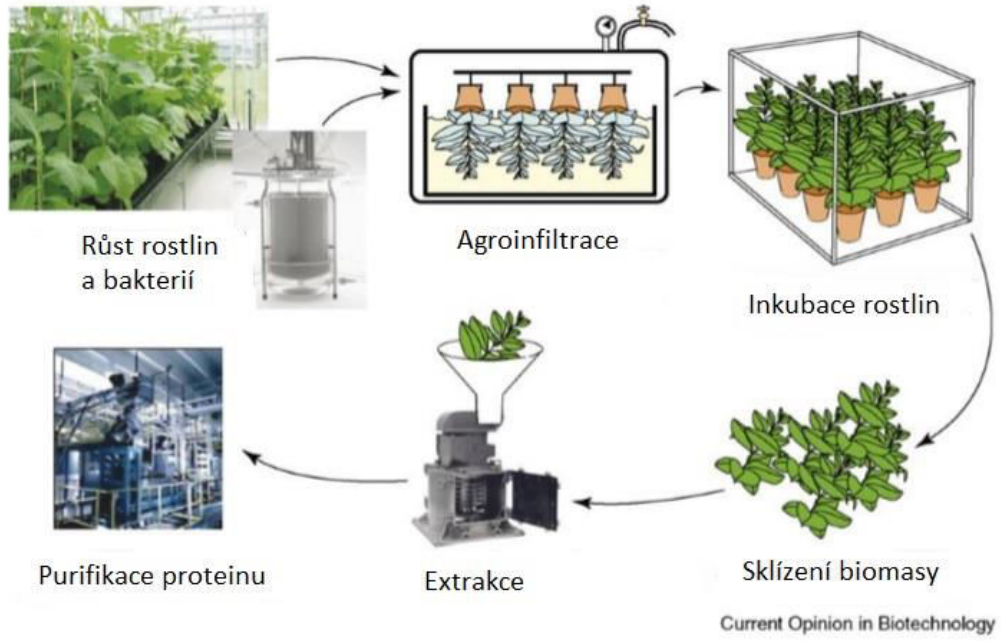
Vektory druhé generace neboli dekonstruované virové vektory jsou založeny na odstranění části virového genomu a jeho nahrazením požadovaným konstruktem. Pokud by posléze chyběly některé z odstraněných funkcí viru, dají se nahradit pomocí transgenních rostlin nebo pomocnými viry. Pro iniciaci virové infekce se u vektorů druhé generace používá A. tumefaciens, která nese ve svém T-DNA rekombinantní virus. Virová RNA se posléze vytvoří z DNA až v rostlině. Tato metoda kombinuje výhody tří biologických systémů: vysokou transfekční účinnost Agrobacteria, rychlost a silnou expresi virů a nízkou cenu a post-transkripční modifikace rostlin.

Po vpravení T-DNA reprezentující genom (+)ssRNA viru do jádra buňky dochází k transkripci. Vzniklý transkript, který by měl být transportován do cytoplasmy, je infekční virový genom. Životní cyklus (+)ssRNA virů se ale běžně neodehrává v jádře, jen v cytoplasmě. Je proto často nutné optimalizovat virový genom pro zajištění bezproblémového transportu z jádra do cytoplasmy.

Pro vektory druhé generace není potřebná tvorba částic a často ani pohyb mezi buňkami. Infekce je dosaženo pomocí vakuové agroinfiltace Agrobacteriem, při které jsou celé rostliny nebo její části ponořena do zředěné suspenze bakterie za sníženého tlaku. Tento postup se nazývá magnifekce (viz obr. 8)

Vektory druhé generace překonají vektory generace první v otázkách infekčnosti, velikosti inzertů i bezpečnosti. I když jsou ale vektory druhé generace bezpečnější metodou, nehodí se kvůli Agrobacteriu pro komerční pěstování na volném poli a mohou se využívat jen v hlídaných sklenících.

(Klimyuk, Pogue, Herz, Butler, & Haydon, 2012) (Marillonnet, Thoeringer, Kandzia, Klimyuk, & Gleba, 2005)



Obr. 8: Komerčně užívaný postup magnifekce
Převzato a upraveno (Gleba Y. K., 2007)

Vektory odvozené od TMV

Virus tabákové mozaiky byl jako první použit pro zkoumání možnosti využívání virových vektorů pro expresi proteinů a do dnešních dnů zůstává nejčastěji používaným virem. Nabízí mnoho výhod, díky kterým je tak často využíván pro tvorbu virových vektorů. Rychle se množí, má poměrně velký rozsah hostitelů, částice TMV jsou velmi stabilní, v napadených rostlinách se množí do vysokých titrů, infekce TMV může vydržet po celou dobu života rostliny a jeho genom je jednoduchý a důkladně prozkoumaný. (Shivprasad, a další, 1999)

Od TMV jsou odvozeny vektory první generace i generace druhé. Vektory první generace mají všechna výše zmíněná omezení, ale i přesto se ve světě používají i v polním měřítku. Příkladem je závod na zpracování infikovaného tabáku v Kentucky.

Výzkum se ale poslední dobou více přiklání k rozšiřování poznatků ohledně vektorů druhé generace. Bylo zjištěno, že se exprese pomocí TMV vektorů až několikanásobně zvýší posunutím ORF cizího genu blíže k 3’ konci genomu a až 100násobně zvýší, když je přitom i odstraněn gen pro obalový protein. (Lindbo, 2007)

První vektory druhé generace byly odvozeny právě od TMV, jednalo se o systém MagnIcon od společnosti ICON Genetics. Na práci se nejvýznamněji podílel Dr. Gleba a jeho spolupracovníci. Současně navrhli způsob infekce zvaný magnifekce (viz obr. 8) (Gleba, Marillonnet, & Klimyuk, 2004)

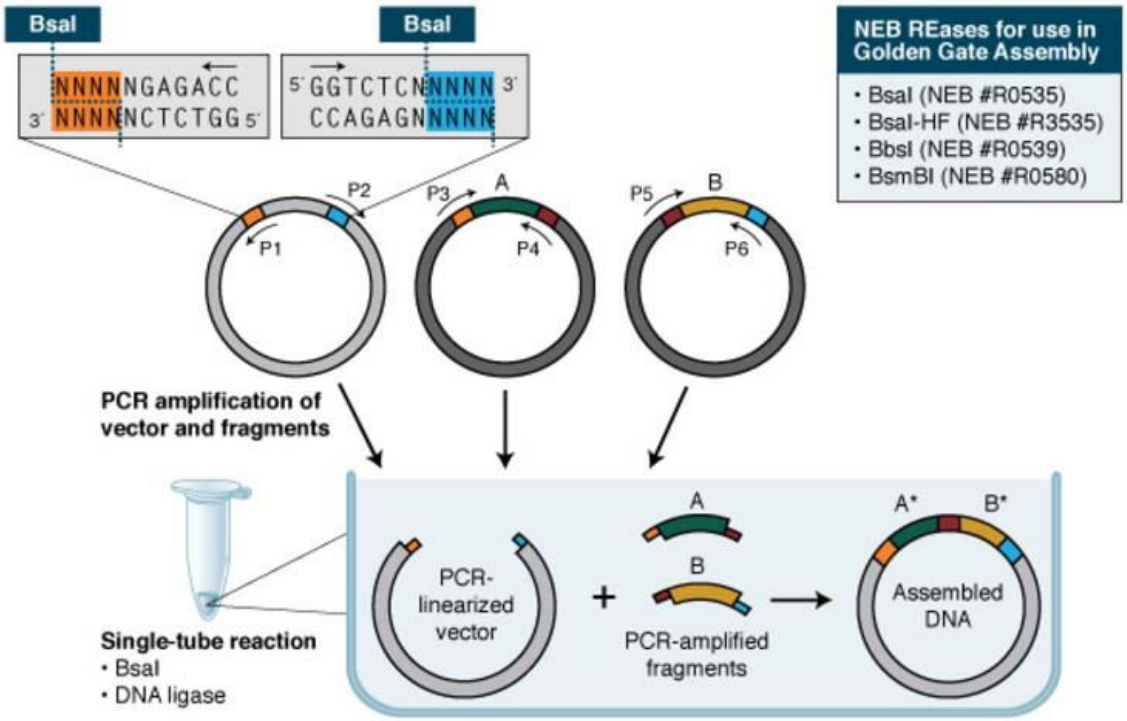
Pomocí MagnIconu je například připravován lék proti ebole, ZMapp. Jedná se o směs tří monoklonálních protilátek produkovaných pomocí virového vektoru odvozeného od TMV v listech Nicotiana benthamiana. (Zhang, Li, Jin, & Huang, 2014)

Jako další příklady, při kterých byl pro expresi využit vektor odvozený od TMV bych mohl uvést například produkci vakcín proti pandemické chřipce (Petukhova, Gasanova, & Stepanova, 2013) a nebo expresi alergenů z prachových roztočů, které by se v budoucnu snad daly použít pro diagnostiku astmatu a následnou imunoterapii. (Li, Jiang, Guo, & Liu, 2013)

Golden Gate klonování

Metoda Golden gate má své počátky v roce 1996, kdy byla popsána metoda pro účinné klonování jakékoli sekvence DNA do míst určení bez omezení přirozeně se vyskytujících restrikčních míst. (Padgett & Sorge, 1996)

Oproti běžně používaným klonovacím metodám, které jsou jinak pružné a poměrně efektivní, nepřidává metoda Golden Gate do klonovaného genomu žádné zbytečné aminokyseliny navíc. Strategie Golden Gate je založena na využití IIS restrikčních enzymů, které štěpí mimo rozpoznávací sekvence. Tím vytvářejí 5 'nebo 3' DNA přesahy, které, pokud bylo vše správně navrženo, mohou sloužit jako suchý zip pro následnou ligaci. Ligace se dnes nejčastěji provádí za pomoci T4 ligázi ve spojení s PCR. Golden Gate je univerzální a dá se použít pro jednoduché klonování, při kterém jde o spojení jen dvou částí genomu, ale i pro skládání většího množství fragmentů v jedné reakci. Tato metoda by mohla být velmi užitečná při vytváření virových vektorů. (Luo, Lin, Bolund, & Sørensen, 2014)



Obr. 9: Schéma možného Golden Gate, při kterém byly v jedné reakci vloženy na vektory dva fragmenty.
Převzato (New England Biolabs, 2017)

Další využití TMV v Biotechnologiích

Jak už bylo několikrát zmíněno, má virus mozaiky tabáku množství vlastností, díky kterým je ideálním laboratorním organismem. Není proto překvapující, že se dnes využívá v mnoha vědních disciplínách a ne jen pro proteinovou expresi. Uvedl bych přikladem dva v dnešní době silně se rozvíjející vědní obory a to nanotechnologii a medicínu.

Nanotechnologie

Struktura a skvělá stabilita dělá z TMV částice výborný templát pro tvorbu nanočástic. První nanočástice byly z TMV vytvořeny roku 1999 a to pomocí mineralizace kapsidy. (Shenton, Mann, Douglas, Young, & Stubbs, 1999). Dnes se tvoří nanočástice hlavně navázáním kovových částic na virovou kapsidu TMV a nebo se experimentuje s vytvořením polymerové vrstvy na jejím povrchu.

V případě kovových částic se nejčastěji využívají sloučeniny stříbra, zlata a platiny. Kationt stříbra se váže do vnitřní části centrální dutiny, zatímco anionty obsahující zlato a platinu ($AuCl_4^-$ a $PtCl_6^{2-}$) upřednostňují vnější povrch virové částice. (Dujardin, Peet, Stubbs, Culver, & Mann, 2003)

Nanočástice vytvořené pomocí TMV mají využití hlavně v elektrotechnice. Bývají stabilní a dobře vodivé. Pro vylepšení vlastností nanočásticí jako vodičů mohou být viry geneticky modifikovány. (Fonoberov & Balandin, 2005) Byly použity například pro tvorbu namomagnetických materiálů a nebo jako elektrody při výrobě lithiových mikrobaterií. (Pomerantseva, Gerasopoulos, Chen, Rubloff, & Ghodssi, 2012)

Využití v medicíně

Viry TMV a virové vektory z nich připravené mají v medicíně využití pro tvorbu vakcín. Mimo běžné exprese mohou sloužit například k výrobě již výše zmíněných jedlých vakcín (exprese v jedlé části rostliny) a nebo jako antigen presentující systém, kdy virus TMV nese na povrchu svého kapsidu antigen.

Kromě těchto využití by se mohl TMV využívat při chemoterapeutii. A to jako transportní částice pro targeted delivery chemoterapeutické medikamenty. Látka by byla dopravována do postižených buněk a to díky vlastnosti viru přímo pronikat do savčích buněk. Tento proces se zatím v medicíně neuplatňuje a vyžaduje do budoucna další zkoumání. (Kernan, Wen, Pitek, & Steinmetz, 2017)

Závěr

Virus tabákové mozaiky je zkoumán už od samého počátků virologie a i přesto se o něm dozvídáme neustále nové informace, na základě kterým můžeme vystavět nové postupy pro genetickou biologii, ale i pro nanotechnologii a jiné vědní obory.

Zkoumání TMV, jeho životního cyklu a expresních drah nám může pomoci objasnit mnohé doposud nepochopené biologické procesy. TMV je výborným modelovým organismem, ale poznatky získané jeho zkoumáním se dají často aplikovat i na viry, se kterými by byla práce v laboratoři mnohem složitější.

Pro další využívání TMV bude v budoucnu důležité prostudovat procesy assembly a diassembly v podmínkách in vivo. Když budeme lépe znát procesy sbalování virové částice, můžeme zajistit lepší prevenci a do budoucna nám to může přispět k vývoji léků proti virovým onemocněním. Také by to mohlo pomoci k vytvoření bezpečnějších virových vektorů.

Samotné virové vektory odvozené od TMV, ale i od jiných virů se za posledních pár let mohou těšit pečlivému zkoumání a neustálému zlepšování. Tento trend by se v budoucnosti neměl měnit, protože jsou stále více a více komerčně využívány. Věda se poslední dobou přiklání k využívání vektorů druhé generace. Se zlepšením jejich vlastností a usnadněním přípravy nám do budoucna mohou pomoci moderní metody klonování, zvláště tedy Golgen Gate.

Citovaná literatura

Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology.* Amsterdam: Elsevier Academic Press.

Allard, H. (1914). The mosaic disease of tobacco. *Bull. No. 40*, 33.

Andret-Link, P., & Fuchs, M. (2005). Transmission specifity of plant viruses by vectors. *J Plant Pathol*, 153–165.

Avesani, L., Marconi, G., Morandini, F., Albertini, E., Bruschetta, M., Bortesi, L., . . . Porceddu, A. (2007). Stability of Potato virus X expression vectors is related to insert size: implications for replication models and risk assessment. *Transgenic Research, 16*, 587-597.

Bagley, C. A. (December 2001). *Controlling Tobacco Mosaic Virus in Tobacco through Resistance.* Blacksburg, Virginia.

Banerjee, A. K. (1987). Transcription and Replication of Rhabdoviruses. *Microbiol. Rev., 51 (1)*, 66–67.

Bawden, F. C., Pirie, N. W., Bernal, J. D., & Fankuchen, I. (1936). Liquid Crystalline Substances from Virus-infected Plants. *Nature 138*, 1051-1052.

Beachy, R. N., & Heinlein, M. (2000). Role of P30 in Replication and Spread of TM. *Traffic*, 540–544.

Beijerinck, M. W. (1898). Uber ein contagium vivum fluidum als Ursache der Fleckenkrankheit der. V *5* (stránky 3-21). Verhandelingen der Koninklijke akademie van Wetenschappen te Amsterdam.

Butler, P. J. (1999). Self-assembly of tobacco mosaic virus: the role of an intermediate aggregate in generating both specificity and speed. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 537–550.

Butler, P. J., & Klug, A. (1978). The Assembly of a Virus. *Sci. Am., 239 (5)*, 62-69.

Butler, P. J., Bloomer, A. C., & Finch, J. (1992). Direct visualization of the structure of the "20 S" aggregate of coat protein of tobacco mosaic virus. The "disk" is the major structure at pH 7.0 and the Proto-helix at lower pH. *J Mol Biol. ,224(2)*, 381-394.

Cann, A. J. (2012). *Principles of Molecular Virology - Fifth Edition.* University of Leicester, UK: Academic Press is an imprint of Elsevier.

Carstens, E., King, A., Adams, M., & Lefkowitz, E. (2012). Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Virus Taxonomy*.

Caspar, D. L. (1963). Assembly and Stability of the Tobacco Mosiac Virus Particle. *Adv. in Protein Chemistry 18*, 37-121.

Daniell, H., Datta, R., Varma, S., Gray, S., & Lee, S. B. (1998). Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nature Biotechnology, 16,*, 345-348.

Daniell, H., Khan, S., & Allison, L. (2002). Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends in Plant Science, 7*, 84-91.

Dědič, P. (2014). *Hlavní virové choroby bramboru v ČR.* Havlíčkův Brod: Výzkumný ústav .

Dimmock, N. J., Easton, A. J., & Leppard, K. N. (2016). *Introduction to Modern Virology.* School of life science, University of Warwick, Coventry: Wiley-Blackwell.

Dujardin, E., Peet, C., Stubbs, G., Culver, J. N., & Mann, S. (2003). Organization of metallic nanoparticles using tobacco mosaic virus templates. *Nano Lett., 3(3),*, 413–441.

Fischer, R., & Emans, N. (2000). Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Res., 9(4-5)*, 279-299.

Fonoberov, V. A., & Balandin, A. A. (2005). Phonon Confinement Effects in Hybrid Virus-Inorganic Nanotubes for Nanoelectronic Applications. *Nano Lett., 5 (10),*, 1920–1923.

Fraenkel-Conrat, H. (1956). The role of the nucleic acid in the reconstitution of active tobacco mosaic virus. *J. Am. Chem. Soc*, 78, 882.

Garabagi, F., McLean, M. D., & Hall, J. C. (2012). Transient and stable expression of antibodies in Nicotiana species. *Methods Mol Biol. 2012;907:389-408*, 907:389-408.

Garcia, J. A., Glasa, M., Cambra, M., & Candresse, T. (2014). Plum pox virus and sharka: a model. V *Mol Plant Pathol* (stránky 226–241).

Giddings, G., Allison, G., Brooks, D., & Carter, A. (2000). Transgenic plants as factories for biopharmaceutical. *Nature Biotechnology*, 18, 1151 - 1155 .

Gleba, Y. K. (2007). Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Current Opinion in Biotechnology, 18(2)*, 134–141.

Gleba, Y., Marillonnet, S., & Klimyuk, V. (2004). Engineering viral expression vectors for plants: the “full virus” and the “deconstructed virus” strategies,. *Current Opinion in Plant Biology, vol. 7, no. 2*, 182–188.

Goelet, P., Lomonossoff, G. P., Butler, P. J., Akam, M. E., Gait, M. J., & Karn, J. (1982). Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. *Proc. Nad Acad. Sci. USA 79*, 5818–5822.

Grabowski, G. A., Golembo, M., & Shaaltiel, Y. (2014). Taliglucerase alfa: an enzyme replacement therapy using plant cell expression technology. *Mol Genet Metab*, 112, 1–8.

Hefferon, K. L. (2014). Virus Vectors for Vaccine Production in Plants: Spotlight on Geminiviruses. *Vaccines*, 642–653.

Howard, A. R., Heppler, M. L., Krishnamurthy, K., Payton, M. E., & Verchot-Lubicz, J. (2004). Potato virus X TGBp1 induces plasmodesmata gating and moves between cells in several host species whereas CP moves only in N. benthamiana leaves. *Virology 328*, 185–197.

Chen, Q., & Davis, K. R. (2016). The potential of plants as a system for the development and production of human biologics. *F1000Res*.

Chen, Q., Lai, H., Hurtado, J., Stahnke, J., Leuzinger, K., & Dent, M. (2013). Agroinfiltration as an Effective and Scalable Strategy of Gene Delivery for Production of Pharmaceutical Proteins. *Adv Tech Biol Med*, 1–21.

Chen, X. S., Casini, G., Harrison, G. S., & Garcea, R. L. (2001). Papillomavirus capsid protein expression in Escherichia coli: Purification and assembly of HPV11 and HPV16 L1. *Journal of Molecular Biology, 307, 173-182*, 307, 173-182.

Chilton, M. D., Drummond, M. H., Merio, D. J., Sciaky, D., Montoya, A. L., Gordon, M. P., & Nester, E. W. (1977). Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell. 11(2)*, 263-71.

Johansen, E., Edwards, M. C., & Hampton, R. O. (1994). Seed Transmission of Viruses: Current Perspectives. *Annu Rev Phytopathol* , 32, 363–386.

Kasteel, D. T., Wellink, J., Goldbach, R. W., & Van Lent, J. W. (1997). Isolation and characterization of tubular structures of cowpea mosaic virus. *J. Gen. Virol 78*, 3167–3170.

Kausche, G., Pfankuch, E., & Ruska, H. (1939). Die Sichtbarmachung von pflanzlichem Virus im Übermikroskop. *Naturwissenschaften.*

Kernan, D. L., Wen, A. M., Pitek, A. S., & Steinmetz, N. F. (2017). Featured Article: Delivery of chemotherapeutic vcMMAE using tobacco mosaic virus nanoparticles. *Exp Biol Med (Maywood), 242(14)*, 1405-1411.

Kikkert, J. R., Vidal, J. R., & Reisch, B. I. (2005). Stable transformation of plant cells by particle bombardment/biolistics. *Methods Mol Biol, 286*, 61-78.

Klimyuk, V., Pogue, G., Herz, S., Butler, J., & Haydon, H. (2012). Production of recombinant antigens and antibodies in Nicotiana benthamiana using Magnifection technology: GMPComplian facilites for Small- and Large-scale manufacturing. *Current topics in microbiology and immunology, 375,*, 127-154.

Klug, A. (1999). The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci., 354(1383)*, 531–535.

Krishnan, A., & Susan, W. L. (2014). TrypZean™: An Animal-Free Alternative to Bovine Trypsin. *Biotechnol Agric For*, 68, 43-63.

Lauffer, M. A. (1944). The Size and Shape of Tobacco Mosaic Virus Particles. *J. Am. Chem. Soc.*, 1188–1194.

Lee, L. Y., & Gelvin, S. B. (2008). T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiol, 146*, 325–332.

Li, C., Jiang, Y., Guo, W., & Liu, Z. (2013). Production of a chimeric allergen derived from the major allergen group 1 of house dust mite species in Nicotiana benthamiana. *Human Immunology, 74(5)*, 531-537.

Lindbo, J. A. (2007). TRBO: a high-efficiency tobacco mosaic virus RNA-based overexpression vector,. *Plant Physiology, vol. 145, no. 4,*, 1232–1240.

Lucas, W. (2010). *Viral Capsids and Envelopes: Structure and Function.* Philadelphia, Pennsylvania, USA.

Luo, Y., Lin, L., Bolund, L., & Sørensen, C. B. (2014). Efficient construction of rAAV-based gene targeting vectors by Golden Gate cloning. *Biotechniques, 56(5)*, 263-268.

Ma, J., Drake, P., & Christou, P. (2003). The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet.*, stránky 794-805.

Maenpaa, P., Gonzalez, E. B., Ahlandsberg, S., & Jansson, C. (1999). Transformation of nuclear and plastomic plant genomes by biolistic particle bombardment. *Molecular Biotechnology, 13*, 67-72.

Marillonnet, S., Thoeringer, C., Kandzia, R., Klimyuk, V., & Gleba, Y. (2005). Systemic Agrobacterium tumefaciens-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nature Biotechnology, 23*, 718-723.

Monsalve-Fonnegra, Z. I., Argüello-Astorga, G. R., & Rivera-Bustamante, R. F. (2002). Geminivirus Replication and Gene Expression. In Plant Viruses As Molecular Pathogens. *Food Product Press*, 257–277.

Musil, M., Kvíčala, A., & Lešková, O. (1981). Diagnostika vírusov strukovín a datelinovín. *Veda, SAV, Bratislava,*, 175.

Nester, E. W. (2014). Agrobacterium: nature's genetic engineer. *Front Plant Sci., 5*, 730.

New England Biolabs. (20. 8 2017). Načteno z New England Biolabs: http://www.neb-online.de/neb/klonierung-synthetische-biologie/cloning-2-dna-assembly/golden-gate-assembly/

Osman, T. A., & Buck, K. W. (1996). Complete replication in vitro of tobacco mosaic virus RNA by a template dependent membrane-bound RNA polymerase. *Journal of Virology, 70(9)*, 6227–6234.

Padgett, K. A., & Sorge, J. A. (1996). Creating seamless junctions independent of restriction sites in PCR cloning. *Gene,168(1):*, 31-35.

Petukhova, N. V., Gasanova, G. A., & Stepanova, L. A. (2013). Immunogenicity and protective efficacy of candidate universal influenza A nanovaccines produced in plants by Tobacco mosaic virus-based vectors. *Current Pharmaceutical Design, 19(31)*, 5587–5600.

Pomerantseva, E., Gerasopoulos, K., Chen, X., Rubloff, G., & Ghodssi, R. (2012). Electrochemical performance of the nanostructured biotemplated V2O5 cathode for lithium-ion batteries. *Journal of Power Sources, 206*, 282–287.

Sala, F., Manuela Rigano, M., Barbante, A., Basso, B., Walmsley, A. M., & Castiglione, S. (2003). Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. *Vaccine (Volume 21, Issues 7–8)*, 803-808.

Scotti, N., Rigano, M. M., & Cardi, T. (2012). Production of foreign proteins using plastid transformatio. *Biotechnol Adv, 30*, 387–397.

Shenton, W., Mann, S., Douglas, T., Young, M., & Stubbs, G. (1999). Inorganic–Organic Nanotube Composites from Template Mineralization of Tobacco Mosaic Virus. *Adv. Mater., 11(3),*, 253–256.

Shivprasad, S., Pogue, G. P., Lewandowski, D. J., Hidalgo, J., Donson, J., Grill, L. K., & Dawson, W. O. (1999). Heterologous sequences greatly affect foreign gene expression in tobacco mosaic virus-based vectors. *Virology, 255(2)*, 312–323.

Schilperoort, P. J., & Hooykaas, R. A. (1992). Agrobacterium and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology, 19*, 15-38.

Scholthof, K.-B. G. (2003). TOBACCO MOSAIC VIRUS: A Model System for Plant Biology. *Annual Review of Phytopathology vol. 42*, 13-34.

Sleat, D. E., Gallic, D. R., Jefferson, R. A., Bevan, M. W., Turner, P. C., & Wilson, T. M. (1987). Characterisation of the 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA as a general enhancer of translation in vitro. *Gene, 60(2-3)*, 217–225.

Stoger, E., Sack, M., Perrin, Y., Vaquero, C., Torres, E., Twyman, R. M., . . . Fischer, R. (2002). Practical considerations for pharmaceutical antibody production in different crop systems. *Molecular Breeding, 9,*, 149-158.

Strasser, R., Stadlmann, J., Schähs, M., Stiegler, G., Quendler, H., Mach, L., . . . Steinkellner, H. (2008). Generation of glyco-engineered Nicotiana benthamiana for the production of monoclonal antibodies with a homogeneous human-like N-glycan structure . *Plant Biotechnol J, 6*, 392–402.

Turner, D. R., Joyce, L. E., & Butler, P. J. (1988). The tobacco mosaic virus assembly origin RNA. Functional characteristics defined by directed mutagenesis. *J Mol Biol., 203(3)*, 531-547.

Vaquero, C., Sack, M., Chandler, J., Drossard, J., Schuster, F., Monecke, M., . . . Fiscer, R. (1999). Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96*, 11128-11133.

Verch, T., Yusibov, V., & Koprowski, H. (1998). Expression and assembly of a full-length monoclonal antibody in plants using a plant virus vector. *Journal of Immunological Methods, 220,*, 69-75.

Weil, J. (2005). Are genetically modified plants useful and safe? *Life, 57(4/5)*, 311 – 314.

Wellink, J., & Van Kammen, A. (1989). Cell-to-cell Transport of Cowpea Mosaic Virus Requires Both the 58K/48K. *J. gen. ViroL*, 70, 2279-2286.

Yusibov, V., Rabindran, S., Commandeur, U., Twyman, R. M., & Fischer, R. (2006). The Potential of Plant Virus Vectors for Vaccine Production. *Drugs R D, 7,*, 203-217.

Zaitlin, M. (1999). Elucidation of the genome organization of tobacco mosaic virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 354(1383)*, 587–591.

Zhang, Y. F., Li, D. P., Jin, X., & Huang, Z. (2014). Fighting Ebola with ZMapp: spotlight on plantmade antibody. *Science China Life Sciences, 57(10)*, 987–988.

Zimmern, D. (1977). The nucleotide sequence at the origin for assembly on tobacco mosaic virus RNA. *Cell, 11(3),*, 463–482.