

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 2016

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, 18.8.2016

..... Daniel Kroupa

Abstract (cz):

V průběhu několika posledních desetiletí se rostlinné viry a vektory odvozené z nich se staly nejen nedílnou součástí práce v laboratořích, ale začali 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, na vektory z nich odvozené. Porovnat je s dalšími používanými expresními systémy v rostlinách a popsat, jak by jejich výhody mohli být dále využívány a zkombinovány s metodami moderního klonování.

Klíčová slova: virový vektor, exprese, virus tabákové mozaiky, virus mozaiky vigny, 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, Cowpea mosaic virus, Golden gate cloning

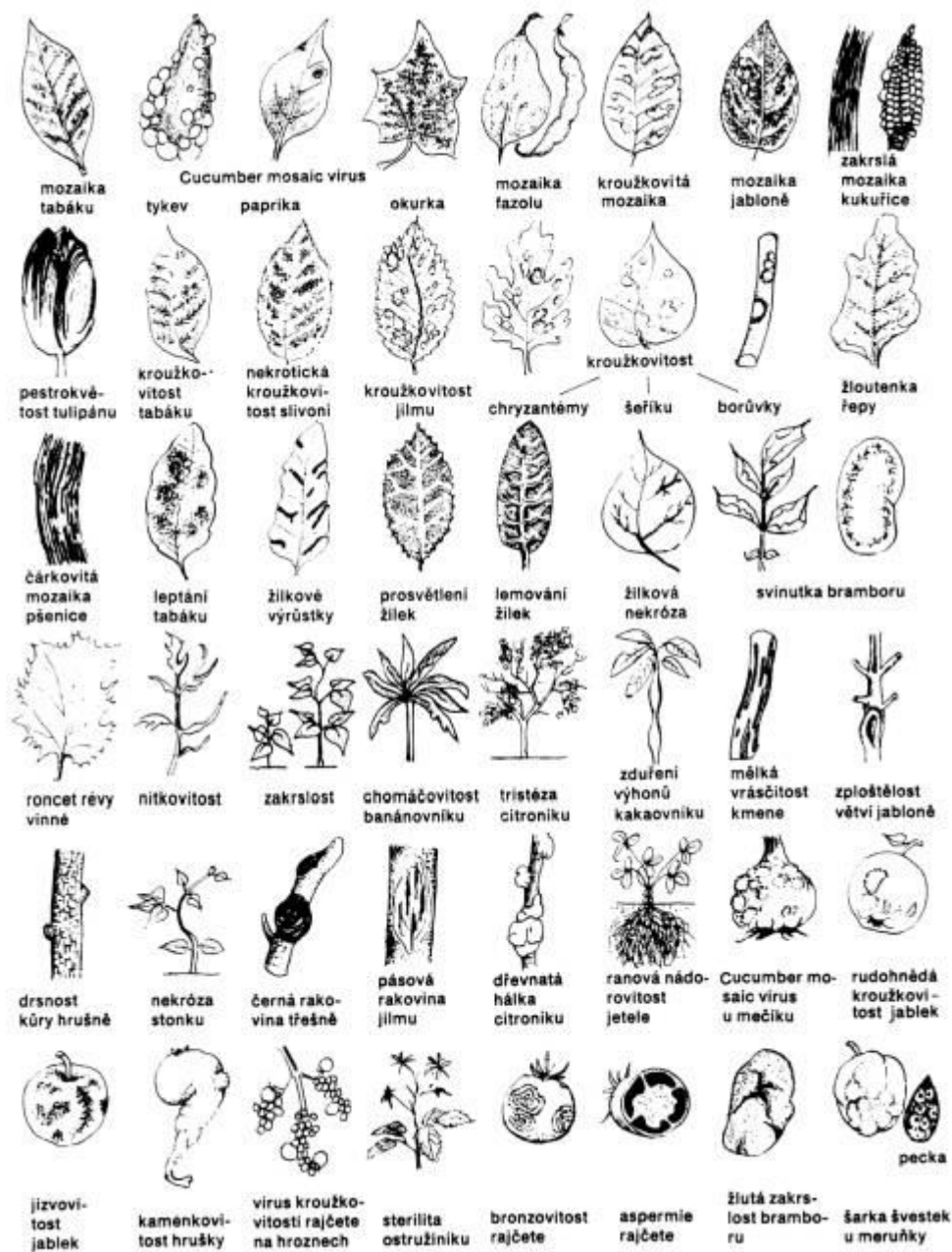
Obsah:

Rostlinné viry.....	- 1 -
Morfologie a taxonomie virů.....	- 2 -
Virus mozaiky tabáku.....	- 4 -
Virus mozaiky viny.....	- 6 -
Rostlinné expresní systémy.....	- 8 -
Stabilní rostlinná exprese.....	- 9 -
Agrobacterium tumefaciens	- 9 -
Transientní rostlinná exprese.....	- 10 -
Rostlinné virové vektory	- 11 -
Virové vektory odvozené od TMV	- 12 -
Virové vektory odvozené od CMPV	- 13 -
Golden Gate.....	- 13 -
Závěr.....	- 15 -
Citovaná literatura	- 16 -

Rostlinné viry

Vir je malý nebuněčný parazit, který není schopný vlastní reprodukce. K reprodukci i k expresi proteinů potřebuje virus hostitelskou buňku, jejíž mechanismy by mohl využít. Je proto zcela závislý na svém hostiteli. Většina virů obsahují buď RNA nebo DNA, které můžou být jedno, ale i dvouvláknové. Nejjednodušší viry mohou obsahovat tolik RNA/DNA pro kódování pouze čtyř proteinů. Zato ty nejsložitější mohou kódovat 100-200. (Harvey, a další, 2000)

Viry byly pro lidi dlouho záhadou a začátek virologie se datuje až od roku 1892, kdy holaňďan Martinus Beijerinck publikoval svou práci. Provedl pokus, při kterém extrahoval šťávu z nakažené rostliny a přecedil jí velice jemným sítem, kterým by neměly projít žádné bakterie, což byly nejmenší tou dobou známé patogeny. Tuto šťávu použil k infikování dalších rostlin. Takovýto pokus provedli před ním už jiní, ale Martinus Beijerinck byl první, kdo výsledky nepovažoval za chybu. O šťávě hovořil jako o „contagious living fluid.“ Což by se dalo přeložit jako nakažlivá žijící tekutina a pro popsání použil slovo „virus“ (Z latiny „jed“). Takto první objevený virus byl právě vir mozaiky tabáku (TMV) (Lustig, A & Levine, 1992) Dnes se na viry pohlíží hlavně jako na patogeny rostlin způsobující velké ztráty v zemědělství. Některé viry svou aktivitou způsobují typické makroskopické projevy na rostlinném těle, díky kterým se dají identifikovat i bez potřeby laboratorních testů (viz. obr. 1). Mezi ekonomicky nejvýznamnější virová onemocnění v Evropě patří například virus svinutky brambor (PLRV), Y virus bramboru (PVY) (Dědič, 2014) a virus šárky švestky (PPV) (Garcia, Glasa, Cambra, & Candresse, 2014). Rostlinné viry ovšem nejsou jen patogeny, ale zastávají také důležitou roli v biotechnologiích. (Yusibov V. , Rabindran, Commandeur, Twyman, & Fischer, 2006) Využívají se například k produkci rekombinantních proteinů v rostlinách a takzvanému „Molekular farming“. To je velmi lukrativní hlavně díky nízkým nákladům na kultivaci a růst rostlin. Rostlinám stačí základní minerály, voda a slunce. (Ma, Drake, & Christou, 2003). Rostlinné expresní systémy jsou ve srovnání s bakteriálními nebo hmyzími nejuniverzálnější a nejrychlejší. (Gecchele, a další, 2015) a mají velkou výhodu v přítomnosti post-translačních modifikací a nepřítomnosti savčích patogenů a toxinů. Podle druhu produktu se může vybrat nejideálnější systém. Liší se totiž expresní systém v celé rostlině, buněčné a tkáňové kultuře. (Rigano & Walmsley, 2005)



Obr. 1: Symptomy rostlinných virů (Kůdelka, 1989)

Morfologie a taxonomie virů

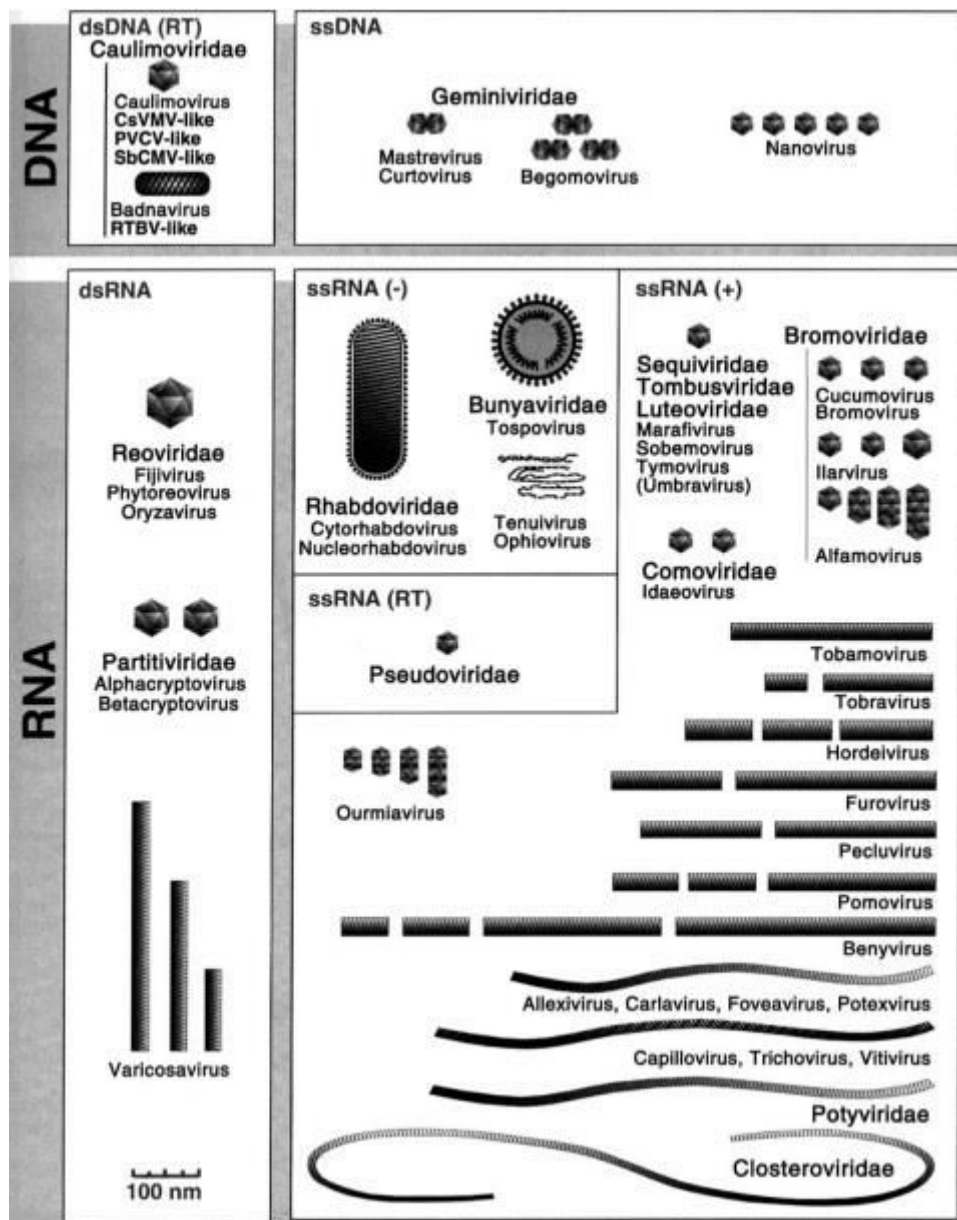
Většina virů jsou malé částice o velikosti 20 – 500 nm. Jednoduché viry jsou převážně tvořeny z nukleové kyseliny a obalových proteinů, které tvoří kapsid. Existuje mnoho kritérií, podle čeho se mohou viry dělit do taxonů. Například způsoby přenosu, druhu hostitele a vlivu na něj či podle sérologických vztahů. Za dvě nejdůležitější kritéria jsou ale považována vlastnosti nukleové kyseliny a vlastnosti obalových proteinů.

Většina rostlinných virů mají genetickou informaci uloženou v (+)ssRNA a jsou obaleny pouze jediným kapsidovým proteinem. (Mahy & van Regenmortel, 2008) To také platí pro většinu virů, se kterými se pracuje v laboratoři, ale existují výjimky. Mimo (+)ssRNA a (-)ssRNA mohou obsahovat viry genetickou informaci jako molekuly ssDNA, dsDNA (RT) nebo dsRNA. Doposud však nejsou známy žádné viry obsahující molekuly dsDNA nebo ssRNA (RT). (Ball, 2005)

Kapsidy mohou udržovat vir v různých tvarech. Podle toho rozeznáváme například viry kulovité (spheres), oválné (ovals), vláknité (worm-like), tyčinkovité (rod-shaped) nebo i nepravidelné (pleomorphic). Hlavní funkce kapsidy je obalovat a chránit genetickou informaci viru. Podle toho, zda je kapsida navíc obalena lipidovou dvouvrstvou (obalem) můžeme viry rozdělit na viry obalené a bezobalné. Pokud je obal přítomen, hraje důležitou roli při infekčnosti, přenosu viru z buňky do buňky, uvolnění obsahu kapsidy a balení nově vzniklých virových částic. Tato struktura také určuje stabilitu částice a její odolnost vůči fyzickému a chemickému poškození. U bezobalných virů většinu těchto funkcí zastává pouze kapsida. (Lucas, 2010)

Pomocí těchto kritérií se dá vytvořit taxonomický strom obsahující tyto kategorie: čeleď, rod, druh, kmen, izolát. Dá se říci, že příslušnost k čeledi je druhem, formou a členěním nukleové kyseliny, zatímco příslušnost k rodu tvarem a velikostí kapsidy/obalu (viz. obr. 2)

Taxonomie virů se neustále mění podle nových poznatků. Úpravy v systému publikuje International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) vždy jednou za několik let. (Carstens, King, Adams, & Lefkowitz, 2012)

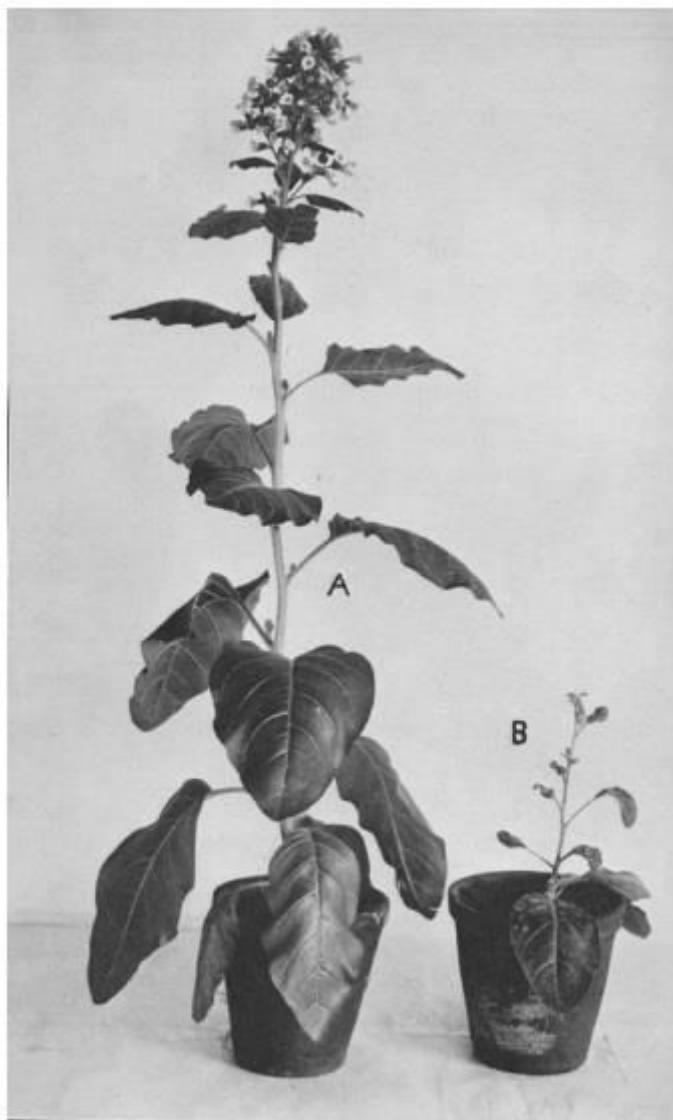


Obr. 2: Ukázka virové taxonomie z roku 1993 (Murphy, a další, 1993)

Virus mozaiky tabáku

Virus mozaiky tabáku (TMV) je nejdéle známý druh viru a dá se považovat za nejprozkoumanější virus vůbec. Možná kvůli tomu se TMV stal modelovým organismem pro mnoho výzkumů a to až do dnešních dnů. TMV byl například první chemicky čištěný virus (Bawden, Pirie, & Fankuchen, 1936), byl to první virus vizualizován v elektronovém mikroskopu (Kausche, Pfankuch, & Ruska, 1939), TMV RNA byla použita při pokusech dokazujících, že nukleové kyseliny nesou genetickou informaci a že i pouhá RNA stačí k infikování rostliny virem. (Fraenkel-Conrat, 1956), bylo na něm osvětleno, jak funguje virový pohyb z buňky do buňky a mnoho dalšího.

TMV má mnoho vlastností, díky kterým se stal modelovým organismem pro tolik možných pokusů. Například, nakažené rostliny produkují TMV v takovém množství, že inkluzní tělíčka krystalických virionů jsou v infikovaných listech viditelná pod elektronovým mikroskopem. Dále je u TMV výhodné, že pro jeho přenos není potřeba hmyz ani jiný vektor. Vir se z rostliny do rostliny přenáší pouhým kontaktem poraněných míst. Vir zabraňuje v rostlině rozvoji chloroplastů a tím způsobuje rostlinnou zakrnělost (viz. obr. 3) a typický mozaikový vzor na listech.

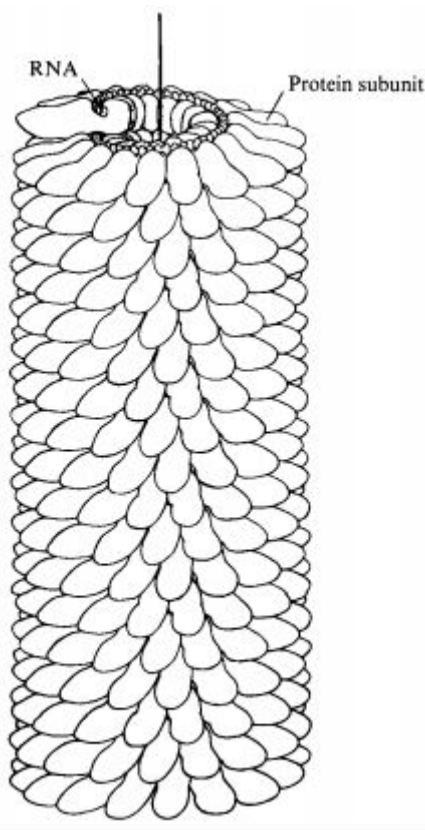


Obr. 3: Zdravá rostlina (A) a rostlina nakažená mozaikou tabáku (B) (Allard, 1914)

TMA je silně stabilní virus a in vitro v infikovaném SAP vydrží i několik let. Čištěný vir vydrží v teplotě 5 ° C životaschopný až 50 let. Jeho stabilita vyplývá z hustoty virových částic. (Scholthof, 2004)

TMV má tyčinkovitý tvar (viz. obr. 4) o délce přibližně 300 nm a o poloměru 10 nm. Uprostřed je centrální otvor s poloměrem 2 nm. (Caspar, 1963)

Genom TMV je tvořen jako u většiny rostlinných virů (+)ssRNA a je dlouhý přibližně 6400 bází a je velmi důkladně zmapovaný, což je další důvod, proč se TMV tak hojně používá v laboratořích. Obsahuje tři otevřené čtecí rámce, z nichž exprimuje nejméně čtyři proteiny. První nukleotidová sekvence byla stanovena pro kmen U1 (Goelet, a další, 1982) a srovnáním genomů s jinými kmeny byl odhalen pevně stanovený genom pro některé základní proteiny.



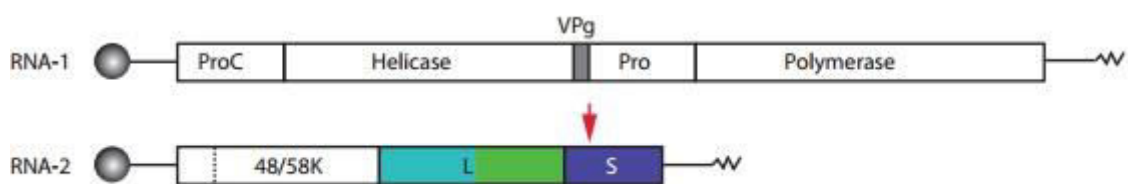
Obr. 4: Schéma TMV částice ukazující uspořádání proteinů a RNA. (Caspar, 1963)

Virus mozaiky viny

Virus mozaiky viny (CPMV) se od svého objevení před přibližně padesáti lety stal jedním z nejintenzivněji studovaných rostlinných virů. Výzkum se v posledních dvaceti letech přesunul ze zkoumání genetické struktury a struktury proteinů na způsoby, jak by se dal CPMV využít v laboratořích.

CPMV infikuje různé druhy luštěnin, ale také modelového hostitele, *Nicotiana benthamiana*. Genom mozaiky viny se skládá ze dvou samostatných (+)ssRNA molekul. Každá z těchto molekul kóduje syntézu jiných proteinů. RNA-1, která je dlouhá 5889 bází, kóduje proteiny zapojené do replikace virové RNA a zpracování polyproteinů. RNA-2, jejíž délka je 3481 bází,

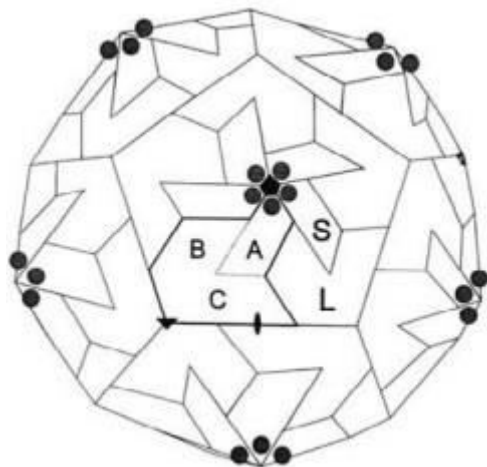
kóduje proteiny spojené s přesunem viru z buňky do buňky a systematické šíření. (viz. obr. 5) Pro správné šíření viru jsou potřeba oba genomy. (Sainsbury, Cañizares, & Lomonossoff, 2010)



Obr. 5: Genetická mapa RNA CPMV. Červená šipka označuje místo vložení insertu při vytváření chiméry (Sainsbury, Cañizares, & Lomonossoff, 2010)

Konkrétní proteiny v RNA-2 jsou Movement proteiny 48K a protein 58K, která s ním sdílí velkou část čtecího rámce a proteiny kapsidy. (Wellink & Van Kammen, 1989)

Kapsida má tvar dvacetistěnu a skládá se ze dvou typů proteinů. Velkého L proteinu, který má dvě β -barrel domény a menšího S proteinu, který má β -barrel doménu jednu. Uspořádání proteinů v kapsidě dává možnost vytvoření stabilní chiméry pomocí vložení insertu do genu pro obalový protein S na RNA-2 (viz. obr. 6) (Hull, 2009)



Obr. 6: Schéma kapsidy chiméry CMPV. (Hull, 2009)

Rostlinné expresní systémy

Proteiny mají mnoho využití nejen ve vědě, ale i jako vakcíny, léčiva, hormony a mnoho jiných. Poptávka po nich neklesá, ale naopak stoupá a proto se rostlinné expresní systémy za posledních pár let stávají více a více populární díky svým mnoha výhodám oproti tradičně využívaným postupům získávání těchto proteinů. Využívání mikrobiální fermentace nebo savčích buněčných linií je oproti rostlinným systémům velmi nákladné a musí být pečlivě kontrolováno kvůli nebezpečí toxicity. Používání transgenních rostlin naopak vyžaduje mnohem méně nákladů a téměř neexistuje riziko kontaminace produktu endotoxiny nebo lidskými patogeny. Velkou výhodou je i přítomnost post-translačních modifikací. Rostliny produkují většinou velké množství biomasy a jsou vhodné i pro molekulární farmením v polním měřítku. (Fischer & Emans, 2000) Další výhodou použití transgenních rostlin při produkci proteinů je, že se mohou proteiny exprimovat v jedlých částech rostliny a mohli by být podávány orálně bez potřeby dalšího složitějšího zpracování. Taková biofarmaceutika by mohla být distribuována ve formě semen, hlíz, plodů a velmi by mohla pomoci při skladování produktů nebo při dovozu a podávání léčiv do rozvojových zemí. (Sala, a další, 2003) Už dnes existuje řada komerčně využívaných produktů, které vznikly pomocí rostlinných expresních systémů. Například v Kanadě produkovaný hirudin, pijavičí protein zabraňující srážení krve. (Giddings, Allison, Brooks, & Carter, 2000) Dále pak Taliglucerasa alfa, lék pro léčbu Gaucherovy choroby, produkovaný v buněčné suspenci mrkve. (Yao, Weng, Dickey, & Wang, 2015) nebo ZMapp, kombinace tří protilátek produkovaných v *Nicotiana benthamiana*, které slouží jako medikament proti Ebole (Chen & Davis, 2016). Podle produktu a potřeb postupu se dá zvolit správná hostitelská rostlina a správný expresní systém. Dá se vybírat podle mnoha kritérií a různé systémy v různých rostlinách mají své nezaměnitelné výhody, ale i nevýhody. (Rigano & Walmsley, 2005) Mimo toho existují dva základní způsoby exprese cizích proteinů v rostlinách a to Stabilní rostlinná exprese a transientní (přechodná) rostlinná exprese. (Garabagi, McLean, & Hall, 2012)

Stabilní rostlinná exprese

Stabilní rostlinná exprese je založena na vložení genu chtěného proteinu do jaderného nebo plastidového genomu každé buňky v rostlině. Nejpoužívanější metody jsou metoda Biolistická nebo metoda založená na využití schopnosti *Agrobacterium tumefaciens* vnášet část svého genomu do jaderného genomu rostlinné buňky.

Biolistická metoda je vhodná pro vnášení genu do jaderného, ale i plastidového genomu.

Metoda se provádí tak, že genetický materiál se nechá absorbovat na kovové částice (nejčastěji zlaté). Těmito částicemi jsou rostlinné buňky bombardovány pomocí genové pistole. Pro proniknutí buněčnou stěnou je zapotřebí poměrně velká rychlost. DNA nabalená na částicích se v buňkách eluuje a může se začlenit do genomu buňky. V případě začlenění do genomu chloroplastu je gen vložen do specifické oblasti, zatímco v případě jádra se gen vkládá na náhodné místo neznámým způsobem. (Kikkert, Vidal, & Reisch, 2005) Výhodou chloroplastové exprese je její stabilita a větší výtěžky, ale nehodí se k produkci proteinů vyžadující post-translační modifikace. U jaderné exprese je tomu naopak. Výtěžky jsou nižší, ale probíhají zde post-translační modifikace. (Scotti, Rigano, & Cardi, 2012)

Biolistická metoda funguje hlavně díky totipotenci rostlinných buněk. Stačí totiž jediná transgenní buňka, ze které je možné vypěstovat embryo/celou rostlinu.

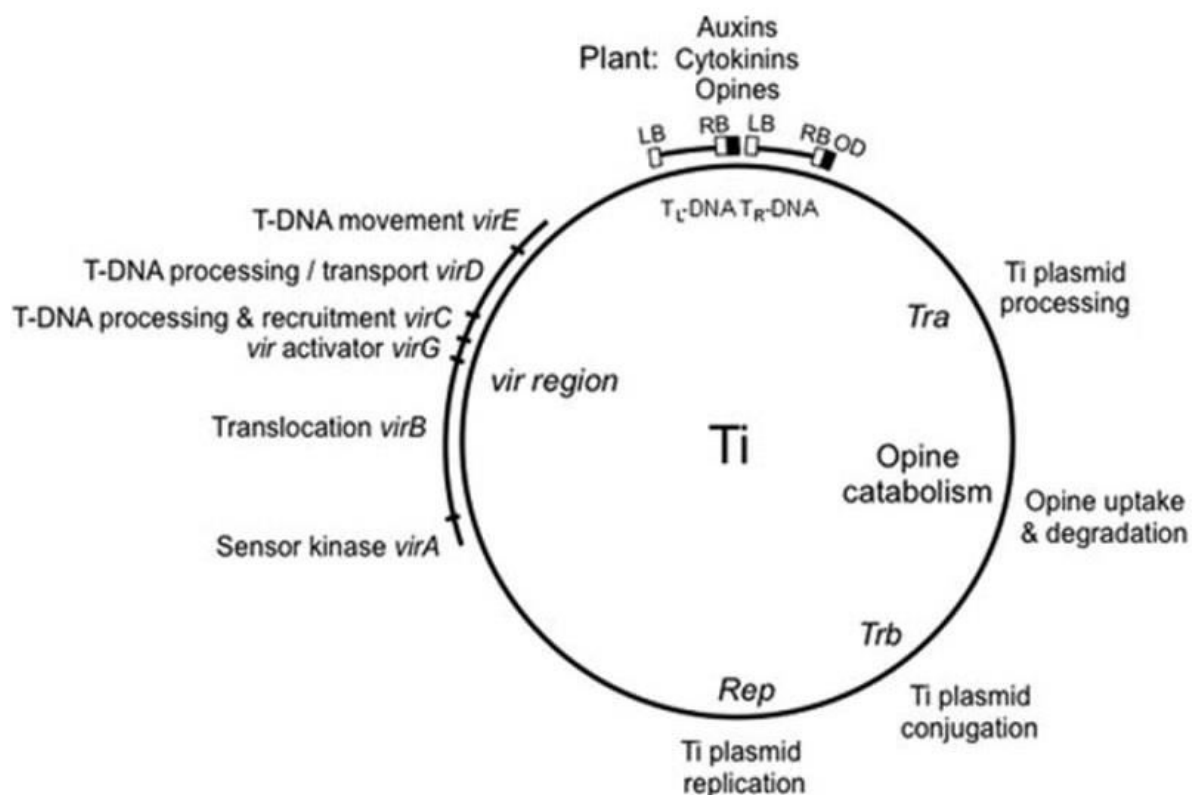
Metoda využívající *Agrobacterium tumefaciens* může být použita jen pro jadernou expresi. Výhodou této metody je menší šance na transkripční inaktivaci.

Agrobacterium tumefaciens

Agrobacterium tumefaciens (*A. tumefaciens*) je známá jako rostlinný patogen od počátku 20. století. Ale teprve posledních 30 let se její schopnost přenášet část svého genomu do jaderné DNA rostliny začala využívat i pro genetické inženýrství.

A. tumefaciens je gram-negativní bakterie vyskytující se v půdě. V přírodě napadá dvouděložné rostliny. Její infekční proces zahrnuje přenos T-DNA a proteinů do rostlinné buňky. Později se T-DNA začlení do DNA rostliny a způsobí zvýšenou expresy rostlinných růstových hormonů (Auxiny a cytokininy), které způsobí tvorbu nádorů. (Gohlke & Deeken, 2014) T-DNA je součástí bakteriálního Ti plasmidu (viz. obr. 7), z něhož se vyštěpí v přítomnosti látek indikujících poškození buněčné stěny. Posléze je pomocí různých obalových proteinů transportován do jádra, kde se může náhodně integrovat do DNA rostlinné buňky.

Pro práci v laboratoři se používají upravené kmeny *A. tumefaciens*. V Ti plasmidu těmto kmenům chybí oblast T-DNA. Ta je jim dodávána ve formě binárního vektoru. Binární plasmid má tu výhodu, že obsahuje počátek replikace pro *A. tumefaciens* i pro *Escherichia coli*. (Lee & Gelvin, 2008)



Obr. 7: Schéma Ti plasmidu (Christie, 2007)

Transientní rostlinná exprese

Oproti stabilní rostlinné exprese dokáže transientní exprese produkovat vysoké výtěžky v relativně krátké době (dny) a není potřeba zdlouhavě pěstovat celou transgenní rostlinu. (Garabagi, McLean, & Hall, 2012) I při transientní expresi se využívá *A. tumefaciens*. Avšak vpravuje se jen do některých buněk v rostlině (většinou do listů). Tam dochází k přechodné extrachromozomální expresi. Integrace do DNA má velmi malou pravděpodobnost a proto exprese z ní nehraje téměř žádnou roli. Většinou se vpravuje suspenze *A. tumefaciens*

nesoucí binární vektor pomocí injekční stříkačky nebo pod tlakem do listů rostliny. Nejčastěji pro transientní exprese v rostlinách používají vektory odvozené od rostlinných virů. (Sainsbury & Lomonosoff, 2014)

Rostlinné virové vektory

Rostlinné viry se používají pro exprese rekombinantních proteinů v rostlinách hlavně díky své schopnosti se v rostlině reprodukovat do vysokých titrů a díky své schopnosti se v rostlinách šířit. Existují dva základní způsoby exprese proteinů pomocí rostlinných virů. Buď se umístí čtecí rámec peptidu pod virový promotor. Potom vzniká rekombinantní protein, který není součástí virových částic. A nebo se umístí do čtecího rámce kapsidového proteinu viru. Dojde pak k fúzi rekombinantního proteinu a proteinu kapsidy viru. Po této fúzi nese vir rekombinantní protein na svém povrchu. (Příkladem je chiméra CMPV na str. 7) (Yusibov V. , Rabindran, Commandeur, Twyman, & Fischer, 2006)

Rostlinný virový vektor je vlastně binární vektor připravený tak, že se vezme laboratorně připravená DNA odpovídajícího viru. Ta je společně s rostlinným transkripčním promotorem a terminátorem ohraničena T-DNA hraničními sekvencemi a celý tento konstrukt je vložen do připraveného binárního vektoru. Při následné agroinfekci se využívá rychlost a jednoduchost transientní exprese kombinovaná se schopností viru reprodukovat se do vysokých titrů. Nejčastěji se používají rostlinné viry odvozené od (+)ssRNA (Například TMV nebo Potato virus X) U nich je však problém. Po vpravení T-DNA virového vektoru do jádra rostlinné buňky začne docházet k transkripci a vzniklý transkript, který by měl být transportován do jádra reprezentuje virový genom. Rostlinné (+)ssRNA viry se ale za normálních podmínek do jádra nedostávají. Jejich životní cyklus se totiž odehrává v cytoplazmě. Proto je potřeba virový genom často poupravit odstraněním některých míst, aby byl zajištěn bezproblémový přechod z jádra do cytoplasmy. (Gleba, Klimyuk, & Marillonnet, 2007) Podle toho, zda se používají celé nebo upravené viry se dělí virové vektory na vektory první a druhé generace. (Gleba, Marillonnet, & Klimyuk, 2004)

Virové vektory první generace (strategie „full virus“) je založena na vložení čtecího rámce do genomu neupraveného viru. Virový genom se tak rozšíří o nový čtecí rámec.

Virové vektory druhé generace (dekonstruované viry) je založena nejen na vložení čtecího rámce do genomu viru, ale zároveň i na odstranění částí virového genomu, které nejsou potřebné nebo jsou nežádoucí. Například jde o odstranění části genomu potřebného pro

tvorbu kapsidy, přesun viru z buňky do buňky nebo kódující proteiny důležité pro přenos viru vektory. Většinou se jedná o úpravu viru za účelem zvýšení bezpečnosti, aby se dekonstruovaný vir nemohl samovolně šířit a nebo za účelem větší stability. Také bývá běžné, že se u dekonstruovaného viru odstraňuje hostitelská specifikace. Ale například může jít i o změnu přesouvání viru z buňky do buňky v rostlině. Toho se využívá, když je potřeba, aby se vir a s ním i chtěný protein exprimoval v co největší části rostliny a nenapadal primárně vzrostlý vrchol či jiná místa podle druhu viru. (Gleba, Klimyuk, & Marillonnet, 2007)

Virové vektory odvozené od TMV

Virus TMV má mnoho výhod, proč se stal jedním z nejpoužívanějších virů pro tvorbu virových vektorů. TMV produkuje velké množství RNA a bílkovin. V jedné buňce může být až několik set vironů a v rostlině *Nicotiana tabacum* může tvořit až 3% hmotnosti rostliny. (Rosypal, 2002) Další výhody jsou ty, že TMV je schopný infikovat poměrně velkou škálu hostitelů, vykazuje rychlé systémové šíření, infekce TMV může vydržet po celou dobu života rostliny, vir je jednoduchý a dobře prozkoumaný. Jeho genom je dlouhý pouhých 6400 bazí a je lineární, což nás neomezuje v inzerci různě dlouhých inzertů. (Donson, Kearney, Hilf, & Dawson, 1991)

Od TMV jsou odvozeny vektory prvního řádu, které vznikají vložením dalšího subgenového promotoru do genomu viru, který pak řídí expresi vloženého genu. (Dawson, a další, 1989) A i vektory druhého řádu, které se připravují výměnou některého genu z viru za jiný. Nejčastěji se nahrazuje obalový protein. (Scholthof, Scholthof, & Jackson, 1996) Protože se ukázalo, že takové vektory produkují v první generaci větší množství rekombinantního proteinu a manipulace s nimi je mnohem bezpečnější, protože nemohou tvořit virové částice. To znamenají, že se mohou šířit jedině z buňky do buňky. A pokud se vektor použije s agroinfekcí, tak je její účinnost mnohem vyšší. (Lindbo, 2007)

Některé viry mohou infikovat rostlinu, aniž by mezi sebou kompetovali. Toho se dá využít pro simultánní expresi dvou rekombinantních proteinů najednou. (Například pro produkci lehkého a těžkého řetězce protilátky). Příkladem toho využití může být systém magniCON od společnosti Icon Genetics. Ten využívá dekonstruovaných vektorů odvozených od TMV a Potato virus X (PVX). U obou těchto virů je odstraněn gen pro kapsidový protein, což opět zajišťuje lepší výnosy v první generaci a snižuje nebezpečí, protože se netvoří virové částice. (Giritch, a další, 2006)

Virové vektory odvozené od CMPV

I když se běžně používají vektory založené na jednoduchých (+)ssRNA virech, tak i ty mají své nevýhody. Mezi některé tyto nevýhody může patřit omezení velikosti a složitosti proteinu, který se dá exprimovat nebo genetická stabilita konstruktů během replikace virového genomu. Jako alternativa byl nedávno vyvinut systém CPMV-HT, který umožňuje rychlou produkci proteinů, aniž by muselo docházet k replikaci viru. Systém CPMV-HT je odvozen od viru mozaiky vigny, u kterého došlo k delecí velké části genomu na RNA-2. (Sainsbury & Lomonosoff, 2008) U CMPV je replikace RNA-2 zcela závislá na RNA-1. RNA-2 kóduje oba kapsidové proteiny a movement protein. Bylo zjištěno, že většina genomu RNA-2 může být nahrazena jinými sekvencemi, aniž by molekula ztratila schopnost být replikována RNA-1. (Cañizares, Liu, Tsakiris, Perrin, & Lomonosoff, 2006) To vedlo k rozvoji konstruktů, u kterých je odstraněna či nahrazena část/většina RNA-2 (delRNA-2).

Původní použití systému CMPV-HT bylo zdlouhavé a vyžadovalo velkou řadu modifikací. V průběhu pár let byl tento systém vylepšen a byla navržena série binárních vektorů pEAQ. Velikost plasmidu klesla více než o polovinu, aby se usnadnilo šíření vektorů a aby byla eliminována nežádoucí restriční místa. Systém je díky těmto vektorům daleko jednodušší a rychlejší. CMPV-HT a využívání vektorů pEAQ má oproti jiným systémům řadu výhod. Je možné najednou exprimovat více cizorodých genů v jedné buňce, není při jeho použití problém s genetickým riftingem během replikace a téměř neexistuje bezpečnostní riziko. (Sainsbury, Thuenemann, & Lomonosoff, 2009)

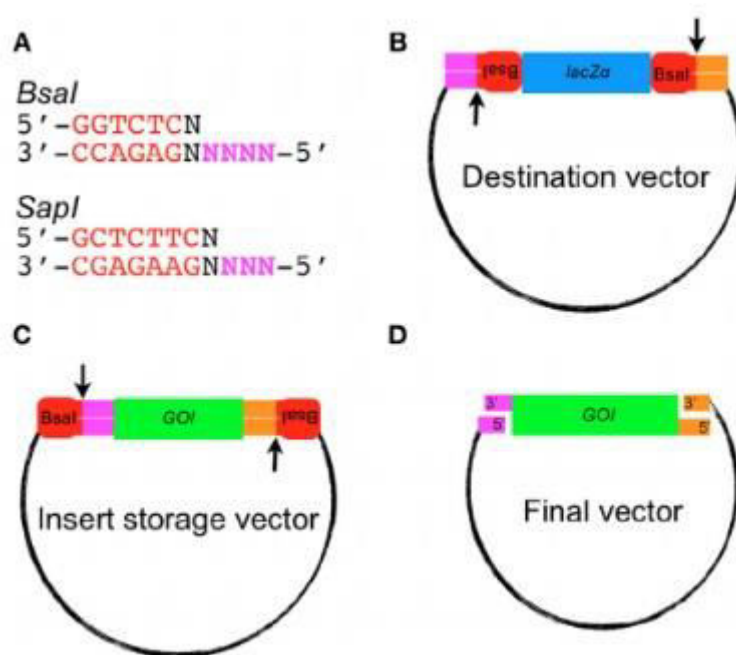
Všechny navržené a připravené vektory pEAQ jsou publikovány a anotovány GenBank nucleotide database.

Golden Gate

Metoda Golden gate má své počátky v roce 1996, kdy byl popsán způsob pro účinné klonování jakékoli sekvence DNA do místa určení bez omezení přirozeně se vyskytujících restričních míst. (Padgett & Sorge, 1996)

Běžně používané klonovací metody založené na místně specifické rekombinaci jsou jednoduché, pružné a poměrně efektivní, ale měli nevýhodu, že do exprimovaného proteinu přidávají dalších 8 až 13 aminokyselin. Proti tomu byla navržena metoda Golden gate, která

mimo jiných výhod, potlačuje tento nedostatek. Tato strategie je založena na použití IIS restričních enzymů, které štěpí mimo rozpoznávací sekvence. Vytváření tak 5' nebo 3' DNA přesahy, které při správném navržení slouží jako zip pro následnou ligaci pomocí DNA ligázy. Dnes se nejčastěji používá T4 DNA ligáze ve spojení s PCR. (Engler, Kandzia, & Marillonnet, 2008) Golden gate je velice univerzální a dá se použít téměř pro jakékoliv systémy a vektory. Dá se použít pro jednoduché klonování, při kterém jde o spojení jen dvou částí genomu (viz. obr. 8), ale i pro skládání většího počtu fragmentů v jedné ligační reakci. Tato metoda by mohla být velmi užitečná při vytváření složitějších virových vektorů. (Luo, Lin, Bolund, & Sørensen, 2014)



Obr. 8: Vložení insertu do cílového vektoru pomocí Golden Gate. (Emami, Yee, & Dinneny, 2015)

- (A) Rozpoznávací sekvence pro danou IIS endonukleázu
- (B) Příklad Golden gate kompatibilního cílového vektoru
- (C) Příklad vektoru obsahující gen, který bude pomocí IIS endonukleázy vyštěpen
- (D) Finální vektor zkompletovaný pomocí T4 DNA ligázy.

Závěr

I když se toho o virech, jejich struktuře, vývoji a systému už ví mnoho, neustále se objevují nové informace, se kterými se musí pracovat a které se musí zohledňovat při tvorbě virové taxonomie. Tyto informace jsou důležité nejen pro taxonomii, ale mohou nám i pomoci při vytváření nových expresních systémů a virových vektorů.

Virové vektory 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.

Citovaná literatura

- Allard, H. (1914). The Mosaic Disease of. *Bull. No. 40*.
- Ball, L. (2005). *The Universal Taxonomy of Viruses*.
- Bawden, F., Pirie, N., & Fankuchen, I. (1936). Liquid crystalline substances from virus-infected plants. *Nature*.
- Cañizares, M., Liu, L., Tsakiris, E., Perrin, Y., & Lomonosoff, G. (2006). A bipartite system for the constitutive and inducible expression of high levels of foreign proteins in plants. *Plant Biotechnol J*.
- 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 mosaic virus particle. *Advances in Protein Chemistry*.
- Dawson, W., Lewandowski, D., Hilf, M., Bubrick, P., Raffo, A., Shaw, J., . . . Desjardins, P. (1989). A tobacco mosaic virus-hybrid expresses and loses an added gene. *Virology*.
- Dědič, P. (2014). *Hlavní virové choroby bramboru v ČR*. Havlíčkův Brod: Výzkumný ústav.
- Donson, J., Kearney, C. M., Hilf, M. E., & Dawson, W. O. (1991). Systemic expression of a bacterial gene by a tobacco mosaic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.
- Emami, S., Yee, M.-c., & Dinneny, J. R. (2015). A robust family of Golden Gate Agrobacterium vectors for plant synthetic biology. *Frontiers in plant science*.
- Engler, C., Kandzia, R., & Marillonnet, S. (2008). A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability. *PLoS ONE 3*.
- Fischer, R., & Emans, N. (2000). Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Res*.
- Fraenkel-Conrat, H. (1956). The role of the nucleic acid in the reconstitution of active tobacco mosaic virus. *J. Am. Chem. Soc*.
- Garabagi, F., McLean, M. D., & Hall, J. C. (2012). Transient and Stable Expression of Antibodies in Nicotiana Species. *Methods in Molecular Biology*.
- Garcia, J. A., Glasa, M., Cambra, M., & Candresse. (2014). *T. Plum pox virus and sharka: a model*. Mol Plant Pathol.

- Gecchele, E., Merlin, M., Brozzetti, A., Falorni, A., Pezzotti, M., & Avesani, L. (2015). A comparative analysis of recombinant protein expression in different biofactories: bacteria, insect cells and plant systems.
- Giddings, G., Allison, G., Brooks, D., & Carter, A. (2000). Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nat Biotechnol*.
- Giritch, A., Marillonnet, S., Engler, C., van Eldik, G., Botterman, J., & Klimyuk, V. (2006). Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
- Gleba, Y., Klimyuk, V., & Marillonnet, S. (2007). Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Current Opinion in Biotechnology*.
- Gleba, Y., Marillonnet, S., & Klimyuk, V. (2004). Engineering viral expression vectors for plants: the 'full virus' and the 'deconstructed virus' strategies. *Curr Opin Plant Biol*.
- Goelet, P., Lomonossoff, G., Butler, P., Akam, M., Gait, M., & Karn, J. (1982). *Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.
- Gohlke, J., & Deeken, R. (2014). Plant responses to *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall development. *Front Plant Sci.*
- Harvey, L., Arnold, B., S Lawrence, Z., Paul, M., David, B., & James, D. (2000). *Molecular Cell Biology, 4th edition*. New York.
- Hull, R. (2009). *Comperative plant virology*. Norwich, UK: Department of Disease and Stress Biology.
- Chen, Q., & Davis, K. (2016). The potential of plants as a system for the development and production of human biologics.
- Christie, P. (2007). *Agrobacterium and plant cell transformation*. *Schaechter M, editor. Desk Encyclopedia of Microbiology*.
- Kausche, G., Pfankuch, E., & Ruska, H. (1939). Die Sichtbarmachung von pflanzlichem Virus im Übermikroskop. *Naturwissenschaften*.
- Kikkert, J., Vidal, J., & Reisch, B. (2005). Stable transformation of plant cells by particle bombardment/biolistics. *Methods Mol Biol*.
- Kúdelka, V. (1989). *Obecná fytopatologie*. Praha: Academia.
- Lee, L.-Y., & Gelvin, S. (2008). T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiology*.
- Lindbo, J. (2007). TRBO: A High-Efficiency Tobacco Mosaic Virus RNA-Based Overexpression Vector. *Plant Physiology*.
- Lucas, W. (2010). Viral Capsids and Envelopes: Structure and Function.
- Luo, Y., Lin, L., Bolund, L., & Sørensen, C. B. (2014). Efficient construction of rAAV-based gene targeting vectors by Golden Gate cloning. *BioTechniques*.
- Lustig, A., & Levine, A. J. (1992). One hundred years of virology. *Journal of Virology*.

- Ma, J., Drake, P., & Christou, P. (2003). The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants.
- Mahy, B., & van Regenmortel, M. (2008). *Encyclopedia of Virology*.
- Murphy, F., Faquet, C., Bishop, D., Ghabrial, S., Jarvis, A., Martelli, G., . . . Summers, M. (1993). *Virus Taxonomy*. Wien.
- Padgett, K., & Sorge, J. (1996). Creating seamless junctions independent of restriction sites in PCR cloning. *Gene*.
- Rigano, M., & Walmsley, A. M. (2005). Expression systems and developments in plant-made vaccines. *Immunology and Cell Biology*.
- Rosypal, S. (2002). *Úvod do molekulární biologie 4*. Brno: Grafex.
- Sainsbury, F., & Lomonosoff, G. (2008). Extremely high-level and rapid transient protein production in plants without the use of viral replication. *Plant Physiol*.
- Sainsbury, F., & Lomonosoff, G. (2014). Transient expressions of synthetic biology in plants. *Current Opinion in Plant Biology*.
- Sainsbury, F., Cañizares, M., & Lomonosoff, G. (2010). Cowpea mosaic virus: the plant virus-based biotechnology workhorse. *Annu Rev Phytopathol*.
- Sainsbury, F., Thuenemann, E., & Lomonosoff, G. (2009). pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnology Journal*.
- Sala, F., Rigano, M., Barbante, A., Basso, B., Walmsley, A., & Castiglione, S. (2003). Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies. *Vaccine 21*.
- Scotti, N., Rigano, M., & Cardi, T. (2012). Production of foreign proteins using plastid transformation. *Biotechnol Adv*.
- Scholthof, H., Scholthof, K., & Jackson, A. (1996). Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants. *Annu Rev Phytopathol*.
- Scholthof, K.-B. (2004). *TOBACCO MOSAIC VIRUS: A Model System*. Texas: Department of Plant Pathology and Microbiology, Texas A&M University.
- Wellink, J., & Van Kammen, A. (1989). Cell-to-cell Transport of Cowpea Mosaic Virus Requires Both the 58K/48K Proteins and the Capsid Proteins. *J. Gen. Virol*.
- Yao, J., Weng, Y., Dickey, A., & Wang, K. Y. (2015). Plants as Factories for Human Pharmaceuticals. *International journal of molekular science*.
- Yusibov, V., Rabindran, S., Commandeur, U., Twyman, R., & Fischer, R. (2006). The potential of plant virus vectors for vaccine production. *Drugs R D*.

