



# Funkcje białek HC-Pro kodowanych przez wirusy roślinne z rodziny Potyviridae

Jerzy Syller

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Oddział Młochów

## Functions of the HC-Pro proteins encoded by plant viruses from the family Potyviridae

### Summary

The helper component-proteinase (HC-Pro) encoded by plant viruses representing the genus *Potyvirus* (family Potyviridae) is involved in several important viral life processes, including aphid transmission, systemic movement and suppression of post-transcriptional gene silencing. Some of the viruses belonging to the genera *Ipomovirus*, *Rymovirus* and *Tritimovirus* in the family Potyviridae have been demonstrated to produce HC-Pro homologues that are likely to be engaged in vector transmission of these viruses alone. In this paper, the current knowledge of the structure, main functions and molecular mechanisms of the HC-Pro proteins encoded by viruses from the family Potyviridae is presented.

### Key words:

potyviruses, helper component-proteinase, structure, functions, mechanisms.

### Adres do korespondencji

Jerzy Syller,  
Instytut Hodowli  
i Aklimatyzacji Roślin,  
Oddział Młochów,  
ul. Platanowa 19,  
05-831 Młochów;  
e-mail:  
j.syller@ihar.edu.pl

## 1. Wstęp

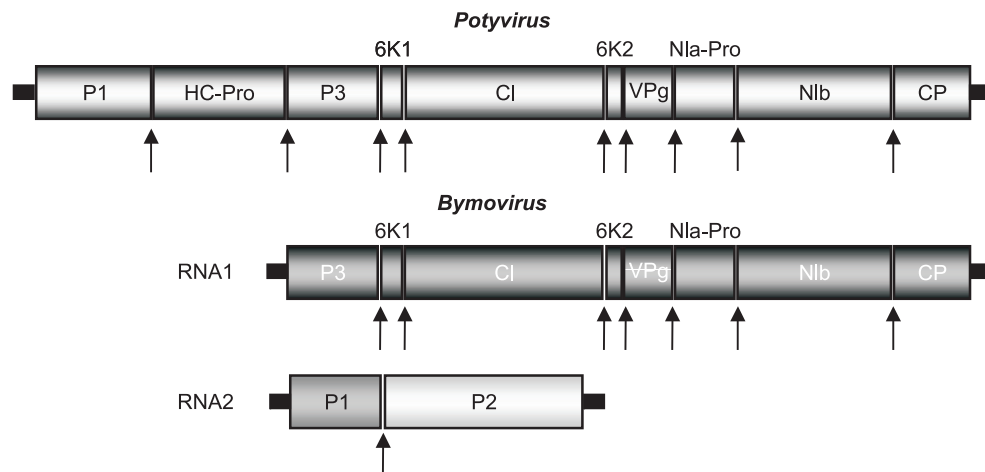
Informacja zawarta w genomie wirusów jest niewielka na tle potrzeb związanych z realizacją cyklu życiowego tych patogenów. Wirusy roślinne mają zwykle nie więcej niż 10 genów odpowiedzialnych za transkrypcję, replikację i transport cząstek wirusowych w roślinie. W procesie infekcji muszą one zatem modyfikować niektóre właściwości komórek rośliny-gospodarza. W tym celu niezbędne jest skorelowanie funkcji białek wirusa z funkcjami białek rośliny (1,2). Z kolei rozprzestrzenianie się

wirusa, warunkujące jego przetrwanie w naturze, wymaga dodatkowo powinowactwa białek wirusa do specyficznych receptorów komórkowych rozlokowanych głównie w przewodzie pokarmowym owada-wektora (3). Realizacja tak różnorodnych zadań przy niewielkiej puli genowej jest możliwa dzięki wielofunkcyjności białek wirusowych. Wielofunkcyjność charakteryzuje zarówno białko kapsydu (CP) (4) jak i niektóre białka niestrukturalne.

Wśród niestrukturalnych białek wirusów roślinnych niezwykłą wszechstronnością wyróżnia się HC-Pro (ang. *helper component-proteinase*), kodowane przez wirusy z rodzaju *Potyvirus*. Wirusy te przenoszone są przez mszyce w sposób niekrążeniowy, nietrwały, a typowym przedstawicielem rodzaju jest wirus Y ziemniaka (PVY, ang. *Potato potyvirus Y*). Rodzaj *Potyvirus* jest największą grupą taksonomiczną w obrębie rodziny Potyviridae. Jest on zarazem jednym z najliczniej reprezentowanych rodzajów wirusów roślinnych zawierających genom RNA. Genomem jest jednoniciowy (+) RNA, wielkości około 10 kb, który wraz z białkiem kapsydu tworzy wirion o długości 650-900 nm i średnicy 11-15 nm. Genom koduje polipeptyd prekursorowy, który jest następnie rozcinany przez trzy proteazy wirusowe (P1, HC-Pro i NIa-Pro) na 10 białek: P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa-Pro, NIb i CP, niezbędnych w cyklu życiowym wirusa (5,6) (rys. 1). Oprócz rodzaju *Potyvirus*, do rodziny Potyviridae zalicza się aktualnie jeszcze pięć rodzajów wirusów: *Macluravirus* (wektor – mszyce, ale od wirusów z rodzaju *Potyvirus* różnią się długością wirionu i niektórymi właściwościami molekularnymi), *Ipomovirus* (wektor – mączlik szklarniowy), *Rymovirus* i *Tritimovirus* (wektor – roztocze), oraz *Bymovirus* (wektor – plazmodioforowce pasożytujące na korzeniach roślin). W odróżnieniu od innych przedstawicieli Potyviridae, wirusy z rodzaju *Bymovirus* mają dwudzielny genom (RNA1 i RNA2) (7) (rys. 1). Jednym z dwóch produktów RNA2 jest białko P1, zawierające domenę proteiny podobną do odpowiedniej domeny białka HC-Pro wirusów z rodzaju *Potyvirus*.

Produkty genu HC-Pro wirusów z rodzajów *Rymovirus* i *Tritimovirus*, a także wirusa łagodnej plamistości batatu (SPMMV, ang. *Sweet potato mild mottle virus*), typowego przedstawiciela rodzaju *Ipomovirus*, są uważane za homologii białek HC-Pro indukowanych przez wirusy z rodzaju *Potyvirus*. Dotychczasowa wiedza na temat ich mechanizmów i funkcji jest jednak niewielka. Sekwencji kodującej HC-Pro nie zawiera natomiast, co jest dość zaskakujące, genom wirusa żółknięcia nerwów ogórka (CVYV, ang. *Cucumber vein yellowing virus*), zaklasyfikowanego do rodzaju *Ipomovirus* dzięki bliskiemu pokrewieństwu z SPMMV (8). Nie ma jej również dwudzielny genom wirusów z rodzaju *Bymovirus*. Dotychczas nie wiadomo czy genom wirusów z rodzaju *Macluravirus* zawiera gen HC-Pro, bowiem pełna sekwencja nukleotydów nie została jeszcze poznana.

Białko HC-Pro zostało pierwotnie zidentyfikowane jako czynnik niezbędny w procesie przenoszenia wirusów z rodzaju *Potyvirus* przez mszyce (9). Koncepcja zakładająca udział HC-Pro w przytwierdzaniu wirionów wirusa z rodzaju *Potyvirus* do tkanki przedniego odcinka układu pokarmowego mszycy została ponad 20 lat



Rys. 1. Organizacja genomu wirusów z rodzajów *Potyvirus* i *Bymovirus*. Genom koduje polipeptydy prekursorowy, który jest następnie rozcinany przez proteazy wirusowe na 10 białek, w tym HC-Pro (*Potyvirus*), lub 8 białek (*Bymovirus*, RNA1). Miejsca cięć są oznaczone strzałkami. Produktem RNA2 wirusów z rodzaju *Bymovirus* są dwa białka. Białko P1 zawiera domenę proteinyazy, podobną do odpowiedniej domeny HC-Pro wirusów z rodzaju *Potyvirus*.

później sformułowana jako tzw. hipoteza mostkowa (ang. *bridge hypothesis*) (10). W dalszych pracach określono (jakkolwiek jeszcze nie w pełni) molekularne podłoże funkcjonowania HC-Pro jako mediatora współdziałania wirusa z wektorem.

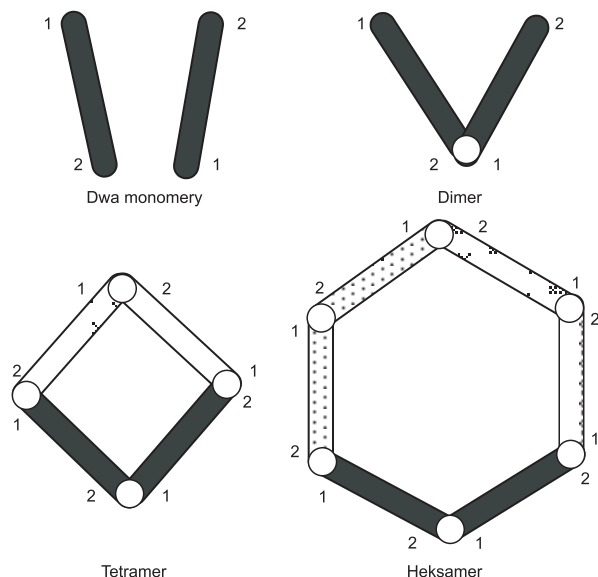
Wielofunkcyjny charakter białka HC-Pro rozpoznano w latach 90. ubiegłego stulecia. Okazało się, że oprócz zasadniczej roli w przenoszeniu wirusa przez mszyce, HC-Pro jest istotnym czynnikiem kontrolującym tak ważne etapy cyklu życiowego patogena, jak replikacja oraz transport międzykomórkowy i długodystansowy (11,12). Posiada ono również zdolność modyfikowania nasilenia objawów wywołanych infekcją wirusową. Ponadto, niezwykle ważnym zadaniem HC-Pro jest zakłócanie funkcjonowania mechanizmów obronnych rośliny poprzez tłumienie potranskrypcyjnego wyciszania genów (PTGS, ang. *posttranscriptional gene silencing*) (13-15). Istotny postęp w rozpoznawaniu roli HC-Pro w przemieszczaniu wirusa w roślinie i supresji PTGS został osiągnięty dopiero w ostatnich 3-4 latach.

Białko HC-Pro kontroluje praktycznie wszystkie najważniejsze etapy cyklu życiowego wirusów reprezentujących rodzaj *Potyvirus*. Jest ono zatem atrakcyjnym modelem do zaprezentowania różnych form wzajemnego oddziaływania wirusa, rośliny i wektora. Z kolei możliwość prowadzenia badań na poziomie molekularnym otwiera nowe perspektywy dla rozwoju strategii biotechnologicznych służących ograniczeniu skutków chorób wywołanych przez choroby wirusowe.

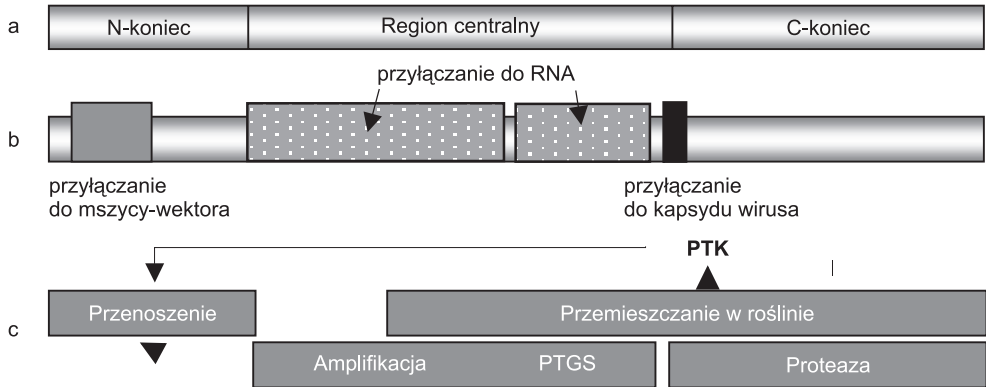
## 2. Struktura białka HC-Pro

Przy użyciu metod ukierunkowanej mutagenyzy skonstruowano różne warianty genu kodującego białko HC-Pro wirusów z rodziny Potyviridae. Na podstawie analizy mutacyjnej umożliwiono już w połowie lat 90. minionego stulecia rozpoznanie trzech regionów białka odpowiedzialnych za różne jego funkcje. Zadania regionu N-końcowego wiążą się z przenoszeniem wirusów przez wektory, wirulencją, amplifikacją genomu i akumulacją wirusa (16-18). Region centralny kontroluje transport długodystansowy wirusa oraz podtrzymywanie replikacji (19,20). Z kolei region C-końcowy, wykazujący właściwości proteiny cysteiny (21), ma udział w międzykomórkowym transporcie wirusa (22).

Na podstawie otrzymanych wyników w pierwszych badaniach nad strukturą białek HC-Pro PVY i wirusa pszczołki nerwów tytoniu (TVMV, Tobacco vein mottling virus) (23), a później wirusa mozaiki rzepy (TuMV, Turnip mosaic virus) (24) wykazano, że są one oligomerami (rys. 2) i przypuszczalnie występują w formie dimerów lub nawet trimerów, o ciężarze cząsteczkowym 100-150 kDa. Dla potwierdzenia struktury oligomerycznej HC-Pro niezbędne byłoby wykazanie, że cząsteczki mogą reagować same z sobą (self-interaction). Zastosowanie drożdżowego systemu dwuhybrydowego do zmapowania domen zaangażowanych w tę interakcję nie dostarczyło jednak spodziewanych dowodów. W zależności bowiem od warunków



Rys. 2. Model strukturalny białka HC-Pro kodowanego przez wirusy z rodziny Potyviridae. Monomer białka ma wydłużony kształt i zawiera dwie domeny (1 i 2), usytuowane na końcach molekule. W wyniku interakcji między domenami 1 i 2 dwóch monomerów ustawionych w odwrotnym położeniu powstaje dimer. Dimery mogą łączyć się, tworząc tetramery i heksamery.



Rys. 3. Model HC-Pro, łączący strukturę białka z jego wielofunkcyjnością. (a) HC-Pro składa się z trzech zasadniczych regionów, odpowiedzialnych za różne funkcje białka. (b) Rozmieszczenie sekwencji aminokwasów kontrolujących przyłączenie HC-Pro do tkanki wektora, RNA i kapsydu wirusa. (c) Najważniejsze biologiczne funkcje różnych regionów białka. Przenoszenie wirusa przez mszyce jest kontrolowane głównie przez N-końcowy motyw KITC, ale strzałka wskazuje, że proces ten jest wspomagany przez motyw PTK.

doświadczalnych, na podstawie wyników analiz wskazywano na udział w reakcji tylko regionu N-końcowego HC-Pro (25) lub udział zarówno regionu N- jak i C-końcowego (26). Potwierdzenie, że rozpuszczalną formą HC-Pro jest rzeczywiście dimer (rys. 2), uzyskano dopiero niedawno w badaniach nad białkiem wirusa mozaiki sałaty (LMV, ang. *Lettuce mosaic potyvirus*) z zastosowaniem wiązań krzyżowych (ang. *cross linking*), w których porównano dziki typ HC-Pro zawierający sekwencję His Tag (*hisHC-Pro*) z formą zmutowaną białka z wprowadzoną delecją w regionie N-końcowym (*hisΔHC-Pro*) (27). Analizując wyniki tych badań wskazywano ponadto na możliwość występowania HC-Pro w postaci tetramerów (dimer x dimer). Stwierdzono, że reakcja dimerów ze sobą odbywa się pod kontrolą centralnego oraz C-końcowego regionu białka. Zastosowanie dwuwymiarowej (2D, ang. *two-dimensional*) projekcji kryształów białek rekombinowanych uzyskanych na jednowarstwowych podłożach lipidowych umożliwiło zaprojektowanie modelu HC-Pro LMV, łączącego strukturę białka z jego wielofunkcyjnością (27) (rys. 3). Hipotetyczne HC-Pro ma kształt wydłużony i zawiera dwie strukturalne domeny, oznaczone jako 1 i 2. Z mapy *hisHC-Pro* wynika, że białko uzyskuje formę tetrameru w związku z wzajemnym oddziaływaniem domen 1. W domenie tej usytuowany jest N-koniec, który odgrywa podstawową rolę w przenoszeniu wirusa przez mszyce. W obrębie C-końca domeny 1 znajduje się swoisty region, którego przypuszczalną funkcją jest sprzężenie domen 1 i 2. Jest on prawdopodobnie oddzielną domeną, kontrolującą amplifikację genomu, przemieszczanie wirusa, przyłączenie HC-Pro do białka kapsydu oraz wyciszenie RNA (27).

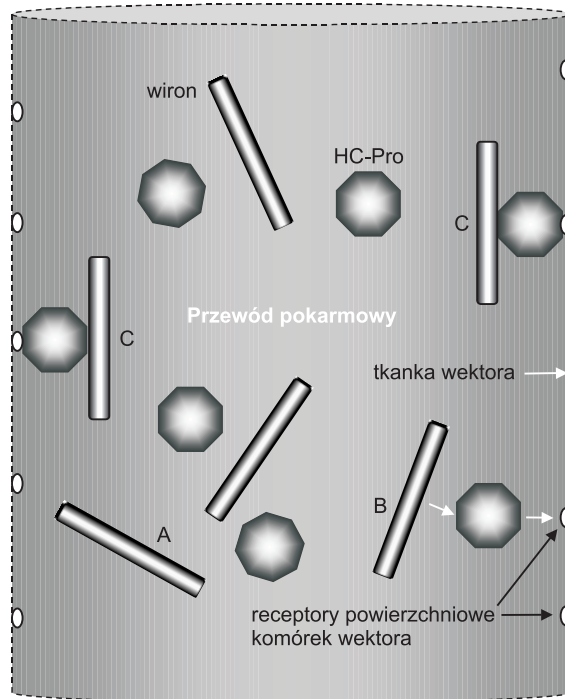
Ostatnio, użyteczną metodą umożliwiającą poznanie budowy HC-Pro okazał się pomiar szybkości sedymentacji. W przeprowadzonej analizie wykazano, że ponad

50% HC-Pro wirusa wżerkowej plamistości tytoniu (TEV, ang. *Tobacco etch virus*) miało formę dimeru, ponad 20% – tetrameru, a resztę stanowiły heksamery, a nawet oktamery (28). Ponieważ podobny stopień oligomeryzacji stwierdzono dla *hisHC-Pro LMV*, tworzenie oligomerów można – zdaniem autorów – uznać za właściwość cechującą białka HC-Pro większości wirusów z rodzaju *Potyvirus* (28). Dokładniejsze scharakteryzowanie HC-Pro TEV było możliwe dzięki zastosowaniu mikroskopu elektronowego przystosowanego do oglądania pojedynczych cząsteczek, w powiązaniu z trójwymiarową (3D, ang. *three-dimentional*) rekonstrukcją kryształu (28). Okazało się, że wydłużony monomer zdolny do formowania dimerycznej struktury *hisHC-Pro TEV* bardzo przypomina kształtem element strukturalny *hisHC-Pro LMV*, scharakteryzowany wcześniej na podstawie projekcji 2D (27). Opisane zatem koncepcje struktury HC-Pro wzajemnie się potwierdzają i uzupełniają. Różnią się jednak dość istotnie w kwestii współdziałania domen. W modelu zaproponowanym na podstawie projekcji 2D (27) białko uzyskuje strukturę tetrameru w efekcie współdziałania domen 1, co oznacza, że domeny 2 też są ze sobą w bliskim kontakcie. Natomiast w koncepcji struktury HC-Pro bazującej na projekcji 3D (28) przyjęto założenie, że monomery w parach ustawione są w odwrotnym położeniu (rys. 2), czyli że współdziałają ze sobą różne domeny (1 i 2). Na razie przyczyny tej rozbieżności nie są znane, ale można się spodziewać, że w niedługim czasie będą one wyjaśnione, a hipoteza na temat struktury HC-Pro zostanie poddana weryfikacji.

Forma oligomeru może okazać się wspólną właściwością wszystkich białek HC-Pro kodowanych przez wirusy z rodziny Potyviridae. Stwierdzono bowiem, przy zastosowaniu m.in. drożdżowego systemu dwuhybrydowego, że cząsteczki HC-Pro wirusa smugowatej mozaiki pszenicy (WSMV, ang. *Wheat streak mosaic virus*), typowego przedstawiciela rodzaju *Tritimovirus*, reagują same z sobą (29), a przecież efektem tego typu reakcji jest tworzenie się dimerów lub nawet oligomerów.

### 3. Funkcje białka HC-Pro w przenoszeniu wirusów przez wektory

Przyłączanie się cząstek wirusa z rodzaju *Potyvirus* do przedniego odcinka przewodu pokarmowego mszycy-wektora za pośrednictwem biologicznie aktywnego białka HC-Pro (rys. 4) jest procesem odwracalnym. W sposób naturalny mszyca pobiera HC-Pro i cząstki wirusa równocześnie, wraz z sokiem zakażonej rośliny. W badaniach z zastosowaniem sztucznych pożywek wykazano jednak, że podanie mszycom najpierw preparatu oczyszczonego HC-Pro, a później preparatu oczyszczonego wirusa również zapewnia efektywne jego przenoszenie (10). W konsekwencji oznacza to, że białko HC-Pro pobrane przez mszycę z komórki zakażonej rośliny jest zdolne wspomagać przenoszenie nie tylko wirionów znajdujących się w tej komórce, lecz także w komórkach innej porażonej rośliny, na którą przemieści się owad. Zjawisko to określane jest mianem transkomplementacji HC (30). Białka HC-Pro kodowane przez określone wirusy mogą w ten sposób pośredniczyć w przenoszeniu



Rys. 4. Model ukazujący funkcje HC-Pro w przenoszeniu wirusów z rodzaju *Potyvirus* przez mszyce. Białko pełni rolę 'mostka', pośrednicząc w przyłączaniu wirusa do przedniego odcinka przewodu pokarmowego wektora. Przyłączenie wirusa jest procesem odwracalnym. (A) Wiriony i molekuly HC-Pro pobierane są przez owada wraz z sokiem porażonej rośliny. (B) Proces przyłączania HC-Pro do receptora na powierzchni tkanki wektora, a następnie (bądź równocześnie) – wirionu do HC-Pro. (C) Kompleks wirion-HC-Pro przytwierdzony do tkanki wektora.

nie tylko izolatów z defektywnym HC-Pro, lecz także niespokrewnionych wirusów. Najlepiej zbadanym przykładem jest przenoszenie wirusa mozaiki aukuba ziemniaka (PAMV, ang. *Potato aucuba mosaic virus*) z rodzaju *Potexvirus* (3,31). Na uwagę zasługują specyficzne zależności między wirusem, HC-Pro i wektorem. Stwierdzono na przykład, że *Lipaphis erysimi* nie przenosiła TEV z porażonych roślin, ale wirus pobrany przez mszyce wraz z HC-Pro TuMV był następnie efektywnie przenoszony (32). W tych samych badaniach, HC-Pro kodowane przez PVY nie wspomagało przenoszenia TEV przez *L. erysimi*, ale umożliwiało przenoszenie tego wirusa przez *M. persicae*. W późniejszych pracach wykazano, że *L. erysimi* i *Brevicoryne brassicae* efektywnie przenosiły TuMV w obecności homologicznego HC-Pro, natomiast nie przenosiły wirusa żółtej mozaiki cukinii (ZYMV, ang. *Zucchini yellow mosaic virus*) pomimo obecności homologicznego HC-Pro (33). Ponadto, mszyce nie były zdolne do przenoszenia TuMV ani ZYMV w obecności heterologicznego białka HC-Pro. Dla porównania, mszyce *M. persicae* i *Aphis gossypii* efektywnie przenosiły TuMV wspoma-

gany przez HC-Pro ZYMV, natomiast – podobnie jak *L. erysimi* i *B. brassicae* – nie były zdolne do przenoszenia ZYMV w obecności HC-Pro TuMV (33).

Białko HC-Pro pełniące rolę ‘mostka’ (rys. 4) musi posiadać specyficzne motywy umożliwiające przyłączanie zarówno do tkanki owada jak i do wirionu. Porównanie sekwencji genów kodujących HC-Pro u przenoszonych i nie przenoszonych przez mszyce szczepów wirusa wykazało obecność mutacji w N-końcowym regionie kodującym konserwatywny motyw KITC (lizyna-izoleucyna-treonina-cysteina) (rys. 3) u wirusa C ziemniaka (PVC, ang. *Potato virus C*), który jest naturalnym szczepem PVY (34), oraz w C-końcowym regionie kodującym konserwatywny motyw PTK (prolina-treonina-lizyna) (rys. 3) u ZYMV (35). Dla wyjaśnienia funkcji, jakie motywy te pełnią w biologicznie aktywnym HC-Pro, wprowadzono punktowe mutacje w regionach kodujących motywy KITC i PTK, a następnie badano zdolność przenoszenia chimerycznych wirusów przez mszyce. Zastąpienie lizyny (K) kwasem glutaminowym (E) lub innymi aminokwasami w motywie KITC powodowało utratę zdolności przenoszenia TVMV (17). Warto zauważyć, że występujące w naturze, ale niezdolne do przenoszenia przez mszyce mutanty PVY (34,36) czy ZYMV (35), charakteryzują się właśnie mutacją K→E w motywie KITC. Kodowane przez PVC białko HC-Pro z punktową mutacją K→E ma zdolność przyłączania się do białka kapsydu, nie wykazuje natomiast zdolności adsorpcji do sztyletów wektora, nie może zatem pełnić roli ‘mostka’ między wirionem a tkanką owada (37). Wynika stąd, że funkcją, lub raczej jedną z funkcji, motywu N-końcowego jest zwiększanie powinowactwa HC-Pro do specyficznych receptorów znajdujących się w tkance wektora. Brak zdolności przenoszenia PVY przez mszyce może być również efektem zamiany glicyny (G) na kwas asparaginowy (D) lub G na E w rejonie otaczającym motyw KITC (36). Mutacje te prawdopodobnie uniemożliwiają adsorpcję HC-Pro do tkanki wektora, prowadzą zatem do takich samych konsekwencji jak mutacja K→E w samym motywie KITC.

W obrębie motywu PTK funkcje HC-Pro w przenoszeniu wirusa przez mszyce determinowane są przez inne sekwencje aminokwasów, niż w motywie KITC. Stwierdzono, że mutacja K→E nie miała wpływu na przenoszenie ZYMV, natomiast zastąpienie proliny (P) alaniną (A) albo treoniny (T) waliną (V) powodowało utratę lub przynajmniej znaczne ograniczenie zdolności przenoszenia wirusa (38). Kolejnym krokiem było zbadanie wpływu tych mutacji na zdolność przyłączania się HC-Pro do CP ZYMV. W porównawczych badaniach *in vitro* nad szczepem z mutacją K→E i szczepem z mutacją T→V wykazano, że białka HC-Pro mutantów zachowały zdolność współdziałania z białkiem kapsydu (38). Wyniki te wskazują na zasadniczą rolę motywu PTK w interakcji między HC-Pro a wirionami.

Skoro białko kapsydu aktywnie współdziała z HC-Pro w procesie przenoszenia wirusów z rodzaju *Potyvirus* przez mszyce, musi i ono posiadać domeny, które mają zdolność oddziaływania z domenami HC-Pro. Metodą mutacji punktowych wykazano, że oddziaływania te są z reguły kontrolowane przez konserwatywną sekwencję aminokwasową Asp-Ala-Gly (DAG) N-końca białka kapsydu (39,40). Przykładem odstępstwa od reguły jest wirus pstrzości orzeszka ziemnego (PeMoV, ang. *Peanut mot-*



*tle potyvirus*), który zamiast trypletu DAG posiada sekwencję Asp-Ala-Ala-Ala (DAAA) (41). Z uwagi na fakt, że w przenoszeniu PeMoV przez mszyce nietypowa sekwencja DAAA wypełnia swoje zadanie równie efektywnie jak tryplet DAG u większości gatunków z rodzaju *Potyvirus*, interesujące było zbadanie, czy DAAA może pod względem funkcjonalnym zastąpić DAG w białku kapsydu innego wirusa z tego samego rodzaju. W wyniku mutacji DAG→DAAA wirus pasiastości orzeszka ziemnego (PStV, ang. *Peanut stripe virus*; syn. wirus zwykłej mozaiki fasoli, BCMV, ang. *Bean common mosaic virus*) utracił zdolność przenoszenia przez mszyce, ale zachował właściwości infekcyjne (41). Mutant PStV-DAAA częściowo odzyskał zdolność przenoszenia przez mszyce po podaniu go owadom w postaci oczyszczonego preparatu z dodatkiem HC-Pro PeMoV. Ponadto, był on przenoszony (jakkolwiek mało efektywnie) przez mszyce, którym uprzednio podano HC-Pro oczyszczone z PStV lub TVMV (41). W wyniku tych odkryć wskazywano, że podstawą efektywnego przenoszenia wirusa przez mszyce jest współdziałanie białka HC-Pro z białkiem kapsydu w zakażonych wirusem roślinach. Istotnie, na podstawie wyników późniejszych prac z LMV, PVY i wirusem ospowatości śliwy (Sharka) (PPV, ang. *Plum pox virus*) potwierdzono występowanie ścisłej interakcji *in planta* między tymi białkami (42). Co więcej, wyniki te pozwalały przypuszczać, że współdziałanie HC-Pro i białka kapsydu, warunkujące przenoszenie wirusa przez wektory, jest niezbędne również dla zapewnienia międzykomórkowego i długodystansowego transportu wirusa w roślinie. Stwierdzono bowiem, między innymi, współdziałanie tych białek w roślinach porażonych szczepem PPV, który nie jest przenoszony przez mszyce z powodu naturalnej delekcji 15 aminokwasów, w tym trypletu DAG (42).

W obrębie rodzaju *Potyvirus* istnieją pewne formy specjalizacji w relacjach między HC-Pro a białkiem kapsydu wirusa. Wykazano, że HC-Pro ZYMV umożliwiło przenoszenie przez mszyce nie tylko ZYMV, lecz także TuMV, natomiast HC-Pro TuMV wspomagało przenoszenie samego TuMV, ale nie było zdolne zapewnić przenoszenia ZYMV (33). Brak współdziałania między HC-Pro TuMV a CP ZYMV nie był spowodowany brakiem lub defektem motywu PTK HC-Pro lub motywu DAG białka kapsydu, gdyż oba motywy były obecne w funkcjonalnej formie. Problem udało się wyjaśnić poprzez zastąpienie fragmentu kodującego N-koniec CP ZYMV kompletnym N-koncem CP TuMV. W efekcie tego zabiegu chimeryczny ZYMV wspomagany przez HC-Pro TuMV nabył zdolności przenoszenia przez mszyce, i chociaż przenoszenie było niezbyt efektywne, stanowiło dowód, że N-koniec białka kapsydu odgrywa podstawową rolę w rozpoznawaniu niehomologicznego HC-Pro (33).

Białko HC-Pro, jak się zdaje, pełni istotną rolę także w przenoszeniu wirusów związanych z wektorami innymi niż mszyce, na przykład wirusów z rodzaju *Tritimovirus*, przenoszonych w sposób niekrążeniowy półtrwały przez roztocze. Utratę zdolności przenoszenia WSMV przez szpeciela *Aceria tosichella* spowodowało zarówno zastąpienie jego własnego HC-Pro homologami HC-Pro pochodzącymi od blisko spokrewnionego wirusa nekrotycznej smugowatości owsa (ONMV, ang. *Oat necrotic mottle virus*; rodzaj *Tritimovirus*), TuMV (rodzaj *Potyvirus*) lub wirusa mozaiki perzu (AgMV,

ang. *Agropyron mosaic virus*; rodzaj *Rymovirus*) (43), jak i delecja 24 nukleotydów (44). Ponieważ nie stwierdzono współdziałania HC-Pro WSMV z białkiem kapsydu wirusa (29), należy przypuszczać, że HC-Pro nie jest zdolne do bezpośredniego przyłączenia się do wirionu. Stenger i in. (43) sugerują, że proces tworzenia „mostka” między tkanką wektora a wirionem wymaga zaangażowania dodatkowego białka, podobnie jak w procesie przenoszenia przez mszyce w sposób półtrwały wirusów z rodzaju *Caulimovirus* (45).

#### 4. Funkcje białka HC-Pro w przemieszczaniu wirusów w roślinie

Wykazano z zastosowaniem systemu ekspresji białek w bakteriach *Escherichia coli* i metody mikroiniekcji, że HC-Pro i CP wirusa zwykłej nekrotycznej mozaiki fasoli (BCMNV, ang. *Bean common mosaic necrosis virus*) i LMV aktywnie przenikają z komórki do komórki przez plazmodesmy (22). Rolą białek jest prawdopodobnie modyfikowanie przepustowości plazmodesm (SEL, ang. *size exclusion limit*) dla umożliwienia międzykomórkowego transportu RNA wirusowego. W procesie tym podstawową rolę, jak się zdaje, odgrywa C-końcowy odcinek HC-Pro (22).

Z kolei w długodystansowy transport RNA wirusa z rodzaju *Potyvirus* zaangażowany jest centralny region HC-Pro (20). Wprowadzenie mutantu TEV z defektywnym białkiem HC-Pro (TEV-GUS/CCCE) do roślin nietransgenicznych oraz transgenicznych z ekspresją HC-Pro wykazało, że obecność HC-Pro zarówno w tkance inokulowanej jak i nie inokulowanej jest niezbędna dla korygowania defektów w transporcie wirusa w roślinie (20). Później okazało się, że HC-Pro hamuje procesy związane z reakcją obronną rośliny, której celem jest ograniczanie replikacji i transportu wirusa (46). Do tych funkcji HC-Pro powrócimy w dalszej części artykułu.

Zakres możliwości HC-Pro jako białka wspomagającego transport długodystansowy wirusa może być niekiedy silnie determinowany genotypem rośliny-gospodarza. Wśród gospodarzy PPV, wirusa atakującego śliwy, jest kilka gatunków z rodzaju *Nicotiana*, z których większość ulega systemicznemu porażeniu wirusem. Inaczej jest w przypadku roślin tytoniu (*N. tabacum*). Wirus wykazuje dużą zdolność replikacji w inokulowanych liściach, ale nie przemieszcza się do innych części rośliny. Defekt udało się skorygować po wprowadzeniu do roślin transgeny w postaci 5'-końcowego regionu genomu TEV, wirusa systemicznie porażającego tytoń (47). Natomiast w roślinach transformowanych tym samym transgenem, ale z mutacją w sekwencji kodującej HC-Pro, wirus nie wykazywał zdolności przemieszczania się do młodych, nie inokulowanych liści (47). Obserwacja ta stanowi potwierdzenie zasadniczej roli biologicznie aktywnego HC-Pro w przemieszczaniu się cząstek wirusów z rodzaju *Potyvirus* na większe odległości.

Dla wspomaganie zarówno długo- jak i krótkodystansowego transportu wirusa w roślinie HC-Pro ściśle współdziała z CP. Wykazano bowiem w badaniach nad różnymi biologicznie izolatami B11 i U wirusa A ziemniaka (PVA, ang. *Potato virus A*), że

mutacje w HC-Pro i CP miały przeciwstawny wpływ na akumulację wirusa w roślinach tytoniu (48). Zastąpienie czterech aminokwasów HC-Pro izolatu B11 aminokwasami HC-Pro izolatu U powodowało 2-4-krotny wzrost akumulacji wirusa, natomiast wymiana całego genu CP izolatu B11 na gen CP izolatu U prowadziła do 5-krotnego spadku ilości wirusa w roślinach. Równoczesna mutacja HC-Pro i wymiana CP izolatu B11 powodowały opóźnienie długodystansowego transportu wirusa w roślinach tytoniu i ograniczały międzykomórkowe przemieszczanie wirusa w roślinach ziemniaka (48). Efekty fenotypowe wywołane równoczesną mutacją dwóch genów różniły się zatem od spodziewanej sumy efektów, obserwowanych w następstwie mutacji w obrębie tylko HC-Pro lub tylko CP. Brak sumowania efektów fenotypowych wskazuje na silne skoordynowanie funkcji białek HC-Pro i CP (48).

Białka HC-Pro indukowane przez wirusy z rodzaju *Potyvirus* mogą również potęgować infekcję systemiczną oraz objawy chorobowe wywoływane przez wirusy odmiennie taksonomicznie, np. wirus X ziemniaka (PVX, ang. *Potato virus X*; rodzaj *Potexvirus*) (49,50), jakkolwiek efekt synergiczny może w istotny sposób zależeć od rośliny-gospodarza (51). Wyjaśnienia synergicznego współdziałania potywirusów z niespokrewnionymi wirusami należy przypuszczalnie szukać w zdolności HC-Pro do supresji PTGS (52).

W odróżnieniu od białek HC-Pro kodowanych przez wirusy z rodzaju *Potyvirus*, HC-Pro WSMV nie odgrywa istotnej roli ani w replikacji, ani w przemieszczaniu międzykomórkowym lub długodystansowym wirusa (53,54). Czym zatem tłumaczyć fakt, że w systemicznie porażonych liściach pszenicy akumulacja mutantu WSMV pozbawionego genu HC-Pro była kilkakrotnie niższa, niż akumulacja dzikiego typu WSMV (53)? Najwidoczniej, zdaniem autorów, HC-Pro WSMV pełni jakąś (jeszcze nie rozpoznaną) funkcję w utrzymaniu optymalnego poziomu akumulacji wirusa, być może jako supresor PTGS.

## 5. Funkcje białka HC-Pro w supresji potranskrypcyjnego wyciszania genu (PTGS)

PTGS jest naturalnym mechanizmem obronnym rośliny, który jest uruchamiany w odpowiedzi na infekcję wirusem i ma za zadanie degradację RNA wirusowego. Sygnał obronny wzbudzony w rejonie infekcji rozprzestrzeniany jest systemicznie i uruchamia proces wyciszania RNA wirusa w całej roślinie. Najsilniejszym induktorem wyciszania RNA są długie (powyżej 200 nt) cząsteczki dwuniciowego RNA (dsRNA) (55,56). Cząsteczki dsRNA są rozpoznawane przez enzym Dicer i rozcinane na fragmenty o długości 21-25 nt, określane jako siRNA (ang. *small interfering RNA*), które następnie są całkowicie degradowane przez kompleks wyciszający RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*). Procesowi degradacji RNA zwykle towarzyszy wzmożona metylacja.

Wyciszanie RNA jest indukowane nie tylko przez wirusy z genomem dsRNA, lecz także przez wirusy posiadające genom jednoniciowy (ssRNA), u których RNA dwuni-

ciowy powstaje jako produkt przejściowy podczas replikacji. Katalizatorem syntezy dsRNA jest kodowana w genomie wirusa RNA-zależna polimeraza RNA. Fragmentacja cząsteczek dsRNA przez enzym Dicer uniemożliwia replikację wirusa, a tym samym hamuje rozwój infekcji.

Wiele wirusów roślinnych posiada zdolność przeciwdziałania PTGS. Wirusy wykorzystują do tego celu własne białka, których zadaniem jest blokowanie bądź zakłócanie transmisji sygnału wyciszenia RNA. W przypadku wirusów z rodzaju *Potyvirus* jest to kolejna z wielu funkcji HC-Pro (13-15,57,58). W procesie supresji PTGS białko HC-Pro prawdopodobnie współdziała z innymi białkami wirusa. Wykazano, że proces jest kontrolowany przez 5'-proksymalny region genomowego RNA, kodujący nie tylko białko HC-Pro, lecz także białko P1 i niewielką część białka P3 (rys. 1). Region ten jest określany jako sekwencja P1/HC-Pro.

Opisane funkcje HC-Pro w krótko- i długodystansowym przemieszczaniu się cząstek wirusa są skorelowane ze zdolnością białka do supresji PTGS. Stwierdzono bowiem z zastosowaniem systemu przejściowej (ang. *transient*) supresji wyciszania, że mutanty HC-Pro mające takie same właściwości proteolityczne jak dziki typ HC-Pro, oraz wykazujące analogiczne zaangażowanie w replikację genomu i długodystansowe przemieszczanie się wirusa w roślinie, charakteryzowały się również zdolnością supresji PTGS (46). Natomiast mutanty, które utraciły aktywność związaną z przemieszczaniem wirusa i replikacją genomu okazały się również całkowicie lub częściowo niezdolne do supresji PTGS. Korelacja tych mechanizmów, jak się wydaje, jest niezależna od funkcji proteolitycznych HC-Pro, pozostały one bowiem nie zakłócone.

Podjęmowane były próby prześledzenia aktywności HC-Pro na różnych etapach transmisji sygnału wyciszania genów. Transgeny P1/HC-Pro wprowadzone do roślin porażonych TEV wykazały zdolność supresji wyciszania wzbudzanego przez gen reporterowy (transgen) GFP lub GUS (13,15). Białko HC-Pro powodowało zatem zablokowanie wyciszania RNA w tkankach, w których proces wyciszania był już zaawansowany. W późniejszych pracach wykazano, że białko HC-Pro TEV wprowadzone do roślin z przejściowo wyciszoną ekspresją transgenu GUS inaktywowało PTGS oraz blokowało akumulację siRNA (59,60). Metylacja transgenu była ograniczona częściowo (59) bądź nie stwierdzono hamującego wpływu HC-Pro na przebieg tego zjawiska (60). Sugeruje się, że supresja PTGS przez białko HC-Pro polega raczej na zakłócaniu rozchodzącego się już sygnału wyciszania RNA, a nie na inaktywowaniu zdolności rośliny do wzbudzenia sygnału w miejscu infekcji wirusem (59,60).

Wsparciem dla tej tezy są wyniki efektywnych badań, w których wyciszające działanie transgenu w postaci fragmentu genomu PPV w roślinach *N. benthamiana* zakażonych uprzednio tym wirusem uwidocznilo się w ozdrowieniu roślin (ang. *recovery*), pomimo dowiedzionej aktywności HC-Pro PPV jako supresora PTGS (61). Rośliny regenerowane z tkanki ozdrowiałych roślin nie wykazywały objawów porażenia PPV, można zatem uznać, że utrzymywał się w nich proces wyciszania RNA wirusowego przez transgen. Rośliny te okazały się jednak podatne na zakażenie TMV,

wykazującym ekspresję białka HC-Pro (61). Podobnie, jedna z linii *N. benthamiana* transformowanych fragmentem białka HC-Pro kodowanego przez *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), odporna na CABMV, uległa zakażeniu PVY, a objawy porażenia nie różniły się od objawów obserwowanych na roślinach nietransgenicznych (62). Mogło tutaj, zdaniem autorów, dojść do swoistego odciążenia (ang. *relief*) transgenu HC-Pro w jego funkcjach przez białko HC-Pro PVY. Z kolei, rośliny innej transgenicznej linii *N. benthamiana* z ekspresją HC-Pro reagowały na zakażenie CABMV silnymi objawami chorobowymi, na przemian z krótkimi fazami zdrowienia (62). Cykliczność faz remisji i nawrotów choroby świadczyła o swoistej 'batalii genów' rośliny i wirusa.

Rośliny *N. benthamiana* transformowane fragmentem genomu PPV okazały się podatne nie tylko na TVMV, lecz także na zakażenie wirusem mozaiki ogórka (CMV, ang. *Cucumber mosaic virus*; rodzaj *Cucumovirus*, rodzina Bromoviridae), z ekspresją białka 2b, również posiadającego zdolności supresyjne. Stłumienie wyciszającego działania transgenu przez białko 2b spowodowało przywrócenie podatności (względnie – utratę odporności) roślin na zakażenie PPV, natomiast supresja transgenu przez HC-Pro TVMV nie miała takich konsekwencji. To zaskakujące zjawisko można próbować tłumaczyć albo istnieniem mechanizmu ochrony krzyżowej (ang. *cross-protection*) wśród wirusów z rodzaju *Potyvirus*, albo wzbudzeniem w roślinie dwóch (lub więcej) mechanizmów wyciszania RNA PPV, o różnym stopniu podatności na działanie supresorów związanych z infekcją CMV i TVMV (61).

Sugeruje się, że w pełnieniu roli supresora PTGS, białko HC-Pro jest wspomagane przez białko P1 (proteazę seryny), kodowane u większości wirusów z rodziny Potyviridae przez gen zlokalizowany w tym samym regionie genomu, co HC-Pro (rys. 1). Hipoteza ta została ostatnio wzmocniona odkryciem, że brak w genomie CVYV (rodzaj *Ipomovirus*) sekwencji kodującej białko HC-Pro, jak się wydaje, jest w pewnym zakresie rekompensowany indukowaniem syntezy białka P1b, które jest dodatkową kopią P1, występuje w tandemie z tym białkiem i jest supresorem wyciszania RNA (63). Kopia P1b CVYV wykazywała zdolność supresji wyciszania wzbudzanego przez różne konstrukty transgenu GFP, a także zdolność do lokalnego wyciszania w miejscu agroinfiltracji jednej z transgenicznych linii *N. benthamiana*. Nie była jednak zdolna do całkowitego zablokowania w roślinie transmisji sygnału wyciszania, wzbudzonego przez transgen GFP.

## 6. Podsumowanie

Oprócz wirusów z rodziny Potyviridae, również wirusy z rodzajów *Caulimovirus* (rodzina Caulimoviridae), *Waikavirus* (rodzina Sequiviridae) i *Tobravirus* wymagają obecności niestrukturalnych białek, kontrolujących przenoszenie wirionów, odpowiednio, przez mszyce (64), skoczki (65) i nicienie (66). Na podstawie dotychczasowej wiedzy można stwierdzić, że produkowanie białka pomocniczego o pożądanym

właściwościach i funkcjach jest strategią najczęściej wykorzystywaną przez wirusy niekrażeniowe dla przenoszenia przez wektory (30). Struktura molekularna, mechanizmy i funkcje tych białek, poza HC-Pro wirusów z rodzaju *Potyvirus* oraz P2 kodowanym przez wirusa mozaiki kalafiora (CaMV, ang. *Cauliflower mosaic caulimovirus* rodzaj *Caulimovirus*) (67), są jednak słabo poznane. W przeciwieństwie do HC-Pro, białka niestrukturalne odpowiedzialne za przenoszenie innych wirusów roślinnych przez ich wektory prawdopodobnie nie pełnią istotnych funkcji związanych z cyklem infekcyjnym wirusa. Zadania są niekiedy rozdzielone między różne białka, zatem dla ich realizacji niezbędna jest ścisła korelacja funkcji białek. Zastosowanie drożdżowego systemu dwuhybrydowego pozwoliło stwierdzić, że również HC-Pro, wyróżniające się wielofunkcyjnością, wykazuje zdolność współdziałania z innymi białkami (68,69).

Ze względu na wyjątkowe właściwości, białko HC-Pro już znajduje zastosowanie w praktyce biotechnologicznej. Zdolność HC-Pro do supresji wyciszania wzbudzanego w roślinie przez RNA wirusa lub sensowy transgen, w połączeniu ze zdolnością amplikonu do indukowania silnego sygnału PTGS, może być wykorzystywana do osiągania wysokiego poziomu ekspresji transgeny (70). Duże stężenia HC-Pro w agroinfiltrowanych liściach niektórych roślin można uzyskiwać przez zastosowanie przejściowego systemu ekspresji białka, z użyciem konstruktów zawierającego region 5' genomu wirusa (71).

## Wykaz skrótów

### Wirusy:

- AgMV – ang. *Agropyron mosaic virus*
- BCMNV – ang. *Bean common mosaic necrosis virus*
- BCMV – ang. *Bean common mosaic virus*
- CABMV – ang. *Cowpea aphid-borne mosaic virus*
- CaMV – ang. *Cauliflower mosaic virus*
- CMV – ang. *Cucumber mosaic virus*
- CVYV – ang. *Cucumber vein yellowing virus*
- LMV – ang. *Lettuce mosaic virus*
- ONMV – ang. *Oat necrotic mottle virus*
- PAMV – ang. *Potato aucuba mosaic virus*
- PeMoV – ang. *Peanut mottle virus*
- PPV – ang. *Plum pox virus*
- PStV – ang. *Peanut stripe virus*
- PVA – ang. *Potato virus A*
- PVC – ang. *Potato virus C*
- PVX – ang. *Potato virus X*
- PVY – ang. *Potato virus Y*

SPMMV – ang. *Sweet potato mild mottle virus*

TEV – ang. *Tobacco etch virus*

TuMV – ang. *Turnip mosaic virus*

TVMV – ang. *Tobacco vein mottling virus*

WSMV – ang. *Wheat streak mosaic virus*

ZYMV – ang. *Zucchini yellow mosaic virus*

#### **Aminokwasy:**

A – alanina

D – kwas asparaginowy

E – kwas glutaminowy

F – fenyloalanina

G – glicyna

K – lizyna

KITC motyw – lizyna-izoleucyna-treonina-cysteina

L – leucyna

P – prolina

PTK motyw – prolina-treonina-lizyna

R – arginina

T – treonina

V – walina

Praca finansowana przez MNiSW, grant nr N310 014 32/1114, ze środków na naukę w latach 2007-2010.

#### **Literatura**

1. Ahlquist P., Noueir A. O., Lee W.-M., Kushner D. B., Dye B. T., (2003), *J. Virol.*, 77, 8181-8186.
2. Stange C., (2006), *Cien. Inv. Agr.*, 33, 1-18.
3. Syller J., (2000), *Bull. Polish Acad. Sci. Biol. Sci.*, 48, 183-196.
4. Callaway A., Giesman-Cookmeyer D., Gillock E. T., Sit T. L., Lommel S. A., (2001), *Annu. Rev. Phytopathol.*, 39, 419-460.
5. Adams M. J., Antoniw J. F., Fauquet C. M., (2004), *Arch. Virol.*, DOI 10.1007/s00705-004-0440-6.
6. Adams M. J., Antoniw J. F., Beaudoin F., (2005), *Mol. Plant Pathol.*, 6, 471-487.
7. ICTVdB Management (2006), 00.057. *Potyviridae*, in: *ICTVdB – The Universal Virus Database*, version 3. Ed. Büchen-Osmond C., Columbia University, New York, USA.
8. Janssen D., Martin G., Velasco L., Gómez P., Segundo E., Ruiz L., Cuadrado I. M., (2005), *Arch. Virol.*, 150, 1439-1447.
9. Govier D. A., Kassanis B., (1974), *Virology*, 61, 420-426.
10. Pirone T. P., Blanc S., (1996), *Annu. Rev. Phytopathol.*, 34, 227-247.
11. Maia I. G., Haenni A-L., Bernardi F., (1996), *J. Gen. Virol.*, 77, 1335-1341.
12. Urcuqui-Inchima S., Haenni A. L., Bernardi F., (2001), *Virus Res.*, 74, 157-175.
13. Anandalakshmi R., Pruss G. J., Ge X., Marathe R., Mallory A. C., Smith T. H., Vance V. B. (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 95, 13079-13084.
14. Brigneti G., Voinnet O., Li W. X., Ji L. H., Ding S. W., Baulcombe D. C., (1998), *EMBO J.*, 17, 6739-6746.

15. Kasschau K. D., Carrington J. C., (1998), *Cell*, 95, 461-470.
16. Atreya C. D., Atreya P. L., Thornbury D. W., Pirone T. P., (1992), *Virology*, 191, 106-111.
17. Atreya C. D., Pirone T. P., (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90, 11919-11923.
18. Kasschau K. D., Carrington J. C., (1995), *Virology*, 209, 268-273.
19. Klein P. G., Klein R. R., Rodriguez-Cerezo E., Hunt A. G., Shaw J. G., (1994), *Virology*, 204, 759-769.
20. Kasschau K. D., Cronin S., Carrington J. C., (1997), *Virology*, 228, 251-262.
21. Carrington J. C., Cary S.M., Parks T. D., Dougherty W. G., (1989), *EMBO J.*, 8, 365-370.
22. Rojas M. R., Zerbini F. M., Allison R. F., Gilbertson R. L., Lucas W. J., (1997), *Virology*, 237, 283-295.
23. Thornbury D. W., Hellman G. M., Rhodes R. E., Pirone T. P., (1985), *Virology*, 144, 260-267.
24. Wang R. Y., Pirone T. P. (1999), *Phytopathology*, 89, 564-567.
25. Urcuqui-Inchima S., Walter J., Drugeon G., German-Retana S., Haenni A.L., Candresse T., Bernardi F., Le Gall O., (1999), *Virology*, 258, 95-99.
26. Guo D., Merits A., Saarma M., (1999), *J. Gen. Virol.*, 80, 1127-1131.
27. Plisson C., Drucker M., Blanc S., German-Retana S., Le Gall O., Thomas D., Bron P., (2003), *J. Biol. Chem.*, 278, 23753-23761.
28. Ruiz-Ferrer V., Boskovic J., Alfonso C., Rivas G., Llorca O., López-Abella D., López-Moja J. J., (2005), *J. Virol.*, 79, 3758-3765.
29. Choi I.-R., Stenger D.C., French R., (2000), *Virology*, 267, 185-198.
30. Froissart R., Michalakakis Y., Blanc S., (2002), *Phytopathology*, 92, 576-579.
31. Sasaya T., Torrance L., Cowan G., Ziegler A., (2000), *J. Gen. Virol.*, 81, 1115-1119.
32. Wang R. Y., Powell G., Hardie J., Pirone T. P., (1998), *J. Gen. Virol.*, 79, 1519-1524.
33. Dombrovsky A., Huet H., Chejanovsky N., Raccah B., (2005), *Arch. Virol.*, 150, 287-298.
34. Thornbury D. W., Patterson C. A., Dessens J. T., Pirone T. P., (1990), *Virology*, 178, 573-578.
35. Granier F., Durand-Tardiff M., Casse-Delbart F., Lecoq H., Robaglia C., (1993), *J. Gen. Virol.*, 74, 2737-2742.
36. Canto T., López-Moja J. J., Serra-Yoldi M. T., Diaz-Ruiz J. R., López-Abella D., (1995), *Phytopathology*, 85, 1519-1524.
37. Blanc S., Ammar E. D., Garcia-Lampasona S., Dolja V. V., Llave C., Baker J., Pirone T. P., (1998), *J. Gen. Virol.*, 79, 3119-3122.
38. Peng Y. H., Kadoury D., Gal-On A., Huet H., Wang Y., Raccah B., (1998), *J. Gen. Virol.*, 79, 897-904.
39. Atreya P. L., López-Moja J. J., Chu M., Atreya C. D., Pirone T. P., (1995), *J. Gen. Virol.*, 76, 265-270.
40. López-Moya J. J., Wang R. Y., Pirone T. P., (1999), *J. Gen. Virol.*, 80, 3281-3288.
41. Flasiński S., Cassidy B. G., (1998), *Arch. Virol.*, 143, 2159-2172.
42. Roudet-Tavert G., German-Retana S., Delaunay T., Delécolle B., Candresse T., Le Gall O., (2002), *J. Gen. Virol.*, 83, 1765-1770.
43. Stenger D. C., Hein G. L., Gildow F. E., Horken K. M., French R., (2005), *J. Virol.*, 79, 9054-9061.
44. Stenger D. C., Hein G. L., French R., (2006), *Virology*, 350, 465-474.
45. Leh V., Jacquot E., Geldreich A., Haas M., Blanc S., Keller M., Yot P., (2001), *J. Virol.*, 75, 100-106.
46. Kasschau K. D., Carrington J. C. (2001), *Virology*, 285, 71-81.
47. Sáenz P., Salvador B., Simón-Mateo C., Kasschau K. D., Carrington J. C., García J. A., (2002), *J. Virol.*, 76, 1922-1931.
48. Andrejeva J., Puurand Ü., Merits A., Rabenstein F., Järvekülg L., Valkonen J. P. T., (1999), *J. Gen. Virol.*, 80, 1133-1139.
49. Pruss G., Ge X., Shi X. M., Carrington J. C., Vance V. B., (1997), *Plant Cell*, 9, 859-868.
50. Sonoda S., Koiwa H., Kanda K., Kato H., Shimono M., Nishiguchi M., (2000), *Phytopathology*, 90, 944-950.
51. González-Jara P., Tenllado F., Martínez-García B., Atencjo F. A., Barajas D., Vargas M., Diaz-Ruiz J., Diaz-Ruiz J. R., (2004), *Mol. Plant Pathol.*, 5, 29-35.
52. Gal-On A., (2007), *Mol. Plant Pathol.*, 8, DOI: 10.1111/j.1364-3703.2007.00381.x
53. Stenger D. C., French R., Gildow F. E., (2005), *J. Virol.*, 79, 12077-12080.
54. Stenger D. C., Young B. A., French R., (2006), *J. Gen. Virol.*, 87, 2741-2747.
55. Matzke M. A., Matzke A. J., Pruss G. J., Vance V. B., (2001), *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 11, 221-227.



56. Vaucheret H., Béclin C., Fagard M., (2001), *J. Cell Sci.*, 114, 3083-3091.
57. Yelina N. E., Savenkov E. I., Solovyev A. G., Morozov S. Y., Valkonen J. P. T., (2002), *J. Virol.*, 76, 12981-12991.
58. Lim H.-S., Ko T.-S., Lambert K. N., Kim H.-G., Korban S. S., Hartman G. L., Domier L. L., (2005), *Plant Physiol. Biochem.*, 43, 1014-1021.
59. Llave C., Kasschau K. D., Carrington J. C., (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 97, 13401-13406.
60. Mallory A. C., Ely L., Smith T. H., Marathe R., Anandalakshmi R., Fagard M., Vaucheret H., Pruss G., Bowman L., Vance V. B., (2001), *Plant Cell*, 13, 571-584.
61. Simón-Mateo C., López-Moya J. J., Guo H. S., González E., Garcia J. A., (2003), *J. Gen. Virol.*, 84, 2877-2883.
62. Mlotshwa S., Verver J., Sithole-Niang I., Prins M., van Kammen A., Wellink J., (2002), *Virus Genes*, 25, 45-57.
63. Valli A., Martín-Hernández A. M., López-Moya J. J., Garcia J. A., (2006), *J. Virol.*, 80, 10055-10063.
64. Blanc S., Hébrard E., Drucker M., Froissart R., (2001), *Molecular basis of vector transmission: caulimoviruses*, in: *Virus-Insect-Plant Interactions*, Eds. Harris K., Smith O. P., Duffus J. E., 143-166, Academic Press, San Diego, CA.
65. Chaouch-Hamada R., Redinbaugh M. G., Gingery R. E., Willie K., Hogenhout S. A., (2004), *Virology*, 325, 379-388.
66. McFarlane S. A., (2003), *Mol. Plant Pathol.*, 4, 211-215.
67. Drucker M., Froissart R., Hébrard E., Uzest M., Ravallec M., Espérandieu P., Mani J.-C., Pugnière M., Roquet F., Fereres A., Blanc S., (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 99, 2422-2427.
68. Guo D., Rajamäki M.-L., Saarma M., Valkonen J. P. T., (2001), *J. Gen. Virol.*, 82, 935-939.
69. Yambao M. L. M., Masuta C., Nakahara K., Uyeda I., (2003), *J. Gen. Virol.*, 84, 2861-2869.
70. Mallory A. C., Parks G., Endres M. W., Baulcombe D., Bowman L. H., Pruss G. J., Vance V. B., (2002), *Nature Biotech.*, 20, 622-625.
71. Goytia E., Fernández-Calvino L., Martínez-García B., López-Abella D., López-Moya J. J., (2006), *J. Gen. Virol.*, 87, 3413-3423.