



Rekombinacja RNA w układzie wirus-roślina transgeniczna – ryzyko powstania nowego wirusa

Anna Urbanowicz¹, Magdalena Alejska¹, Marek Figlerowicz¹,
Józef J. Bujarski^{1,2}

¹Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

²Northern Illinois University, Department of Biological Sciences,
Plant Molecular Biology Center, Montgomery Hall, DeKalb, USA

RNA recombination in the virus-transgenic plant system – the risk of creating a new virus

Summary

It is generally assumed that RNA recombination is one of the major driving forces in the evolution of plant viruses. This process leads to rearrangements of viral genomes and plays an important role in adaptation, genome repair and genetic variability of RNA viruses. It has been observed that viruses could recombine not only with each other, but also with mRNA of transgenic plants expressing viral genes. This observation has given rise to new concerns about creating virus-resistant transgenic plants, because the recombination could generate the viruses with new properties that were different from the parental strains. In this article, we present the current state of knowledge about recombination between transgens and challenging virus, we discuss what may happen in a field during interaction between the virus and the transgenic plant, and we propose strategies that allow to control the virus-transgene crossovers.

Key words:

RNA virus, transgenic plants, transgene, RNA recombination.

Adres do korespondencji

Józef J. Bujarski,
Northern Illinois
University,
Department of Biological
Sciences,
Plant Molecular Biology
Center,
Montgomery Hall,
DeKalb, IL 60115, USA.

1. Wstęp

Przystosowanie się organizmów do środowiska uwarunkowane jest zmiennością genetyczną i presją selekcyjną. Oba te czynniki prowadzą do ogromnej różnorodności form życia z jaką

spotykamy się w otaczającym nas świecie. Różnorodność ta dotyczy także wirusów RNA, w przypadku których wysokie tempo rearanżacji materiału genetycznego jest głównym sposobem umożliwiającym przetrwanie i zdobycie nowych nisz ekologicznych. Początkowo za jedyne źródło zmienności genetycznej wirusów RNA uważano niedokładność kopiowania ich genomowych cząsteczek przez wirusowe kompleksy replikacyjne. Jednak w prowadzonych w ostatnich latach badaniach dotyczących struktury oraz ewolucji genów wirusowych wykazano, że istnieje dodatkowy proces prowadzący do rearanżacji genomów wirusowych. Jest nim genetyczna rekombinacja RNA. Proces ten dotyczy praktycznie wszystkich wirusów RNA i może zachodzić nie tylko pomiędzy samymi cząsteczkami wirusowymi, lecz również pomiędzy cząsteczkami wirusowymi i transkryptami gospodarza, dzięki czemu genom wirusowy może zostać wzbogacony w sekwencje pochodzenia roślinnego bądź zwierzęcego. W przypadku roślin transgenicznych zawierających geny wirusowe istnieje ryzyko, że podczas infekcji, wskutek rekombinacji RNA pomiędzy genomem wirusowym i mRNA transgeny (tmRNA), powstanie nowy bardziej patogenny wirus o właściwościach pozwalających mu przystosować się do warunków, które wcześniej uniemożliwiały jego rozmnażanie i rozprzestrzenianie (41). Temu właśnie zagadnieniu poświęcona została ta praca.

2. Rekombinacja wirusów RNA

Do początku lat sześćdziesiątych uważano rekombinację genetyczną za proces dotyczący jedynie cząsteczek DNA. Pogląd ten został obalony przez Hirsta, który zaobserwował wymianę informacji genetycznej pomiędzy różnymi szczepami wirusa Newcastle, polio czy wirusa grypy (1). Od tego czasu rekombinacja wirusów RNA jest intensywnie badana w wielu ośrodkach naukowych, a lista wirusów u których zaobserwowano ten proces ciągle się powiększa.

Istnieją dwa źródła informacji na temat rekombinacji wirusów RNA, są nimi: analiza filogenetyczna genomów wirusowych oraz dane eksperymentalne. W przypadku analizy filogenetycznej, stwierdzono podobieństwa dotyczące zarówno organizacji całych genomów wirusowych, jak i poszczególnych genów kodujących białka wirusowe (2). W trakcie poznawania genomów wirusów RNA zaobserwowano, że pewne sekwencje są zbliżone lub niemal identyczne z sekwencjami innych wirusów, co sugeruje, że to właśnie rekombinacja RNA uczestniczyła w kształtowaniu ich genomów (1,3-5). Naturalne przetasowania sekwencji genomowych wykryte zostały u bromowirusów (3,6-8), hordeiwirusów (9), luteowirusów (10), nepowirusów (11), tobamowirusów (12), tombuswirusów (13), pikornawirusów (1,14), koronawirusów (15,16), nodawirusów (17) oraz u bakteriofagów (18,19). Wirusy w trakcie ewolucji wcielały do swego genomu również fragmenty sekwencji RNA gospodarza, o czym świadczy obecność sekwencji komórkowych w ich genomach. Jako przykład może posłużyć sekwencja 28S rRNA występująca wewnątrz genu hemaglutyniny wirusa grypy (20), sekwencja tRNA w genomowym RNA wirusa Sindibis (21), czy sekwencja homologicz-

na do chloroplastowych egzonów tytoniu w genomach luteowirusów (10) i bromowirusów (22). Obserwacja ta odnosi się również do roślin w których dochodzi do ekspresji białka wirusowego. Zaobserwowano, że podczas infekcji roślin transgenicznych delecyjnymi mutantami wirusowymi dochodzi do przywrócenia sekwencji typu dzikiego poprzez rekombinację materiału genetycznego wirusa z tmRNA (23-28). Defektywne interferujące RNA, które towarzyszą niektórym wirusom zwierzęcym i roślinnym są również produktami rekombinacji RNA (29,30). Wszystkie te przykłady ilustrują ogromną rolę jaką odgrywa rekombinacja w procesie ewolucji wirusów RNA.

Szereg interesujących danych dotyczących rekombinacji RNA dostarczyły badania prowadzone z użyciem zmutowanych szczepów wirusowych (31). Doprowadziły one do powstania powszechnie akceptowanej hipotezy wybiórczego kopiowania (*copy choice*), w której zakłada się, że rekombinant powstaje podczas replikacji genomowych cząsteczek RNA, gdy wirusowy kompleks replikacyjny przeskakuje z jednej matrycy na drugą (31). Zrekombinowana cząsteczka RNA jest zatem syntetyzowana na podstawie co najmniej dwóch matryc. Inny model rekombinacji RNA został zaproponowany przez Chetverina i dotyczy bakteriofaga Q β . Jego autor zakłada, że rekombinanty powstają na drodze transestryfikacji, podobnie jak ma to miejsce w trakcie wycinania intronów grupy II (18). Bakteriofag Q β jest do tej pory jedynym wirusem, u którego zaobserwowano ten mechanizm.

Analizując strukturę oraz funkcję substratów i produktów rekombinacji, wyróżniono jej trzy podstawowe typy: homologiczną, homologiczną nieprecyzyjną i niehomologiczną (31). W rekombinacji homologicznej uczestniczą identyczne lub podobne cząsteczki RNA, a przeskok ma miejsce dokładnie pomiędzy odpowiadającymi sobie nukleotydami. Rekombinant zachowuje zatem sekwencję i organizację cząsteczek rodzicielskich. W warunkach naturalnych ten typ rekombinacji zachodzi najczęściej. Ponieważ nie wprowadza on żadnych istotnych zmian w genomie, jego znaczenie ewolucyjne, jak się wydaje, jest znikome, jednak może pełnić rolę mechanizmu naprawczego, umożliwiając korekcję błędnie skopiowanych lub uszkodzonych cząsteczek genomowych. W rekombinacji homologicznej nieprecyzyjnej biorą udział identyczne cząsteczki RNA, jednak przeskok nie zachodzi dokładnie pomiędzy odpowiadającymi sobie nukleotydami, co prowadzi do powstania delecji lub insercji w cząsteczkach potomnych. W rekombinacji niehomologicznej uczestniczą różne matryce RNA, a powstały rekombinant zdecydowanie różni się od cząsteczek rodzicielskich. Ten typ rekombinacji zachodzi w przyrodzie najrzadziej, jednak wprowadza największe zmiany w genomie wirusowym, może zatem odgrywać szczególnie istotną rolę w ewolucji wirusów RNA.

3. Rośliny transgeniczne odporne na infekcje wirusowe

Pierwsze próby otrzymania transgenicznych roślin odpornych na infekcje wirusowe miały miejsce w połowie lat osiemdziesiątych (32). Wykazano wtedy, że ekspresja białka płaszczka wirusa mozaiki tytoniu (*tobacco mosaic virus* – TMV) w trans-

genicznym tytoniu chroni roślinę przed infekcją tymże wirusem. To odkrycie zapoczątkowało intensywne badania nad możliwościami ochrony roślin uprawnych przed wirusami za pomocą wirusowych transgenów oraz nad mechanizmami tej ochrony.

Obecnie możemy wyróżnić trzy typy genów chroniących roślinę przed wirusami (33). Mogą to być geny pochodzenia wirusowego, dające roślinie tzw. odporność wywodzącą się od patogena (PDR – *pathogen-derived resistance*), naturalne geny odporności pochodzenia roślinnego oraz geny kodujące czynniki oddziałujące na wirusa uzyskane z innych organizmów.

W celu wywołania PDR stosuje się różne sekwencje wirusowe, takie jak geny kodujące białko płaszczka lub replikazę, uszkodzone geny białka odpowiedzialnego za rozprzestrzenianie się wirusa czy geny proteazy (33). Sekwencje te wprowadza się do genomu roślinnego pod odpowiednim promotorem umożliwiającym ich ekspresję. Do konstrukcji roślin transgenicznnych odpornych na infekcję wirusową najczęściej stosowane są geny kodujące białka płaszczka. Podejście takie zastosowano dla co najmniej 35 wirusów reprezentujących 15 grup taksonomicznych (44). W USA już w 1999 r. pierwsze tego typu rośliny uprawne znalazły praktyczne zastosowanie w rolnictwie. Równolegle kontynuowane są prace nad uzyskiwaniem nowych transgenicznnych linii (34). Rosnące zainteresowanie tym zagadnieniem jest całkowicie zrozumiałe, gdyż koszty uzyskania roślin transgenicznnych odpornych na wirusy są niewielkie w porównaniu z korzyściami płynącymi z polepszenia wydajności upraw. Dodatkowo zastosowanie takich roślin znacznie ogranicza zużycie środków chemicznych skierowanych przeciwko wirusom, jest zatem wskazane ze względów ekonomicznych jak i ekologicznych.

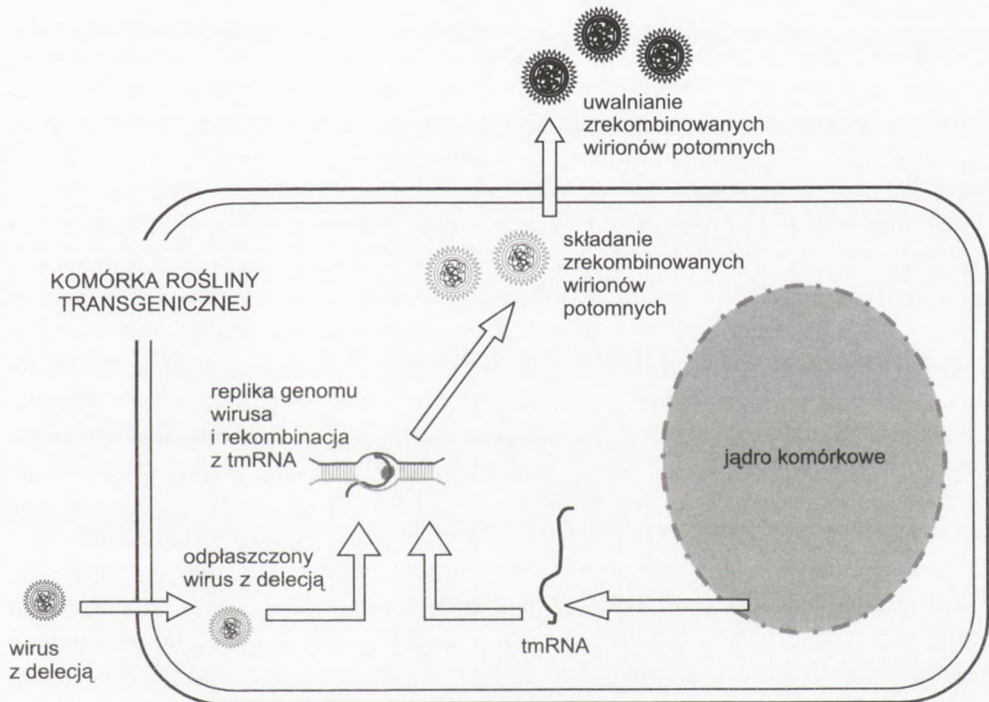
Należy jednak pamiętać, że działania naruszające równowagę stworzonych przez przyrodę systemów pociągają za sobą nie tylko korzyści, ale także zagrożenia. W przypadku transgenicznnych roślin wytwarzających białka wirusowe, może dojść do niepożądanych oddziaływań pomiędzy produktami transgenu (czyli RNA lub białkiem wirusowym) a wirusem atakującym roślinę. Przykładem tego typu oddziaływań jest: synergizm, heterokapsydacja czy rekombinacja (33). Skutkiem synergistycznego działania cząsteczek pochodzących z dwóch niespokrewnionych wirusów może być wzmocnienie ich niekorzystnego wpływu na roślinę. Z kolei heterokapsydacja polega na opłaszczeniu wirusa atakującego roślinę obcym białkiem płaszczka (np. kodowanym przez transgen), co może zmienić sposób rozprzestrzeniania się tego patogena w zainfekowanym gospodarzu. Natomiast rekombinacja pomiędzy tmRNA a materiałem genetycznym innego wirusa może prowadzić do powstania wirusa hybrydowego inaczej oddziałującego na gospodarza lub rozprzestrzeniającego się wśród gatunków, które wcześniej były dla niego niedostępne (szerzej zob. w rozdz. 4). Do tej pory przypadków takich nie obserwowano bezpośrednio *in vivo*. Analizując genomy wirusowe sugeruje się jednak, że w przeszłości miały one miejsce. Ponadto wykazano, że hybryda, skonstruowana *in vitro* przez zastąpienie genu *2b* wirusa mozaiki ogórka (*cucumber mosaic virus* – CMV) przez jego homolog z wi-

rusa aspermy pomidora (*tomato aspermy virus* – TAV), jest o wiele bardziej wirulentny od wirusów rodzicielskich (35).

4. Rekombinacja pomiędzy wirusowym RNA i tmRNA w warunkach eksperymentalnych

Z uwagi na to, że rekombinacja pomiędzy wirusami RNA i mRNA transgenów roślin odpornych na infekcje wirusowe stwarza realne zagrożenie dla biosfery, w kilku ośrodkach naukowych prowadzone są badania mające na celu dokładniejsze zbadanie i rozwiązanie tego problemu. Strategia wykorzystywana w tych badaniach polega m.in. na inokulacji defektywnym wirusem roślin transgenicznych transformowanych nieuszkodzonym genem wirusowym (rys.).

Pierwszy tego typu eksperyment dotyczył wirusa nekrotycznej mozaiki czerwonej koniczyny (*red clover necrotic mosaic dianthovirus* – RCNMV), którego genom złożony jest z dwóch segmentów – RNA1 i RNA2 (23). Rośliny *Nicotiana benthamiana*



Rys. Rekombinacja wirusa z mRNA transgenu gospodarza. Delecja sekwencji w wirusowym genomie zostaje uzupełniona podczas replikacji jego genomu w wyniku rekombinacji z tmRNA rośliny zawierającej nieuszkodzony odpowiedni fragment genu wirusowego. Dojrzałe cząstki potomne wirusa mają zrekombinowane genomy wirusowe nie zawierające delecji.

transformowane genem RCNMV, kodującym białko odpowiedzialne za rozprzestrzenianie się wirusowego RNA, inokulowano samym tylko RNA1 RCNMV, kodującym jedynie replikazę i białko płaszczka. U kilku z zakażonych roślin transgenicznych zaobserwowano infekcję systemiczną. Pomimo że transgen wprowadzony do *Nicotiana benthamiana* nie posiadał na końcu 5' rejonu nie ulegającego translacji (*untranslated region* – UTR), wirus wyizolowany z systemicznie zakażonych roślin zawierał kompletny RNA2 z funkcjonalnym 5'UTR, pochodzącym z RNA1, a wprowadzonym do RNA2 poprzez rekombinację pomiędzy tmRNA i RNA1 wirusa.

Zjawisko rekombinacji pomiędzy wirusem a transgenem zaobserwowano także u wirusa mozaiki kalafiora (*cauliflower mosaic caulimovirus* – CaMV) (24). CaMV jest pararetrowirusem którego genom zbudowany jest z DNA. W jego cyklu replikacyjnym wirusowy genom potomny syntetyzowany jest na matrycy RNA przy udziale odwrotnej transkryptazy. Rośliny rzepaku (*Brassica napus*) transformowano genem VI pochodzącym ze szczepu D4 CaMV. Wykazano jednocześnie, że szczep CM1841 CaMV z delecją tego genu niezdolny jest do wywołania systemicznej infekcji u *Brassica napus*. Sekwencje około 1000 nukleotydów na obu końcach transgeny były homologiczne do sekwencji występujących w zmutowanym wirusie użytym do inokulacji transgenicznych roślin, co stworzyło dogodne warunki do zajścia rekombinacji. Cztery z dwunastu zainfekowanych roślin wykazało systemiczne objawy infekcji zrekombinowanym wirusem. W przeprowadzonej analizie sekwencji nukleotydowych trzech zrekombinowanych wirusów sugerowano, że kolisty genom CaMV został naprawiony w wyniku zajścia dwóch przeskoków rekombinacyjnych zachodzących na poziomie RNA. Sekwencja czwartego rekombinanta uległa rewersji do typu dzikiego na drodze rekombinacji na poziomie RNA i DNA.

Eksperymenty z użyciem CaMV prowadzone były również na transgenicznych roślinach *Nicotiana bigelovii*, w których dochodzi do ekspresji transgeny kodującego ORF VI szczepu D4 CaMV (25). Podobnie jak w przypadku *Brassica napus*, szczep CM1841 CaMV pozbawiony genu VI nie jest w stanie wywołać infekcji systemicznej u *Nicotiana bigelovii*. Pomimo że użyty do inokulacji CaMV nie posiadał genu VI, infekcja systemiczna rozwinęła się u wszystkich dziesięciu zakażonych roślin. W przeprowadzonej analizie sekwencji genomowej w izolowanego z tych roślin wirusa wykazano, że nabył on gen VI poprzez rekombinację z tmRNA prawdopodobnie podczas odwrotnej transkrypcji lub replikacji. Zrekombinowany wirus pasażowany na nietransgeniczne rośliny *Nicotiana bigelovii* był również zdolny do wywołania infekcji.

Naprawę małych delecji w genomie poprzez rekombinację z tmRNA zaobserwowano także u tombuswirusa TBSV (*tomato bushy stunt virus* – TBSV) (26). *Nicotiana benthamiana* transformowano genem białka płaszczka TBSV, a następnie infekowano mutantem TBSV z 50-nukleotydową delecją w obrębie genu kodującego białko płaszczka. Mutant ten u nietransgenicznych roślin wywołuje infekcję o lekkim przebiegu, jednak u roślin transgenicznych spowodował obumieranie. Obecność wirionów w plamkach nekrotycznych sugerowała, że wirus wytwarzał w pełni funkcjonalne białko płaszczka. Podczas przeprowadzania dodatkowej inokulacji transgenicz-

nych roślin za pomocą chimerycznego tombuswirusa CMV zawierającego defektywny gen białka płaszczka z TBSV ponownie obserwowano obumieranie zainfekowanych transgenicznych roślin *Nicotiana benthamiana* wywołane przez zrekombinowanego wirusa. Geny białek płaszczka tombuswirusów umieszczone są centralnie, zatem by zaszła naprawa uszkodzonego wirusowego genu, musiało dojść do co najmniej dwóch przeskoków rekombinacyjnych pomiędzy wirusowym RNA a tmRNA.

Naprawa małej delecji w genie kapsydu podczas infekcji w roślinie transgenicznej zachodzi także u wirusa chlorowatości wspanięli chińskiej (*cowpea chlorotic mottle virus* – CCMV) (27). Genom tego wirusa składa się z trzech segmentów: RNA1, RNA2 i RNA3. RNA1 i RNA2 kodują białka biorące udział w replikacji i nie są w stanie wywołać w roślinie infekcji systemicznej, do której potrzebny jest RNA3 kodujący białko odpowiedzialne za rozprzestrzenianie się wirusa w zakażonej roślinie oraz białko płaszczka. Rośliny *Nicotiana benthamiana* transformowano fragmentem genu białka płaszczka CCMV, obejmującym 2/3 jego sekwencji końcowej 3' łącznie z 3' UTR. Dodatkowo wprowadzono do transgeny trzy substytucje nukleotydowe, które nie miały wpływu na translację, tworzyły dodatkowe miejsce restrykcyjne NotI. Następnie skonstruowano mutant CCMV, w którym usunięto ostatnie 121 nukleotydów z genu białka płaszczka oraz 3'UTR. Delecyjnym mutantem RNA3, wraz z pozostałymi komponentami genomu CCMV, inokulowano rośliny transgeniczne. U siedmiu roślin na 235 zakażonych wystąpiły objawy infekcji systemicznej. Wirus z tych roślin był pasażowany na nietransgeniczne rośliny *Nicotiana benthamiana*, a następnie po izolacji i po uzyskaniu cDNA, odpowiednie części RNA3 sklonowano i sekwencjonowano. Wszystkie ze sklonowanych rekombinantów zawierały markerowe miejsce NotI, co świadczy o tym, że zaszła rekombinacja między wirusem i tmRNA. Sekwencje genów kapsydu u poszczególnych zrekombinowanych wirusów różniły się od siebie, zawierając od kilku punktowych mutacji do 42-nukleotydowej delecji. Zostały one wprowadzone do genomu wirusa najprawdopodobniej przez nieprecyzyjną homologiczną rekombinację RNA.

Wszystkie opisane przypadki rekombinacji pomiędzy wirusowym materiałem genetycznym a tmRNA gospodarza obserwowano w warunkach, w których działała wysoka presja selekcyjna faworyzująca zrekombinowaną formę wirusa jako jedyną, która mogła rozprzestrzeniać się w zakażonych roślinach. Pokazują one, że rekombinacja pomiędzy RNA wirusa i tmRNA jest możliwa, a także, iż uszkodzony wirus może dzięki rekombinacji odzyskać dawne właściwości, jednak nie pozwalają ustalić, z jaką częstością zaszłaby rekombinacja podczas infekcji rośliny transgenicznej wirusem typu dzikiego. Aby to wyjaśnić, należy prowadzić badania w systemach o zmniejszonej presji selekcyjnej. Pierwszy tego typu eksperyment przeprowadzono dla szczepu W260-CaMV, który infekuje systemicznie rośliny z rodziny *Solanaceae* (36). Podczas infekcji tym szczepem transgenicznych roślin *Nicotiana bigelovii* zawierających transgen odpowiadający genowi VI szczepu D4 CaMV zaobserwowano, że zrekombinowany wirus jest bardziej wirulentny w porównaniu z wyjściowym szczepem W260 CaMV.

Inne badania prowadzone w warunkach umiarkowanej presji selekcyjnej dotyczą tombuswirusa TBSV. Wykazano, że zmutowana forma wirusa TBSV z delecją genu kodującego białko płaszczka, jest zdolna do wywołania w roślinie systemicznej infekcji o małym nasileniu (26). Kiedy rośliny transgeniczne zawierające gen kodujący białko płaszczka TBSV infekowano zmutowaną formą wirusa, powstawał rekombinant posiadający usunięty wcześniej gen, który wywoływał infekcję systemiczną o dużym nasileniu.

Inną strategię zastosowano w eksperymentach prowadzonych z wykorzystaniem potywirusa PPV (*plum pox virus*) prowadzonych w warunkach umiarkowanej presji selekcyjnej (42). Rośliny *Nicotiana benthamiana*, transformowane genem kodującym białko płaszczka PPV, infekowano chimerycznym wirusem PPV zawierającym gen białka płaszczka pochodzącym z innego potywirusa – ZYMV (*zucchini yellow mosaic virus*). Mutant ten wywoływał w nietransgenicznym roślinał infekcję systemiczną, jednak jej objawy były znacznie mniej ostre od objawów wywołanych przez niezmutowanego PPV. Jednakże po zaiokulowaniu chimerą PPV-ZYMV transgenicznych roślin, zaobserwowano zaostrenie objawów infekcji, a w analizie sekwencji nukleotydowej genu białka płaszczka potomnego wirusa wykazano, że chimeryczny gen pochodzący z ZYMV został zastąpiony przez gen białka płaszczka PPV na drodze homologicznej rekombinacji RNA. W trakcie tych badań poczyniono bardzo ciekawą obserwację. Stwierdzono, że mRNA syntetyzowany na transgenie nie jest zdolny do rekombinacji z wirusowym materiałem genetycznym, jeśli pozbawiony był sekwencji 3' UTR. Obserwacja ta dotyczyła nie tylko badań z wykorzystaniem chimerycznego wirusa PPV-ZYMV, lecz także eksperymentów prowadzonych z użyciem mutantów PPV zawierających delecje w genie białka płaszczka. Homologiczna rekombinacja RNA pomiędzy materiałem genetycznym wirusa i mRNA transgeny zachodziła jedynie w roślinach posiadających wirusowy gen białka płaszczka poprzedzony wirusowym 3'UTR.

5. Rekombinacja pomiędzy wirusowym RNA i tmRNA w warunkach naturalnych – ryzyko powstania nowych wirusów

Z opisanych doświadczeń wynika, że tmRNA może brać udział w rekombinacji z RNA wirusa infekującego roślinę. We wszystkich przypadkach delecje wprowadzone do wirusowych genów podlegały naprawianiu, a niektóre z powstałych rekombinantów różniły się od wirusów typu dzikiego. Nie wiadomo jednak na ile warunki laboratoryjne, w jakich prowadzone były te badania, odzwierciedlają to, co mogłoby wydarzyć się w warunkach naturalnych. Ponieważ rekombinacja RNA jest jednym z czynników napędzających ewolucję wirusów, jest oczywiste, że istnieje możliwość włączenia transgeny lub jego części do infekującego roślinę wirusa. Wirusy infekujące rośliny mogą posiadać właściwości patogenne, ale mogą też być ich pozbawione. Patogeny przystosowały się do swoich gospodarzy i w przeszłości prawdo-

podobnie miały możliwość rekombinacji z innymi wirusami podczas infekcji mieszanych. Natomiast wirusy niepatogenne, które namnażają się w roślinie nie wywołując infekcji systemicznej, lub których rozprzestrzenianie w roślinie jest ograniczone, poprzez rekombinację mogą przekształcić się w systemicznie infekujące patogeny. Presja selekcyjna będzie działała na korzyść takich rekombinantów, co zilustrowane zostało w opisanych doświadczeniach. Wiadomo, że w rozwijaniu się infekcji systemicznej uczestniczy nie tylko białko odpowiedzialne za rozprzestrzenianie wirusa, lecz także białko płaszczka i inne bliżej nieokreślone czynniki komórkowe (33). Z powodu zbyt małej wiedzy o zachodzących między nimi oddziałyvaniach oraz strukturalnych uwarunkowaniach samej rekombinacji, trudno jest przewidzieć, jak wielkie jest ryzyko, że rekombinacja wirusowego RNA z tmRNA może przekształcić niepatogenego wirusa w patogen. W warunkach laboratoryjnych stworzono funkcjonalne chimeryczne wirusy, jednak nie wiemy czy jest to możliwe w warunkach naturalnych.

Jedną z możliwości uniknięcia rekombinacji pomiędzy tmRNA i wirusowym materiałem genetycznym jest takie projektowanie transgenów aby prawdopodobieństwo zajścia tego procesu było niskie. Dlatego sekwencja transgenu powinna być niezbyt długa i pozbawiona wszelkich elementów indukujących przeskoki rekombinacyjne, jak struktury promotorowe (42) czy sekwencje bogate w pary AU (37). W przypadku gdyby jednak doszło do rekombinacji pomiędzy wirusowym RNA i tmRNA, kodowane przez transgen białko powinno być niefunkcjonalne. Dodatkowo poziom ekspresji transgenu w roślinie powinien być jak najniższy, ponieważ częstość rekombinacji zależy również od dostępności RNA w komórce. Wykazano, że fragmenty genów wirusowych oraz geny wirusowe pozbawione możliwości translacji są w stanie wywołać odporność na infekcje wirusowe w roślinach transgenicznych (43,45,46). Inną strategią unikania rekombinacji pomiędzy RNA wirusa i transgenem w roślinie jest wykorzystanie zjawiska potranskrypcyjnego wyciszania genów (PTGS – *posttranscriptional gene silencing*), tzn. indukcja degradacji zarówno mRNA transgenu jak i homologicznej sekwencji wirusowej. Ostatnio wykazano jednak, że niektóre wirusy posiadają zdolność blokowania potranskrypcyjnego wyciszania genów, dzięki zakodowanym w ich genomie supresorom PTGS (38-40).

6. Podsumowanie

Dokładne oszacowanie ryzyka związanego z rekombinacją pomiędzy tmRNA i genomem wirusowym oraz opracowanie strategii pozwalającej na eliminację tego zjawiska jest zadaniem trudnym i wymagającym lepszego poznania mechanizmów odpowiedzialnych za proces genetycznej rekombinacji RNA. Zbyt skromny jest bowiem obecny poziom wiedzy o strukturalnych i funkcjonalnych uwarunkowaniach rekombinacji, a także o oddziałyvaniach zachodzących w trakcie infekcji pomiędzy wirusem a jego gospodarzem. Konieczne są również dalsze badania rekombinacji

pomiędzy tmRNA oraz wirusowym materiałem genetycznym w warunkach zbliżonych do naturalnych, bez presji selekcyjnej czy drastycznych zmian w genomie wirusowym.

Praca powstała w ramach realizacji projektu badawczego nr 6 P04C 046 19 finansowanego przez Komitet Badań Naukowych.

Literatura

1. Hirst G. K., (1962), Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol., 27, 303-309.
2. Fields i in. (1996), *Virology*, Lipincott-Raven Publishers.
3. Bujarski J. J., Nagy P. D., Flasiński S., (1994), Adv. Vir. Res., 43, 275-302.
4. Emini E. A., Leibowitz J., Diamond D. C., Bonin J. Wimmer E., (1984), *Virology*, 173, 74-85.
5. Kilbertis P., Loesch-Fries L. S., Hall T. C., (1981), *Virology Res.*, 3, 373-384.
6. Allison R. C., Thompson C., Alquist P., (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 1820-1824.
7. Bujarski J. J., Dzianott A. M., (1991), J. Virol., 65, 4153-4159.
8. Figlerowicz M., Nagy P. D., Tang N., Kao C. C., Bujarski J. J., (1998), J. Virol., 72, 9192-9200.
9. Edwards M. C., Pretty I. T. D., Jackson A. O., (1992), *Virology*, 189, 389-392.
10. Mayo M. A., Jolly C. A., (1991), J. Gen. Virol., 72, 2591-2595.
11. Rott M. E., Tremaine J. H., Rochon D. M., (1991), *Virology*, 40, 181-211.
12. Robinson D. J., Hamilton W. D. O., Harrison B. D., Baulcombe D. C., (1987), J. Gen. Virol., 68, 2551-2561.
13. Shirakko Y., Brakke M. K., (1984), J. Gen. Virol., 65, 855-858.
14. Kirkegaard K., Baltimore D., (1986), Cell, 47, 433-443.
15. Banner L. R., Lai M. M., (1991), *Virology*, 185, 441-445.
16. Zhang X., Lai M. M., (1994), J. Virol., 68, 6626-6633.
17. Ball A. L., (1997), Seminars in Virology, 8, 95-100.
18. Chetverin A. B., Chetverina H. V., Demidenko A. A., Ugarov V. I., (1997), Science, 260, 801-805.
19. Palasingan K., Shaklee P. N., (1992), J. Virol., 67, 4914-4922.
20. Khatchikian D., Orlich M., Rott R., (1989), Nature, 340, 156-157.
21. Monroe S., Schlesinger S., (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 3279-3283.
22. Nagy P. D., Bujarski J. J., (1995), J. Virol., 69, 131-140.
23. Lomell S. A., Xiong Z., (1991), J. Cell Biochem., 15A, 151.
24. Gal S., Pisan B., Hohn T., Grimsey N., Hohn B., (1992), *Virology*, 187, 525-533.
25. Schoelz J. E., Wintermantel W. M., (1993), Plant Cell, 5, 1669-1679.
26. Borja M., Rubio T., Scholthof H. B., Jackson A. O., (1999), Mol. Plant-Micr. Interact., 12, 153-162.
27. Greene A. E., Allison R. F., (1994), Science, 263, 1423-1425.
28. Greene A. E., Allison R. F., (1996), *Virology*, 225, 231-234.
29. Lazzarini R. A., Keene J. D., Schubert M., (1981), Cell, 26, 145-154.
30. Inoue-Nagata A. K., Kormelink R., Sgro J.-Y., Nagata T., Kitajima E. W., Goldbach R., Reters D., (1997), *Virology*, 248, 342-356.
31. M. M. C. Lai., (1992), Microbiol. Rev., 61-79.
32. Powell-Abel P., Nelson R. S., De B., Hoffmann N., Rogers S. G., Fraley R. T., Beachy R. N., (1986), Science, 232, 738-763.
33. Hull R., (2002), *Mathew's Plant Virology*, 4th ed., Academic Press, London, 712-730.
34. White L., (1999), Proc. of the 5th International Symposium on Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms, Eds. J. Schiemann, R. Casper, Braunschweig.
35. Salanki K., Carrere I., Jacquemond M., Balazs E., Tepfer M., (1997), J. Virol., 71, 3597-3602.
36. Wintermantel W., Schoelz J. E., (1996), *Virology*, 223, 156-164.
37. Bujarski J. J., Nagy P. D., (1996), Seminars in Virology, 7, 363-372.

38. Anamadalakshmi R., Pruss G. J., Ge X., Marathe R., Mallory A. C., Vance V. B., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 13079-13084.
39. Beclin C., Berthome R., Palauqui J.-C., Tepfer M., Vaucheret H., (1998), *Virology*, 252, 313-317.
40. Brigneti G., Voinnet O., Li W.-X., Ji L.-H., Ding S.-W., Baulcombe D. C., (1998), *EMBO J.*, 17, 6739-6746.
41. Aaziz R., Tepfer M., (1999), *J. Gen. Virol.*, 80, 1339-1346.
42. Varrelmann M., Palkovics L., Maiss E., (2000), *J. Virol.*, (Aug 2000), 7462-7469.
43. Varrelmann M., Maiss E., (2000), *J. Gen. Virol.*, 81, 567-576.
44. Palukaitis P., Zaitlin M., (1997), *Adv. Vir. Res.*, 48, 349-377.
45. Lindbo J. A., Dougherty W. G., (1992), *Virology*, 189, 725-733.
46. Jacquet C., Ravelonandro M., Bachelier J., Dunez J., (1998), *Trans. Res.*, 7, 19-39.