



## Wirusy roślinne jako wektory do wyrażania obcych genów

Andrzej Pałucha

Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa

### Plant viruses as vectors for foreign gene expression in plants

#### Summary

Several studies have demonstrated the use of plant viruses as vehicles to introduce and express nonviral genes in plants. Many plant viruses multiply intensely in plants, leading to concomitantly high levels of nonviral gene expression. Plant virus expression vector technology can be improved along several lines. Not all viruses are equally sensitive to sequence manipulations. New vectors and new expression strategies are needed to expand the range of plants in which the systems can be used. To increase the carrying capacity or the ability to express more than one nonviral gene, new vectors should be developed.

#### Key words:

plant virus, virus-based vector, foreign gene expression.

### 1. Wprowadzenie

Jednym z podstawowych celów manipulacji genetycznych dokonywanych na roślinach jest obniżenie strat w plonach przez konstrukcję roślin odpornych na infekcje wirusowe, bakteryjne czy zakażenia wywołane grzybami. Innym celem jest zwiększenie odporności na warunki stresowe środowiska, wprowadzanie genów warunkujących odporność na pestycydy, zmiana kompozycji aminokwasowej w białkach zapasowych nasion, eliminacja szkodliwych kwasów tłuszczowych, a także modyfikacje polimerów takich jak celulozy czy woski.

W ostatnich latach, dzięki rozwojowi technik inżynierii genetycznej roślin, a w szczególności rozwojowi metod trwałego

#### Adres do korespondencji

Andrzej Pałucha,  
Instytut Biochemii  
i Biofizyki  
Polska Akademia Nauk,  
ul. Pawińskiego 5A,  
02-106 Warszawa;  
e-mail: [alfap@ibb.waw.pl](mailto:alfap@ibb.waw.pl)

---

#### biotechnologia

wprowadzania DNA do ich genomów, nastąpił znaczny postęp w pracach nad otrzymywaniem roślin transgenicznych. Ze względu na niskie koszty hodowli, sterylność i olbrzymią biomasę powstającą z energii słonecznej i mineralnego podłoża, rośliny są, jak się wydaje, doskonałymi kandydatami na bioreaktory, w których można wyrażać nie tylko geny warunkujące poprawę właściwości roślin, lecz także białka istotne z punktu widzenia człowieka i jego zdrowia, takie jak białka krwi, neuropeptydy, czynniki wzrostu, przeciwciała, a także antygeny warunkujące odporność organizmów zwierzęcych.

Genetyczna modyfikacja roślin często nie jest obojętna dla organizmu w którym jej dokonano. Niekiedy wyrażenie obcego genu ma niekorzystny, fitotoksyczny wpływ na samego gospodarza już na wczesnych etapach jego rozwoju, co w biotechnologii przekłada się na wydajność systemu. Pewną alternatywą dla trwałego i wydajnego wyrażania obcych genów w roślinach może być, jak się wydaje, użycie wirusów jako ich nośników. Wirusy posiadają naturalną zdolność do zmiany metabolizmu zainfekowanej komórki, a w efekcie całego organizmu i przełączania go na syntezę własnych, funkcjonalnych i strukturalnych białek. Rozwój biologii molekularnej wirusów roślinnych o genomie zbudowanym z DNA, a przede wszystkim wirusów których genom stanowi jednoniciowy RNA, pozwala na ich wykorzystanie jako gospodarzy obcych genów wyrażanych w zainfekowanych roślinach. System ten cechuje także łatwość i szybkość klonowania genów przeznaczonych do ekspresji, a także to, że zmodyfikowanym genetycznie wirusem możemy infekować roślinę na dowolnym etapie jej wzrostu i rozwoju.

## 2. Wektory ekspresyjne otrzymywane z wirusów o genomie DNA

Jednym z pierwszych wirusów, który był brany pod uwagę jako ekspresyjny wektor roślinny, był wirus mozaiki kalafiora CaMV (*cauliflower mosaic virus*) którego DNA po klonowaniu pozostawało infekcyjne. Niestety, wektor ten miał pewne ograniczenia. Przede wszystkim zwiększenie wielkości DNA wirusowego o obcy gen powodowało upośledzenie procesu enkapsydacji, a co za tym idzie, wydajności infekcji. Częściowo problem ten rozwiązano i zastąpiono otwartą ramkę odczytu II, której produkt warunkuje transmisję wirusa przez wektor owadzi, małymi genami kodującymi reduktazę dwuhydrofolianową DHFR (*dihydrofolate reductase*) (1) i MT II (*metallothionein II*) (2). Białka te zostały wyrażone odpowiednio w ilości ok. 8 µg/g świeżej masy i ok. 0,5% rozpuszczalnych białek z liści.

Inną grupą wirusów, która znalazła się w centrum zainteresowania biotechnologów, były geminiwirusy. Mogą one być używane jako wektory w szerokim zakresie gospodarza, dodatkowo infekują rośliny jednoliścienne. W przypadku wirusa karłowatości pszenicy WDV (*wheat dwarf virus*) udało się usunąć, bez szkody dla procesu replikacji, gen białka płaszczka i zastąpić go odpowiednio markerami bakteryjnymi: NPT (neomycynowa fosfotransferaza; *neomycin phosphotransferase*), CAT (acety-

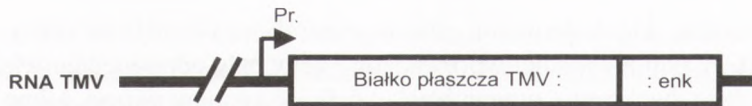
lotransferaza chloramfenikolu; *chloramphenicol acetyltransferase*) oraz  $\beta$ -galaktozydazą (3). W tym przypadku wprowadzone geny były odpowiednio większe, a  $\beta$ -galaktozydaza dwukrotnie przewyższała wielkość genomu wirusa. Mimo to nie zaobserwowano upośledzenia ekspresji wprowadzonych genów, która była średnio 20 razy wyższa niż w odpowiednim układzie niereplikatywnym, co wykazano transformując roślinne zawiesiny komórkowe.

### 3. Wektory ekspresyjne otrzymywane z wirusów o genomie zbudowanym z RNA

Największą grupę wirusów roślinnych stanowią wirusy o genomie zbudowanym z jednoniciowego RNA o polarności dodatniej. Na ich genomy składają się jedna (*monopartite*), dwie (*bipartite*) trzy (*tripartite*) lub cztery (*tetrapartite*) cząsteczki RNA. Oprócz białka płaszcza (BP) genomy tych wirusów kodują geny białek biorących udział w replikacji, w przemieszczaniu się wirusa z komórki do komórki, w rozprzestrzenianiu wirusa w roślinie, czy przenoszeniu wirusa pomiędzy roślinami przez owady czy nicienie. Replikacja tych wirusów wymaga obecności zależnej od RNA polimerazy RNA, która kodowana jest przez genom wirusa. Geny wirusów RNA wyrażane są w wyniku różnych strategii, takich jak supresja kodonu stop, zmiana fazy odczytu, tzw. *leaky scanning* czy ko- i posttranslacyjne procesowanie poliproteiny. „Wewnętrzne” geny wirusowe często wyrażane są przez subgenomowe (sg) RNA syntetyzowane z wewnętrznych promotorów transkrypcji. Olbrzymia różnorodność wirusów RNA czyni je doskonałym materiałem do poszukiwań wydajnych wektorów wirusowych zdolnych do wyrażania w roślinach obcych genów lub prezentacji fragmentów białek na powierzchni ich kapsydów.

W celu otrzymania wektora wirusowego należy najpierw sklonować jego cDNA, z którego można otrzymywać *in vitro* infekcyjne transkrypty lub infekcyjny, zaopatrzony w promotor 35S RNA CaMV, DNA wirusowy.

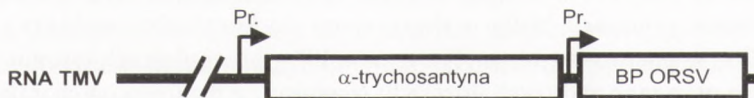
Jednym z pierwszych wirusów, w których podjęto próby klonowania obcych genów był wirus mozaiki tytoniu TMV (*tobacco mosaic virus*). Infekcyjny transkrypt tego wirusa otrzymywany z jego cDNA jest matrycą do syntezy białek odpowiedzialnych za replikację RNA wirusa, jego przemieszczanie i enkapsydację (4). Subgenomowy RNA, z którego translacji ulega białko płaszcza wyrażany jest z promotora znajdującego się na nici ujemnej wirusa (5). Wirus ten bardzo wydajnie infekuje rośliny i jego białko płaszcza akumuluje w ilości kilku miligramów na gram liścia. Zdolność do wydajnej produkcji białka wykorzystano do konstrukcji wektora wyrażającego enkefalinę w postaci fuzji (rys. 1) z genem BP w protoplastach tytoniu (6). Białko to udało się otrzymać w dużych ilościach. Niestety, ze względu na charakter konstruktu, w celu otrzymania czystej enkefaliny należało białko fuzyjne poddać trawieniu bromocyanem i dodatkowym procedurom oczyszczania.



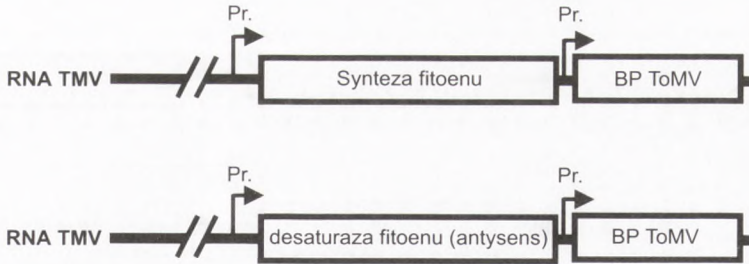
Rys. 1. Schemat konstruktu zawierającego fuzję białka płaszcza wirusa TMV z enkefaliną. Pr. – promotor transkrypcji subgenomowego RNA; enk – enkefalina

Inną strategię zastosowano w celu wydajnej produkcji z wektora na bazie TMV (7) białka inaktywującego rybosomy –  $\alpha$ -trychosantyny (8). Białko to jest wydajnym inhibitorem replikacji wirusa HIV-1 (*human immunodeficiency virus -1*) w układach *in vitro*. Gen  $\alpha$ -trychosantyny został wprowadzony do wektora wirusowego pod kontrolę promotora transkrypcji (rys. 2). Za rozprzestrzenianie wirusa w infekowanej roślinie odpowiedzialne jest białko płaszcza wirusa ORSV (*odontoglossum ringspot virus*) którego gen został wstawiony pod kontrolę dodatkowego promotora transkrypcji. Transfekowane rośliny tytoniu akumulowały po dwóch tygodniach  $\alpha$ -trychosantynę w ilości 2% całkowitej ilości rozpuszczalnych białek rośliny. Oczyszczona  $\alpha$ -trychosantyna zachowała wszystkie swoje właściwości strukturalne i funkcjonalne.

Wektory na bazie wirusów roślinnych mogą być wykorzystywane nie tylko do produkcji wybranych genów w roślinach, lecz także do wpływania w sposób precyzyjny na metabolizm rośliny będącej w określonym stadium rozwoju. Wykorzystując wektor otrzymany z wirusa TMV, podobny do opisanego, lecz zawierający gen białka płaszcza wirusa mozaiki pomidora ToMV (*tomato mosaic virus*), wyrażono w transfekowanych roślinach syntetazę fitoenu (karoten) oraz fragment genu desaturazy fitoenu w orientacji antysensowej (9) (rys. 3). Po dwóch tygodniach od transfekcji infekcyjnym transkrypcyjnym badano poziom karotenu w systemicznie zainfekowanych roślinach. Liście roślin transfekowanych wektorem niosącym gen syntetazy fitoenu posiadały intensywny, pomarańczowy kolor i akumulowały duże ilości fitoenu. Liście roślin transfekowanych wektorem, niosącym antysensowy fragment genu desaturazy były białe i także akumulowały dużo fitoenu. Na tym przykładzie widać jak umiejętne użycie wektora wirusowego może pomóc w modulacji ekspresji genów, ważnego szlaku metabolicznego rośliny.



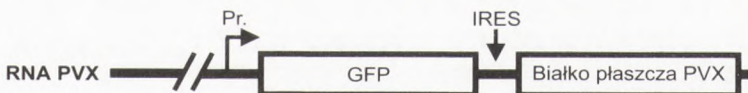
Rys. 2. Schemat konstruktu zawierającego gen  $\alpha$ -trychosantyny. Pod kontrolą dodatkowego promotora transkrypcji sgRNA znajduje się gen białka płaszcza ORSV. Pr. – promotor transkrypcji sgRNA; BP ORSV – białko płaszcza wirusa ORSV.



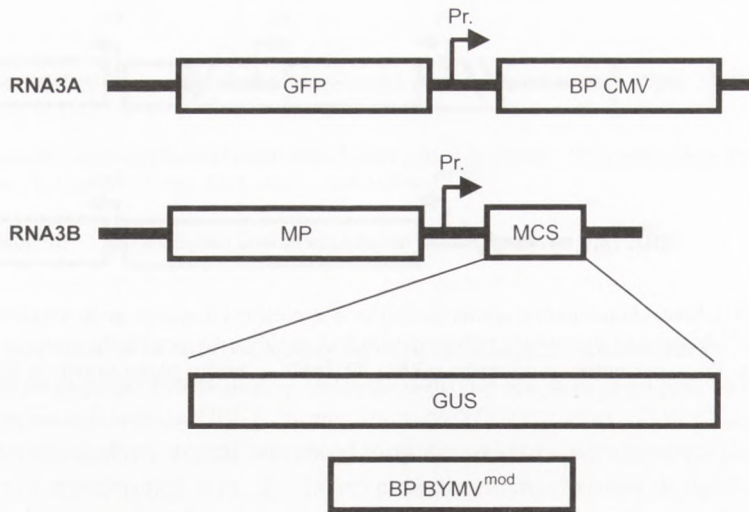
Rys. 3. Schemat konstrukcyjnych zawierających geny syntetazy i fragment genu desaturazy fitoenu. Pod kontrolą dodatkowego promotora transkrypcji sgRNA znajduje się gen białka płaszczka wirusa mozaiki pomidora. Pr. – promotor transkrypcji sgRNA; BP ToMV – białko płaszczka wirusa ToMV.

Innym wirusem często używanym jako wektor do ekspresji obcych białek jest wirus X ziemniaka (PVX – *potato virus X*). Aby zwiększyć jego przydatność jako wydajnego systemu klonowania i wyrażania genów zamiast dodatkowego promotora transkrypcji sgRNA wklonowano pomiędzy gen reporterowy białka zielonej fluorescencji (GFP – *green fluorescent protein*), a białko płaszczka wirusa sekwencję IRES (*internal ribosome entry site*) (10) (rys. 4). Taka konstrukcja zapewniła wydajną syntezę obcego genu w wyniku translacji pierwszego cistronu, natomiast potrzebny do przemieszczania z komórki do komórki gen BP wirusa powstawał w wyniku wewnętrznej inicjacji translacji za którą odpowiedzialna była sekwencja IRES. Analiza ekspresji genów w transfekowanych roślinach tytoniu i protoplastach wykazała wydajną syntezę obu białek. Dzięki takiemu podejściu zmniejsza się ryzyko rekombinacji homologicznej pomiędzy syntetyzowanymi podczas infekcji fragmentami genu wirusa RNA.

Inna grupa wektorów wirusowych może być otrzymywana z wirusów o genomach podzielonych. Taki system został stworzony na bazie wirusa mozaiki ogórka CMV (*cucumber mosaic virus*). Wirus ten zbudowany jest z trzech RNA genomowych z których pierwsze dwa (RNA1, RNA2) kodują białka funkcjonalne zaangażowane w replikację wirusa. RNA3 zawiera dwa geny, z których jeden koduje białko MP (*move-*



Rys. 4. Schemat konstruktu zawierającego dwucistronowy sgRNA z genem GFP i BP PVX. Pod kontrolą sekwencji IRES znajduje się gen białka płaszczka wirusa. Pr. – promotor transkrypcji sgRNA, BP ToMV – białko płaszczka wirusa ToMV.



Rys. 5. Schemat RNA3 CMV przekonstruowanego w komplementujący się wzajemnie układ RNA3A i RNA3B do wyrażania obcych genów. Pr. – promotor transkrypcji sgRNA; MCS – miejsce klonowania (*multicloning site*); GUS – gen  $\beta$ -glukuronidazy; BP BYMV<sup>mod</sup> – zmodyfikowane białko płaszczka wirusa BYMV.

ment protein) odpowiedzialne za przemieszczanie wirusa, drugi natomiast BP wirusa, które jest wyrażane z sgRNA. Do systemicznej infekcji rośliny niezbędna jest aktywność obu genów. Podstawą do konstrukcji nowego wektora było rozdzielenie RNA3 na dwie, komplementujące się funkcjonalnie, dwucistronowe komponenty (11) (rys. 5). RNA3A zawiera oprócz wyrażanego z promotora sgRNA białka płaszczka CMV także gen GFP umożliwiający bezpośrednie monitorowanie aktywności wirusowego wektora w roślinie. RNA3B oprócz białka odpowiedzialnego za przemieszczanie zawiera także miejsce MCS (*multicloning site*) do klonowania wybranych genów. W tym przypadku wyrażono z powodzeniem gen GUS, jak też zmodyfikowany gen BP BYMV (*bean yellow mosaic virus*) w zainfekowanych liściach. System ten jednak okazał się mało odporny na międzycząsteczkową rekombinację homologiczną pomiędzy RNA3A i RNA3B, co prowadziło do osłabienia wyrażania tych białek.

Wirusowe wektory roślinne mają również swoje szerokie zastosowanie jako systemy do ekspresji i prezentacji obcych białek będących antygenami stymulującymi powstawanie przeciwciał. Bardzo często same białka uważane za antygeny nie prowadzą do powstania na tyle wysokiego poziomu przeciwciał by mógł on warunkować odporność organizmu. Powstanie stabilnych wirusopodobnych cząsteczek w znaczący sposób wzmacnia „pobieranie” antygeny przez system immunologiczny.

W jednej z pierwszych prac (12), do sekwencji cDNA małej podjednostki białka płaszczka BP S (*small*) wirusa mozaiki wspanięgi azjatyckiej (CPMV – *cowpea mosaic virus*) wprowadzono fragment genu kodujący 20 aminokwasów epitopu VP1 BP wirusa

pryszczycy (FMDV – *foot and mouth disease virus*) w taki sposób, aby stanowił on insercję lub substytucję w obrębie klonowanego regionu. W obu przypadkach chimerowy konstrukt był wyrażany, jednak tylko substytucja fragmentu BP CPMV nie upośledziła składania wirionu. Zmodyfikowane białko S CPMV było zdolne do oddziaływania z przeciwciałami przeciwko FMDV. Praca ta przyczyniła się w sposób znaczący do rozwoju zastosowania wektorów wirusowych jako nośników antygenów, a wektor wirusowy stworzony na bazie CPMV posłużył następnie do wyrażenia takich epitopów jak VP1 HRV-14 (*human rhinovirus 14*), czy gp41 HIV-1 (13). Cząstki wirusa zawierające epitop VP1 HRV były użyte także do immunizacji królika i w efekcie wykazano ich immunogenność (13). Podobne prace były prowadzone też z wektorem wirusowym, pochodnym TMV, gdzie w obręb sekwencji DNA BP wirusa wprowadzono epitopy malarii (14). Wybrane fragmenty DNA kodujące epitopy zarodźca malarii wklonowano w część kodującą powierzchniową pętlę genu białka płaszczka, a także w region eksponowanego na powierzchni wirionu C-końca. Modyfikacje te nie miały wpływu na wydajność namnażania wirusa w transfekowanej roślinie, która była niewiele niższa niż w przypadku dzikiego wirusa.

Ciekawym nośnikiem 13-aminokwasowego epitopu z pętli V3 gp120 wirusa HIV-1 stał się wektor zrobiony z wirusa TBSV (*tomato bushy stunt virus*) (15). Fragment ten został podłączony do części C terminalnej BP wirusa, co umożliwiło jego zaprezentowanie w ilości 180 kopii na wirion. Również w tym przypadku nie zaobserwowano dużego upośledzenia w namnażaniu wirusa w transfekowanej roślinie. Konstrukt ten okazał się ponadto bardzo stabilny i epitop HIV-1 był wykrywany przez przeciwciała monoklonalne oraz surowicę od pacjentów zainfekowanych wirusem nawet po sześciu sekwencyjnych pasażach. Opisane właściwości pozwolą na użycie takich konstruktyw w diagnostyce HIV-1. Wykazano też, że myszy szczepione prezentującym epitop wirionem TBSV indukowały specyficzną odpowiedź na HIV.

#### 4. Perspektywy

Konstrukcja wektorów wirusowych jest dziedziną wirusologii molekularnej roślin, która będzie się w najbliższych latach intensywnie rozwijać. Otrzymywane z infekcyjnych klonów wektory wirusowe przyczynią się do postępu w biologii molekularnej wirusów i roślin oraz znajdą zastosowanie w szeroko rozumianej biotechnologii. Przede wszystkim wektory te, podobnie jak wirusy z których są otrzymywane, mają olbrzymi potencjał produkcyjny. Naturalną cechą tych układów jest zahamowanie metabolizmu gospodarza i przestawienie go na syntezę własnych komponentów. Umiejętne wykorzystanie tej właściwości pozwoli niewątpliwie przekształcać zdrowe dobrze rozwinięte rośliny w żywe, tanie bioreaktory zdolne do produkcji nie tylko wirusa i jego białek, ale także tych składników o które zostanie on wzbogacony. Wystarczy spojrzeć na kalkulacje przeprowadzone dla tytoniu. W intensywnej fazie wzrostu roślina jest zdolna do akumulacji 26 g świeżej masy z metra kwa-

dratowego w ciągu dnia. W optymalnych warunkach z tytoniu można uzyskać rocznie 2000 kg białek z 4 ha przy nakładzie finansowym rządu 10 000 USD (za Ray C. Long, North Carolina State University). Łatwo sobie wyobrazić, ile określonego białka może wyprodukować roślina transfekowana wirusem wyrażającym obcy gen w ilości 0,4-2% całkowitych białek w roślinie. Większość obecnie prowadzonych prac skupia się na zwiększeniu wydajności i stabilności stosowanych wektorów.

Należy przypuszczać, że w najbliższych latach będziemy mieli niejedno zaskakujące rozwiązanie w wykorzystaniu wirusów roślinnych jako systemu do ekspresji genów.

## Literatura

1. Brisson N., Paszkowski J., Penswick J. R., Gronenborn B., Potrykus I., Hohn T., (1984), *Nature*, 310, 511-514.
2. Lefebvre D. D., Miki B. L., Laliberte J. F., (1987), *Bio/Technology*, 5, 1053-1056.
3. Matzeit V., Schaefer S., Kammann M., Schalk H. J., Schell J., Gronenborn B., (1991), *Plant Cell*, Mar. (3), 3, 247-258.
4. Dawson W. O., Lehto K. M., (1990), *Adv. Virus Research*, 38, 307-342.
5. Miller W. A., Dreher T. W., Hall T. C., (1985), *Nature*, (Jan. 3-9); 313(5997), 68-70.
6. Takamatsu N., Watanabe Y., Yanagi H., Meshi T., Shiba T., Okada Y., (1990), *FEBS Letters*, (Aug. 20), 269(1), 73-76.
7. Donson J., Kearney C. M., Hilf M. E., Dawson W. O., (1991), *PNAS*, 88, 7204-7208.
8. Kumagai M. H., Turpen T. H., Weinzettl N., Della-Cioppa G., Turpen A. M., Donson J., Hilf M. E., Grantham G. L., Dawson W. O., Chow T. P., Piatak Jr. M., Grill L. K., (1993), *PNAS*, 90, 427-430.
9. Kumagai M. H., Donson J., Della-Cioppa G., Harvey D., Hanley K., Grill L. K., (1995), *PNAS*, 92, 1679-1683.
10. Toth R. L., Chapman S., Carr F., Santa Cruz S., (2001), *FEBS Letters*, 489, 215-219.
11. Zhao Y., Hammond J., Tousignant M. E., Hammond R. W., (2000), *Archives of Virology*, 145 11, 2285-229.
12. Usha R., Rohll J. B., Spall V. E., Shanks M., Maule A. J., Johnson J. E., Lomonosoff G. P., (1993), *Virology*, 197, 366-374.
13. Porta C., Spall V. E., Loveland J., Johnson J., E., Barker P. J., Lomonosoff G. P., (1994), *Virology*, 202, 949-955.
14. Turpen T. H., Reinl S. J., Charoenvit Y., Hoffman S. L., Fallarme V., Grill L. K., (1995), *Biotechnology (N Y)*, (Jan. 13), 1, 53-57.
15. Joelson T., Akerblom L., Oxelfelt P., Strandberg B., Tomenius K., Morris T. J., (1997), *Journal of General Virology*, 78, 1213-1217.