



Augu vīrusi un biotehnoloģija

Andris Zeltiņš, Dr.biol.

LU Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs

09.12. 2005

Plāns

IEVADS.

AUGU VĪRUSU VISPĀRĪGS
RAKSTUROJUMS.

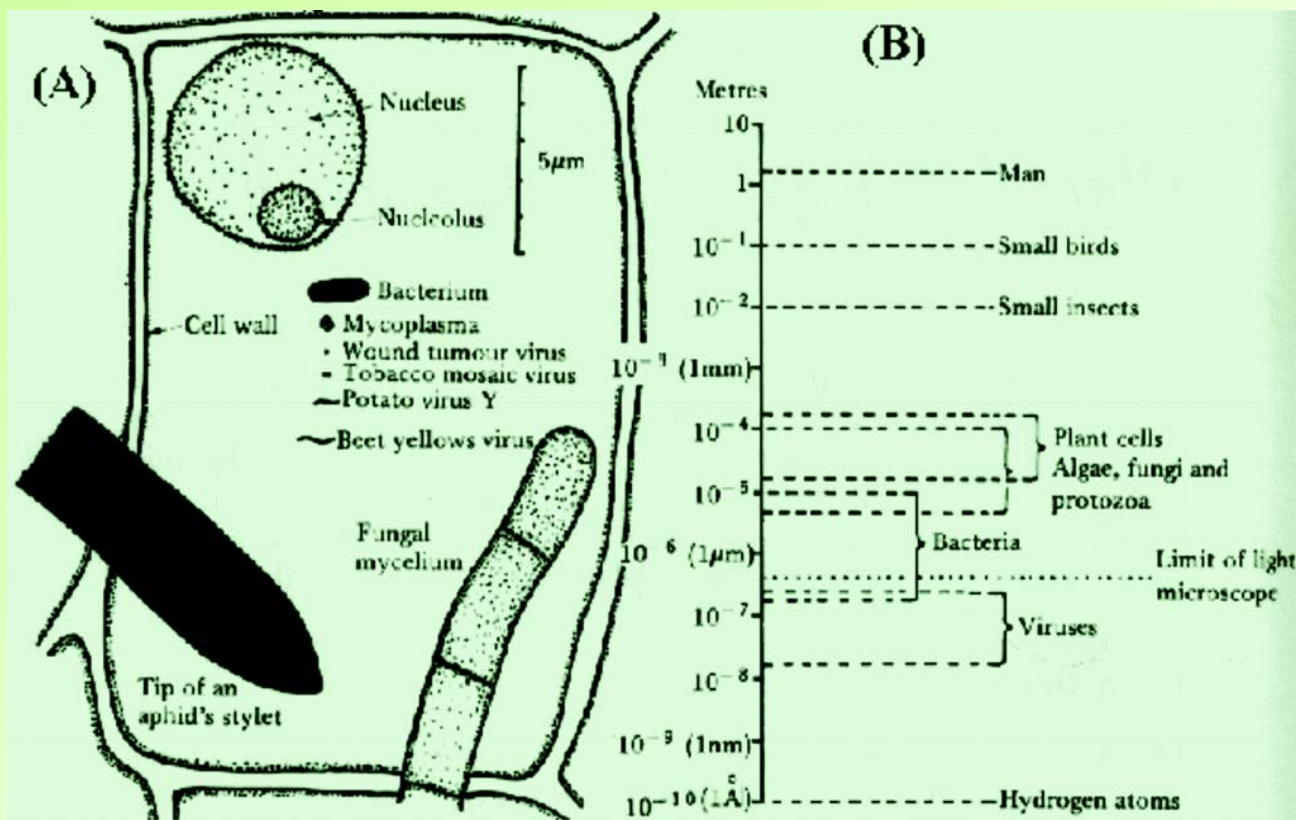
TEHNOLOĢISKIE ASPEKTI:

- vīrusu identificēšana un vīrusu nesaturošu augu iegūšana;
- augu vīrusi un rekombinanto proteīnu iegūšana;
- bioloģiskās drošības aspekti.

KOPSAVILKUMS.

Augu vīrusi un biotehnoloģija

IEVADS.



www.plantvirusdetection.com

Dažādu augu kaitēkļu un patogēnu izmēru salīdzinājums

IEVADS.

Vīrusi :

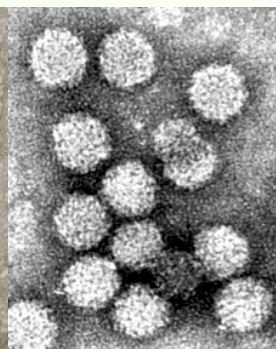
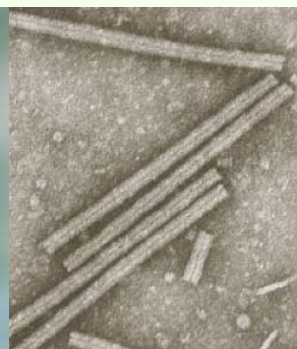
- lat. “*virus – inde*”,
Martinus Beijerinck ieviests termins, 1898
- ultramikroskopiski parazitāri, kas inficē organismu šūnas,
- obligāti intracellulāri parazitāri,
- satur nukleīnskābi (RNS vai DNS),
- apvalks – proteīns(i), dažkārt lipīdi, glikoproteīni.

Augu vīrusi un biotehnoloģija

IEVADS.

Augu vīrusu raksturīgās īpašības :

- neinficē cilvēku un dzīvnieku organismus,
- augu vīrusiem nav identificēti receptori,
- infekcija izplatās no auga uz augu ar mehānisku bojājumu starpniecību (piem.,insekti),
- morfoloģija – nūjiņveida, izometriski vai neregulāras struktūras.



IEVADS.

Augu virusoloģijas vēsture – svarīgākie notikumi :

Pirmā augu vīrusu dokumentācija –
XVII gs. Holandes gleznotāju – floristu darbos



IEVADS.

Augu virusoloģijas vēsture – svarīgākie notikumi :

1886 - Adolf Mayer -
apraksta tabakas “mozaīkas
slimību” (die Mosaikkrankheit).
Tiek parādīta arī slimības pārnese
ar inficētu augu sulu uz veselajiem
augiem



IEVADS.

Augu virusoloģijas vēsture – svarīgākie notikumi :

1892 - Dmitrijs Ivanovskis -
parāda, ka tabakas mozaīkas
izraisītājs iziet cauri filtriem, kuri
aiztur baktērijas



IEVADS.

Augu virusoloģijas vēsture – svarīgākie notikumi :

1898 - Martinus Beijerinck –
demonstrē, ka mozaīkas
izraisītājs nav baktērija, bet
“infekciozs dzīvs šķidrums” -
contagium vivum fluidum;
- secina, ka mozaīku neizraisa
toksīni.

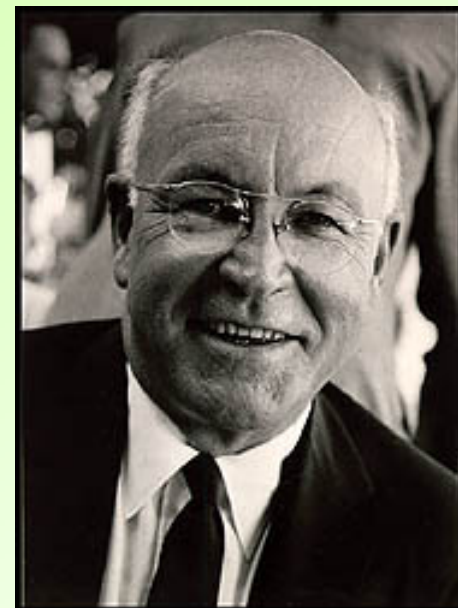


IEVADS.

Augu virusoloģijas vēsture – svarīgākie notikumi :

1935 - W. M. Stanley –

- izolē un attīra kristālisku vielu no inficētām tabakas, lapām, kas izsauc tabakas mozaīkas simptomus veselajos augos,
- secina, ka mozaīkas aģents ir autokatalītisks, pašreplīcējošs proteīns,
- Nobela prēmija ķīmijā (1946.g.).



IEVADS.

Augu virusoloģijas vēsture – svarīgākie notikumi :

1939 - Kausche *et al.*-
identificē tabakas mozaīkas vīrusu
(TMV) ar elektronu mikroskopa
palīdzību

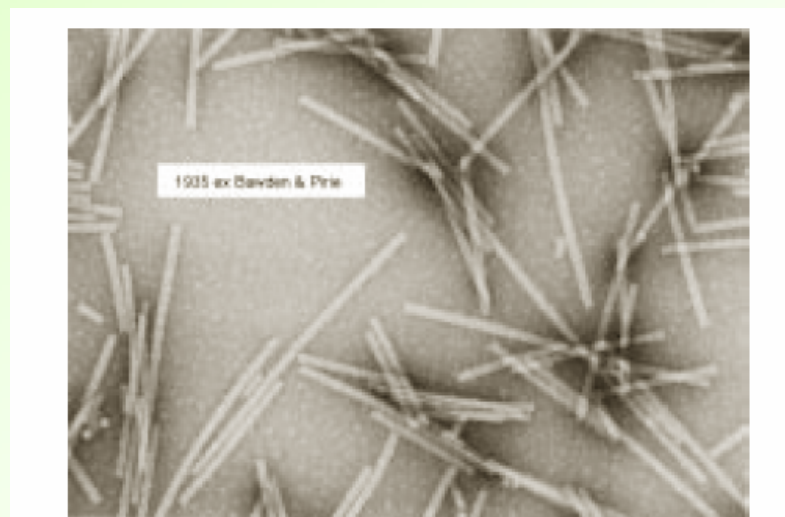


Figure 4. Electron micrograph of a preparation of TMV particles, purified by F. C. Bawden & N. W. Pirie in 1935 and examined after storage for 50 years. The negatively stained particles are 18 nm in diameter.

TMV research milestones B. D. Harrison and T. M. A. Wilson

IEVADS.

Augu virusoloģijas vēsture – svarīgākie notikumi :

1954 - Watson izvirza ideju par TMV daļiņas spirālveida struktūru

1956 - Caspar & Franklin atrod RNS TMV vīrusu daļiņās

1956 - Gierer & Schramm parāda, ka attīrīta TMV RNS ir infekcioza augiem

1960 - Anderer *et al.*; Tsugita *et al.* noskaidro TMV virsmas proteīna (CP) aminoskābju sekvenci

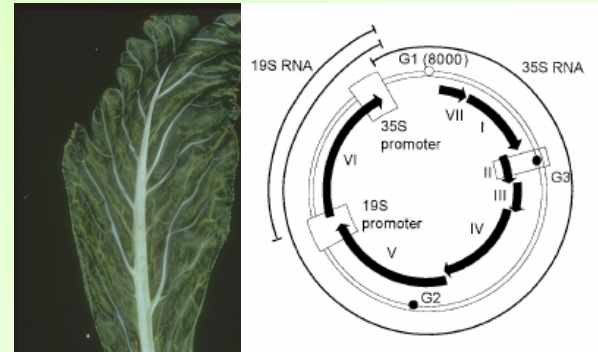


Augu vīrusi un biotehnoloģija

IEVADS.

Augu virusoloģijas vēsture – svarīgākie notikumi :

1980 – Franck *et al.*
publicē puķukāpostu mozaīkas
vīrusa (CaMV ~8000 bp) pilna
garuma dubultspirāliskās DNS
sekvenci;



1982 – Goelet *et al.*
noskaidro tabakas mozaīkas
vīrusa (TMV ~6400 nt) pilna
garuma RNS sekvenci.

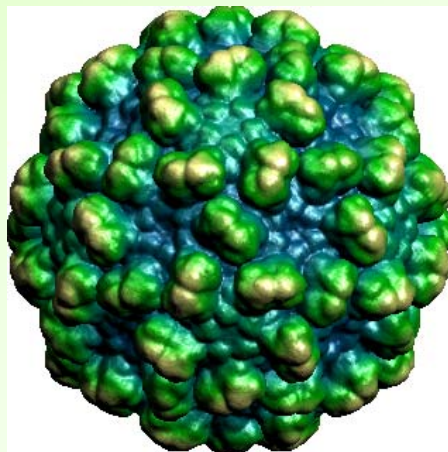


IEVADS.

Augu virusoloģijas vēsture – svarīgākie notikumi :

1978 - Harrison *et al.*

Pirmā atomu struktūra, kas noteikta vīrusa daļiņām. TBSV (*Tomato bushy stunt virus*) kristālu struktūra noteikta 2.9 Å izšķirtspējas. Darbs uzsākts 1965. gadā Caspar laboratorijā.



TBSV

IEVADS.

Augu virusoloģijas vēsture – svarīgākie notikumi :

1986 - Namba & Stubbs

iegūst datus par TMV daļiņu 3D struktūru pie 3.6 Å izšķirtspējas

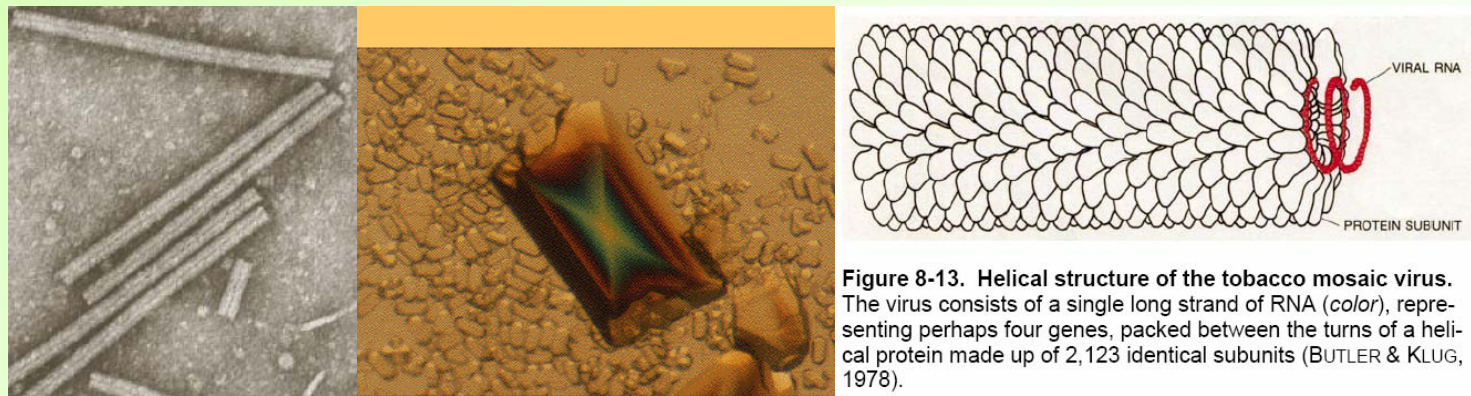


Figure 8-13. Helical structure of the tobacco mosaic virus. The virus consists of a single long strand of RNA (*color*), representing perhaps four genes, packed between the turns of a helical protein made up of 2,123 identical subunits (BUTLER & KLUG, 1978).

Tobacco mosaic virus crystal (Photo credit: NASA)

AUGU VĪRUSU VISPĀRĪGS RAKSTUROJUMS:

- Klasifikācija un nosaukumu veidošana,
- augu vīrusu dzīves cikls:
 - - vīrusu pārnese starp augiem,
 - - vīrusu replikācija un gēnu ekspresijas stratēģijas,
 - - vīrusu transports starp augu šūnām.

AUGU VĪRUSU VISPĀRĪGS RAKSTUROJUMS

Nosaukumu veidošana:

- tipiska saimniekauga nosaukums + raksturīgākā fenotipiskā pazīme, ko izraisa vīruss:

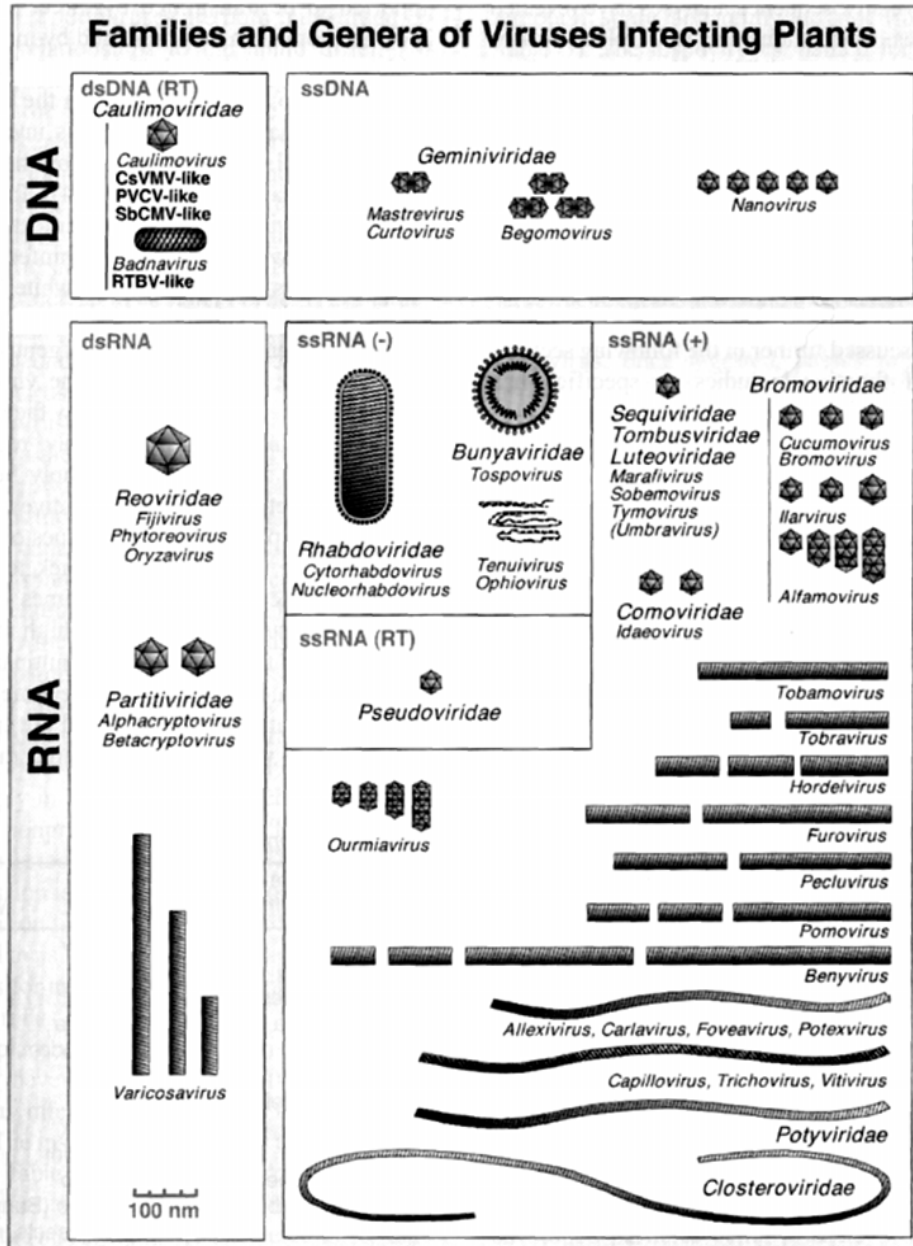
tabakas mozaīkas vīruss

- saīsinājumi:

bet **Tabakas Mozaīkas Vīruss – TMV,**
Tomātu Mozaīkas Vīruss – ToMV

- vīrusu taksonomisko grupu nosaukumus veido no to tipiskāko pārstāvju nosaukumiem:

Tobacco Mosaic Virus - Tobamovirus



Klasifikācija:

Klasificē pēc vīrusa iekapsidētās nukleīnskābes:

- dsDNA;
- ssDNA;
- dsRNA;
- ssRNA;
- - (+) ķēde;
- - (-) ķēde;
- - RT

≈ 3700 zināmi vīrusi;

≈ 1000 - augu vīrusi,

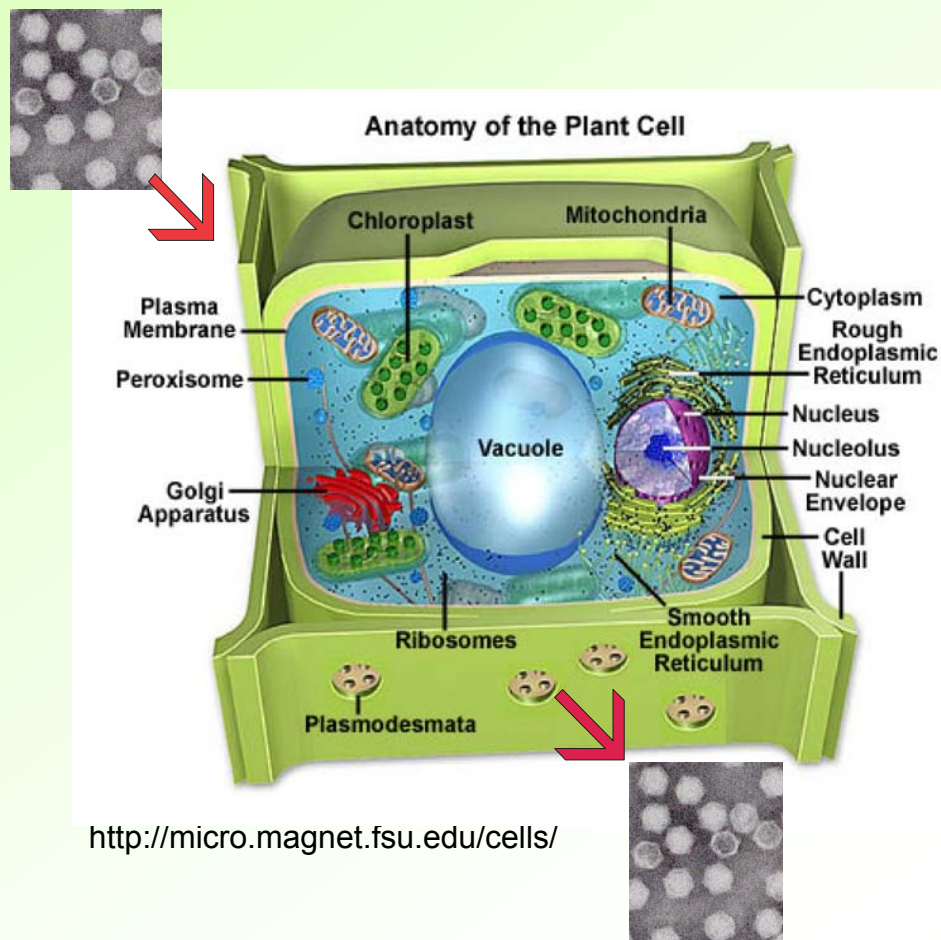
no tiem līdz 90% ss(+)RNS vīrusi.

(7th report of International Comitee on Taxonomy of Viruses (2000))

AUGU VĪRUSU VISPĀRĪGS RAKSTUROJUMS

Augu vīrusu dzīves cikls

- vīrusu pārnese starp augiem,
- vīrusu replikācija un gēnu ekspresijas stratēģijas,
- vīrusu pārnese starp šūnām,
- augu šūnu atbilde uz vīrusa infekciju,

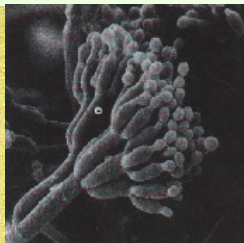


AUGU VĪRUSU VISPĀRĪGS RAKSTUROJUMS

Augu vīrusu dzīves cikls

Vīrusu pārnese starp augiem

- Augu vīrusi iekļūst šūnās *tikai* caur audu mehāniskajiem bojājumiem;
- Nav dzīvnieku vīrusiem raksturīgā receptoru mehānisma;
- Vektori – vīrusu pārnēsātāji:
 - - insekti (>80%);
 - - mikroskopiskās sēnes;
 - - nematodes;
 - - mehāniska pārnese;
 - - sēklas;
 - - putekšņi.

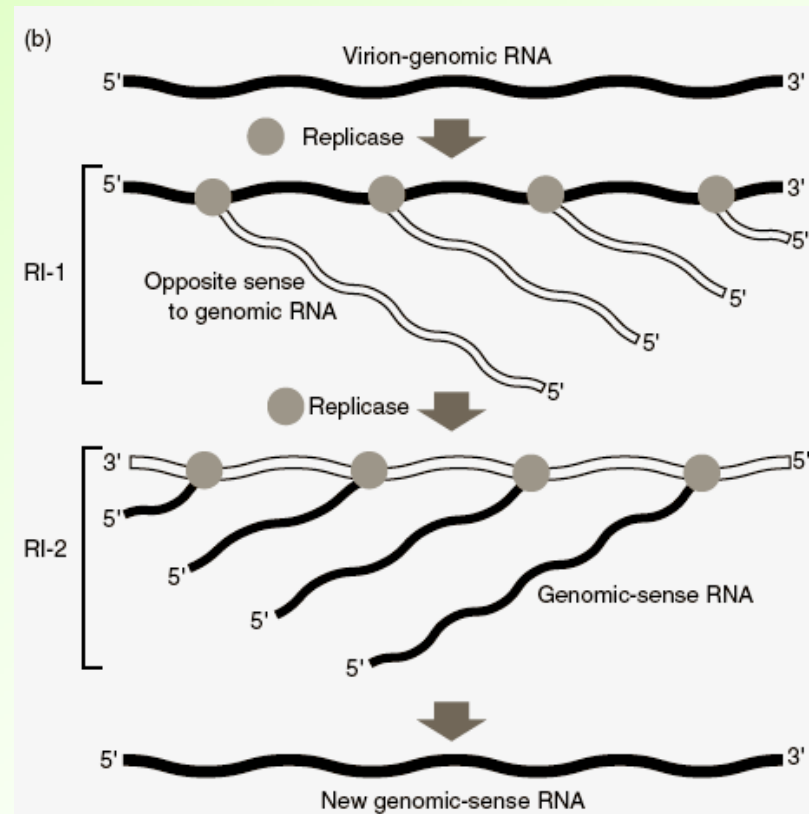
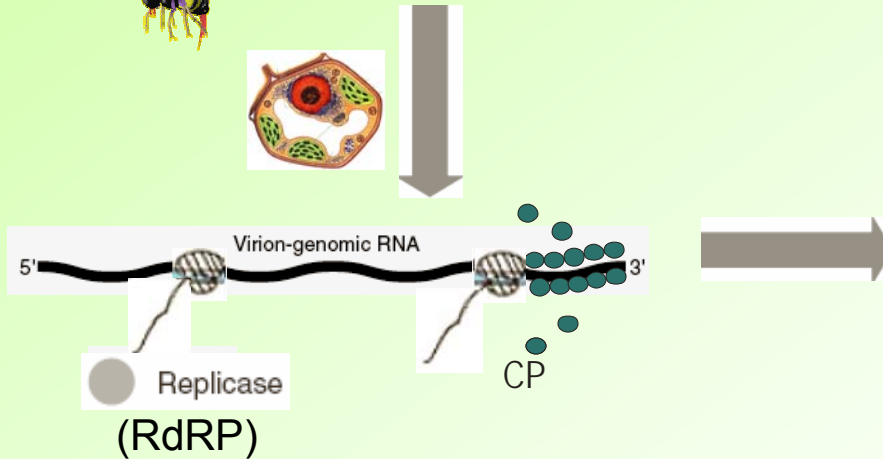


Augu vīrusi un biotehnoloģija

AUGU VĪRUSU VISPĀRĪGS RAKSTUROJUMS

Augu vīrusu dzīves cikls

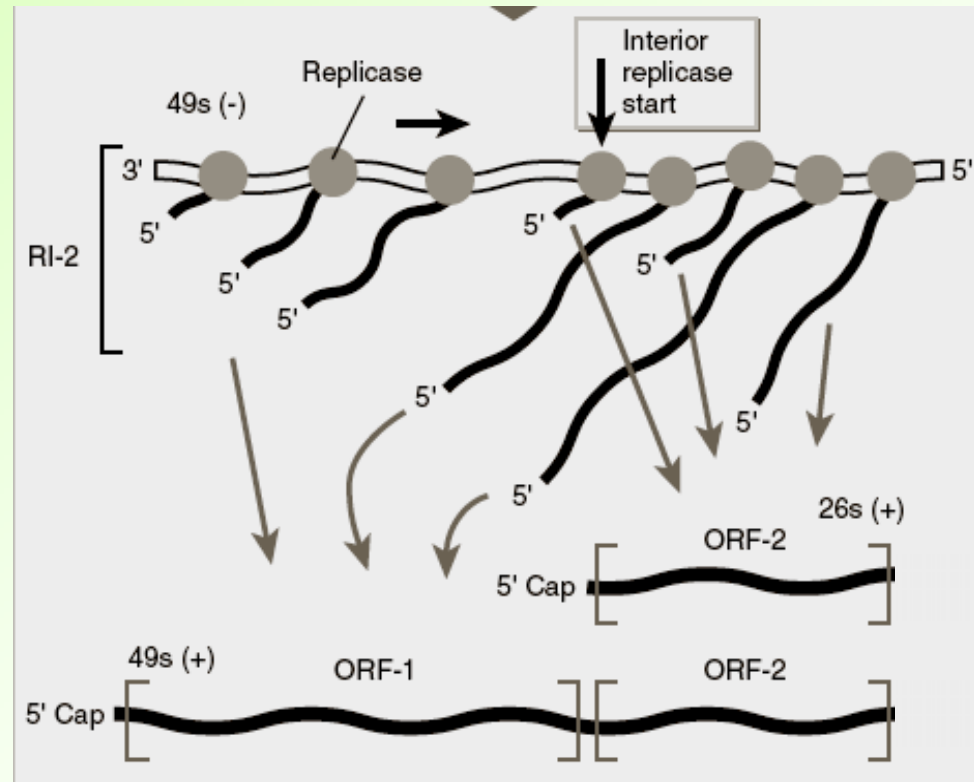
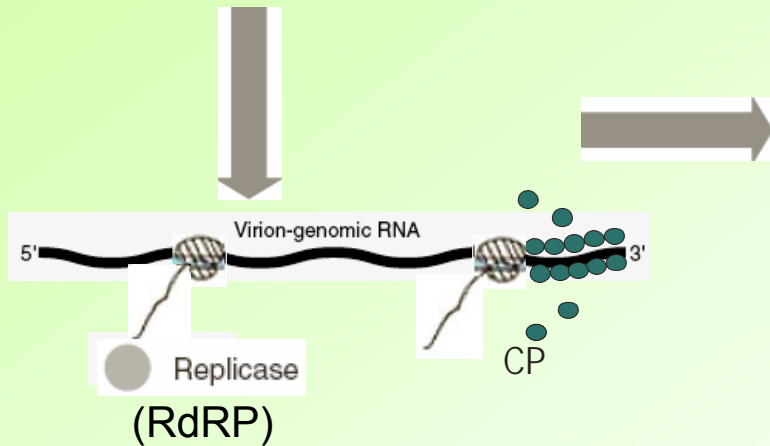
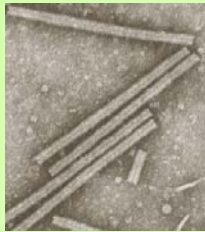
Vīrusu replikācija (ss(+))RNA vīrusi – TMV piemērs



AUGU VĪRUSU VISPĀRĪGS RAKSTUROJUMS

Augu vīrusu dzīves cikls

Vīrusu subgenomiskās RNS replikācija (ss(+)RNA vīrusi - TMV piemērs)



AUGU VĪRUSU VISPĀRĪGS RAKSTUROJUMS

Augu vīrusu dzīves cikls

Vīrusu subgenomiskās RNS replikācija / gēnu ekspresijas stratēģija
(ss(+))RNA vīrusi – TMV piemērs)

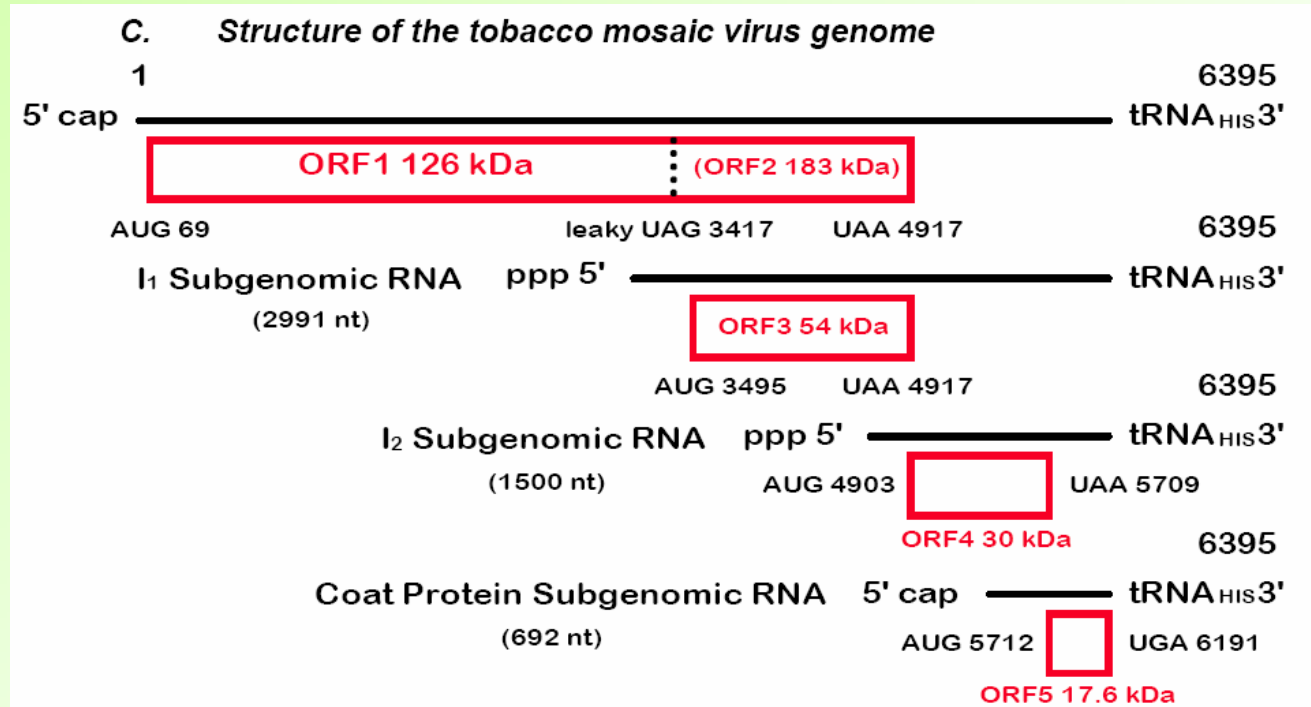
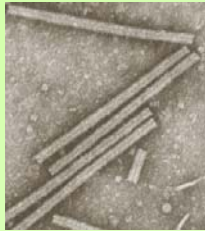
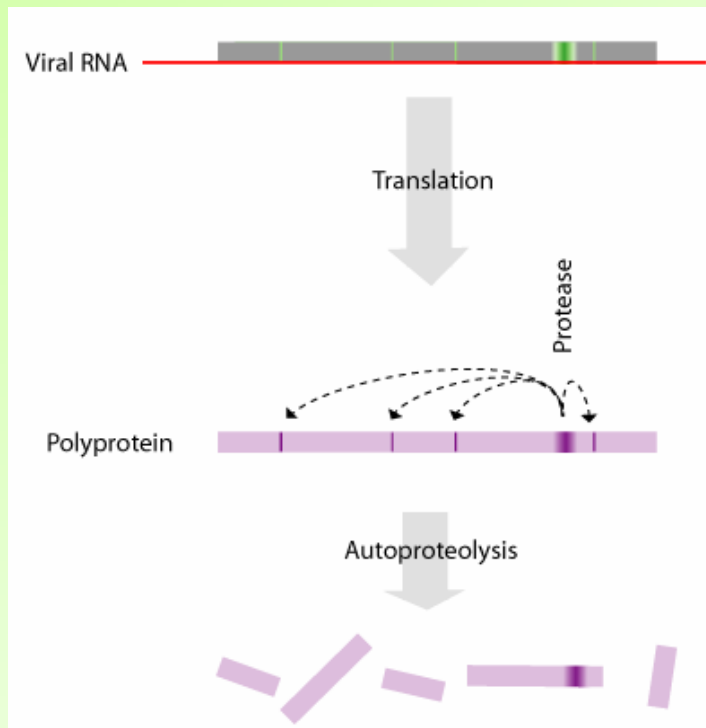


Figure 8-14. Structure of the tobacco mosaic viral genome. ORF1 (and ORF2) encode the polymerase. The product of ORF3 is uncertain. ORF4 encodes a protein necessary for cell-to-cell movement of the virus. ORF5 encodes the coat protein (LEVY *et al.*, 1994, p. 53).

AUGU VĪRUSU VISPĀRĪGS RAKSTUROJUMS

Augu vīrusu dzīves cikls

Gēnu ekspresijas stratēģijas – poliproteīna stratēģija



Ole Søgaard Lund; <http://www.bioinvision.dk/>

- Augu vīrusi kodē 3 – 12 proteīnus;
- Internāla proteāze šķel poliproteīnu pa *consensus* saitiem (5-7 AA);
- Pēc šķelšanas (autoproteolīze) subvienības funkcionē neatkarīgi.

Piemēri (*Potyviridae*):

- TEV (*Tobacco etch virus*)
- PVY (*Potato virus Y*)
- PPV (*Plum pox virus*)
- WSMV (*Wheat streak mosaic virus*)

AUGU VĪRUSU VISPĀRĪGS RAKSTUROJUMS

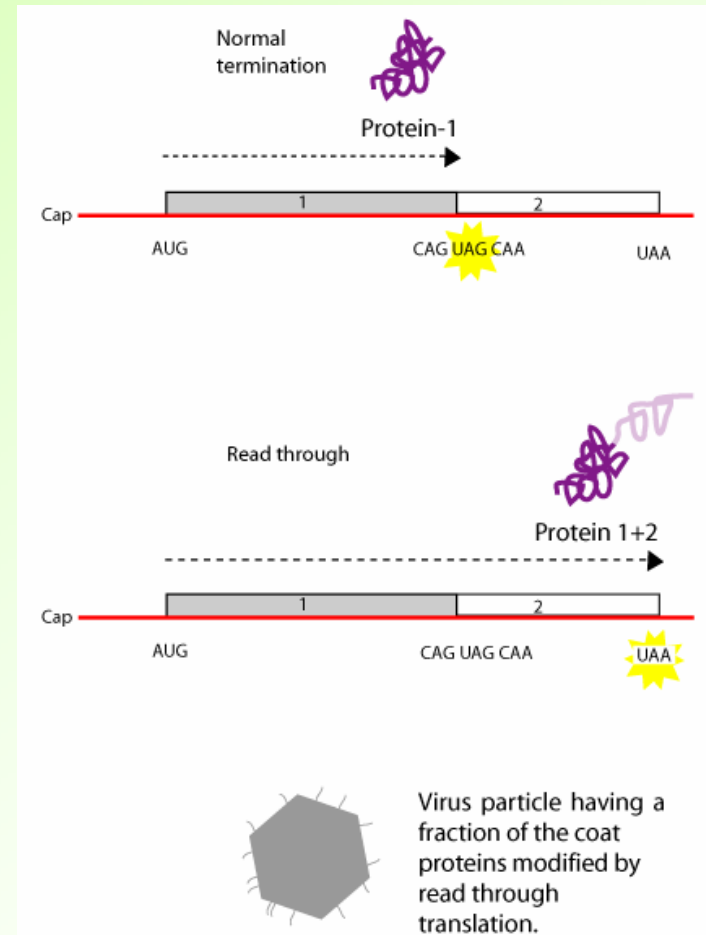
Augu vīrusu dzīves cikls

Gēnu ekspresijas stratēģijas –
stop-kodonu caurlasīšana

UAA – 100%
UGA < 100%
UAG < 100%
CAG **UAG** CAA
(1-10%)

Piemēri :

- PVX (*Potato virus X*)
- TMV (*Tobacco mosaic virus*)



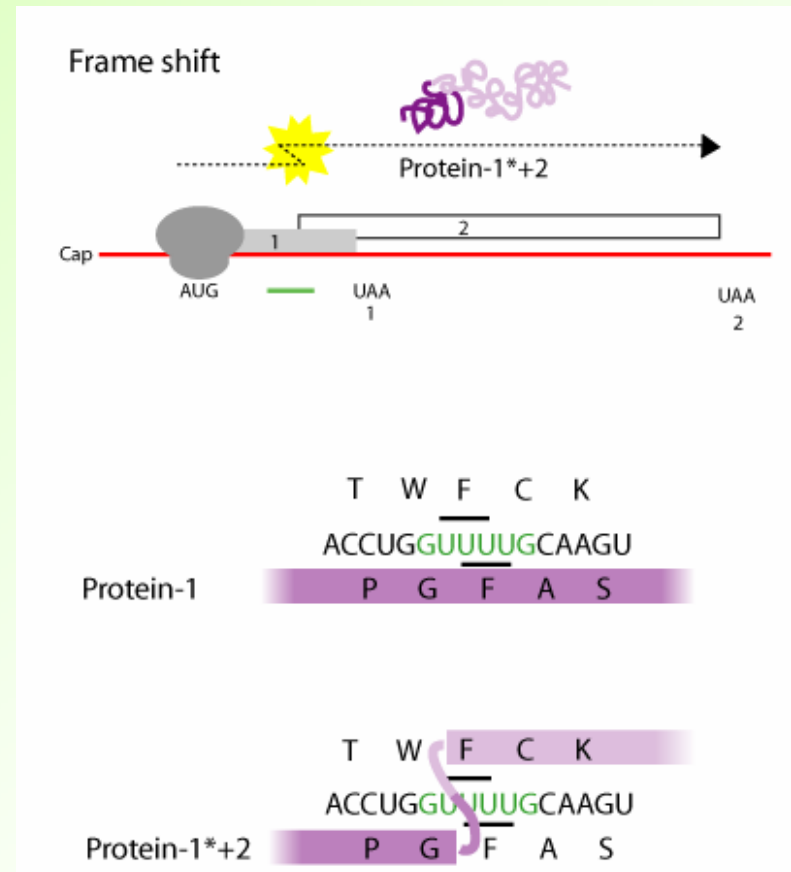
AUGU VĪRUSU VISPĀRĪGS RAKSTUROJUMS

Augu vīrusu dzīves cikls

Gēnu ekspresijas stratēģijas – translācijas nobīde (*frame shift*)

Piemēri :

- Sobemovirus (SBMV, RYMV, etc.)
- Luteovirus (BYDV)
- Polerovirus (PLRV)

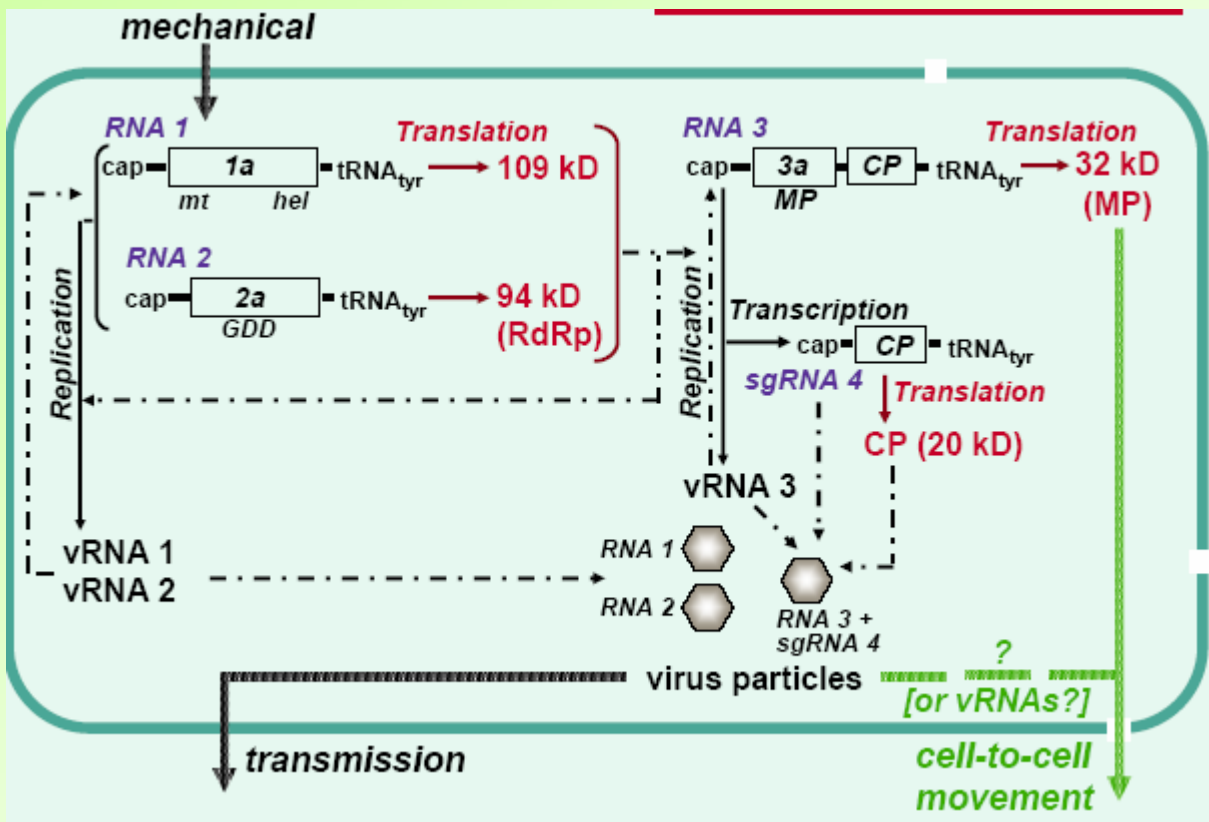


Augu vīrusi un biotehnoloģija

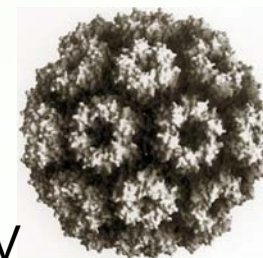
AUGU VĪRUSU VISPĀRĪGS RAKSTUROJUMS

Augu vīrusu dzīves cikls

Gēnu ekspresijas stratēģijas – genoms sadalīts vairākos fragmentos (*multipartite*)



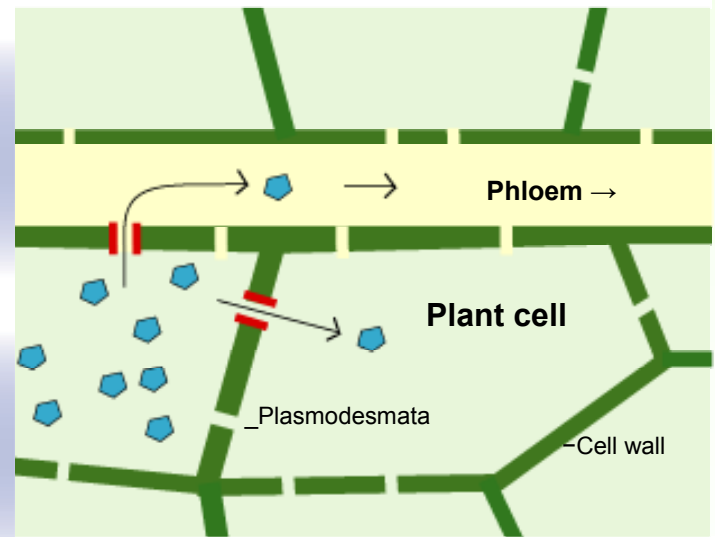
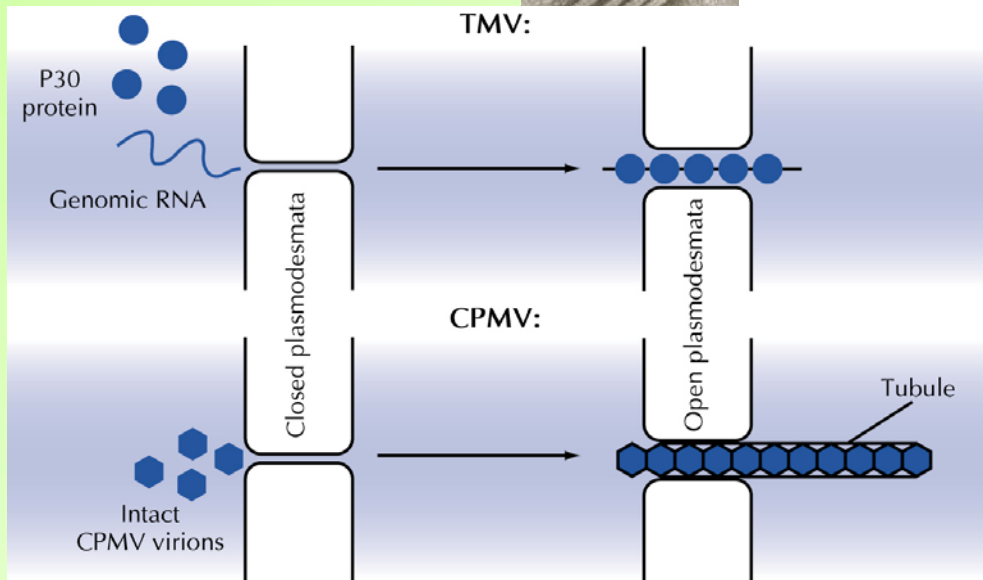
Piemēri :
-*Bromoviridae*
(BMV, ApMV, etc.)



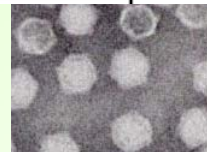
AUGU VĪRUSU VISPĀRĪGS RAKSTUROJUMS

Augu vīrusu dzīves cikls

Vīrusu transports starp augu šūnām



©Academic Press, 2000



Ole Søgaard Lund; <http://www.bioinvision.dk/>

AUGU VĪRUSU VISPĀRĪGS RAKSTUROJUMS

Augu vīrusu dzīves cikls

Augu šūnu atbilde uz vīrusu infekciju - fenotipiskās pazīmes

- augšanas aizkavēšanās;
- šūnu nekroze;
- hipoplāzija – mozaīkas pazīmes šūnu aizkavētas augšanas rezultātā;
- hiperplāzija – pātrinātas šūnu dalīšanās rezultātā morfoloģiski netipisku auga daļu veidošanās.

Alfaalfa mosaic virus



Potato Leafroll Virus



Apple mosaic virus



Pea enation mosaic virus



AUGU VĪRUSU VISPĀRĪGS RAKSTUROJUMS

Augu vīrusu dzīves cikls

Augu šūnu atbilde uz vīrusu infekciju - šūnu / molekulu līmenis:

Vīrusu inficētu augu šūnu transkriptomas analīze – 444 (!) faktoru izmaiņas (*Arabidopsis* / CMV rezistoma – Marathe et al., 2004);

Hipersensitīva atbilde uz vīrusa infekciju, kas izpaužas:

- PR-proteīnu veidošanās (PR - *pathogenesis related*);
- paaugstināta šūnu sienu fenolsaturošo metabolītu sintēze;
- peroksīdus saturošu komponentu veidošanās;
- fitoaleksīnu sintēze;
- salicilskābes atvasinājumu veidošanās (starpaugu signālmolekulas (?) – metilsalicilāti)
- Vīrusa inducēta “gēnu klusēšana” (gene silencing).



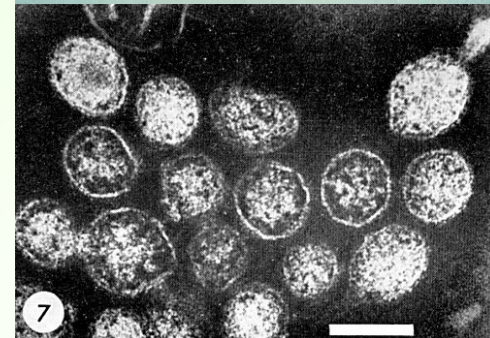
Ar CMV (Cucumber mosaic virus) inficēti gurķu augi

TEHNOLOĢISKIE ASPEKTI

Vīrusu nozīme tradicionālajā lauksaimniecībā - **ievērojami ražas zudumi:**

- kopā 60×10^9 \$/gadā (?);
- TSWV radītie zaudējumi līdz 1×10^9 \$/gadā

Tomato spotted wilt virus (TSWV):
plašs saimnieku spektrs – tomāti, kartupeļi,
tabaka, ziedaugi etc. (> 600 (!) sugas)



TEHNOLOĢISKIE ASPEKTI

Vīrusu identificēšana

Fenotipiskās pazīmes

Alfaalfa mosaic virus



Potato Leafroll Virus



Apple mosaic virus



Pea enation mosaic virus



Var kalpot par identifikācijas pirmo stadiju – nepieciešami papildus testi!

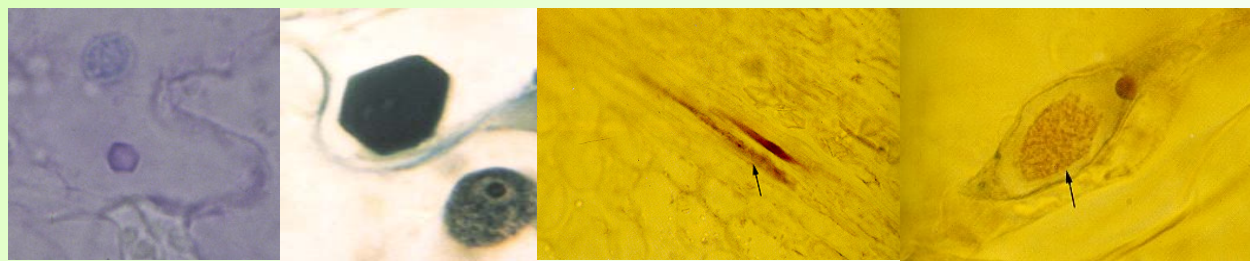
Augu vīrusi un biotehnoloģija

TEHNOLOĢISKIE ASPEKTI

Vīrusu identificēšana

Gaismas mikroskopa analīzes

Izmanto krāsvielas, kas iekrāso RNS vai DNS
(piem. Azure A)



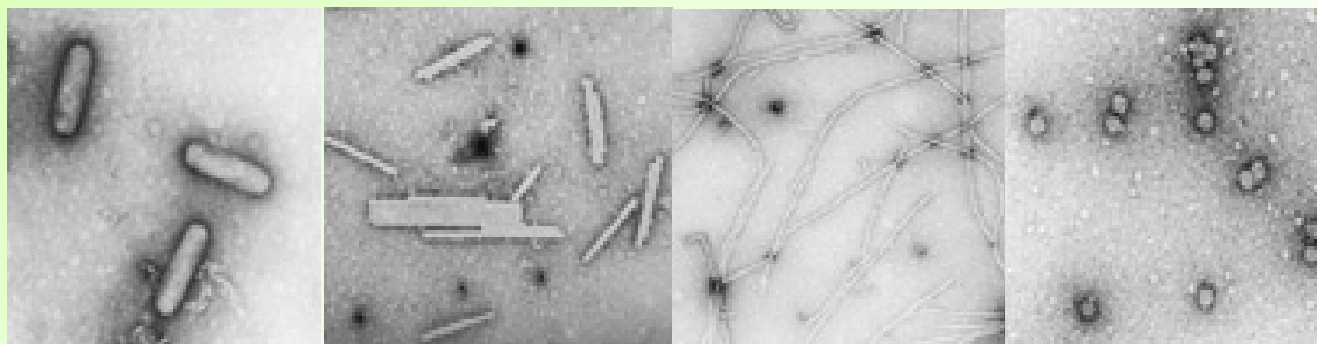
Ierobežotas izmantošanas iespējas – vīrusu koncentrācijai
augu šūnās jābūt ļoti augstai, kad veidojas vīrusu agregāti vai pat kristāliski veidojumi.
Nepieciešami papildus testi.

Augu vīrusi un biotehnoloģija

TEHNOLOĢISKIE ASPEKTI

Vīrusu identificēšana

Elektronu mikroskopa analīzes



Ierobežotas izmantošanas iespējas – lietojama, ja vīrusu koncentrācija augu šūnās vidēja vai augsta; nepieciešami papildus apstiprinoši testi

TEHNOLOĢISKIE ASPEKTI

Vīrusu identificēšana

Indikatoraugu inficēšana



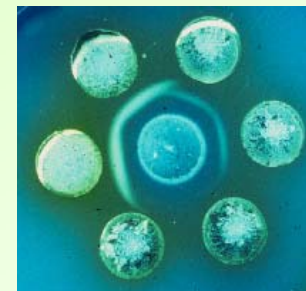
Ierobežotas izmantošanas iespējas:

- lēna metode, indikatoraugi var uzrādīt simptomus pat pēc vairākām nedēļām;
- ne visiem vīrusiem iespējama pārnese ar mehāniskas inokulācijas palīdzību;
- ne visiem vīrusiem zināmi piemēroti laboratorijas testaugi.

TEHNOLOĢISKIE ASPEKTI

Vīrusu identificēšana

Imunoloģiskās metodes



Imūndifūzijas testi



ELISA testi

Specifiskas un ātras metodes, ko plaši lieto komerciālajā praksē.

Ierobežojošie faktori:

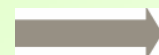
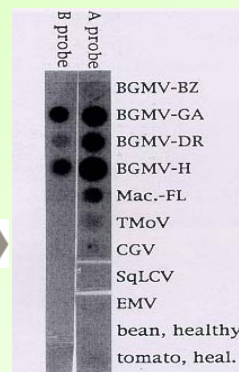
- nepieciešamas specifiskas antivielas pret pārbaudāmo vīrusu;
- vīrusa koncentrācijai ekstraktos jābūt salīdzinoši augstai

Augu vīrusi un biotehnoloģija

TEHNOLOĢISKIE ASPEKTI

Vīrusu identificēšana

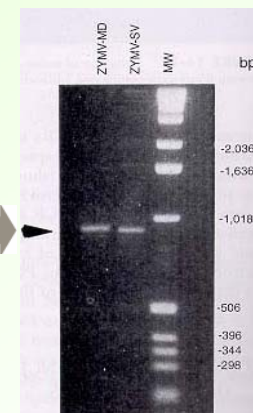
DNS / RNS analīzes



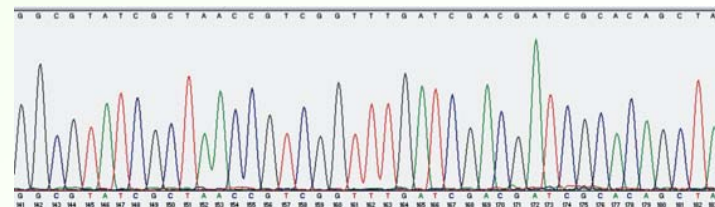
Nukleīnskābju hibridizācija

Ļoti specifiska un ātra metode, plaši lieto komerciālajā praksē. Ierobežojošie faktori:

- nepieciešama dārga aparatūra un speciāli iekārtotas telpas;
- nereti darbietilpīga metodes optimizācija.



(RT)-PCR testi



TEHNOLOĢISKIE ASPEKTI

Vīrusu nesaturošu augu iegūšana

- Augu stādmateriāliem starptautiskai izplatīšanai (tirdzniecībai) jābūt brīviem no patogēniem (vīrusi, baktērijas, fitopatogēnās mikroskopiskās sēnes utt.);
- Ar vīrusiem inficētus augus nav iespējams “izārstēt”!
- Vīrusu inficētu augu sakņu meristēmas un augu terminālie dzinumi reizēm ir brīvi no vīrusiem;
- Ja augus inkubē pie netipiskas, paaugstinātas temperatūras (35° – 42°C), vīrusa koncentrācija augos samazinās - *termoterapija*;
- Apvienojot meristēmu iegūšanu ar termoterapiju ir iespējams iegūt no vīrusiem brīvus augus.



TEHNOLOĢISKIE ASPEKTI

Vīrusu nesaturošu augu iegūšana

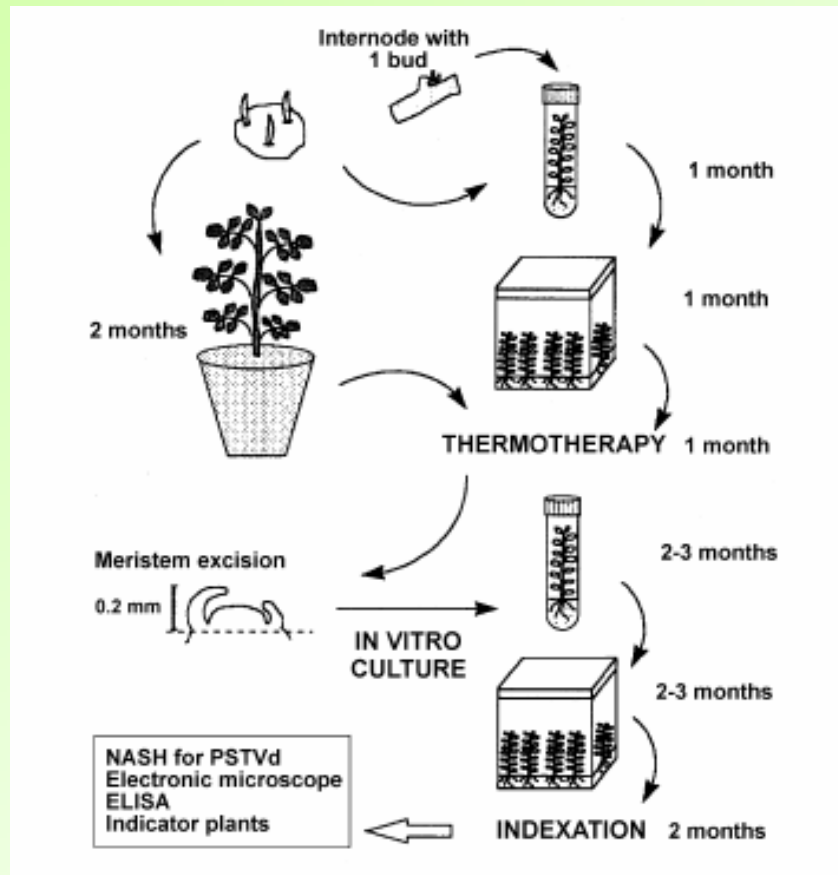


Figure 1. Schematic representation of virus eradication process for potato.

TEHNOLOĢISKIE ASPEKTI

Vīrusu nesaturošu augu iegūšana

Augu aizsardzības pasākumi

Infekcijas avota likvidēšana;

- - jāiznīcina inficēti augi, nezāles,
- - augu kultūru audzēšanas vietu maiņa,
- - augsnes nomaiņa siltumnīcās,
- - instrumentu un piederumu sterilizācija
(piem., $\text{Ca}(\text{OCI})_2$ – *Chlorox* + Tween20).
- - vīrusu brīvs jeb **indeksēts** stādmateriāls,



TEHNOLOĢISKIE ASPEKTI

Vīrusu nesaturošu augu iegūšana

Augu aizsardzības pasākumi

Vīrusu pārnēsātāju ietekmes izslēgšana vai samazināšana;

- audzēšanas vietā nav attiecīgo insektu,
- stādīšanas / ražas novākšanas laiks nesakrīt ar insektu aktivitāti,
- pesticīdu izmantošana,
- citi augu aizsardzības līdzekļi (mehāniskas barjeras, kukaiņēdāji, utt.),



TEHNOLOĢISKIE ASPEKTI

Vīrusu nesaturošu augu iegūšana

Augu aizsardzības pasākumi

Vīrusu rezistentu augu selekcija;

- dabiskā selekcija,
- gēnu inženierija (rezistences gēni, virsmas proteīnu un vīrusa transporta proteīnu gēni)



Transgenic (PRSV CP) papaya inoculated with PRSV from Hawaii (left) and nontransgenic papaya inoculated with Papaya Ringspot Virus from Hawaii (right). Note the resistance of transgenic papaya.

TEHNOLOĢISKIE ASPEKTI

Augu vīrusi un rekombinanto proteīnu iegūšana

Biotehnoloģijas industrijas intereses:

- perspektīva - rekombinanto biofarmaceutisko līdzekļu tirgus 2010. gadā sastādīs līdz 35% no kopējā un ienesīs līdz 20 miljardu USD lielu peļņu;
- bioreaktoru kapacitātes pieaug: 2005. gada pasaules prognozes - 2 milj. litru;
- bioreaktoru kapacitātes nākotnē var izrādīties nepietiekošas, lai nodrošinātu klīniskās izpētes fāzes izgājušo preparātu ražošanu veselības aizsardzības tirgus vajadzībām.

ALTERNATĪVA:

Annu. Rev. Phytopathol. 2002. 40:45-74
doi: 10.1146/annurev.phyto.40.021102.150133
Copyright © 2002 by Annual Reviews. All rights reserved

MAKING AN ALLY FROM AN ENEMY: Plant Virology and the New Agriculture

Gregory P. Pogue, John A. Lindbo, Stephen J. Garger, and
Wayne P. Fitzmaurice

*Large Scale Biology Corporation, 3333 Vaca Valley Pkwy, Vacaville, CA 95688;
e-mail: greg.pogue@lsbc.com, john.lindbo@lsbc.com, steve.garger@lsbc.com,
wayne.fitzmaurice@lsbc.com*

Augu vīrusi un biotehnoloģija

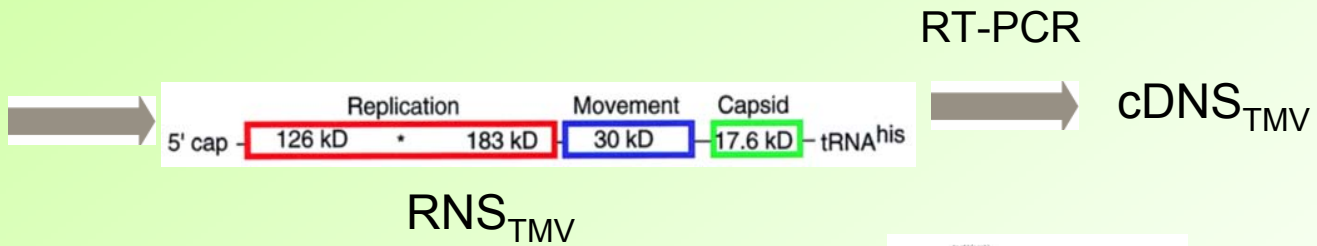
TEHNOLOĢISKIE ASPEKTI

Augu vīrusi un rekombinanto proteīnu iegūšana

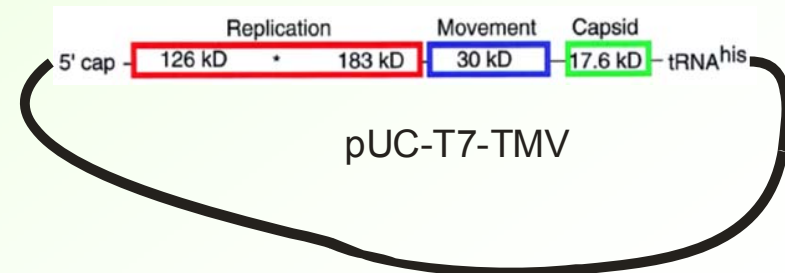
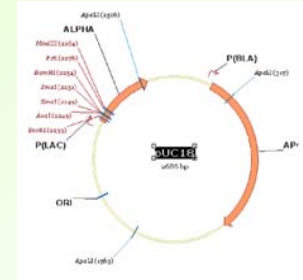
Augu vīrusa vektora konstruēšana



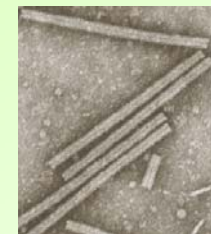
TMV



RNS_{TMV}



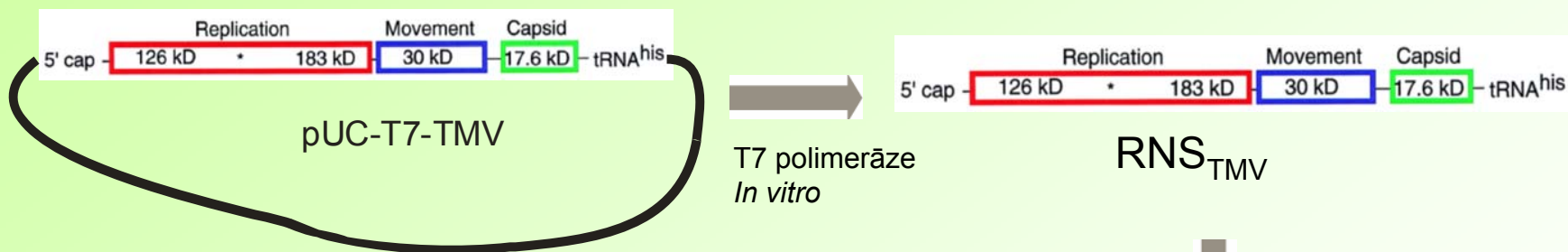
Augu vīrusi un biotehnoloģija



TEHNOLOĢISKIE ASPEKTI

Augu vīrusi un rekombinanto proteīnu iegūšana

Augu vīrusa vektora pārbaude



Ballistiska
inficēšana

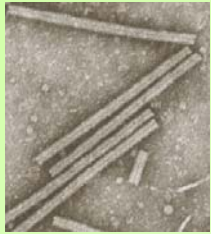
Mehāniska
inficēšana

Augu vīrusi un biotehnoloģija

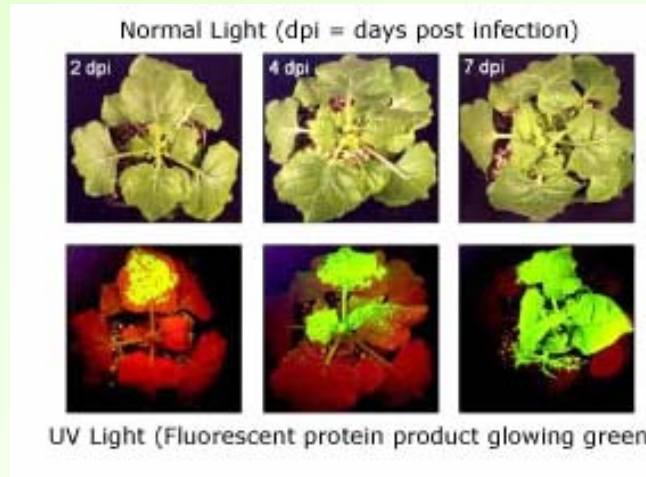
TEHNOLOĢISKIE ASPEKTI

Augu vīrusi un rekombinanto proteīnu iegūšana

Rekombinanta augu vīrusa vektora konstruēšana un pārbaude – TMV/GFP



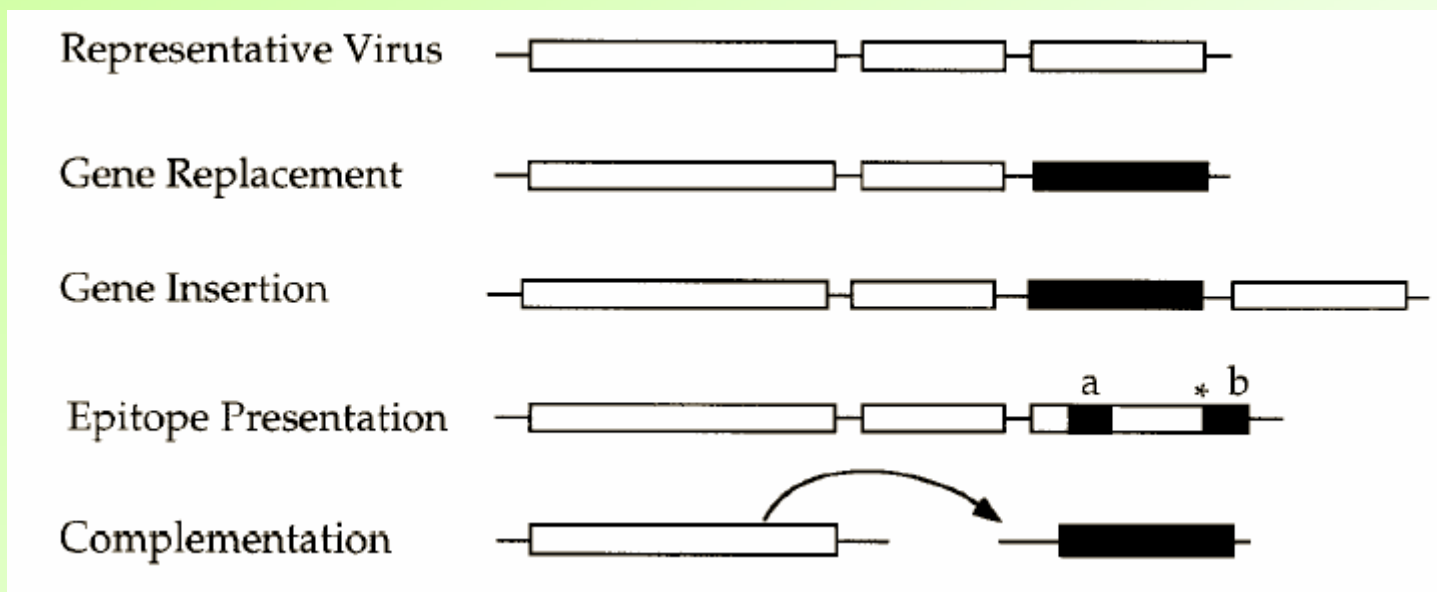
↓
rRNS_{TMV}



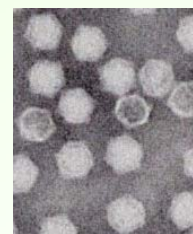
Augu vīrusi un biotehnoloģija

TEHNOLOĢISKIE ASPEKTI

Augu vīrusi un rekombinanto proteīnu iegūšana



SCHOLTHOF, SCHOLTHOF & JACKSON, 1996



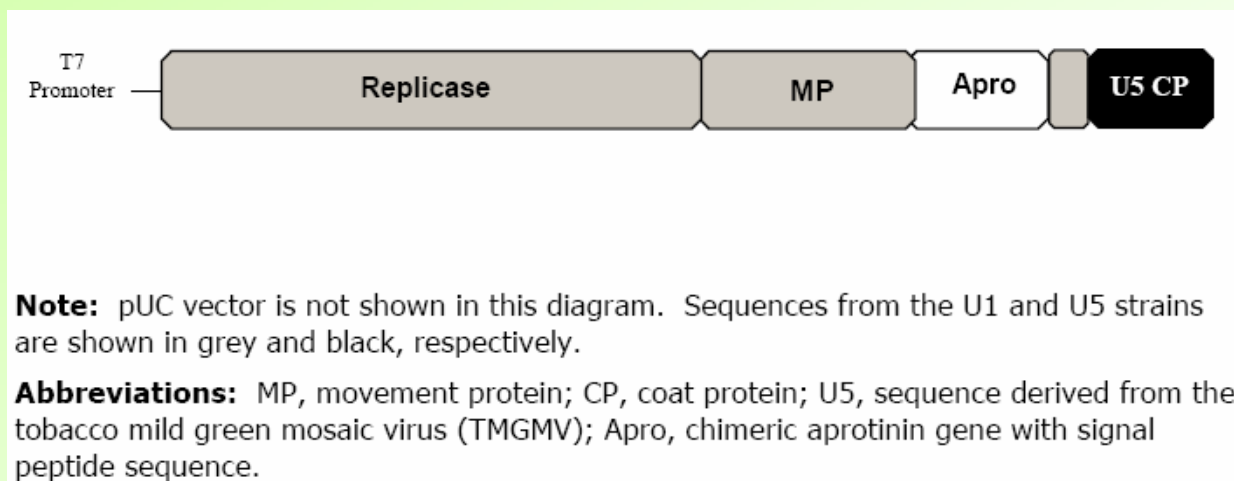
TEHNOLOĢISKIE ASPEKTI

Augu vīrusi un rekombinanto proteīnu iegūšana

Large Scale Biology Corporation pieredze



Augu vīrusa (TMV) vektors aprotinīna komerciālai ražošanai no augu biomasas



Aprotinīns – serīna proteāzes inhibitors, lieto sirds ķirurģijā asiņošanas samazināšanai un pēcoperāciju iekaisuma procesu ierobežošanai

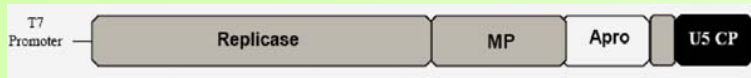
Augu vīrusi un biotehnoloģija

TEHNOLOĢISKIE ASPEKTI

Augu vīrusi un rekombinanto proteīnu iegūšana

Large Scale Biology Corporation pieredze

Aprotinīna ražošana no augu biomasas / TMV vektora platforma



rTMV RNS transkripts



$$10 \mu\text{g rTMV} \times \sim 37000 \text{ augi/ha} = 370 \text{ mg rTMV} / 370 \text{ l}$$

TEHNOLOĢISKIE ASPEKTI

Augu vīrusi un rekombinanto proteīnu iegūšana

Large Scale Biology Corporation pieredze

Aproteīna ražošana no augu biomasas / TMV vektora platforma

~30d
→



Biomass Homogenization



Extract Clarification



TEHNOLOĢISKIE ASPEKTI

Augu vīrusi un rekombinanto proteīnu iegūšana

Large Scale Biology Corporation pieredze

Aprotinīna ražošana no augu biomasas / TMV vektora platforma

Chromatography/Ultrafiltration

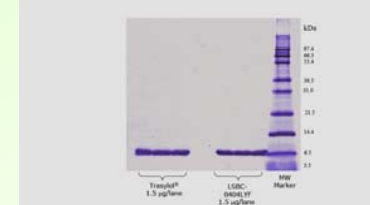


Finish and Fill

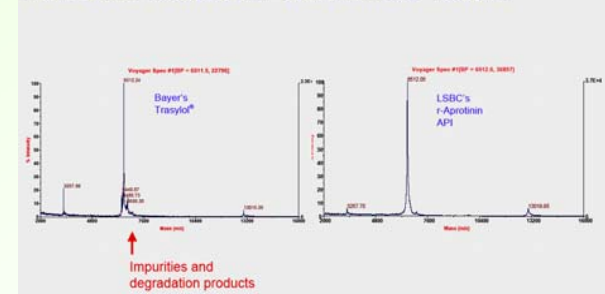


Kvalitātes kontrole

SDS-Page Analysis of r-Aprotinin and Trasylol®



MALDI-TOF Analysis of r-Aprotinin and Trasylol®



TEHNOLOĢISKIE ASPEKTI

Augu vīrusi un rekombinanto proteīnu iegūšana

Large Scale Biology Corporation pieredze

Potenciālās malārijas vakcīnas ražošana no augu biomasas (TMV vektora platforma)

TABLE 4 Large-scale manufacture of antimalarial TMV291 coat fusion and product analysis

Tobacco variety	A	B	C
Biomass and expression			
Acres harvested	0.25	0.25	0.4
kg Biomass harvested	2106	1957	2709
kg Biomass/acre	8424	7828	6773
mg TMV291/kg biomass	123	104	97
g TMV291/acre	1036	814	656

~ 2.5 kg vakcīnas kandidāta no 1 ha!



TEHNOLOĢISKIE ASPEKTI

Augu vīrusi un rekombinanto proteīnu iegūšana

Large Scale Biology Corporation pieredze - nepieciešamā laika plānojums



TEHNOLOĢISKIE ASPEKTI

Bioloģiskās drošības aspekti

- augu vīrusi un to vektori nav infekciozi cilvēkiem un dzīvniekiem;
- augu vīrusu vektori ir augu kaitēkļi! (*USDA-Plant protection & quarantine Regulations*)
- jāsaņem atļauja darbam ierobežotos siltumnīcu / lauka apstākļos;
- jāsniedz detalizētas atskaites par izmēģinājumiem;
- vispārīgi secinājumi:
 - - konstruējot vektorus izmantošanai brīvā dabā var būt nepieciešams ievadīt mutācijas, kas izslēdz vektoru izplatīšanās iespējas ar insektu, sēņu vai nematožu starpniecību,
 - - jākonstruē vektori, kuri var kalpot par marķieriem lauka izmēģinājumos (piem., ar GFP marķierģēnu),
 - - atkarībā no rezultātiem jāpieņem lēmums par ierobežotu izmantošanu siltumnīcas apstākļos / brīvā dabā.

Pogue *et al.* (2002)



KOPSAVILKUMS

Klasifikācija:

≈ 1000 zināmu augu vīrusu,
no tiem līdz 90% ss(+)RNS vīrusi.

Augu vīrusu raksturīgās īpašības :

- neinficē cilvēku un dzīvnieku organismus,
- augu vīrusiem nav identificēti receptori,
- infekcija izplatās no auga uz augu ar mehānisku bojājumu starpniecību (piem.,insekti),

KOPSAVILKUMS

Augu vīrusu dzīves cikls

Augu vīrusi izmanto sekojošas galvenās gēnu ekspresijas stratēģijas:

- Subgenomiskās RNS sintēze un proteīnu translācija no sg-RNS;
- Poliproteīna sintēze un autoproteolīze;
- “*Stop*”- kodonu caurlasīšana;
- translācijas rāmja nobīde - “*frameshift*”;
- genoma sadalījums pa vairākiem fragmentiem (*multipartite*).

Visas šīs stratēģijas nodrošina maksimālu genoma izmantošanu vīrusa dzīves ciklam nepieciešamo proteīnu sintēzei.

KOPSAVILKUMS

Augu vīrusu dzīves cikls

- vīrusam nokļūstot auga šūnās, vīrusa nukleīnskābe atbrīvojas no apvalka;
- auga šūnas proteīnu sintēzes mašīnērija tiek izmantota vīrusa kodēto proteīnu ekspresijai - var novest pie fenotipisko pazīmju parādīšanās;
- vīrusa genoms replicējas un tiek sintezēts liels daudzums virsmas proteīna molekulu, kuras *iepako* vīrusa nukleīnskābi;
- veidojas jaunas vīrusa daļiņas, kas tiek pārnestas uz blakus esošajām šūnām ar transporta (movement) proteīnu starpniecību.

KOPSAVILKUMS

Augu vīrusu dzīves cikls

Augu vīrusi pārvietojas no šūnas uz šūnu ar transporta jeb “*movement*” proteīnu palīdzību caur modificētiem jeb izmēros izmainītiem plasmodesmas kanāliem:

- RNS / proteīnu kompleksu formā (TMV);
- pilnībā izveidotu daļiņu formā (CPMV).

KOPSAVILKUMS

Augu šūnu atbilde uz vīrusu infekciju

- augšanas aizkavēšanās;
- morfoloģiski netipisku auga daļu veidošanās;
- hipersensitīva atbilde uz infekciju, kas izpaužas kā simtiem faktoru izmaiņas augu gēnu ekspresijas kopainā – transkriptomā;

KOPSAVILKUMS

Vīrusu identificēšana

Metožu kopums, kas ietver sevī:

- fenotipisko pazīmju identificēšanu,
- indikatoraugu inficēšanu un analīzi,
- molekulārās metodes:
 - - imunoloģiskās metodes – ELISA un imūndifūzijas testi,
 - - vīrusu nukleīnskābju analīzes – hibridizācijas, RT-PCR un sekvenēšanas metodes.

KOPSAVILKUMS

Vīrusu nesaturošu augu iegūšana

- Ar vīrusiem inficētus augus nav iespējams “izārstēt”!
- Apvienojot meristēmu iegūšanu ar termoterapiju ir iespējams iegūt no vīrusiem brīvus augus.

KOPSAVILKUMS

Augu vīrusi un rekombinanto proteīnu iegūšana

- No augu vīrusiem var tikt izveidoti gēnu vektori rekombinanto proteīnu ekspresijai augu šūnās;
- Klonējot rekombinatos proteīnu gēnus augu vektoros, vissekmīgākā ir izrādījusies gēnu *insercijas* stratēģija;
- Rekombinanto proteīnu ekspresija augos no vīrusu gēnu vektoriem var dot tehnoloģiski nozīmīgus iznākumus un var aizstāt tradicionālo rekombinanto mikroorganismu tehnoloģiju vai arī transgēno augu izmantošanu.

KOPSAVILKUMS

Bioloģiskās drošības aspekti

- augu vīrusi un to vektori nav infekciozi cilvēkiem un dzīvniekiem;
- augu vīrusu vektori ir augu kaitēkļi ! Var ietekmēt apkārtējo vidi !
- jāsaņem atļauja darbam ierobežotos siltumnīcu / lauka apstākļos;
- jāsniedz detalizētas atskaites par izmēģinājumiem;
- atkarībā no rezultātiem jāpieņem lēmums par rekombinanto augu vīrusu ierobežotu izmantošanu tehnoloģiskām vajadzībām siltumnīcas apstākļos / brīvā dabā.



Augu vīrusi un biotehnoloģija

Andris Zeltiņš, Dr.biol.

LU Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs

09.12. 2005