



Wirusowe wektory ekspresyjne typu RNA

Anna Siek, Marek Figlerowicz

Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

RNA virus-derived expression vectors

Summary

Large-scale production of pure, properly folded and biologically active proteins is a requirement of industry as well as of basic sciences. Although many expression systems have been developed, not all of them entirely comply with the conditions of the synthesis of therapeutics. The application of plants as bioreactors seems to be a promising solution for transient expression of recombinant genes. The article reviews some strategies used in the construction of RNA virus-derived vectors risen for this purpose.

Key words:

plant RNA viruses, RNA vectors, transient expression.

1. Wstęp

Wymóg produkcji dużych ilości białek o wysokim stopniu czystości, odpowiedniej konformacji i aktywności biologicznej, wynika zarówno z potrzeb przemysłu jak i nauk podstawowych. Już dziś nowoczesna medycyna jest na etapie testów klinicznych wielu białkowych terapeutyków, takich jak szczepionki, hormony, czynniki przeciwnowotworowe czy enzymy (1). Pomimo że dysponujemy wieloma systemami ekspresyjnymi, zarówno prokariotycznymi jak i eukariotycznymi, tylko nieliczne spośród nich spełniają wymogi związane z syntezą białek o znaczeniu terapeutycznym. Wynika to głównie z trudności natury biologicznej (modyfikacje postranslacyjne), ekonomicznej (koszt produkcji) czy prawnej (patentowanie transgenicznych osobników), jakich nastrocza produkcja polipeptydów pochodzenia zwierzęce-

Adres do korespondencji

Marek Figlerowicz,
Instytut Chemii
Bioorganicznej,
Polska Akademia Nauk,
ul. Noskowskiego 12/14,
61-704 Poznań;
e-mail:
marekf@ibch.poznan.pl

biotechnologia

2 (61) 120–128 2003

go (2). Jednym z najciekawszych rozwiązań pozwalających uniknąć tych problemów, jest, jak się wydaje, wykorzystanie roślin jako bioreaktorów. Systemy takie są przede wszystkim bardzo ekonomiczne ze względu na niskie koszty hodowli (do powstania dużych ilości biomasy potrzebna jest jedynie energia słoneczna oraz podłoże mineralne (2)) oraz możliwość pominięcia skomplikowanych procedur oczyszczania białek (np. jadalne szczepionki (3,4)). Kolejnym ich walorem, mającym szczególnie istotne znaczenie w przypadku terapeutyków, jest sterylność procesu syntezy, wykluczająca możliwość przeniesienia innych patogenów (np. HIV, HCV) wraz z produkowanym lekiem (4,5). Podstawowa metoda umożliwiająca produkcję białek w komórkach roślinnych polega na transformacji ich genomu jądrowego. Stosowanie genetycznie zmodyfikowanych organizmów rodzi jednak wiele wątpliwości natury prawnej i społecznej. Dlatego nie jest możliwe, jak się wydaje, by transgeniczne rośliny mogły znaleźć w najbliższym czasie szerokie zastosowanie. Bardzo obiecującą alternatywą dla organizmów transgenicznych, są systemy roślinne, w których przeprowadzana jest ekspresja przejściowa, uzyskiwana za pomocą roślinnych wektorów wirusowych. Doskonałym materiałem do konstrukcji takich cząsteczek, będących nośnikami obcych genów są wirusy o jednoniciowym genomie, posiadającym polarność mRNA ((+)RNA wirusy). Wysoki poziom ich akumulacji w zainfekowanej tkance (do 8,6 mg wirionu / g świeżej masy) (6) jak również naturalna zdolność do przełączania metabolizmu rośliny na niezwykle wydajną syntezę własnych komponentów białkowych (synteza mg białka płaszczka CP / g tkanki roślinnej) (7) czynią z układu wirus RNA-gospodarz roślinny system o olbrzymim potencjale produkcyjnym (synteza produktu w ilości 0,4-2% rozpuszczalnych białek rośliny) (6). Dodatkową jego zaletą jest możliwość manipulowania klonami cDNA genomów wirusowych, co w połączeniu z ich niewielkimi wymiarami, w znacznym stopniu ułatwia pracę oraz skraca czas konstruowania zrekombinowanych cząstek wektora do kilku tygodni. Kolejnym walorem wymienionego systemu, jest możliwość wyboru momentu infekcji wirusem. Można jej dokonać w sposób kontrolowany podczas dowolnego etapu rozwoju rośliny. Ma to szczególne znaczenie w przypadku syntezy białek toksycznych dla metabolizmu gospodarza. Wszystkie wymienione zalety, w połączeniu z szerokim zakresem gospodarzy roślinnych (rośliny jedno- i dwuliścienne), czynią wirusowe wektory RNA niezwykle atrakcyjnym rozwiązaniem umożliwiającym syntezę białek o znaczeniu terapeutycznym. Niemniej ważną pozostaje kwestia biobezpieczeństwa systemu. Ze względu na dość niską stabilność wektora RNA, faworyzującą dryft potomnych wirusów w kierunku typu dzikiego, ryzyko wymknięcia się takiego układu spod kontroli jest ograniczone (8). Krótki przegląd strategii stosowanych do ekspresji białek za pomocą odpowiednio zmodyfikowanych wektorów wirusowych przedstawiony został w tabeli.

Przykłady ekspresyjnych wektorów RNA

Wirus	Strategia
bromovirus	substytucja genu wirusowego (21,22)
tobamovirus	promotor subgenomowy, substytucja genu wirusowego, geny fuzyjne, heterologiczny promotor subgenomowy, prezentacja antygeny na powierzchni płaszczka (8,20,23,28,29,32)
potexvirus	sekwencja 2A FMDV (kotranslacyjne trawienie poliproteiny), IRES, promotor subgenomowy (25-27)
comovirus	prezentacja antygeny na powierzchni kapsydu (34)
tombusvirus	prezentacja antygeny na powierzchni kapsydu (30)
tobravirus	promotor subgenomowy (35)
clostrovirus	potranslacyjne trawienie poliproteiny (36)
hordivirus	geny fuzyjne (37)
potyvirus	geny fuzyjne, ko- i potranslacyjne trawienie poliproteiny (38)

2. Różne strategie wyrażania genów wirusowych

Aż 99% wszystkich wirusowych patogenów roślinnych stanowią wirusy RNA (9). Ich niewielki genom (zwykle 6-10kb) występuje najczęściej w formie jednej nici (ssRNA – *single stranded RNA*), u niektórych wirusów składa się z dwóch, trzech oraz czterech jednoniciowych RNA. Najprostsze wirusy kodują tylko kilka białek: niezbędną do replikacji genomu zależną od RNA polimerazę RNA (RdRp – *RNA dependent RNA polymerase*), białko umożliwiające systemiczną infekcję (MP – *movement protein*) oraz strukturalne białko płaszczka (CP – *coat protein*). W przypadku bardziej złożonych wirusów ich genom może zawierać więcej genów, kodujących dodatkowe czynniki wirusowe (10). Presja selekcyjna spowodowała, że w celu zwiększenia konkurencyjności w stosunku do gospodarza roślinnego, wirusy RNA zmuszone zostały do zmaksymalizowania ilości kodowanej przez siebie informacji genetycznej. Patogeny te wykorzystują szereg niezwykle precyzyjnych strategii wyrażania genów, umożliwiających całkowite zapanowanie nad metabolizmem gospodarza oraz przełączenie go na syntezę własnych komponentów. Jednym z najczęściej spotykanych rozwiązań, efektywnie zwiększających pojemność genomu, jest zjawisko nachodzenia otwartych ramek odczytu (*open reading frame overlapping* – *ORF overlapping*). Występuje ono prawie u wszystkich wirusów (+)RNA, czasami tworzą się nawet potrójne bloki genowe (11). Jednym ze sposobów wykorzystywanych przez wirusy RNA do translacji nachodzących ORF, jest zmiana ramki odczytywanej przez rybosom (*ribosome frameshift*) (12) innym występowanie przeciekającego kodonu start (13,14). Sygnałem indukującym zmianę ramki odczytu jest specyficzna sekwencja (*slippery site*), wymuszająca przeskok rybosomu w pozycję -1. W rezultacie syntetyzowane jest białko fuzyjne o częściowo zmienionej sekwencji aminokwasowej. Ze względu na niską częstość zachodzenia tego zjawiska (w porównaniu z translacją pierwszej ORF), jest ono wykorzystywane do syntezy białek potrzebnych wirusowi jedynie w małych ilościach. W ten sposób zachowana zostaje zasada ekonomicznego wykorzystania pojemności kodującej matrycy. Przeciekanie kodonu start umożli-

wia odczytywanie nachodzących ORF zarówno w niezgodnych jak i zgodnych fazach. Proces ten polega na selektywnym wyborze przez rybosom odpowiedniego kodonu start AUG jako miejsca inicjacji translacji. Selekcja jest uzależniona od sekwencji oskrzydlających triplet AUG, które w systemach eukariotycznych preferują purynę w pozycji -3 oraz guaninę w pozycji +4 (15-17). Szczep ATCC66 wirusa BMV (*brome mosaic virus*) poprzez odpowiednią modyfikację sekwencji otaczającej pierwszy od końca 5' kodon AUG jest w stanie syntetyzować dwa białka kapsydu powstające wskutek inicjacji translacji zarówno z pierwszego jak i drugiego tripletu AUG (CP 20 kD i CP 19 kD) (14). Jest to niewątpliwie bardzo ciekawy przykład modulacji mechanizmu translacyjnego gospodarza przez genom wirusa, pozwalający na znaczne uelastycznienie pojemności kodującej tego ostatniego. Innym często występującym sposobem efektywnego wykorzystywania cząsteczki genomowej przez wirusy RNA jest tzw. przeciekanie kodonu STOP (*readthrough*), które prowadzi do pominięcia występującego w matrycy miejsca terminacji translacji (18). Najczęściej obserwowane jest ono podczas syntezy białek zaangażowanych w replikację wirusa (np. TMV, *tobacco mosaic virus* – poliproteina 183 kD; TBSV, *tomato bushy stunt virus* – poliproteina 92 kD; TRV, *tobacco rattle virus* – poliproteina 194 kD), choć może także występować w trakcie translacji protein o innych właściwościach niż polimerazowe (BYDV, *barley yellow dwarf virus* – białko 50 kD). Ciekawymi sposobami wyrażania wewnętrznych genów wirusowych są również synteza subgenomowego RNA oraz występowanie miejsc wewnętrznego wiązania rybosomu (11). Pierwsza jest bardzo rozpowszechniona wśród roślinnych wirusów RNA (BMV, BBMV, *broad bean mottle virus*; ALMV, *alfalfa mosaic virus*; CMV, *cucumber mosaic virus*), nierzadko umożliwia odczytanie przez rybosom nachodzących ramek odczytu. Generalnie jest to jedna z głównych strategii, stosowanych przez roślinne wirusy typu RNA, do przewycięzania już na etapie transkrypcji problemów związanych z policistronowością matrycy mRNA. Synteza subgenomowego, monocistronowego RNA zachodzi pod kontrolą specyficznego promotora, znajdującego się na nici (-)RNA, powstającej podczas replikacji wirusa. Wewnętrzne wiązanie rybosomu (IRES, *internal ribosome entry site*) przez matrycę zachodzi dzięki obecności specyficznych sekwencji umożliwiających inicjację translacji bez udziału struktury Cap, występującej na końcu 5' każdego eukariotycznego mRNA. Bezpośrednim tego efektem jest synteza białka, wyrażanego przez wewnętrzny gen. Ciekawą, choć wciąż nie do końca poznaną strategią, jest kotranslacyjna modyfikacja poliproteiny. Białko powstałe na bazie jednej ORF, cięte jest na mniejsze peptydy. Proces ten wraz z potranslacyjnym trawieniem polipeptydu stanowi główną strategię wyrażania genów przez potywirusy (10).

Reasumując, stwierdzić można, że metody, jakimi posługują się roślinne wirusy RNA do ekspresji informacji genetycznej, charakteryzują się niezwykle różnorodnością oraz bardzo wysoką efektywnością. Nic zatem dziwnego, że od wielu lat znajdują się w centrum zainteresowania biotechnologów.

3. Strategie stosowane do ekspresji rekombinowanych genów

Niewątpliwie przełomem w badaniach ekspresyjnych wektorów RNA było uzyskanie w 1984 r. pierwszego infekcyjnego klonu cDNA wirusa BMV (19). Od tego momentu nastąpił gwałtowny rozwój badań nad możliwością bezpośredniego wykorzystania wirusów RNA do przejściowej ekspresji pożądaných genów w roślinach. Pierwsze próby polegały na konstruowaniu wektorów na zasadzie zwykłej wymiany genu białka płaszczka na obcy gen (*gene replacement*). Okazały się one jednak mało przydatnymi rozwiązaniami do produkcji białek na skalę przemysłową, gdyż uniemożliwiały systemiczną infekcję roślin (20), często wręcz ograniczając rozprzestrzenianie się wirusa, praktycznie do pojedynczych komórek (21,22). Pomimo dość wydajnej syntezy terapeutyków w kulturach protoplastów, systemy te nie pozwalały stworzyć zadowalającej, pod względem ekonomicznym, technologii syntezy produktu na większą skalę.

Biorąc pod uwagę ograniczenia wymienionej metody, obrano inną strategię konstrukcji wektorów RNA, generalnie polegającą na wprowadzaniu obcej sekwencji do genomu wirusa przy jednoczesnym zachowaniu jego całkowitej informacji genetycznej. Podejście takie miało umożliwić patogenowi przechodzenie naturalnego cyklu życiowego, obejmującego także systemiczną migracją cząstek w obrębie zainfekowanej rośliny. Jednym z przykładów jest wprowadzanie obcego genu w zgodnej ramce odczytu z genem wirusowym. W większości przypadków metoda ta polega na fuzji genu białka płaszczka (CP) z genem innego białka (23). Niestety takie podejście nie stanowi idealnego rozwiązania, gdyż w celu uzyskania czystego produktu końcowego należy zastosować różne, często bardzo pracochłonne, a zarazem kosztowne procedury trawienia i oczyszczania poliproteiny. Innym sposobem stosowanym w przypadku wektorów opartych na potywirusach lub kłostrowirusach, jest wprowadzenie do białka miejsc postranslacyjnego trawienia przez proteazy wirusowe, co umożliwi pominięcie późniejszych obróbek produktu. Szczególnie obiecujący, jak się wydaje, jest wektor ekspresyjny oparty na wirusie WSMV (*wheat streak mosaic virus*), infekującego rośliny jednoliścienne (24). Należy on do niedawno odkrytego rodzaju *tritimovirus*. Organizacja genomu tego wirusa jest bardzo podobna do potywirusów, stąd możliwe było zastosowanie wymienionej metody oskrzydlenia insertu – genu dla NPT II (fosfataza neomycyny II) – sekwencjami kodującymi miejsca cięcia przez proteazy. Jeśli wziąć pod uwagę fakt, że stopień akumulacji WSMV w systemicznie zainfekowanych liściach waha się w granicach 75 µg/g tkanki liściowej, wówczas poziom ekspresji, jaki odnotowano dla NPTII – 15 µg/g tkanki liściowej – należy uważać za znaczny.

Bardzo interesującym rozwiązaniem problemu wyrażania genów fuzyjnych za pomocą ekspresyjnych wektorów RNA, jest wykorzystanie zjawiska kotranslacyjnego trawienia białka. Do konstrukcji wektora PVX (*potato virus X*), niosącego gen fuzyjny białka *gfp* i CP, zastosowano sekwencją sygnałową 2A zwierzęcego wirusa pryszczycy (FMDV, *foot and mouth disease virus*) (25). Szesnastoaminokwasowy łań-

cuch 2A bierze udział w kotranslacyjnym cięciu białka tego wirusa na dwa peptydy. W tym przypadku trawienie polipeptydu zachodzi dokładnie pomiędzy proliną a bezpośrednio poprzedzającą ją glicyną, należącą do peptydu 2A. W wymienionym wektorze PVX sekwencja 2A została połączona swym końcem 5' z genem *gfp* oraz końcem 3' z czwartym kodonem (od końca 5') genu CP, kodującym pierwszą prolinę w łańcuchu polipeptydowym CP. W ten sposób uzyskano wydajną syntezę białka GFP, przedłużonego o szesnaście dodatkowych aminokwasów, pochodzących z sekwencji 2A, oraz wolnego białka CP.

Inną, równie ciekawą inicjatywą była konstrukcja wektora ekspresyjnego, opartego na genomie PVX, w którym pomiędzy ORF białka CP a gen *gfp*, wprowadzono sekwencję wewnętrznego wiązania rybosomu (IRES) (26). Dzięki tej modyfikacji, powstający w cyklu życiowym wirusa bicistronowy, subgenomowy mRNA umożliwił niezależną i wydajną translację obu białek (GFP oraz CP) w transfekowanych roślinach tytoniu. Co więcej, takie rozwiązanie znacznie obniżyło prawdopodobieństwo zajścia rekombinacji homologicznej RNA wektora w czasie replikacji.

Jedną z pierwszych alternatyw wektorów RNA opartych na substytucji genów wirusowych, było zastosowanie strategii duplikacji subgenomowego (sg) promotora dla mRNA CP. Metoda ta polegała na wprowadzeniu kasety ekspresyjnej – promotor sg-obcy gen – w pozycji 3' lub 5' względem genu CP (TMV, PVX) (8,27). W doświadczeniach nad tak skonstruowanymi wektorami TMV i PVX wykazano, że wprowadzenie do genomu wirusowego drugiej sekwencji promotorowej znacznie obniża stabilność insertu. Najprawdopodobniej pozbywanie się obcych sekwencji spowodowane jest rekombinacją homologiczną, zachodzącą pomiędzy zduplikowanymi regionami wektora. O wiele bardziej stabilnym okazały się konstrukty, w których umieszczono heterologiczną sekwencję subgenomowego promotora oraz genu białka kapsydu (obie pochodziły od blisko spokrewnionego wirusa). Takie rozwiązanie zastosowano do konstrukcji dwóch hybrydowych RNA (hybryd TMV-ORSV, hybryd TMV-ToMV). Dla otrzymania wektora TMV-ORSV do genomu TMV wprowadzono subgenomowy promotor wraz z genem kodującym białko płaszczka ORSV (*odontoglossum ringspot virus*), obcym genem natomiast zastąpiono CP TMV (28). W podobny sposób skonstruowano hybrydowe RNA TMV-ToMV, w którym heterologiczna sekwencja promotora i białka kapsydu pochodziła z wirusa ToMV (*tomato mosaic virus*) (29). W obu przypadkach zastosowane podejście, znacznie podwyższyło stabilność insertu, np. dla genu DHFR (reduktaza dihydrofolianu) utrzymywał się on przez kilka pasażów (28). Ponadto odnotowano bardzo wysoki poziom ekspresji rekombinowanego białka – dla α trichosantyny wyniósł on do 2% wyzolowanego, rozpuszczalnego białka (po czterech dniach od inokulacji) (6). Ilość ta, jak się wydaje, jest wyższa od otrzymanej w jakiegokolwiek transgenicznej roślinie. Wynik ten potwierdza niezwykły potencjał odpowiednio zmodyfikowanych wektorów RNA.

Warto też wspomnieć o dwóch strategiach, ogólnie zwanych układami rekompensacji czy też komplementacji, stosowanych w przypadku wektorów opartych na wirusach o genomie podzielonym, w których jeden z genów wirusowych zostaje

zastąpiony obcą sekwencją (*gene replacement*). Wyróżnia się komplementację częściową, kiedy zrekombinowana, defektywna cząsteczka wektorowa koinokulowana jest z rekompensującą ją dziką cząsteczką RNA oraz komplementację krzyżową, gdzie odpowiednia kombinacja obu koinokulowanych cząsteczek umożliwia im wzajemną komplementację. Trudno jednak jest przewidzieć stabilność takiego systemu, gdyż w obu przypadkach istnieje możliwość rekombinacji, co w efekcie może prowadzić do szybkiego pozbywania się transgeny przez wektor wirusowy.

Synteza szczepionek w roślinach stanowi jedno z bardzo obiecujących zastosowań wektorów RNA. Wykazano jednak, że immunizacja wolnymi antygenami (syntetyzowanymi przez transgeniczną roślinę lub wektor wirusowy) nie zawsze jest w stanie wywołać odporność organizmu. Jedną z przyczyn takiego stanu rzeczy może być mała stabilność antygeny. Aby ją zwiększyć tworzy się roślinne systemy wirusowe prezentujące dany epitop na powierzchni swego kapsydu (5,30,31). Innymi słowy, białko płaszczka wirusa roślinnego służy jako nośnik (*carrier molecule*) dla peptydu antygenowego (połączonego z nim końcem aminowym bądź karboksylowym). Do tego celu próbowano wykorzystać wiele wirusów roślinnych, jednak nie wszystkie okazały się w pełni przydatne. Ograniczenia głównie sprowadzały się do wielkości wprowadzanego peptydu, który przekraczając liczbę dwudziestu pięciu aminokwasów w przypadku TMV oraz CPMV (*cowpea mosaic virus*) znacznie ograniczał proces enkapsydacji tych wirusów (32). Wielkość epitopu wykorzystywanego do immunizacji nie pozostaje bez znaczenia dla efektu odpowiedzi immunologicznej organizmu. Wykazano, że w przypadku wirusa wścieklizny, jedynie antygeny przekraczające swą wielkością wymieniony limit aminokwasowy, są w stanie indukować produkcję przeciwciał na odpowiednio wysokim poziomie (33). Do konstrukcji wektora mogącego prezentować tak duży epitop na powierzchni swego kapsydu wykorzystano hybrydę wirusa TMV z AIMV, w której nośnikiem dla 38 aminokwasów peptydu antygenowego wirusa wścieklizny (Drg24) było CP AIMV, znajdujące się pod kontrolą subgenomowego promotora (5). Tak zmodyfikowany wektor TMV produkował zarówno własne CP (CP-TMV) jak i fuzyjne CP-Drg24, pochodzące z wirusa AIMV, czego rezultatem była obecność dwóch typów wirionów w zainfekowanej tkance roślinnej: CP-TMV oraz CP-Drg24. W przeprowadzonej analizie immunogenności prezentowanego w ten sposób antygeny Drg24, wykazano efektywną indukcję syntezy przeciwciał anty-Drg24 u myszy.

4. Podsumowanie

Niewątpliwie badania struktury i funkcji genów roślinnych wirusów RNA należą do jednej z najbardziej dynamicznie rozwijających się gałęzi wirusologii molekularnej. Poznaliśmy już wiele cech, dzięki którym patogenny te sięją tak ogromne spustoszenie w organizmach roślinnych. Z całą pewnością umiejętne wykorzystanie tej wiedzy może spowodować, że wirusy RNA staną się także naszymi sprzymierzeńca-

mi. Już dziś wiemy, że mogą one posłużyć jako narzędzia do ekspresji wybranych genów w komórkach roślinnych. Oprócz zastosowania w przemyśle biotechnologicznym, możliwe jest także użycie wektorów wirusowych w genomice funkcjonalnej roślin do indukcji zjawiska potranskrypcyjnego wyciszania genów (VIGS, *virus induced gene silencing*) (39). Kwestią pozostającą wciąż do rozwiązania jest dopracowanie układu gospodarz roślinny – wektor RNA w taki sposób, aby synteza rekombinowanego białka była jak najbardziej wydajna. Dlatego też kolejnym wyzwaniem w dziedzinie konstrukcji wektorów wirusowych, jakiemu starają się sprostać badacze jest zwiększanie stabilności zmodyfikowanego wirusa, podwyższenie wydajności infekcji wirusowej (40,41) oraz udoskonalenie strategii wyrażania obcego genu. Nie bez znaczenia pozostaje także sam gospodarz roślinny. Tak zatem optymalizacja tego systemu będzie również polegać na modyfikacji genomu rośliny, mającej na celu stworzenie odmian łatwych w uprawie, podatnych na infekcje danym wektorem bez względu na warunki środowiskowe, a także będących w stanie dokonywać wszelkich typowych dla białek pochodzenia zwierzęcego, modyfikacji postranslacyjnych (42).

Literatura

1. Kelley B. D., (2001), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 12, 173-174.
2. de Wilde Ch., van Houdt H., de Buck S., Angenon G., de Jaeger G., Depicker A., (2000), *Plant Molecular Biology*, 43, 347-359.
3. Mason H. S., Haq T. A., Clements J. D., Arntzen C. J., (1998), *Vaccine*, 16, 1336-1343.
4. Koprowski H., Yusibov V., (2001), *Vaccine*, 2735-2741.
5. Yusibov V., Modelska A., Steplewski K., Agadjanyan M., Weiner D., Hooper D. C., Koprowski H., (1997), *PNAS*, 94, 5784-5788.
6. 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 M., Grill L. K., (1993), *PNAS*, 90, 427-430.
7. Lane L., (1981), *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis*, Ed. E. Kurstak, 333-376, Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
8. Dawson W. O., Lewandowski D. J., Hilf M. E., Bubrick P., Raffao A. J., Shaw J. J., Grantham G. L., Desjardins P. R., (1989), *Virology*, 172, 285-292.
9. Shaw J. G., (1996), *Fields Virology*, 3rd ed., Eds. Fields B. N., Knipe P. M., Howley P. M., et al., 17, 510, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
10. Shaw J. G., (1996), *Fields Virology*, 3rd ed., Eds. Fields B. N., Knipe P. M., Howley P. M., et al., 17, 515-517, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
11. Shaw J. G., (1996), *Fields Virology*, 3rd ed., Eds. Fields B. N., Knipe P. M., Howley P. M., et al., 17, 514-515, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
12. Brault V., Miller W. A., (1992), *PNAS*, 89, 2262-2266.
13. Simon-Buela L., Shan Guo H., Garcia J. A., (1997), *J. Gen. Virol.*, 78, 2691-2699.
14. Kazuyuki M., Tsuge S., Nagao K., Okuno T., Furusawa I., (1992), *J. Gen. Virol.*, 73, 2543-2551.
15. Kozak M., (1981), *Nucleic Research*, 9, 5233-5252.
16. Kozak M., (1986), *Cell*, 44, 283-292.
17. Kozak M., (1986), *Cell*, 47, 481-483.
18. Shaw J. G., (1996), *Fields Virology*, 3rd ed., Eds. Fields B. N., Knipe P. M., Howley P. M., et al., 17, 511-514, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
19. Ahlquist P., French R., Janda M., Loesch-Fries L.S., (1984), *PNAS*, 81, 7066-7070.

20. Takamatsu N., Ishikawa M., Meshi T., Okada T., (1987), *EMBO J.*, 6, 307-311.
21. French R., Janda M., Ahlquist P., (1986), *Science*, 231, 1294-1297.
22. Mori M., Zhang G. H., Kaido M., Okuno T., Furusawa I., (1993), *J. Gen. Virol.*, 74, 1255-1260.
23. Takamatsu N., Watanabe Y., Yanagi H., Meshi T., Shiba T., Okada Y., (1990), *FEBS Letters*, 269, 73-76.
24. Choi I. R., Stenger D. C., Morris T. J., French R., (2000), *The Plant Journal*, 23, 547-555.
25. Santa Cruz S., Chapman S., Roberts A. G., Roberts I. M., Prior D. A. M., Oparka K. J., (1996), *PNAS*, 93, 6286-6290.
26. Toth R. L., Chapman S., Carr F., Santa Cruz S., (2001), *FEBS Letters*, 489, 215-219.
27. Chapman S., Kavanagh T., Baulcombe D., (1992), *The Plant Journal*, 2, 549-557.
28. Donson J., Kearney C. M., Hilf M. E., Dawson W. O., (1991), *PNAS*, 88, 7204-7208.
29. McCormick A., Kumagai M. H., Hanley K., Turpen T. H., Hakim I., Grill L. K., Tuse D., Levy S., Levy R., (1999), *PNAS*, 96, 703-708.
30. Joelson T., Akerblom L., Oxelfelt P., Strandberg B., Tomenius K., Morris T.J., (1997), *J. Gen. Virol.*, 78, 1213-1217.
31. Modelska A., Dietzschold B., Sleysh N., Fang Fu Z., Steplewski K., Hooper D. C., Koprowski H., Yusibov V., (1998), *PNAS*, 95, 248-2485.
32. Fitch J., Beachy R. N., Hein M. B., (1995), *Vaccine*, 1051-1057.
33. Dietzschold B., Gore M., Marchadier D., Niu H. S., Bunschoten H. M., Otvos L., Wunner W. H., Ertl H. C. J., Osterhaus A. D. M. E., Koprowski H., (1990), *J. Virol.*, 64, 3804-3809.
34. Porta C., Spall V. E., Loveland J., Johnson J. E., Barker P. J., Lomonosoff G. P., (1994), *Virology*, 202, 949-955.
35. MacFarlane S. A., Popovich A. H., (2000), *Virology*, 267, 29-35.
36. Hagiwara Y., Peremyslov V. V., Dolja V. V., (1999), *J. Virol.*, 73, 7988-7993.
37. Holzberg S., Brosio P., Gross C., Pogue G. P., (2002), *Plant J.*, 30, 1-13.
38. Dolja V. V., McBride H. J., Carrington J. C., (1992), *PNAS*, 89, 10208-10212.
39. Lindbo J. A., Fitzmaurice W. P., Della Cioppa G., (2001), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4, 181-185.
40. Anandalakshmi R., Pruss G. J., Ge X., Marathe R., Mallory A. C., Smith T. H., Vance V. B., (1998), *PNAS*, 95, 13079-13084.
41. Marathe R., Anandalakshmi R., Smith T. H., Pruss G. J., Vance V. B., (2000), *Plant Mol Biol.*, 43, 295-306.
42. Wenderoth I., Von Schaewen A., (2000), *Plant Physiology*, 123, 1097-1108.