# Virus mozaika duhana – nekad i sad

**Gorišek, Matea**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2009**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:057710

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-24**

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**
**PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET**
**BIOLOŠKI ODSJEK**

# VIRUS MOZAIKA DUHANA – NEKAD I SAD
# TOBACCO MOSAIC VIRUS (TMV) THROUGH THE TIME

SEMINARSKI RAD

Matea Gorišek
Preddiplomski studij biologije
(Undergraduate Study of Biology)
Mentor: prof. dr.sc. Dijana Škorić

Zagreb, 2009.

# SADRŽAJ

**1. UVOD** ..... 2

**2. BEIJERINCKOV *„CONTAGIUM VIVUM FLUIDUM“* – POČETAK VIROLOGIJE** ..... 3

2.1. IZOLACIJA I KRISTALIZACIJA TMV-A ..... 6

**3. ULOGA TMV-a U RAZVOJU VIROLOGIJE I MOLEKULARNE BIOLOGIJE** ..... 7

3.1. ISTRAŽIVANJA STRUKTURE VIRUSNE ČESTICE ..... 8

3.1.1. Kapsida ..... 8

3.1.2. RNA ..... 9

**4. ULOGA TMV-a U PROIZVODNJI LIJEKOVA** ..... 11

**5. LITERATURA** ..... 14

**6. SAŽETAK** ..... 15

**7. SUMMARY** ..... 15

# 1. UVOD

U drugoj polovici 19. stoljeća bakterije i gljivice su bile glavni poznati uzročnici zaraznih bolesti ljudi, životinja i biljaka te se smatralo da u prirodi ne postoji ništa sitnije što bi bilo zarazno. Godine 1879. njemački agrokemičar A. E. Mayer proučava jednu osobitu bolest duhana koju je karakterizirala pojava malih područja svjetlije i tamnije zelene boje na listovima. Bolest je nazvana mozaičnom bolesti duhana, a Mayerov zaključak je bio da je vjerojatno uzrokuje neka slabo poznata bakterija (Juretić, 1997.).

Godine 1892. dolazi do značajnog otkrića koje je bilo veliko iznenađenje za mikrobiologe tog vremena. Ruski student biologije Dmitrij Ivanovski otkriva da je uzročnik mozaične bolesti duhana znatno manji od bakterija jer ga je bilo nemoguće vidjeti svjetlosnim mikroskopom ili zadržati na bakterijskom filtru. Naime, Ivanovski je sok zaraženih biljaka puštao kroz bakterijske filtre čije su pore bile sitnije i od najsitnijih bakterija očekujući da će se nepoznata bakterija zadržati na njima. Međutim, nije uspio izolirati nikakvu bakteriju, a filtrirani sok bio je i dalje infektivan. Na temelju toga Ivanovski zaključuje da je otkrio „filtrabilnu infektivnost“, tj. infektivnost koja potječe od nečeg što je manje i od najmanjih bakterija (Juretić, 1997.). Da on ni sam nije bio svjestan značenja svojih rezultata, najbolje govori činjenica da je ipak ostavio otvorenu mogućnost da je nepoznati uzročnik bolesti bakterijski toksin koji je prošao kroz bakterijske filtre. Upravo zbog toga Ivanovski u mnogim literaturnim izvorima danas nije naveden kao otkrivač virusa (Škorić i Juretić, 2004.). Postojanje „filtrabilne infektivnosti“ dokazali su 1897. godine i njemački istraživači F. Loeffler i P. Frosch filtrirajući ekstrakte dobivene iz tkiva bolesnih goveda koja su po simptomima bila zaražena značajnom virusnom bolesti papkara - slinavkom i šapom (Juretić, 1997.). No, prvi znanstvenik koji je u svojim zaključcima išao dalje od svojih prethodnika bio je Martinus Beijerinck, priznati nizozemski mikrobiolog s oko 140 objavljenih znanstvenih radova. Tijekom svoje pedesetogodišnje karijere otkrio je postojanje luminiscentnih bakterija i simbiontskih bakterija u nodulima biljaka koje fiksiraju dušik, hranidbene potrebe mnogih bakterija, a proučavao je i procese fermentacije. Ipak, njegova najznačajnija znanstvena dostignuća bila su ona vezana uz mozaičnu bolest duhana te je upravo zbog toga danas smatran prvim znanstvenikom koji je dokazao postojanje i imenovao virus (TMV – *Tobacco mosaic virus*) 1897. godine u Delftu (Zaitlin i sur., 1999.).

Cilj ovog seminara je iznijeti pregled važnih otkrića vezanih uz TMV, objasniti njegovo značenje u razvoju molekularne biologije od samih početaka, kao i prikazati veliku ulogu u današnjim biomedicinskim istraživanjima s ciljem proizvodnje lijekova protiv nekih od najopasnijih bolesti današnjice.

## 2. BEIJERINCKOV *„CONTAGIUM VIVUM FLUIDUM“* – POČETAK VIROLOGIJE

Beijerinckova istraživanja uzročnika mozaične bolesti duhana primjer su domišljatih i sustavnih znanstvenih eksperimenata, a dovela su do sljedećih zaključaka:

1. *Uzročnik infekcije nije nikakav mikrob („contagium fixum“), nego tekući zarazni uzročnik („contagium vivum fluidum“)*

Eksperiment je započeo filtriranjem soka zaražene biljke duhana pri čemu su na filtru zadržani i aerobi i anaerobi. U početku je sumnjao da su potonji potencijalni uzročnici pa se sok činio potpuno sterilnim. Nakon toga stavio je zaraženi list i filtrirani sok na agarsku podlogu pri čemu je vidio da uzročnik lako difundira kroz agar, odnosno da je vjerojatno topljiv u vodi tj. tekuće je prirode te je zbog toga i nazvan „contagium vivum fluidum“ (Zaitlin i sur., 1999.).

2. *Virus se razmnožava samo u stanicama koje se dijele i u tkivima koja rastu*

Iako je Beijerinck imao poteškoća kod procjenjivanja razlike između količine virusa koja je unesena u biljku i količine koja je nastala u njoj, došao je do zaključka da su biljke podložne infekciji samo ako imaju tkiva koja i dalje rastu, odnosno ako su stanice u fazi diobe. Sva tkiva i organi koji su dostigli svoju punu veličinu su imuni na zarazu, ali mogu

u određenim uvjetima prenositi virus u ostale dijelove biljke. Izvan biljke virus se ne može reproducirati, ali ekstrakt svejedno ne gubi na svojoj virulenciji (Zaitlin i sur., 1999.) .

### *3. Virus se unutar biljke prenosi provodnim sustavom*

Beijerinck je smatrao da se virus unutar biljke može rasprostranjivati floemom kao i hranjivi materijal (smjer širenja je i prema vršnom dijelu stabljike i prema korijenu). Isto tako, prijenos je moguć i ksilemom. Mladi listovi imali su simptome infekcije samo na vršnom dijelu što bi značilo da je velika količina virusnih čestica naglo došla u to područje. Beijerinck to povezuje sa snagom transpiracije, odnosno s prolazom virusa ksilemom. Zaraza je moguća i preko korijena biljke ako se infektivne čestice nalaze u tlu, a pri tome će do pojave infekcije doći nakon tri ili više tjedana i to samo kod novoformiranih listova (unutar tkiva koje raste, kao što je i ranije spomenuto).

Beijerinck je također zamijetio dvije vrste infekcije - lokalnu i opću (sistemičnu). Ako je biljka zaražena preko korijena, odmah se javlja sistemična infekcija, a ako je do zaraze došlo preko ozlijede na stabljici prvo se javlja lokalna, a tek nakon nekog vremena i sistemična infekcija (Zaitlin i sur., 1999.).

### *4. Virus se može isušiti bez gubitka infektivnosti*

Isušeni zaraženi listovi duhana držani dvije godine u herbariju pokazivali su sposobnost induciranja infekcije. Isto tako, filter-papir namočen u infektivni sok nakon sušenja na temperaturi od 40° C također uzrokuje infekciju. Ipak, virulencija je smanjena u odnosu na svježe materijale (Zaitlin i sur., 1999.).

### *5. Virus može prezimiti u isušenom obliku u tlu*

Beijerinck je u jesen zaraženu biljku ostavio da uvene te je sakupio zemlju oko korijena i ostavio je u isušenom obliku preko zime. Na proljeće je izmiješao zemlju sa česticama virusa i „čistu“ zemlju te u nju posadio nekoliko potpuno zdravih biljaka. Nakon nekoliko tjedana primijetio je na biljkama sve simptome zaraze, a na njihovu korijenu

ozljede. Beijerinck je smatrao da kod neoštećenog korijenja virus u biljku ulazi preko epiderme, a kod oštećenog preko ozljeda koje biljci mogu nanijeti različite životinje iz tla (Zaitlin i sur., 1999.).

### *6. Virus gubi infektivnost na temperaturama vrenja i kod primjene formalina*

Na temperaturi od oko 90° C virus je u potpunosti bio uništen. Kako se za sterilizaciju koristio formalin, Beijerinck je zamijetio da male količine formalina ne uništavaju virus, ali da se produžuje period između infekcije i pojave prvih znakova zaraze (period inkubacije virusa u tom slučaju traje oko šest tjedana). Stajanjem virusa u formalinu, došlo je do potpunog gubitka infektivnosti što znači da je formalin djelovao na RNA (Zaitlin i sur., 1999.).

### *7. Simptomi zaraze*

Prema Beijerincku, simptomi slabije infekcije očituju se u pjegavosti listova duhana, odnosno dolazi do djelovanja na klorofil dok kod jače infekcije dolazi do uništavanja protoplazme stanica. U slučaju prirodne zaraze, dva do tri tjedna nakon infekcije biljke virusom, u blizini lisnih žila dolazilo je do pojave tamnozelenih točkica (sl. 1.). Poslije nekog vremena, u sredini ili na rubovima tih točkica Beijerinck je zamijetio nekrozu tkiva (sl. 2.). Ako je infekcija bila izazvana putem injektiranja zaraženog soka, novoformirani listovi bili su drugačijeg oblika (okrugli) kao i središnje i lateralne lisne žile, a zatim su se pojavile i tamnozelene točke koje su u kontrastu s ostatkom lista, posebno s dijelovima oko žila.

**Sl. 1.** Listovi duhana zaraženog TMV-om s ranim simptomima zaraze (http://www.apsnet.org/education/feature/tmv/Images/tmv26.htm).

**Sl. 2.** Listovi duhana zaraženog TMV-om s kasnijim, nekrotičnim, simptomima zaraze (http://www.apsnet.org/education/feature/tmv/Images/tmv26.htm).

Beijerincka je također zanimalo imaju li bakterije utjecaja na simptome zaraze te je izvodio pokuse u kojima je kombinirao zaraze bakterijom i virusom. U biljku je unio suspenziju virusa mozaika duhana i bakterije *Bacillus anglomerans* te je nakon dva tjedna primijetio pojavu prvih simptoma koji, ipak, nisu bili u potpunosti slični uobičajenim simptomima zaraze virusom, već se počeo pojavljivati albinizam.

Beijernick se u ovome radu osvrnuo i na neke druge biljne bolesti za koje je pretpostavio da bi mogle biti uzrokovane virusima. „Žutica breskve“ („peach yellows“), netom opisana bolest u Sjevernoj Americi je po Beijerincku bila takav slučaj. Pojava žutih listova, vještičine metle (proliferacije aksilarnih izdanaka) i nedozrelost plodova

njene su simptomatološke značajke. „Peach rosette“ je također svrstao u slične potencijalno virusne bolesti, a glavna karakteristika joj je, uz pojavu žutih listova i otpadanje nezrelih plodova, rast listova u malim rozetama. Obje zaraze moguće je prenijeti cijepljenjem ili preko korijena (Zaitlin, 1999.). Danas je poznato da se u oba navedena slučaja radi o fitoplazmama, vrlo malim bakterijama bez stanične stijenke koje se nalaze u floemu biljaka, ali i u nekim kukcima.

## 2.1. IZOLACIJA I KRISTALIZACIJA TMV-A

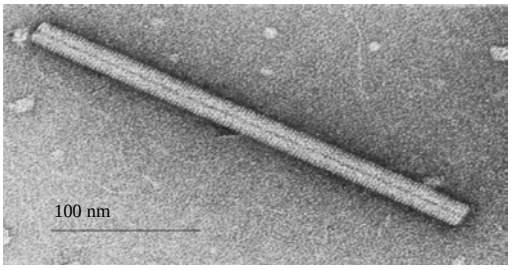
Dvadesetih i tridesetih godina 20. stoljeća otkriveno je da su enzimi, organske tvari neophodne za život, po strukturi zapravo proteini. Upravo zbog toga počeli su se razvijati postupci dobivanja proteina u čistom stanju, a kako se mislilo da je i TMV proteinskog karaktera, tako su se oni primjenjivali i na njegovo izdvajanje. Godine 1929. američki znanstvenici C. G. Vinson i A. W. Petre prvi uspijevaju dobiti TMV u pročišćenom, kristaličnom stanju. No, pripravci nisu bili zadovoljavajuće čistoće pa se njima nije mogla dokazati infektivnost kristala TMV-a. Napori da se TMV dobije u čistom stanju nastavljeni su u Rockefellerovom institutu na Princetonu gdje je 1935. godine W. M. Stanley uspio izdvojiti TMV i dobiti ga u vrlo čistom obliku. On dokazuje da virus lako kristalizira te da je kristal jako infektivan nakon otapanja. Godine 1946. dobiva i Nobelovu nagradu za to otkriće (Škorić i Juretić, 2004.).

# 3. ULOGA TMV-a U RAZVOJU VIROLOGIJE I MOLEKULARNE BIOLOGIJE

Otkad je Stanley uspio iskristalizirati TMV, počeo je razvoj mnogih polja biologije poput biokemije i genetike, odnosno molekularne biologije. Naime, virusi su se pokazali odličnim modelima u proučavanju kemijskih i fizičkih procesa.

G. A. Kausche i H. Ruska 1939. godine elektronskim mikroskopom uspijevaju vidjeti čestice TMV-a koje su imale oblik štapića dužine 300 nm i širine 18 nm (sl. 3.). Kasnije se

čak TMV zbog svojih standardnih dimenzija koristio za baždarenje mikroskopa (Škorić i Juretić, 2004.).




**Sl. 3.** Elektronskomikroskopska slika čestice TMV-a

(prerađeno iz http://www.virology.net/Big_Virology/BVunassignplant.html).

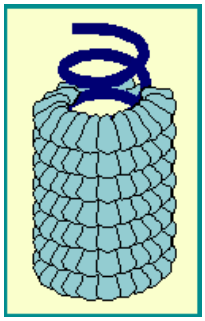
## 3.1. ISTRAŽIVANJA STRUKTURE VIRUSNE ČESTICE

Stanley je smatrao da je virus mozaika duhana proteinske prirode i nije smatrao da mala količina fosfora (0,5%) ima neko posebno značenje već da je to dio kristalnog pripravka TMV-a. Nedugo nakon toga dokazano je da i svi drugi virusi sadrže nešto fosfora, uglavnom više nego sam TMV. F. C. Bawden i N. W. Pirie 1937. godine dokazuju da fosfor potječe od nukleinske kiseline koja je sastavni dio svih virusa. Prema tome, virusi više nisu smatrani proteinima već nukleoproteinima.

Na temelju razvoja kemije i rentgenske strukturne analize, 50 – ih godina 20. stoljeća otkrivena je detaljna struktura TMV-a zahvaljujući većem broju znanstvenika poput J. J. Harrisa, C. A. Knighta, F. H. Cricka, J. D. Watsona i A. Kluga (Škorić i Juretić, 2004.).

### 3.1.1. Kapsida

Kapsida koja čini 95% mase virusa je vanjski proteinski omotač virusa. Građena je od 2130 identičnih proteinskih podjedinica poredanih u blagu uzvojnicu i naslaganih u 130 slojeva (uzvoja) (sl. 4.). U svakom sloju nalazi se 17 proteinskih molekula. Na C – kraju proteinskih podjedinica nalazi se aminokiselina treonin, a N – kraj je acetiliran što je u to doba bila novost jer se do tada nije znalo da je i to moguće.



**Sl. 4.** Građa čestice TMV-a
(http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/virarch.html).

F. A. Anderer je 1959. godine pokazao da se proteini kapsidne podjedinice TMV-a nakon denaturacije pod određenim uvjetima mogu renaturirati do izvorne konformacije,a zatim ponovo agregirati u štapić. Vrlo važna spoznaja u razvitku molekularne biologije, također temeljena na istraživanjima TMV-a, bila je ta da je sama primarna struktura proteina ključna za njegovu konformaciju. Godine 1960. A. Tsugita i F. A. Anderer ustanovili su da je svaka od 2130 podjedinica izgrađena od istih 153 aminokiselinskih ostataka koji imaju identičan slijed. Tako je kapsida TMV-a postala treći protein, poslije inzulina i ribonukleaze, čija je molekula bila sekvencionirana (Juretić, 1997.).

Nakon otkrića trodimenzionalne strukture počela su se proučavati imunokemijska svojstva svakog aminokiselinskog ostatka proteinske kapside. Otkriveno je da kapsida ima velik broj preklapajućih epitopa (antigene determinante) koje prepoznaje imunološki sustav, odnosno na koje se mogu vezati protutijela. Postoje još i kriptotopi (epitopi koji se otkrivaju tek nakon poremećaja građe kapside) i neotopi (novonastali epitopi specifični za kvarternu strukturu promijenjenih virusnih čestica) koji imaju značajnu ulogu u istraživanjima koja bi poboljšala serološke dijagnoze i istraživanjima cjepiva protiv raznih virusnih bolesti (Škorić i Juretić, 2004.).

### 3.1.2. RNA

Pedesetih godina 20. stoljeća uspijeva se izdvojiti nativna RNA u čistom stanju. H. Fraenkel – Conrat i Williams 1955. godine iz proteina dobivenog razgradnjom kapside i zasebne nativne RNA rekonstituiraju nukleoproteinske čestice *in vitro*. One su po infektivnosti i obliku odgovarale nativnim virusnim česticama. Time se otvorila mogućnost konstituiranja kimernih virusnih čestica kojima bi kapsida bila sastavljena od proteina jednog virusa, a RNA bi bila podrijetlom od drugog virusa. Do rekonstitucije TMV-a smatralo se da je za infektivnost odgovorna cijela nukleoproteinska čestica. No, 1956.

godine H. Fraenkel – Conrat, A. Gierer i G. Schramm dokazuju da je RNA nosilac svih genetičkih poruka virusa mozaika duhana i time se pobila teorija da jedino DNA može predstavljati nasljednu tvar. Također je dokazano da je RNA glavni faktor u određivanju duljine virusne čestice i da bitno doprinosi njezinoj stabilnosti.

Jednolančana RNA molekula (5% mase virusa), koja se nalazi unutar kapside, sastavljena je od 6395 nukleotida koji prate uzvojnicu proteinskih podjedinica. Između kapside i RNA postoji kontakt – svaka proteinska podjedinica u dodiru je s tri nukleotida, a u središnjem dijelu čestice nalazi se šupljina promjera 4 nm (Juretić, 1997.). Primarnu strukturu RNA TMV-a počeli su 1960. godine istraživati T. Sugiyama i H. Fraenkel – Conrat. Dokazali su da 3' – kraj sadrži nefosforilirani adenozin (oblikom sliči na tRNA), a 5' – kraj ima "kapu" ($m^7G^{5'}ppp^{5'}Gp$) koju ima većina mRNA. Cijela molekula RNA TMV-a sekvencionirana je 1982.

Šezdesetih godina prošloga stoljeća, translacija RNA je još uvijek predstavljala enigmu. Prva zagonetka sastojala se u tome što su translacijom RNA nastajala dva dugačka produkta čija je duljina zajedno bila veća od duljine virusne RNA. Druga zagonetka bila je u tome što cjelovita RNA TMV-a nije mogla stvarati kapsidni protein, a dokazano je prisustvo dodatne mRNA čije se podrijetlo nije znalo.

Prvi problem bio je riješen kada se otkrilo da kod RNA postoji "propusni" stop-kodon. Analizama 5' – kraja dokazano je da postoji otvoreni okvir čitanja (cistron) čiji je translacijski produkt protein dugačak 126 kDa. Inicijacijski kodon tog cistrona je zapravo i inicijacijski kodon sljedećeg cistrona koji je duži od prvog, ima svoj zasebni stop-kodon nizvodno i njegov protein dugačak je 183 kDa. Dokazano je da se tu radi o preklapajućoj translaciji tj. o preklapanju dvaju cistrona. To svojstvo TMV-a da pohranjuje što veće količine informacija unutar kontinuirane RNA kasnije je zamijećeno i kod drugih virusa.

Druga enigma riješena je Hunterovim otkrićem virusne subgenomske RNA koja postoji uz genomsku RNA. Genomska RNA ima nekoliko cistrona, a ribosomi domaćina (u ovom slučaju biljke) prevode u proteine samo dva cistrona bliža njenom 5' – kraju, a ostala dva cistrona nizvodno prevode se u proteine tek nakon što se prepišu u (-) RNA, a zatim u (+) RNA koje se zovu subgenomske RNA. Produkti tih subgenomskih RNA su 30 kDa dugačak protein za pokretanje virusa i 17 kDa dugačak kapsidni protein (Škorić i Juretić, 2004.).

Osamdesetih godina, zahvaljujući detaljnom poznavanju genoma, TMV se počeo koristiti kao vektor za kloniranje biljnih i životinjskih gena. Odabrani nevirusni gen (egzogen) koji kodira neki manji protein, ugradi se u u izdvojenu RNA TMV-a *in vitro*, a

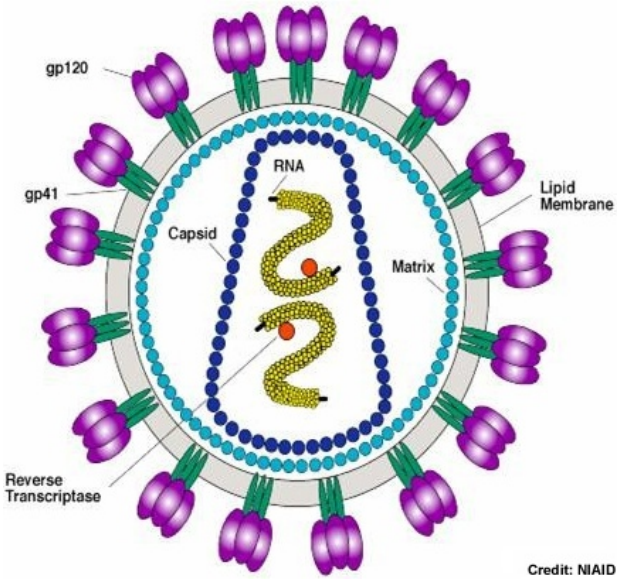
zatim se takvi preinačeni virusi mehaničkom inokulacijom unose u biljku. U svrhu umnažanja proteinskog produkta egzogena komercijalno se dosta primjenjuju biljke iz roda duhana, a posebno *Nicotiana benthamiana* te *N. tabacum.* Rekombinantna RNA se u biljci replicira velikom brzinom i njezinom translacijom nastaju virusni proteini, ali i oni koji nastaju ekspresijom ugrađenog stranog gena. Danas se tako mogu dobiti proteini poput amilaze, hemoglobina, neki sekundarni metaboliti pa i cjepiva protiv različitih bolesti (npr. protiv malarije) (Juretić, 1997.).

Istraživanjem TMV-a otkrivena je u biljkama RNA – ovisna RNA – polimeraza za koju se u početku smatralo da je produkt virusne genomske RNA, odnosno da postoji samo u onim biljnim stanicama u kojima se odvija replikacija virusne RNA. No, dokazano je da ona ne postoji samo u zaraženim biljkama, već i u bezvirusnim, potpuno zdravim biljkama poput rajčice, petunije i česte eksperimentalne biljke *Arabidopsis thaliana*. Naime RNA – ovisna RNA – polimeraza u biljkama konvertira virusnu jednostruku RNA (ssRNA) u dvostruku RNA (dsRNA), a u klicama biljaka pronađeni su i enzimi (Dicer – like proteini) koji pretvaraju te dsRNA u dvije vrste malih interferirajućih RNA (small interfering RNA, siRNA). Te siRNA sudjeluju u utišavanju gena biljnih stanica zaraženih virusom. TMV danas ima vrlo važnu ulogu u razvoju najnovijih metoda (temeljenih na utišavanju gena) korištenih za proučavanja funkcija pojedinih gena (Škorić i Juretić, 2004.).

# 4. ULOGA TMV-a U PROIZVODNJI LIJEKOVA

Jedna od danas najraširenijih i najopakijih virusnih bolesti svakako je AIDS, a njezin uzročnik je HIV (*Human immunodeficiency virus*) (sl. 5.). Velika potreba za lijekovima protiv AIDS-a potaknula je mnoga istraživanja u području molekularne biologije i medicine. Najpoželjniji sastojci antivirusnog lijeka (virocida) moraju imati snažan utjecaj i širok spektar aktivnosti protiv čestica virusa, moraju biti selektivni za ciljne viruse ili specifične stanice domaćina, stabilni u uvjetima *in vivo* i *in vitro*, neotrovni za mukozne stanice (što znači da ne smiju izazivati direktne iritacije, poticati imunološke reakcije i mitozu), moraju sprječavati prijenos čestica HIV-a između stanica (*cell-to-cell transmission*) i svakako moraju imati mogućnost proizvodnje u velikim količinama i po

niskim cijenama. Istraživači danas u svrhe proizvodnje takvih lijekova sve više koriste biljke.




**Sl. 5.** Čestica virusa HIV-a
(http://www.stanford.edu/group/virus/retro/2005gongishmail/HIV.html).

Istraživanja na HIV-om zaraženim ljudskim stanicama pokazala su da je grificin (GRFT), protein iz crvene alge *Griffithsia* sp., vrlo efikasan u borbi protiv HIV-a, odnosno inaktivira HIV već pri samom kontaktu. Naime, GRFT se veže izravno na oligosaharide glikoproteina virusne ovojnice gp120 i onemogućuje ulaz virusa u ciljne stanice jer je upravo taj glikoprotein presudan za prvi korak u infekciji. Osim toga, GRFT je vrlo stabilan u uvjetima izvan stanice. Ima veliku otpornost na promjene pH-vrijednosti, stabilan je kod liofilizacije, nije toksičan i sprječava rasprostranjivanje virusa iz stanice u stanicu. Temperatura njegove denaturacije iznosi 80° C, što je vrlo praktično zbog transporta i mogućnosti pohranjivanja (O'Keefe i sur., 2009.).

Znanstvenici iz SAD-a i Velike Britanije unijeli su gen koji kodira grificin u TMV, a zatim zarazili biljku *Nicotiana benthamiana* tim kimernim oblikom virusa. Vrlo značajno bilo je to da je produkcija GRFT-a u biljci (GRFT-P) bila više od 1 g/kg lisnog tkiva, odnosno proizvedeno je 60 g GRFT-P iz biljaka zasađenih u stakleniku površine 460 $m^2$ što se procjenjuje dovoljnim za milijun doza antivirusnog lijeka u obliku gela (http://www.nature.com/news/2009/090330/full/news.2009.208.html). Produkcija GRFT-P-a bila je puno veća nego produkcija GRFT-a u bakteriji *Escherichia coli* (GRFT-E) ili drugim biljkama. Da bi se vidjela učinkovitost GRFT-P, uspoređivali su ga s nativnim

GRFT-om. Dokazana je efikasnost već kod pikomolarnih vrijednosti transgenog grificina kao što je prethodno bilo dokazano za nativni oblik. Također, dokazano je da GRFT ne potiče nikakve diobe stanica ni imunološke odgovore organizma što nije bio slučaj s prethodno testiranim potencijalnim virocidima. Vrlo bitno bilo je analizirati utjecaj GRFT-P-a na vaginalni epitel, odnosno provjeriti uzrokuje li iritaciju tog područja s obzirom na to da bi se virocid u obliku gela nanosio upravo na to područje. RVI (rabbit vaginal irritancy) analizom, koja se općenito koristi za testiranje proizvoda namijenjenih vaginalnom području, dokazano je da je GRFT-P siguran za daljnja klinička testiranja. Sada se ona vrše na kulturama ljudskih stanica, zečevima i majmunima, a kroz neko vrijeme očekuju se i rezultati testiranja na ljudima (O'Keefe i sur., 2009.).

Danas se biljke iz skupine duhana koriste i za produkciju vakcina koje bi se upotrebljavale u borbi protiv raka. Tradicionalni načini liječenja, tj. kemoterapija izazivaju brojne nuspojave u organizmu koje su često vrlo štetne, dok bi se cjepivom one u potpunosti izbjegle. Jedan od karcinoma na kojima se provode istraživanja je jedan oblik limfoma ("follicular B-cell lymphoma"), kronične i neizlječive bolesti. Naime, do ovog tipa limfoma dolazi kada se jedan B-limfocit počne nekontrolirano dijeliti i proizvoditi svoje klonove od kojih svi nose identična protutitijela (marker) na svojoj vanjštini. Ta pojava uočena je samo kod stanica tumora, a svaki pacijent ima tumor s markerom svojstvenim samo za njegov limfom. Kada bi se u tijelo pacijenta injektirala vakcina koja sadrži velik broja kopija protutijela specifičnih za njegov limfom, imunološki sustav pacijenta prepoznao bi i u određenom vremenu uništio tumorske B-limfocite. Kako svaki pacijent ima drugačija specifična protutijela, potrebna su i individualna cjepiva. Biljke su idealne za produkciju tih cjepiva jer mogu proizvesti velike količine u kratkom vremenu, jeftine su, a i ne postoji mogućnost zaraze drugim virusima koji se mogu pojavljivati u animalnim modelima. Pojednostavljeno, u TMV-vektor se unese ljudski gen za proizvodnju specifičnog pacijentovog protutijela te se zarazi biljka. Već nakon nekoliko dana, iz zaraženih listova se mogu izolirati i purificirati protutijela. Raniji rezultati istraživanja učinkovitosti ovog cjepiva na animalnim stanicama, te na miševima i ljudima imali su proturječne rezultate, a šesnaest novodijagnosticiranih pacijenata podvrgnuto je tretmanu i nisu zamijećene nikakve nuspojave. Konačni rezultati učinkovitosti vakcine tek se očekuju,a u budućnosti se planiraju istraživanja na većem broju oboljelih (http://med.stanford.edu/mcr/2008/plant-vaccine-0723.html).

Dosadašnja biomedicinska istraživanja obećavaju, a znanstvenici predviđaju kako bi se prvi od antivirusnih lijekova protiv HIV-a i vakcina koje bi se koristile u borbi protiv

raka pojavili na tržištu krajem desetljeća. Ako se ta predviđanja ostvare, još jednom bi se potvrdila neizmjerna uloga TMV-a u razvoju znanosti. Iako se o njemu zna dosta, granice našeg znanja i dalje se stalno pomiču.

## 5. LITERATURA


Juretić N. (1997): Virus mozaične bolesti duhana i evolucija molekularne biologije. *Rugjer* 2,29-34.

O'Keefe B. R., Vojdani F., Buffa V., Shattock R. J., Montefiori D. C., Bakke J., Mirsalis J., d'Andrea A-L., Hume S. D., Bratcher B., Saucedo C. J., McMahon J. B., Pogue G. P., Palmer K. E. (2009): Scalable manufacture of HIV-1 entry inhibitor griffithsin and validation of its safety and efficacy as a topical microbicide component. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **106**, 6099-6104.

Škorić D., Juretić N. (2004): Main contributions of tobacco mosaic virus research to the evolution of molecular biology. *Periodicum biologorum* **106** (2), 115-120

Beijernick M. W. (1898): Concerning a contagium vivum fluidum as cause of the spot disease of tobacco leaves (preuzeto kao prijevod na engleski iz Johnson J. (1942): Phytopathological Classics Number 7. APS, St. Paul , Minessota). U: Zaitlin M., Scholothof K. – B. G., Shaw G. J. (Eds.) (1999): Tobacco mosaic virus. One hundred years of contributions to virology. *APS Press*, St. Paul, Minnesota, 3-27

http://med.stanford.edu/mcr/2008/plant-vaccine-0723.html

http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/virarch.html

http://www.nature.com/news/2009/090330/full/news.2009.208.html

http://www.stanford.edu/group/virus/retro/2005gongishmail/HIV.html

http://www.virology.net/Big_Virology/BVunassignplant.html

## 6. SAŽETAK

Virus mozaika duhana (TMV) jedan je od najjednostavnijih i najbolje istraženih virusa uopće. O njegovoj strukturi napisan je velik broj znanstvenih članaka, a mnoga otkrića do kojih se dolazilo od 19. stoljeća, kada je virus otkriven, predstavljala su temelje za razvoj molekularne biologije. Zbog svoje jednostavnosti, neškodljivosti za čovjeka i mogućnosti izolacije u visokim koncentracijama iz zaraženih biljaka, TMV je bio odličan model u istraživanjima strukture proteina i RNA. TMV je prvi otkriveni virus, prvi koji je bio izoliran, prvi virus na kojem je uopće otkriveno načelo infektivnosti virusa.

U ovom radu izložen je pregled otkrića vezanih uz TMV kroz povijest, njegov doprinos razvoju molekularne biologije, kratak pregled strukture kao i najnovije mogućnosti upotrebe TMV-a u medicini, odnosno u proizvodnji lijekova. Granice našeg znanja o TMV-u i dalje se stalno pomiču. On je i dalje u središtu istraživanja temeljnih bioloških procesa pogotovo u biljkama, ali i značajnim primjenjenim biomedicinskim istraživanjima tako da možemo očekivati da će ovaj povijesno značajan virus i dalje igrati važnu ulogu u razvoju znanosti.

## 6. SUMMARY

*Tobacco mosaic virus* is one of the simplest and the best researched viruses in general. Its structure is very well known and many discoveries since the end of the 19$^{th}$ century, when the virus was discovered, represented a basis for development of molecular biology. Because of its simplicity, harmlessnes to man and availability in high concentrations, as an isolate from infected tobacco plants, TMV has proved to be very useful tool in studies of protein and RNA macromolecular structures.

In this work, a review of TMV related discoveries through history has been presented, as well as its contributions to the development of molecular biology, structural biology and the newest possibility of use in medicine. Our body of knowledge on TMV is steadily growing. It is widely used in elucidating fundamental biological processes, especially in plants, it underlines development of new strategies in biomedical research, so we can expect that this historically important virus will continue to play a pivotal role in further scientific breakthroughs.