

Marcin Przybyś

*Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy
w Puławach*

TYTOŃ – ZIELONY BIOREAKTOR*

Wstęp

Gwałtowny rozwój biologii molekularnej w ostatnich latach umożliwił wykorzystanie roślin, jako bioreaktorów do produkcji niemal nieograniczonej ilości zrekombinowanych białek, które znajdują zastosowanie w medycynie (diagnostyka, profilaktyka, leczenie chorób), przemyśle (biopolimery, enzymy) i ochronie środowiska (fitoremediacja). Tytoń był i jest główną rośliną wykorzystywaną w tzw. rolnictwie molekularnym (ang. *molecular farming*). Wynika to z bardzo wydajnej transformacji genetycznej, oraz dużej ilości wytwarzanej biomasy. Światowy popyt na rekombinowane białka rośnie szybciej niż możliwości tradycyjnych systemów produkcyjnych. Dotyczy to zarówno białek wykorzystywanych w przemyśle farmaceutycznym jak również enzymów przemysłowych i wtórnych metabolitów. Tradycyjne systemy produkcyjne wykorzystujące mikroorganizmy lub hodowle komórkowe są ograniczone trudnościami w zwiększaniu skali procesów oraz dużymi kosztami produkcji, szczególnie w odniesieniu do potrzeby stosowania bardzo skomplikowanej i kosztownej aparatury, ale również drogimi etapami końcowego oczyszczania produktu. Produkcja zrekombinowanych białek w roślinach pozwala na łatwe i tanie zwiększenie skali produkcji, a poza tym zapewnia możliwości niedostępne w tradycyjnych systemach. Rośliny, jako zielone bioreaktory, posiadają zdolność do przeprowadzania potranslacyjnych modyfikacji białek – glikozylacji, lub tworzenia mostków dwusiarczkowych, które są często niezbędne do aktywności biologicznej białek wielu ssaków (60, 38). Przy wykorzystaniu roślin jako zielonych bioreaktorów, szczególnie w przemyśle farmaceutycznym, nie ma ryzyka zanieczyszczenia wirusami i patogenami ludzkimi, ponieważ nie są znane przypadki zakażenia roślin przez ludzkie patogeny. Uprawa roślin jest tania w porównaniu do kosztów prowadzenia hodowli komórkowych, a jako źródło energii wykorzystywane jest światło słoneczne, co dodatkowo redukuje koszty. Wykazuje również duże stężenia białek rozpuszczalnych, co stanowi atrakcyjną cechę dla wykorzystania tej rośliny jako platformy do produkcji zrekombinowanych białek. Tytoń umożliwia wykorzystanie różnych systemów ekspresyjnych: ze stabilnie

*Opracowanie wykonano w ramach zadania 3.5 w programie wieloletnim IUNG-PIB

wbudowanym transgenem w genom jądrowy (rośliny transgeniczne) lub chloroplastowy (rośliny transplastomiczne) lub z przejściową ekspresją transgenów opartą na zakażaniu roślin i namnażaniu zrekombinowanego wirusa.

Systemy ekspresji genów

Stabilna transformacja genomu jądrowego:

Jest prowadzona najczęściej przy użyciu patogena roślinnego *Agrobacterium tumefaciens*, który wydajnie przenosi rDNA do genomu jądrowego komórek roślinnych. Miejsce integracji genów przenoszonych za pomocą *Agrobacterium* jest przypadkowe. Szczepy *Agrobacterium* wykorzystywane w transformacji zostały technikami inżynierii genetycznej zmodyfikowane w taki sposób, aby wyeliminować geny wirulencji powodujące u zakażonych roślin guzowatość korzeni, jednocześnie pozostawiając te, które są odpowiedzialne za wydajny transfer rDNA. Alternatywną metodą wprowadzania DNA do komórki roślinnej jest mikrowstrzeliwanie (ang. *biolistic, gene gun*). Jest to metoda bezpośredniego (bezwektorowego) wprowadzania obcego DNA. W tej metodzie rDNA oplaszczą złote kulki (zwykle ok. 1 μm średnicy), które są wstrzeliwane do tkanki roślinnej przy użyciu sprężonego helu. Tak wprowadzone rDNA ulega następnie intergracji z genomem. Taki sposób wprowadzania rDNA często skutkuje większą liczbą kopii genu, która częściej ulega integracji z genomem niż w przypadku stosowania *Agrobacterium*.

Stabilna transformacja genomu chloroplastowego

rDNA wprowadza się do chloroplastów najczęściej stosując metodę mikrowstrzeliwania lub przy użyciu wektora. Jako wektor najczęściej stosuje się pochodne wektorów *E.coli* zawierające sekwencje plastydowe długości 1-2 kb, które na obu końcach otaczają gen selekcyjny i wprowadzany rDNA. Takie wektory namnażane są w *E.coli*, a następnie wprowadzane do plastydów, gdzie gen markerowy i wprowadzany rDNA ulegają integracji z genomem chloroplastowym (64). Zaletą transformacji genomu chloroplastowego jest wysoka zawartość produkowanych rekombinowanych białek – nawet do 46% ogółu białek rozpuszczalnych TSP (ang. *total soluble protein*) (87).

Ekspresja przejściowa

Polega na wprowadzeniu do rośliny zrekombinowanego DNA za pomocą wektora wirusowego. W tym celu wykorzystuje się odpowiednio przygotowane wirusy, gdzie w genom wirusa wbudowuje się rDNA. Następnie roślinę zakaża się tak spreparowanym wirusem. W efekcie w zakażonej roślinie poza białkami wirusa produkowane jest również białko kodowane przez wprowadzony gen. Wprowadzany gen w tej metodzie nie ulega integracji z materiałem genetycznym rośliny

(87). Wykorzystanie ekspresji przejściowej pozwala na bardzo szybkie wytworzenie dużych ilości zrekombinowanych białek w krótkim czasie. Metodę tę można wykorzystać na przykład do szybkiego reagowania podczas wybuchu pandemii (np. ostatnia pandemia grypy A/H1N1) (99).

Wytwarzanie białek terapeutycznych w tytoniu

Tytoń nie jest jadalny dla człowieka i dla zwierząt, co minimalizuje ryzyko wprowadzenia do łańcucha żywieniowego materiału modyfikowanego genetycznie. Te cechy sprawiły, że tytoń idealnie nadaje się do wykorzystania jako zielony bioreaktor do produkcji biofarmaceutyków. Obecnie prowadzonych jest wiele badań nad produkcją białek terapeutycznych w transgenicznym roślaku tytoniu, a niektóre przechodzą właśnie etap badań klinicznych na człowieku (99).

Produkcja przeciwciał

Przeciwciała stanowią dużą grupę nowych leków (Tab. 1). Monoklonalne przeciwciała tradycyjnie produkowane są w hodowlach linii komórkowych hybrydoma. Utrzymywanie takich hodowli jest kosztowne. Produkcja w roślinach jest więc tanią alternatywą. Tytoń był pierwszą rośliną wykorzystaną do tego celu. Już w 1989 roku H i a t t i n. (36) uzyskali w nim w pełni funkcjonalne przeciwciało monoklonalne 6D4. W tym celu użyli dwóch transgenicznych roślin rodzicielskich, z których jedna wytwarzała ciężki łańcuch, a druga lekki łańcuch przeciwciała. Proste skrzyżowanie tych roślin spowodowało, że w pokoleniu F1 rośliny wytwarzały w pełni funkcjonalne, złożone z ciężkich i lekkich łańcuchów, przeciwciało. Białka te były wytwarzane z dość dużą wydajnością i stanowiły 1,3% ogółu białek rozpuszczalnych (TSP) (ang. *total soluble protein*).

Innym rodzajem przeciwciał uzyskanych w tytoniu były przeciwciała sekrecyjne IgA (SIgA) (ang. *secretory IgA*) o bardziej skomplikowanej budowie, składające się z kompleksu 2 jednostek IgA (2 ciężkie i 2 lekkie łańcuchy), połączonych łańcuchem J oraz z łańcucha wydzielniczego (43). Są to przeciwciała naturalnie produkowane przez organizm, wydzielane na powierzchnię błon śluzowych, w celu ochrony przed infekcjami i toksynami. Produkcja tego typu zrekombinowanych białek przy wykorzystaniu linii komórkowych ssaków jest bardzo droga i skomplikowana z uwagi na konieczność stosowania dwóch niezależnych oraz mieszanych linii komórkowych i stałego nadzoru nad prowadzeniem tej hodowli (99). Zastosowanie tytoniu do wytwarzania tego typu przeciwciał bardzo uprościło ten proces oraz ograniczyło jego koszty. W ten sposób udało się uzyskać w tytoniu humanizowane (o cechach zbliżonych do przeciwciał ludzkich) mysie przeciwciało sekrecyjne IgA1 (Guy's 13 SIgA-G). Mysie przeciwciało monoklonalne IgG1 (Guy's 13) rozpoznaje antygeny I/II (SA I/II) *Streptococcus mutans* – głównego sprawcy próchnicy zębów,

a jego użycie terapeutyczne zapobiega kolonizacji jamy ustnej przez tę bakterię (101). Uzyskanie humanizowanego SIgA-G było możliwe poprzez wyprowadzenie niezależnych linii tytoniu z ekspresją odpowiednio: lekkich łańcuchów Guy's 13 IgG, ciężkich łańcuchów przeciwciała hybrydowego IgG-A, mysiego łańcucha J oraz szczerzego łańcucha wydzielniczego. Następnie, dzięki serii krzyżowań tych linii, uzyskano tytoń wytwarzający w pełni funkcjonalną wielkocząsteczkową mysią immunoglobulinę Guy's13 SIgA-G z wydajnością dochodzącą nawet do 500 µg na gram liści (58). Badania kliniczne na ludziach potwierdziły skuteczność w zapobieganiu kolonizacji jamy ustnej przez *S. mutans* pozyskiwanych z tytoniu przeciwciał SIgA-G (59). Od 2005 roku dostępny jest już na rynku komercyjny preparat o nazwie CaroRx™ bazujący na uzyskiwanych w tytoniu przeciwciałach SIgA-G (99).

Tytoń może być również wykorzystany do wytwarzania fragmentów przeciwciał m.in. fragmentów przeciwciał (Fab) (ang. *antibody-binding fragment*), czy zmienionych fragmentów jednołańcuchowych przeciwciał (scFv) (ang. *single-chain variable fragment*). Te małe syntetyczne przeciwciała są w pełni funkcjonalne i posiadają zdolność specyficznego wiązania antygeny. Wykorzystywane są zarówno w diagnostyce jak i leczeniu (92). W tytoniu udało się uzyskać przeciwciała skierowane przeciwko ErbB-2 (HER 2, Neu) – białku receptorowemu zaliczanemu do ludzkich nabłonkowych czynników wzrostu (EGF) (ang. *epidermal growth factor*) (27). Białko ErbB-2, szczególnie aktywne u pacjentek z nowotworami piersi, sprzyja proliferacji komórek i wydłużeniu ich czasu przeżycia, poza tym hamuje powstawanie przerzutów (51). W badaniach wykorzystano dwa niezależne systemy ekspresji konstruktów zawierającego gen kodujący ErbB-2. System ze stabilnie wbudowanym transgenem w genomie jądrowym wykorzystano przy użyciu roślin tytoniu uprawnego *Nicotiana tabacum*, a system z przejściową ekspresją u dzikiego gatunku *Nicotiana benthamiana*. Ilość wytwarzanych przeciwciał w przypadku systemu ze stabilnie wbudowanym transgenem wynosił 0,6-0,8 g/g tkanki, zaś w systemie przejściowym 800 µg/g (26,27). W ostatnich latach prowadzone są również badania nad tytoniem niosącym w jednym genomie transgeny kodujące przeciwciała skierowane przeciwko neurotoksynie botulinowej (jadowi kiełbasianemu) i węglikowi (2). Ma to ogromne znaczenie, szczególnie w obecnym czasie, kiedy ryzyko wykorzystania broni biologicznej jest wysokie. Tytoń może stać się źródłem pozyskiwania tanich i szybkich w produkcji skutecznych przeciwciał.

Szczepionki

Szczepienie to podawanie antygeny (szczepionki), w celu produkcji przez organizm odpowiednich przeciwciał zapewniających odporność na choroby. Szczepienie jest najbardziej efektywną i skuteczną formą zapobiegania chorobom zakaźnym. W szczepionce mogą być podawane zarówno atenuowane (wywołujące odpowiedź immunologiczną, ale niezdolne do wywołania choroby) jak i martwe formy patogenów

Tabela 1

Przykłady przeciwciał uzyskanych w tytoniu

Choroba/Patogen	Uzyskane przeciwciało	Maks. zawartość	Literatura
Botulina	Anti-BoNT/A scFv	20 mg/kg świeżych liści	Almquist i in., 2006 (2)
HIV	2G12 mAb	1%	Floss i in., 2009 (22)
HIV	2F5 mAb		Sack i in., 2007 (86)
Nowotwór (chłoniak z komórek B)	Idiotypowo specyficzne	b.d.	McCormick i in., 2008 (70)
Nowotwór piersi i jelita grubego	Anti-Lewis Y mAb	30 mg/kg świeżych liści	Brodzik i in., 2006 (8)
Nowotwory (szerokie spektrum)	H10 mAb	1,1 mg/kg świeżych liści	Vilanni i in., 2009 (104)
Nowotwór jelita grubego	CO17-1A mAb	0,02% TSP	Ko i in., 2005 (48)
Nowotwór skóry	TheraCIM®	1,2µg/g	Rodriguez i in., 2005 (82)
Powiązany z guzami nowotworowymi mózgu – antygen tenascyny-C	H10 mAb	100 mg/kg świeżych liści	Villani i in., 2009 (104)
<i>Streptococcus mutans</i>	Guy's 13 mAb	b.d.	Daniell i in., 2004 (14)
<i>Streptococcus mutans</i>	CaroRX™	80 mg/kg świeżych liści	Ma i in., 1998 (59)
Salmonella	Anti-LPS scFv	41,7 µg/g	Makvandi-Nejad i in., 2005 (62)
Wąglik	Anti-PA mAb	b.d.	Hull i in., 2005 (40)
Wścieklizna	R12 mAb	0,5 mg/l	Girard i in., 2006 (29)
W ścieklizna	SO57 mAb	0,07% TSP	Ko i in., 2003 (47)
Zapalenie wątroby typu B (HBV)	B294, B303 mAb	5g/kg świeżych liści	Gleba i in., 2005 (30)
Zapobieganie odrzucaniu przeszczepów	LO-BM2	0,29% TSP	De Mynck i in., 2009 (17)

bakteryjnych, czy wirusowych. Opracowanie szczepionek opartych na wykorzystaniu specyficznych białek zamiast całych patogenów stwarza mniejsze ryzyko wystąpienia działań niepożądanych. Zastosowanie nowoczesnych technik inżynierii genetycznej uprościło ten proces. Podobnie jak przeciwciała szczepionki są obecnie produkowane w bakteriach, drożdżach i z wykorzystaniem linii komórkowych ssaków. Jednak tytoń w ostatnich latach staje się nowoczesną alternatywą dla systemów tradycyjnych (Tab. 2). Warto wspomnieć o wytwarzanych w tytoniu szczepionkach przeciwko wirusowi HIV (ang. *human immunodeficiency virus*), wirusowemu zapaleniu wątroby typu B, cholercze, wirusowi ostrego zespołu niewydolności oddechowej (SARS) (ang.

severe acute respiratory syndrome), czy wirusowi Epsteina-Barr wywołującemu mononukleozę zakaźną. Wiele z tych szczepionek wyszło już z fazy testów laboratoryjnych i znajduje się na etapie badań na zwierzętach, poprzedzających testy kliniczne na człowieku. Przykładem takiej szczepionki może być szczepionka przeciwko ospie prawdziwej. Udało się uzyskać w tytoniu białko B5 z domeną antygenową, pB5. Zastosowanie tej szczepionki u myszy wywoływało silną odpowiedź immunologiczną organizmu i wytworzenie odpowiednich przeciwciał chroniących przed chorobą (31). Tytoń został również wykorzystany do produkcji białka SARS-CoV S1. Podanie tego białka myszy prowadziło do wytworzenia specyficznych przeciwciał zabezpieczających zwierzę przed zakażeniem wirusem SARS (80). Innym przykładem może być szczepionka przeciwko wąglikowi (*Bacillus anthracis*). W tradycyjnych systemach szczepionkę uzyskuje się przez izolację z podłoża hodowlanego antygeny ochronnego (PA) (ang. *protective antigen*). K o y a i i n. (50) uzyskali ten antygen w transgenicznym tytoniu. Ekspresja genu *pagA* kodującego białko PA zachodziła w chloroplastach. Produkowane w transgenicznym tytoniu białko PA stanowiło do 14,2% ogółu białek rozpuszczalnych rośliny (TSP). W ostatnim czasie udało się uzyskać w roślinach *Nicotiana benthamiana* kompleks immunologiczny Ebola (EIC) (ang. *Ebola immune complex*) (79). Ebola należy do najniebezpieczniejszych wirusów świata. Przez amerykańskie Centrum Kontroli Chorób został razem z wirusem Marburg zaklasyfikowany do kategorii A, oznaczonej jako stwarzające zagrożenie dla bezpieczeństwa narodowego. Wirusy te wywołują gorączki krwotoczne, a śmiertelność po zakażeniu dochodzi do 90%. Glikoproteina GP1 wirusa Ebola została połączona z C-końcem ciężkiego łańcucha humanizowanej immunoglobuliny 6D8 IgG – przeciwciała monoklonalnego specyficznie wiążącego się z liniowym epitopem na powierzchni GP1. Wspólna ekspresja kompleksu GP1-ciężki łańcuch 6D8 IgG oraz lekkiego łańcucha 6D8 w *Nicotiana benthamiana* pozwoliło na uzyskanie funkcjonalnej immunoglobuliny (EIC). Testy *in vitro* przeprowadzone na myszach BALB/C, którym podano oczyszczony EIC, wykazały produkcję przeciwciał anti-Ebola. Pokazuje to potencjał jaki daje produkcja EIC w tytoniu, w celu wytwarzania szczepionki dla ludzi. Rośliny *Nicotiana benthamiana* zostały również wykorzystane, jako zielone bioreaktory do uzyskania rekombinowanych podjednostek hemaglutyniny (HA) pochodzącej od szczepów grypy H1N1 i H5N1 (91). Szczepienie jest preferowanym sposobem zapobiegania grypie. Obecnie wykorzystywana metoda wytwarzania hemaglutyniny nie zapewnia wystarczającej wydajności i szybkości produkcji, wystarczającej dla zaspokojenia światowego zapotrzebowania, szczególnie w odniesieniu do nowych potencjalnie niebezpiecznych szczepów mogących wywołać pandemię. S h o j i i n. (91) udało się uzyskać w roślinach *Nicotiana benthamiana* 90 mg hemaglutyniny z 1 kg biomasy. Obiecujące wyniki dotyczące wykorzystania tytoniu jako zielonego bioreaktora skłoniły naukowców do próby wykorzystania u pacjentów cierpiących na chłoniaki niezłośliwe, produkowanych w tytoniu personalizowanych przeciwciał typu scFv

jako szczepionek (69, 70). Z guzów pacjentów pobierano materiał, który posłużył do wydzielenia regionów o zmiennej sekwencji, następnie domeny idiotypowe łączono za pomocą polilinkera (krótki odcinek DNA zawierający wiele miejsc rozpoznawanych przez różne enzymy restrykcyjne) i klonowano do zmodyfikowanego genomu wirusa mozaiki tytoniowej (TMV). Tak spreparowany wirus służył do zakażenia roślin tytoniu, które w następstwie infekcji wirusowej produkowały spersonalizowane przeciwciała. System ten pozwala na szybkie pozyskiwanie przeciwciał i immunizację pacjentów ich własnymi indywidualnymi terapeutycznymi antygenami.

Tytoń wykorzystywany jest również do produkcji szczepionek stosowanych w weterynarii. Przykładem może być szczepionka przeciwko zakaźnemu zapaleniu żołądka i jelit świń wywoływanemu przez *Coronavirus* (TGEV) (ang. *Transmissible Gastroenteritis Virus*). W tytoniu uzyskano N-końcową domenę glikoproteiny S (N-gS), zawierającą główne miejsca antygenowe białka (100). Po podaniu świniom szczepionki zawierającej N-gS wytwarzała ona przeciwciała przeciw TGEV. W tytoniu uzyskano również białko H kodowane przez wirusa księgoszusu bydła (RPV) (ang. *Rinderpest Virus*). Choroba ta charakteryzuje się blisko 100% śmiertelnością. Dootrzewnowe podanie myszom białka H powodowało produkcję przeciwciał rozpoznających wirus RPV (46). W ostatnim czasie, w USA, firma DOW AgroSciences uzyskała zgodę Departamentu Rolnictwa na wprowadzenie do sprzedaży szczepionki wytworzonej w tytoniu, stosowanej przeciw rzekomemu pomorowi drobiu (choroba Newcastle) (102).

Cytokiny

Cytokiny to małe białka lub glikoproteiny produkowane przez wiele typów komórek. Są silnymi immunoregulatorami. Poprzez stymulację lub hamowanie aktywacji, proliferacji i różnicowania komórek oraz regulację sekrecji przeciwciał lub innych cytokin, wpływają na intensywność i długość trwania odpowiedzi immunologicznej (77). Cytokiny mogą działać zarówno na komórki, które je wydzielają, komórki w najbliższym sąsiedztwie, jak również na komórki w innych narządach. Cytokiny mogą działać zarówno synergistycznie jak i antagonistycznie oraz mogą wywoływać kaskady sprzężeń dodatnich i ujemnych (32). Cytokiny dzielimy na: interleukiny, interferony, hemopoetyny, chemokiny, cząsteczki TNF (ang. *tumor necrotic factor*) i inne. Rekombinowane cytokiny są szeroko testowane jako farmaceutyki w leczeniu infekcji, chorób autoimmunologicznych i nowotworów (57, 76, 108). Obecnie na rynku dostępnych jest wiele rekombinowanych cytokin, ale są one bardzo drogie przez co mało dostępne dla zastosowań terapeutycznych. Poza tym wiele z nich – produkowanych w *E. coli* – nie jest glikozylowanych. Glikozylacja jest bardzo ważnym procesem wpływającym na fałdowanie białek, stabilizującym ich strukturę oraz wpływającym na ich funkcję (99). W ostatnich latach poczyniono duże postępy w modyfikacji genetycznej enzymów biorących udział w procesie glikozylacji.

Dzięki temu możliwe stało się dodawanie lub usuwanie pożądaných grup cukrowych i uzyskiwanie białek z pożądanym wzorem cukrowym zbliżonym do ludzkiego (18, 63). W efekcie stało się możliwe wykorzystanie roślin, w szczególności tytoniu do produkcji tanich zrekombinowanych cytokin (Tab. 3).

Tabela 2

Przykłady szczepionek uzyskanych w tytoniu

Choroba/ Patogen	Uzyskany antygen	Max. zawartość	Literatura
Amebioza	lecA	6,3% TSP	Chebolu i Daniell 2007 (11)
Cholera	Podjednostka B toksyny cholery połączona z ludzką proinsuliną (CTB-Pins)	16% TSP	Ruhlman i in., 2007 (84)
Cholera	ctxB	4,1% TSP	Daniell i in., 2001 (13)
Cholera i malaria	Podjednostka B toksyny cholery (CTB) połączona z antygenem AMA-1 malarii lub CTB połączona z białkiem powierzchniowym merozoitów (MSP)	13,2% i 10,1% TSP	Davoodi-Semiromi i in., 2010 (15)
Ebola	kompleks immunologiczny EIC	50 µg/g liści	Phoolcharoen i in., 2011 (79)
<i>E. coli</i> 0157:H7	Intimina	13 µg/g świeżej masy liści	Judge i in., 2004 (44)
<i>E. coli</i> szczep K88	FaeG of K88 fantygen fimbii	0,15% TSP	Huang i in., 2003 (39)
Gruźlica	Ag85b	4% TSP	Floss i in., 2010 (23)
Grypa (H1N1, H5N1)	HAC1, HAI-05	90 i 50 mg/kg liści	Shoji i in., 2011 (91)
Grypa	HA	200 mg/kg świeżej masy liści	Shoji i in., 2008 (90)
HBV	HbsAg (HepB)	3% TSP	Thanavala i in., 1995 (96)
HCV	Biało rdzenia (Hep C)	b.d.	Nianiou i in., 2008 (75)
HIV	p24 białko płaszczka HIV-Nef	0,0035% TSP 0,7% TSP	Zhang i in., 2002 (109) Marusic i in., 2007 (65)
HIV	2G12	1% TSP	Floss i in., 2009 (22)
Wirus brodawczaka ludzkiego (HPV)	L1 białko płaszczka	0,5% TSP 1 mg/kg	Biemelt i in., 2003 (4) Kohl i in., 2006 (49)
Wirus brodawczaka ludzkiego (HPV)	HPV-16 L1	24% TSP	Fernández-San Millán i in., 2008 (21)

Tabela 2. cd.

Malaria	Pfs25	400mg/kg świeżych liści	Farrance i in., 2011 (20)
Malaria	PyMSP4/5	10% TSP	Webster i in., 2009 (107)
Ospa prawdziwa	pB5	100 mg/kg	Golovkin i in., 2007 (31)
Rotavirus	VP6	3% TSP	Birch-Machin i in., 2004 (6)
Toksyna tężcowa	tetC	25% TSP	Tregoning i in., 2003 (98)
Wąglik	PA	14,2% TSP	Watson i in., 2004 (106) Koya i in., 2005 (50)
Wirus Norwalk	VLP	0,23%	Mason i in., 1996 (66)
Epidemiczna biegunka świń (PED)	Białko spike	2,1% TSP	Kang i in., 2005 (45)
Parwovirus psów (CPV)	CTB-2L21 GFP-2L21	33,1% TSP	Molina i in., 2004, 2005 (72, 73)
Parwovirus świń (PPV)	VP2	0,3% TSP	Rymerson, 2003 (85)
Pryszczycza	VP1 białko płaszczka	51% TSP	Lentz i in., 2010 (56)

Tabela 3

Przykłady cytokin uzyskanych w tytoniu

Grupa cytokin	Cytokina	Maks. zawartość	Literatura
Hematopoetyny	Erytropoetyna	0,0026% TSP	Matsumoto i in., 1995 (67)
	Erytropoetyna	0,05% TSP	Conley i in., 2009 (12)
	G-CSF	105 µg/l	Hong i in., 2002 (37)
	GM-CSF	0,03% TSP	Sardana i in., 2002 (88)
	GM-CSF	2% TSP	Zhou i in., 2006 (111)
Interferony	IFN- γ	6% TSP	Leelavathi i Reddy, 2003a (53)
	IFN- α 2b	20% TSP	Arlen i in., 2007 (3)
Czynniki wzrostu	aFGF (FGF-1)	8% TSP	Matsuo i in., 2007 (68)
Interleukiny	IL-2	b.d.	Redkiewicz i in., 2012 (81)
	IL-4	0,086% TSP	Patel i in., 2007 (78)
	IL-4	0,1% TSP	Ma i in., 2005 (61)
	IL-10	37 µg/g liści	Bortesi i in., 2009 (7)
	IL-10	0,27% TSP	Patel i in., 2007 (78)
	IL-12	40 ng/g	Gutierrez-Ortega i in., 2004 (34)
	IL-13	0,15% TSP	Wang i in., 2008 (105)
	IL-18	0,051%	Zhang i in., 2003 (110)

Interleukiny

Ludzka interleukina IL-13 ma działanie plejotropowe wywołując zarówno prozapalną jak i przeciwzapalną odpowiedź immunologiczną (19). Możliwe jest jej wykorzystanie do leczenia wielu chorób m.in. cukrzycy typu I (T1DM) (99). Dotychczasowe, tradycyjne systemy pozyskiwania rekombinowanej IL-13 są mało wydajne (97). Dodatkowo IL-13 pozyskiwana z *E. coli* nie jest glikozylowana, przez co nienatywna, co oznacza konieczność wprowadzenia dodatkowych etapów jej obróbki: pakowanie do ciał inkluzyjnych, dodatkowe rozpuszczanie i renaturacja (97). Dodatkowe etapy powodują zwiększenie kosztów pozyskiwania tej cytokiny. Alternatywą może być wykorzystanie jako gospodarza do produkcji rekombinowanej IL-13 niskonikotynowej i niskoalkaloidowej odmiany tytoniu 81V9 (105). Ludzka IL-13 była tu produkowana w wielu formach molekularnych w ilości ok. 0,15% ogółu białek rozpuszczalnych. Różnorodne formy IL-13 wynikały z różnej glikozylacji N-końca białka. W testach laboratoryjnych polegających na trawieniu trypsyną potwierdzono większą odporność glikozylowanych form IL-13 na trawienie, w stosunku do form nieglikozylowanych. Testy biologiczne prowadzone w warunkach *in vitro* wykazały, że zastosowanie uzyskanej w tytoniu IL-13, w hodowli czynnikozależnej ludzkiej erytroleukemicznej linii komórkowej, zachowuje funkcje biologiczne identyczne z autentyczną IL-13. Wyniki te sugerują, że wykorzystanie transgenicznego tytoniu do produkcji ludzkiej IL-13 jest bardziej odpowiednie niż konwencjonalnych systemów ekspresyjnych.

Interleukina IL-10 jest cytokiną o silnym działaniu przeciwzapalnym. Stosuje się ją w leczeniu chorób zapalnych i niektórych chorób autoimmunologicznych. W badaniach wykorzystano system ekspresji oparty zarówno na stałej ekspresji wynikającej z wbudowania genu kodującego IL-10 do genomu tytoniu jak też z systemu ekspresji tymczasowej. Zastosowano dwa rodzaje IL-10 – od myszy oraz bardzo zbliżoną do niej (wykazującą 84% identyczności sekwencji aminokwasowej) pochodzącą od wirusa Epsteina-Barr (7). W roślinach tytoniu zawartość IL-10 wynosiła odpowiednio 37 $\mu\text{g/g}$ i 10,8 $\mu\text{g/g}$ świeżej masy liści. Uzyskane interleukiny w obu przypadkach były zdolne aktywować ścieżkę sygnałową IL-10 oraz indukować specyficzną odpowiedź przeciwzapalną w makrofagach J744 myszy.

Hematopoetyny

Ludzka erytropoetyna (EPO) bierze udział w procesie powstawania erytrocytów, ale posiada również drugą aktywność – ochrony uszkodzonych tkanek poprzez hamowanie apoptozy, tłumienie stanów zapalnych, stymulację angiogenezy (28). Kanadyjscy badacze przy wykorzystaniu systemu tymczasowej ekspresji wytworzyli w roślinach tytoniu zrekombinowaną ludzką erytropoetynę. Wytwarzana była ona w ilości 0,05 % ogółu białek rozpuszczalnych. Wytworzona w ten sposób erytropoetyna wykazywała zwiększone powinowactwo do łączenia się z receptorem i była zdolna do ochrony komórek nabłonkowych nerki przed śmiercią indukowaną cytokinami (12).

W tytoniu uzyskano również czynnik stymulujący kolonie granulocytarno-makrofagowe (GM-CSF) (ang. *granulocyte, macrophage colony stimulating factor*). GM-CSF jest szeroko stosowaną cytokiną w leczeniu neutropenii, niedokrwistości aplastycznej oraz jest stosowana w ograniczaniu infekcji po przeszczepie szpiku kostnego. Jej roczna produkcja wynosząca ok. 157g była warta w 2003 r. 77 milionów \$ (111). Badania dotyczące produkcji ludzkiego GM-CSF w systemach roślinnych prowadzone są już od kilku lat, głównie w hodowlach zawieszonych komórek roślinnych. Niestety wydajność produkcji jest bardzo niska (41, 52, 89). Zhou i in. (111), wykorzystując jako wektor zmodyfikowany wirus PVX niosący w swoim genomie gen kodujący GM-CSF, zakażając nim rośliny *Nicotiana benthamiana*, uzyskali zadowalającą wydajność produkcji tej glikoproteiny na poziomie 2% ogółu białek rozpuszczalnych. Zauważyli oni, że wiek liści znacząco wpływa na zawartość GM-CSF. W młodych liściach koncentracja GM-CSF była 2,6 razy większa. Aktywność biologiczna uzyskanego rekombinowanego ludzkiego GM-CSF została potwierdzona przez stymulację wzrostu ludzkich komórek TF-1.

Czynniki wzrostu

Kwaśny czynnik wzrostu fibroblastów (aFGF=FGF 1) (ang. *acidic fibroblast growth factor*) to cytokina produkowana w wielu narządach: mózgu, nerkach, siatkówce, mięśniach gładkich i komórkach śródłbionka (9). Matsuo i in. (68) zaproponowali wykorzystanie zmodyfikowanego wirusa mozaiki ogórkowej (CMV) (ang. *cucumber mosaic virus*) jako wektora niosącego gen kodujący aFGF. Genom tego wirusa stanowią 3 nici RNA (RNA 1-3). W cząsteczce RNA 2 zastąpiono gen kodujący białko 2a fragmentem zawierającym miejsca restrykcyjne *StuI*, *MluI* i *SpeI*, tworząc w ten sposób wektor C2-H1. Następnie gen aFGF umieszczono w wektorze C2-H1. Takim zmodyfikowanym wirusem sztucznie zakażano rośliny *Nicotiana benthamiana*. Zainfekowane rośliny wykazywały wysoki poziom produkcji aFGF dochodzący aż do 8 % TSP.

Interferony

Interferony to grupa związków należących do cytokin, które hamują replikację wirusów i wzrost komórek oraz wzmacniają odpowiedź immunologiczną organizmu. Dlatego też znajdują szerokie zastosowanie w zwalczaniu zakażeń wirusowych. Interferony stanowią trzecią pod względem produkcji grupę biofarmaceutyków po insulinie i erytropoetynie. Niestety średni roczny koszt leczenia jednego pacjenta zakażonego wirusem zapalenia wątroby typu C wynosi ok. 26000 \$, co mocno ogranicza ich stosowanie, szczególnie w krajach rozwijających się (3). W ostatnim czasie udało się uzyskać w roślinach tytoniu w pełni funkcjonalny ludzki interferon IFN- α 2b. Gen kodujący interferon wprowadzono do DNA chloroplastowego. Uzyskano bardzo wysoką wydajność produkcji tego białka wynoszącą do 20%

ogółu białek rozpuszczalnych, co w przeliczeniu dawało ok. 3 mg interferonu na 1 g świeżej masy liści tytoniu. Warto tu podkreślić, że doświadczenia te prowadzono w warunkach polowych (3).

Inne farmaceutyki

Kolagen jest szeroko stosowany w medycynie do wspomagania regeneracji tkanek. Tradycyjnie pozyskiwany jest z materiału zwierzęcego lub ze zwłok, ale nie się to ze sobą ryzyko ewentualnych niebezpieczeństw związanych z alergiennością oraz zakażeniem patogenami. Ostatnio do produkcji ludzkiego kolagenu typu I wykorzystano tytoń (94). W tym celu, do genomu tytoniu wprowadzono 2 ludzkie geny kodujące zrekombinowany heterotrimeryczny kolagen typu I (rhCOL1) oraz geny kodujące ludzkie enzymy: P4H (ang. *prolyl-4-hydroxylase*) i LH3 (ang. *lysyl hydroxylase 3*), odpowiedzialne za kluczowe modyfikacje potranslacyjne. Uzyskany kolagen tworzył stabilne struktury potrójnych spirali i wykazywał biofunkcjonalność zbliżoną do ludzkiego kolagenu. Białka kolagenu stanowiły 2% TSP.

De Marchis i in. (16) wykorzystali tytoń do produkcji ludzkiej α -mannozydazy (MAN2B1). Niedobory tego enzymu powodują u ludzi α -mannozydozę, polegającą na gromadzeniu się oligosacharydów zawierających mannozę i objawiającą się nieprawidłowościami w budowie szkieletu, cechami dysmorficznymi twarzy, upośledzeniem słuchu i opóźnieniem umysłowym. Produkowany enzym był glikozylowany, a wydajność osiągnęła 10,2 jednostki na gram świeżych liści.

Innym przykładem wykorzystania tytoniu do produkcji biofarmaceutyków jest pozyskiwanie ludzkiej somatotropiny (hST) (ang. *human somatotropin*) (93). Somatotropina jest produkowanym przez przysadkę hormonem wzrostu. Wytworzone białko wykazywało prawidłową aktywność biologiczną oraz posiadało prawidłową konformację przestrzenną z wytworzonymi mostkami dwusiarczkowymi. Wykorzystanie transplastomicznego systemu ekspresji pozwoliło osiągnąć dużą wydajność produkcji białka – 7% TSP. Podobny gen przeniesiony do genomu jądrowego pozwolił już tylko na 300-krotnie niższą produkcję tego białka.

Wytwarzanie biopolimerów i enzymów

Tytoń coraz częściej zaczyna być wykorzystywany nie tylko do produkcji biofarmaceutyków, ale również biopolimerów, enzymów bakteryjnych lub grzybowych. Przykładem może być uzyskiwanie polihydroksyalkanolanów (PHA) (74). Związki te należą do grupy alifatycznych poliestrów pochodzenia mikrobiologicznego, będących odnawialnym źródłem biodegradowalnych termoplastików. Znajdują zastosowanie m.in. do produkcji implantów. Konstrukcjami zawierającymi geny $phaA_{Re}$, $phaB_{Re}$ pochodzące od *Ralstonia eutropha* i $phaC_{Ac}$ z *Aeromonas caviae* transformowano jądra komórkowe tytoniu. W efekcie transgeniczny tytoń produkował PHA w ilości dochodzącej do 1500 ppm.

Podjęmowane są również kroki wykorzystania tytoniu do produkcji celulozy, która byłaby wykorzystywana do uzyskiwania bioetanolu na cele energetyczne. Celuloza jest jednym z najliczniej występujących związków organicznych. W formie nieprzetworzonej znajduje zastosowanie w przemyśle papierniczym i tekstylnym. Celuloza może jednak znaleźć zastosowanie jako substrat do produkcji etanolu. Obecnie enzym celuloza wykorzystywany do hydrolizy celulozy w procesie produkcji etanolu pozyskuje się z grzyba *Trichoderma reesei*. Pozyskiwana w ten sposób celuloza jest droga, a jej produkcja mało wydajna. J i n i i n. (42), chcąc obniżyć koszty jej wytwarzania, transformowali rośliny tytoniu wprowadzając do ich genomu gen *e1*, kodujący domenę katalityczną termotolerancyjnej celuloazy endo-1,4- β -D glukazy E1 z *Acidothermus cellulolyticus*. Poddany transformacji tytoń wykazywał wysoki poziom produkcji celulozy.

Bardzo ciekawym jest również pomysł wykorzystania tytoniu do produkcji włókien nici pajęczej. Włókna takie cechuje duża wytrzymałość połączona z elastycznością, przez co znalazłyby one zastosowanie w produkcji sztucznych ścięgien i więzadeł, podłoży komórkowych dla kości i chrząstek, a także implantów i biodegradowalnych mikroszwów. M e n a s s a i i n. (71) transformowali tytoń konstruktami zawierającymi geny *MaSp1* i *MaSp2* pochodzące od *Nephila clavipes*. W konstruktach zastosowano dwa różne promotory: wzmocniony CaMV 35S oraz nowy tCUP. Obydwa geny z powodzeniem ulegały ekspresji, co w efekcie prowadziło do wytworzenia odpowiednich białek nici pajęczej.

Tabela 4

Przykłady biomateriałów i enzymów uzyskanych w tytoniu

Produkt	Użyty gen	Maks. zawartość	Literatura
Bioelastyczny polimer białkowy (PBP)	<i>aadA</i> , EG121	b.d.	Guda i in., 2000 (33)
Ksylanaza	<i>xynZ</i>	25,5 μ g/g	Chatterjee i in., 2010 (10)
Ksylanaza	<i>xynA</i>	6% TSP	Leelavathi i in., 2003b (54)
Monelina – słodkie białko	Mon	1,3% TSP	Roh i in., 2006 (83)
Polihydroksyalkanolany (PHA)	<i>ubiC</i>	26,5% TSP	Viitanen i in., 2004 (103)
Polihydroksyalkanolany (PHA)	<i>phaA</i> , <i>phbB</i> , <i>phbC</i>	1500 ppm	Nakashita i in., 2001 (74)
Polihydroksymaślan (PHB)	<i>phbA</i> , <i>phbB</i> , <i>phbC</i>	1,7 % TSP	Lössl i in., 2003 (55)

Wykorzystanie w ochronie środowiska

Zdegradowane, zanieczyszczone tereny stanowią obecnie duży problem. Dotychczas stosowane fizykochemiczne metody remediacji są kosztowne, zaś fitoremediacja jest przyjazną dla środowiska, potencjalnie efektywniejszą i tańszą metodą oczyszczania gleby z zanieczyszczeń niż metody tradycyjne (1). Niektóre rośliny

mają naturalną zdolność do pobierania zanieczyszczeń z gleby i ich degradacji (przekształcania) w mniej toksyczne substancje. W celu zwiększenia stopnia naturalnej remediacji możliwe jest umieszczenie w genomie roślin genów bakteryjnych odpowiedzialnych za oczyszczanie gleby z niektórych zanieczyszczeń takich jak rtęć, czy 2,4,6-Trinitrotoluen (TNT) (materiał wybuchowy).

Zanieczyszczenia rtęcią spowodowane są głównie przez związki metaloorganiczne – odpady z rolnictwa, górnictwa i przemysłu. Niektóre bakterie Gram-ujemne posiadają zdolność do detoksykacji związków metaloorganicznych przez konwersję metylowanej rtęci do rtęci metalicznej, która jest mniej toksyczną formą rtęci (95). Geny biorące udział w detoksyfikacji rtęci to: *merA* i *merB*. Gen *merB* koduje liazę odpowiedzialną za rozrywanie wiązań C-Hg, co prowadzi do uwalniania jonów Hg^{2+} . Gen *merA* koduje reduktazę, która przekształca jony Hg^{2+} do formy metalicznej Hg^0 (95). A b d e l R a h m a n i i n. (1) transformowali tytoń odmiany Gold Leaf za pomocą *Agrobacterium*, niosącą plazmid Ti zawierający geny *merA* i *merB*. Odporność na związki rtęci testowano na podłożach zawierających fenyllooctan rtęciowy (PMA) (ang. *phenyl mercuric acetate*) i chlorek rtęci (II) $HgCl_2$. Transgeniczny tytoń wykazywał długość korzeni i suchą masę korzeni odpowiednio 60 i 17 razy większą w stosunku do tytoniu nietransformowanego, co umożliwia lepsze pobieranie składników, w tym większej ilości związków rtęci i kumulowanie ich w roślinie (1).

Transgeniczny tytoń może być użyty także do fitoremediacji terenów skażonych materiałami wybuchowymi. Trotyl (TNT) jest jednym z najbardziej toksycznych materiałów wybuchowych. Gram-ujemna bakteria *Enterobacter cloacae* jest zdolna do degradacji trotylu (5). Gen *nsfl* wyizolowany z *E. cloacae* koduje enzym nitroreduktazę (NR), który jest odpowiedzialny za redukcję grup nitrozowych trotylu, co w efekcie prowadzi do wytworzenia hydroksyaminodinitrotoluenu i aminodinitrotoluenu (24). H a n n i n k i i n. (35) przenieśli bakteryjny gen *nsfl* do tytoniu. Transgeniczny tytoń tolerował stężenie trotylu do 0,5 mM, co jest jednocześnie granicą rozpuszczalności trotylu w wodzie. W innych badaniach tytoń był transformowany konstruktem zawierającym gen *onr* również pochodzącym od *E. cloacae*. Gen ten koduje reduktazę tetraazotanu (V) pentaerytrytu (PETN) (25). Reduktaza PETN redukuje PETN i nitroglicerynę do azotynów. Transgeniczny tytoń wzrastał na podłożu zawierającym 1 mM nitrogliceryny, co było toksycznym stężeniem dla tytoniu nietrasformowanego. Dowiedziono, że transgeniczny tytoń zawierający geny nitroreduktazy (NR) i reduktazy PETN nie tylko tolerują wysokie stężenia trotylu, nitrogliceryny i tetraazotanu (V) pentaerytrytu, ale również pobierają go z podłoża i degradują, czyniąc fitodetoksyfikację możliwą do zastosowania w oczyszczaniu terenów zanieczyszczonych materiałami wybuchowymi

Podsumowanie

Rośliny to skuteczne i wydajne zielone bioreaktory, użyteczne do produkcji rekombinowanych białek w celach medycznych, przemysłowych oraz dla potrzeb ochrony środowiska. Roślinne systemy ekspresji są alternatywą dla obecnie powszechnie stosowanych, tradycyjnych systemów opartych na hodowlach bakterii lub grzybów. Wśród roślinnych systemów ekspresyjnych, tytoń wyróżnia się łatwością we wprowadzaniu obcych genów oraz dużą produkcją biomasy. Przy dalszym dynamicznym rozwoju biotechnologii, tytoń może stać się rośliną, która nie będzie kojarzona z dymem papierosowym, ale jako roślina poprawiająca jakość życia nas wszystkich.

Literatura

1. Abdel Rahman R. A., Abou-Shanab R. A., Moawad H.: Mercury detoxification using genetic engineered *Nicotiana tabacum*. Global NEST Journal, 2008, **10(3)**: 432-438.
2. Almqvist K. C., McLean M. D., Niu Y. Q., Byrne G., Olea-Popelka F. C., Murrant C.: Expression of an anti-botulinum toxin A neutralizing single-chain Fv recombinant antibody in transgenic tobacco. Vaccine, 2006, **24**: 2079-2086.
3. Arlen P. A., Falconer R., Cherukumilli S., Cole A., Cole A. M., Oishi K. K., Daniell H.: Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon- α 2b. Plant Biotechnol. J., 2007, **5(4)**: 511-525.
4. Biemelt S., Sonnewald U., Galmbacher P., Willmitzer L., Muller M.: Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants. J. Virology, 2003, **77(17)**: 9211-9220.
5. Binks P. R., French C. E., Nicklin S., Bruce N. C.: Degradation of pentaerythritol tetranitrate by *Enterobacter cloacae* PB2. Applied and Environmental Microbiology, 1996, **62(4)**: 1214-1219.
6. Birch-Machin I., Newell C. A., Hibberd J. M., Gray J. C.: Accumulation of rotavirus VP6 protein in chloroplasts of transplastomic tobacco is limited by protein stability. Plant Biotechnol. J., 2004, **2**: 261-270.
7. Bortesi L., Rossato M., Schuster F., Raven N., Stadlmann J., Avesani L., Falorni A., Bazzoni F., Bock R., Schillberg S., Pezzotti M.: Viral and murine interleukin-10 are correctly processed and retain their biological activity when produced in tobacco. BMC Biotechnology, 2009, **9**:22.
8. Brodzik R., Głogowska M., Bandurska K., Okulicz M., Deka D., Ko K.: Plant-derived anti-Lewis Y mAb exhibits biological activities for efficient immunotherapy against human cancer cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, **103**:8804-8809.
9. Burgess W. H., Maciag T.: The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. Ann. Rev. Biochem., 1989, **58**: 575-606.
10. Chatterjee A., Das N. C., Raha S., Babbit R., Huang Q., Zaitlin D., Maiti I. B.: Production of xylanase in transgenic tobacco for industrial use in bioenergy and biofuel applications. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 2010, **46(2)**: 198-209.
11. Chebolu S., Daniell H.: Stable expression of Gal/GalNAc lectin of *Entamoeba histolytica* in transgenic chloroplasts and immunogenicity in mice towards vaccine development for amoebiasis. Plant Biotechnol. J., 2007, **5**: 230-239.

12. Conley A. J., Mohib K., Jevnikar A. M., Brandle J. E.: Plant recombinant erythropoietin attenuates inflammatory kidney cell injury. *Plant Biotechnol. J.*, 2009, **7(2)**: 183-199.
13. Daniell H., Lee S. B., Panchal T., Wiebe P. O.: Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *J. Mol. Biol.*, 2001, **311**: 1001-1009.
14. Daniell H., Carmona-Sanchez O., Burns B.: Chloroplast-derived antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines. w: Fischer R., Schillberg S. *Molecular Farming*. Verlag Publishers, Weinheim, Germany, 2004, 113-133.
15. Davoodi-Semiromi A., Schreiber M., Nalapalli S., Verma D., Singh N. D., Banks R. K., Chakrabarti D., Daniell H.: Chloroplast-derived vaccine antigens confer dual immunity against cholera and malaria by oral or injectable delivery. *Plant Biotechnol. J.*, 2010, **8**: 223-242.
16. DeMarchis F., Balducci C., Pompa A., Riise Stensland H. M., Guaragno M., Pagiotti R., Menghini A. R., Persichetti E., Beccari T., Bellucci M.: Human α -mannosidase produced in transgenic tobacco plants is processed in human α -mannosidosis cell lines. *Plant Biotechnol. J.*, 2011, **9(9)**: 1061-1073.
17. De Muynck B., Navarre C., Nizet Y., Stadlmann J., Boutry M.: Different subcellular localization and glycosylation for a functional antibody expressed in *Nicotiana tabacum* plants and suspension cells. *Transgenic Research*, 2009, **18(3)**: 467-482.
18. Desai P. N., Shrivastava N., Padh H.: Production of heterologous proteins in plants: strategies for optimal expression. *Biotechnology Advances*, 2010, **28**: 427-435.
19. Eisenmesser E. Z., Kapust R. B., Nawrocki J. P., Mazzulla M. J., Pannell L. K., Waugh D. S., Byrd R. A.: Expression, purification, refolding, and characterization of recombinant human interleukin-13: utilization of intracellular processing. *Protein Expression and Purification*, 2000, **20(2)**: 186-195.
20. Farrance C. E., Chichester J. A., Musiychuk K., Shamloul M., Rhee A., Manceva S. D., Jones R. M., Mamedov T., Sharma S., Mett V., Streatfield S. J., Roeffen W., Vegte-Bolmer M. V., Sauerwein R. W., Wu Y., Muratova O., Miller L., Duffy P., Sinden R., Yusibov V.: Antibodies to plant-produced *Vaccinium falciparum* sexual stage protein Pfs25 exhibit transmission blocking activity. *Human Vaccines*, 2011, **7(Supplement)**: 191-198.
21. Fernández-San Millán A., Ortigosa S. M., Hervás-Stubbs S., Corral-Martínez P., Seguí-Simarro J. M., Gaétan J., Coursaget P., Veramendi J.: Human papilloma virus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Plant Biotechnol. J.*, 2008, **6(6)**: 427-441.
22. Floss D. M., Sack M., Arcalis E., Stadlmann J., Quendler H., Rademacher T., Stoger E., Scheller J., Fischer R., Conrad U.: Influence of elastin-like peptide fusions on the quantity and quality of a tobacco-derived human immunodeficiency virus-neutralizing antibody. *Plant Biotechnol. J.*, 2009, **7**: 899-913.
23. Floss D. M., Mockey M., Zanello G., Brosson D., Diogon M., Frutos R., Bruel T., Rodrigues V., Garzon E., Chevalerey C., Berri M., Salmon H., Conrad U., Dedieu L.: Expression and immunogenicity of the mycobacterial Ag85B/ESAT-6 antigens produced in transgenic plants by elastin-like peptide fusion strategy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, Article ID: 274346.
24. French C. E., Nicklin S., Bruce N. C.: Aerobic degradation of 2, 4, 6-trinitrotoluene by *Enterobacter cloacae* PB2 and by pentaerythritol tetranitrate reductase. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64(8)**: 2864-2868.

25. French C.E., Rosser S., Davies G.J., Nicklin S., Bruce N.C.: Biodegradation of explosives by transgenic plants expressing pentaerythritol tetranitrate reductase. *Nature Biotechnology*, 1999, **17**(5): 491-494.
26. Galeffi P., Lombardia A., Di Donato M., Latinia A., Sperandea M., Cantalea C., Giacomini P.: Expression of single-chain antibodies in transgenic plants. *Vaccine*, 2005, **23**(15): 1823-1827.
27. Galeffi P., Lombardi A., Pietraforte I., Novelli F., Di Donato M., Sperandea M., Tornambé A., Fraioli R., Martayan A., Natali P.G., Benevolo M., Mottolese M., Ylera F., Cantale C., Giacomini P.: Functional expression of a single-chain antibody to ErbB-2 in plants and cell-free systems. *Journal of Translational Medicine*, 2006, **4**: 39.
28. Ghezzi P., Brines M.: Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine. *Cell Death Differ.*, 2004, **11**(Suppl. 1): S37-S44.
29. Girard L.S., Fabis M.J., Bastin M., Courtois D., Petiard V., Koproński H.: Expression of a human anti-rabies virus monoclonal antibody in tobacco cell culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006, **345**: 602-607.
30. Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S.: Magniffection – a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine*, 2005, **23**: 2042-2048.
31. Golovkin M., Spitsin S., Andrianov V., Smirnov Y., Xiao Y., Pogrebnyak N., Markley K., Brodzik R., Gleba Y., Isaacs S.N., Koproński H.: Smallpox subunit vaccine produced in planta confers protection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, **104**(16): 6864-6869.
32. Gołąb J., Jakóbsiak M., Zagożdżon R., Obłąkowski P.: Cytokiny, w: Jakóbsiak M., Gołąb J., Lasek W. (red) *Immunologia*. PWN: Warszawa, 2004, 198-224.
33. Guda C., Lee S.B., Daniell H.: Stable expression of a biodegradable protein-based polymer in tobacco chloroplasts. *Plant Cell Rep.*, 2000, **19**: 257-262.
34. Gutierrez-Ortega A., Avila-Moreno F., Saucedo-Arias L.J., Sanchez-Torres C., Gomez-Lim M. A.: Expression of a single-chain human interleukin-12 gene in transgenic tobacco plants and functional studies. *Biotechnol Bioeng*, 2004, **85**: 734-740.
35. Hannink N., Rosser S.J., French C.E., Basran A., Murray J.A.H., Nicklin S., Bruce N.C.: Phytodetoxification of TNT by transgenic plants expressing a bacterial nitroreductase. *Nature Biotechnology*, 2001, **19**(12): 1168-1172.
36. Hiatt A., Cafferkey R., Bowdish K.: Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, 1989, **342**: 76-78.
37. Hong S.-Y., Kwon T.-H., Lee J.-H., Jang Y.-S., Yang M.-S.: Production of biologically active hG-CSF by transgenic plant cell suspension culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, **30**: 762-767.
38. Horn M.E., Woodard S.L., Howard J.A.: Plant molecular farming: systems and products. *Plant Cell Rep.*, 2004, **22**: 711-720.
39. Huang Y., Liang W., Pan A., Zhou Z., Huang C., Chern, J., Zhang D.: Production of FaeG, the major subunit of K88 fimbriae, in transgenic tobacco plants and its immunogenicity in mice. *Infection and Immunity*, 2003, **71**(9): 5436-5439.
40. Hull A.K., Criscuolo C.J., Mett V., Groen H., Steeman W., Westra H.: Human-derived, plant-produced monoclonal antibody for the treatment of anthrax. *Vaccine*, 2005, **23**: 2082-2086.
41. James E.A., Wang C., Wang Z., Reeves R., Shin J.H., Magnuson N.S., Lee J.M.: Production and characterization of biologically active human GM-CSF secreted by genetically modified plant cells. *Protein Expression Purification*, 2000, **19**: 131-138.
42. Jin, R., Richter S., Zhong R., Lampa G.K.: (2003). Expression and import of an active cellulase from a thermophilic bacterium into the chloroplast both *in vitro* and *in vivo*. *Plant Molecular Biology*, 2003, **51**(4): 493-507.

43. Johansen F.E., Pekna M., Norderhaug I.N., Haneberg B., Hietala M.A., Krajci P.: Absence of epithelial immunoglobulin A transport, with increased mucosal leakiness, in polymeric immunoglobulin receptor/secretory component-deficient mice. *J. Exp. Med.*, 1999, **190**: 915-922.
44. Judge N.A., Mason H.S., O'Brien A.D.: Plant cell-based intimin vaccine given orally to mice primed with intimin reduces times of *Escherichia coli* O157:H7 shedding in feces. *Infection and Immunity*, 2004, **72(1)**: 168-175.
45. Kang T.-J., Seo J.-E., Kim D.-H.: Cloning and sequence analysis of the Korean strain of spike gene of porcine epidemic diarrhea virus and expression of its neutralizing epitope in plants. *Protein Expr. Purif.*, 2005, **41**: 378-383.
46. Khandelwal A., Sita G.L., Shaila M.S.: Expression of hemagglutinin protein of rinderpest virus in transgenic tobacco and immunogenicity of plant-derived protein in a mouse model. *Virology*, 2003, **308(2)**: 207-215.
47. Ko K., Tekoah Y., Rudd P.M., Harvey D.J., Dwek R.A., Spitsin S., Hanlon C.A., Rupprecht C., Dietzschold B., Golovkin M., Koprowski H.: Function and glycosylation of plant-derived antiviral monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, **100(13)**: 8013-8018.
48. Ko K., Steplewski Z., Glogowska M., Koprowski H.: Inhibition of tumor growth by plant-derived mAb. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, **102**: 7026-7030.
49. Kohl T., Hitzweith I.I., Stewart D., Varsani A., Govan V.A., Christensen N.D., Williamson A.-L., Rybicki E.P.: Plant-produced cottontail rabbit papillomavirus L1 protein protects against tumor challenge: a proof of concept study. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2006, **13(8)**: 845-853.
50. Koya V., Moayeri M., Leppla S.H., Daniell H.: Plant-based vaccine: mice immunized with chloroplast-derived anthrax protective antigen survive anthrax lethal toxin challenge. *Infect. Immun.*, 2005, **73**: 8266-8274.
51. Kruszewski W.J., Rzepko R., Warężak C., Zieliński J., Jastrzębski T., Kopač A., Jaśkiewicz K.: Brak przydatności klinicznej wspólnego oznaczania białek: c-erbB2 i p53 w raku jelita grubego. Nowotwory. *Journal of Oncology*, 2006, **56(4)**: 436-441.
52. Lee J.H., Kim N.S., Kwon T.H., Jang Y.S., Yang M.S.: Increased production of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) by the addition of stabilizing polymer in plant suspension cultures. *J. Biotechnol.*, 2002, **96**: 205-211.
53. Leelavathi S., Reddy V.S.: Chloroplast expression of His-tagged GUS fusions: a general strategy to overproduce and purify foreign proteins using transplastomic plants as bioreactors. *Mol. Breed.*, 2003a, **11**: 49-58.
54. Leelavathi S., Gupta N., Maiti S., Ghosh A., Reddy V.S.: Overproduction of an alkali- and thermo-stable xylanase in tobacco chloroplasts and efficient recovery of the enzyme. *Mol. Breed.*, 2003b, **11**: 59-67.
55. Lössl A., Eibl C., Harloff H.J., Jung C., Koop H.U.: Polyester synthesis in transplastomic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.): significant contents of polyhydroxybutyrate are associated with growth reduction. *Plant Cell Rep.*, 2003, **21**: 891-899.
56. Lentz E.M., Segretin M.E., Mauro M., Wirth S.A., Mozgovoij M.V., Wigdorovitz A., Bravo-Almonacid F.F.: High expression level of a foot and mouth disease virus epitope in tobacco transplastomic plants. *Planta*, 2010, **231(2)**: 387-395.
57. Levy Y.: Cytokine therapies in HIV infection. *Med. Sci.*, 2006, **22**: 751-754.
58. Ma J.K.C., Hiatt A., Hein M., Vine N.D., Wang F., Stabila P.: Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science*, 1995, **268**: 716-719.
59. Ma J.K.C., Hikmat B.Y., Wycoff K., Vine N.D., Chargelegue D., Yu L.: Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nat. Med.*, 1998, **4**: 601-606.

60. Ma J. K. C., Drake P. M. W., Christou P.: The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat. Rev. Genet.*, 2003, **4**: 794-805.
61. Ma S., Huang Y., Davis A., Yin Z., Mi Q., Menassa R., Brandle J. E., Jevnikar A. M.: Production of biologically active human interleukin-4 in transgenic tobacco and potato. *Plant Biotechnol. J.*, 2005, **3**: 309-318.
62. Makvandi-Nejad S., McLean M. D., Hiramata T., Almquist K. C., Mac-Kenzie C. R., Hall J. C.: Transgenic tobacco plants expressing a dimeric single-chain variable fragment (scFv) antibody against *Salmonella enterica* serotype paratyphi B. *Transgenic Res.*, 2005, **14**: 785-92.
63. Malabadi R. B., Ganguly A., Teixeira da Silva J. A., Parashar A., Suresh M. R., Sunwoo H. H.: Overview of plant-derived vaccine antigens: Dengue virus. *J. Pharm. and Pharmaceutical Sci.*, 2011 **14**(3): 400-413.
64. Maliga P.: Plastid transformation in higher plants. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 2004, **55**: 289-313.
65. Marusic C., Nuttall J., Buriani G., Lico C., Lombardi R., Baschieri S.: Expression, intracellular targeting and purification of HIV Nef variants in tobacco cells. *BMC Biotechnol.*, 2007, 7:12.
66. Mason H. S., Ball J. M., Jian-Jian Shi, Jiang X., Estes M. K., Arntzen C. J.: Expression of Norwalk Virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1996, **93**: 5335-5340.
67. Matsumoto S., Ikura K., Ueda M., Sasaki R.: Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells. *Plant. Mol. Biol.*, 1995, **27**: 1163-1172.
68. Matsuo K., Hong J-S, Tabayashi N., Ito A., Masuta C., Matsumura T.: Development of Cucumber mosaic virus as a vector modifiable for different host species to produce therapeutic proteins. *Planta*, 2007, **225**(2): 277-286.
69. McCormick A. A., Reinl S. J., Cameron T. I., Vojdani F., Fronefield M., Levy R., Tusé D.: Individualized human scFv vaccines produced in plants: humoral anti-idiotypic responses in vaccinated mice confirm relevance to the tumor Ig. *J. Immunological Methods*, 2003, **278**(1-2): 95-104.
70. McCormick A. A., Reddy S., Reinl S. J., Cameron T. I., Czerwinski D. K., Vojdani F.: Plantproduced idiotype vaccines for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: safety and immunogenicity in a phase I clinical study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, **105**: 10131-10136.
71. Menassa R., Zhu H., Karatzas C. N., Lazaris A., Richman A., Brandle J.: Spider dragline silk proteins in transgenic tobacco leaves: accumulation and field production. *Plant Biotechnol. J.*, 2004, **2**(5): 431-438.
72. Molina A., Hervas-Stubbs S., Daniell H., Mingo-Castel A. M., Veramendi J.: High-yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts. *Plant Biotechnol. J.*: 2004, **2**: 141-153.
73. Molina A., Veramendi J., Hervas-Stubbs S.: Induction of neutralizing antibodies by a tobacco chloroplast-derived vaccine based on a B cell epitope from canine parvovirus. *Virology*, 2005, **342**(2): 266-275.
74. Nakashita H., Arai Y., Suzuki Y., Yamaguchi I.: Molecular breeding of transgenic tobacco plants which accumulate polyhydroxyalkanoates. *Riken Review*, 2001, **42**: 67-70.
75. Nianiou I., Kalantidis K., Madesis P., Georgopoulou U., Mavromarap., Tsaftaris A.: Expression of an HCV core antigen coding gene in tobacco (*N. tabacum* L.). *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 2008, **38**: 411-421.
76. Papaetis G. S., Karapanagiotou L. M., Pandha H., Syrigos K. N.: Targeted therapy for advanced renal cell cancer: cytokines and beyond. *Curr. Pharm. Des.*, 2008, **14**: 2229-2251.

77. Parkin J., Cohen B.: An overview of the immune system. *Lancet*, 2001, **357**: 1777-1789.
78. Patel J., Zhu H., Menassa R., Gyenis L., Richman A., Brandle J.: Elastin-like polypeptide fusions enhance the accumulation of recombinant proteins in tobacco leaves. *Transgenic Res.*, 2007, **16**: 239-249.
79. Phoolcharoen W., Bhoo S.H., Lai H., Ma J., Arntzen C.J., Chen Q., Mason H.S.: Expression of an immunogenic Ebola immune complex in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Biotechnol. J.*, 2011, **9**: 807-816.
80. Pogrebnyak N., Golovkin M., Andrianov V., Spitsin S., Smirnov Y., Egolf R.: Severe acute respiratory syndrome (SARS) S protein production in plants: development of recombinant vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, **102**: 9062-9067.
81. Redkiewicz P., Więsyk A., Góra-Sochacka A., Sirko A.: Transgenic tobacco plants as production platform for biologically active human interleukin 2 and its fusion with proteinase inhibitors. *Plant Biotechnol. J.*, doi: 10.1111/j.1467-7652.2012.00698.x., 2012 (w druku).
82. Rodriguez M., Ramirez N.I., Ayala M., Freyre F., Perez L., Triguero A.: Transient expression in tobacco leaves of an aglycosylated recombinant antibody against the epidermal growth factor receptor. *Biotechnol. Bioeng.*, 2005, **89**: 188-94.
83. Roh K.H., Shin K.S., Lee Y.H., Seo S.C., Park H.G., Daniell H., Lee S.B.: Accumulation of sweet protein monellin is regulated by the psbA 5'UTR in tobacco chloroplasts. *J. Plant Biol.*, 2006, **49**: 34-43.
84. Ruhlman T., Ahangari R., Devine A., Samsam M., Daniell H.: Expression of cholera toxin B-proinsulin fusion protein in lettuce and tobacco chloroplasts – oral administration protects against development of insulinitis in non-obese diabetic mice. *Plant Biotechnol. J.*, 2007, **5**: 495-510.
85. Rymerson R.T., Babiuk L., Menassa R.: Immunogenicity of the capsid protein VP2 from porcine parvovirus expressed in low alkaloid transgenic tobacco. *Mol. Breed.*, 2003, **11**: 267-276.
86. Sack M., Paetz A., Kunert R., Bomble M., Hesse F., Stiegler G.: Functional analysis of the broadly neutralizing human anti-HI V-1 antibody 2F5 produced in transgenic BY-2 suspension cultures. *Faseb J.*, 2007, **21**: 1644-1655.
87. Sala F., Riganoa M.M., Barbantea A., Bassoa B., Walmsleyb A., Castiglione S.: Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. *Vaccine*, 2003, **21(7-8)**: 803-808.
88. Sardana R.K., Alli Z., Dudani A., Tackaberry E., Panahi M., Narayanan M., Ganz P., Altosaar I.: Biological activity of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor is maintained in a fusion with seed glutelin peptide. *Transgenic Res.*, 2002, **11**: 521-531.
89. Shin Y.J., Hong S.Y., Kwon T.H., Jang Y.S., Yang M.S.: High level of expression of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in transgenic rice cell suspension culture. *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, **82**: 778-783.
90. Shoji Y., Chichester J.A., Bi H., Musiychuk K., de la Rosa P., Goldschmidt L., Horsey A., Ugulava N., Palmer G.A., Mett V., Yusibov V.: Plant-expressed HA as a seasonal influenza vaccine candidate. *Vaccine*, 2008, **26(23)**: 2930-2934.
91. Shoji Y., Chichester J.A., Jones M., Manceva S.D., Damon E., Mett V., Musiychuk K., Bi H., Farrance C., Shamloul M., Kushnir N., Sharma S., Yusibov V.: Plant-based rapid production of recombinant subunit hemagglutinin vaccines targeting H1N1 and H5N1 influenza. *Human Vaccine*, 2011, **7** (Supplement): 41-50.
92. Souriau C., Hudson P.J.: Recombinant antibodies for cancer diagnosis and therapy. *Expert Opin Biol Ther*, 2003, **3**: 305-318.

93. Staub J.M., Garcia B., Graves J., Hajdukiewicz P.T.J., Hunter P., Nehra N., Paradkar V., Schlittler M., Carroll J.A., Spatola L.: High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat. Biotechnol.*, 2000, **18**: 333-338.
94. Stein H., Wilensky M., Tsafir Y., Rosenthal M., Amir R., Avraham T., Ofir K., Dgany O., Yayon A., Shoseyov O.: Production of bioactive, post-translationally modified, heterotrimeric, human recombinant type-I collagen in transgenic tobacco. *Biomacromolecules*, 2009, **10(9)**: 2640-2645.
95. Summers A. O.: Organization, expression and evolution of genes for mercury resistance. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1986, **40**: 607-634.
96. Thanavala Y., Yang Y.F., Lyons P., Mason H.S., Arntzen C.: Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis-B surface-antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, **8(92)**: 3358-3361.
97. Thompson J.P., Dębiński W.: Mutants of interleukin 13 with altered reactivity toward interleukin 13 receptors. *J Biol. Chem.*, 1999, **274**: 29944-29950.
98. Tregoning J.S., Nixon P., Kuroda H., Svab Z., Clare S., Bowe F., Fairweather N., Ytterberg J., van Wijk K.J., Dougan G.: Expression of tetanus toxin Fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acids Res.*, 2003, **31**: 1174-1179.
99. Tremblay R., Wang D., Jevnikar A.M., Ma S.: Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins. *Biotechnology Advances*, 2010, **28**: 214-21.
100. Tuboly T., Yu W., Bailey A., Degrandis S., Du S., Erickson L., Nagy E.: Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed in plants. *Vaccine*, 2000, **18**: 2023-2028.
101. van Dolleweerd C.J., Chargelegue D., Ma J.K.C.: Characterization of the conformational epitope of Guy's 13, a monoclonal antibody that prevents *Streptococcus mutans* Colonization in humans. *Infection and Immunity*, 2003, **71(2)**: 754-765.
102. Vermij P., Waltz E.: USDA approves the first plant-based vaccine. *Nat. Biotechnol.*, 2006, **24**: 233-234.
103. Viitanen P.V., Devine A.L., Khan M.S., Deuel D.L., Van Dyk D.E., Daniell H.: Metabolic engineering of the chloroplast genome using the *Escherichia coli* *ubiC* gene reveals that chorismate is a readily abundant plant precursor for p-hydroxybenzoic acid biosynthesis. *Plant Physiol.*, 2004, **136**: 4048-4060.
104. Villani M.E., Morgun B., Brunetti P., Marusic C., Lombardi R., Pisoni I.: Plant pharming of a full-sized, tumour-targeting antibody using different expression strategies. *Plant Biotechnol. J.*, 2009, **7**: 59-72.
105. Wang D.J., Brandsma M., Yin Z., Wang A., Jevnikar A.M., Ma S.: A novel platform for biologically active recombinant human interleukin-13 production. *Plant Biotechnol. J.*, 2008, **6**: 504-515.
106. Watson J., Koya V., Leppla S.H., Daniell H.: Expression of *Bacillus anthracis* protective antigen in transgenic chloroplasts of tobacco, a nonfood/feed crop. *Vaccine*, 2004, **22**: 4374-4384.
107. Webster D.E., Wang L., Mulcair M., Ma Ch., Santi L., Mason H.S., Wesselingh S.L., Ross L., Coppel R.L.: Production and characterization of an orally immunogenic *Plasmodium* antigen in plants using a virus-based expression system. *Plant Biotechnol. J.*, 2009, **7(9)**: 846-855.
108. Weigert C., Rocken M., Ghoreschi K.: Interleukin 4 as a potential drug candidate for psoriasis. *Expert Opin. Drug Discov.*, 2008, **3**: 357-368.
109. Zhang G.G., Rodrigues L., Rovinski B., White K.A.: Production of HIV-1 p24 protein in transgenic tobacco plants. *Mol. Biotechnol.*, 2002, **20**: 131-136.

110. Zhang B, Yang Y.H., Lin Y.M., Rao Q., Zheng G.G., Wu K.F.: Expression and production of bioactive human interleukin-18 in transgenic tobacco plants. *Biotechnol Lett.*, 2003, **25**: 1629-1635.
111. Zhou F., Wang M., Albert H.H., Moore P., Zhu Y.J.: Efficient transient expression of human GM-CSF protein in *Nicotiana benthamiana* using potato virus X vector. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, **72**: 756-762.

Adres do korespondencji

dr Marcin Przybyś
Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin
IUNG-PIB
ul. Czartoryskich 8
24-100 Puławy
tel. 81 886 34 21, w. 297
e-mail: mprzybys@iung.pulawy.pl