

Bartosz KOSZOWSKI
 Maciej Łukasz GONIEWICZ
 Jan CZOGAŁA
 Andrzej SOBCZAK

Genetycznie modyfikowany tytoń – szansa czy zagrożenie dla palaczy?

Genetically modified tobacco – chance or threat for smokers?

Zakład Chemii Ogólnej i Nieorganicznej,
 Katedra Chemii Ogólnej i Analitycznej,
 Wydział Farmaceutyczny i Oddział Medycyny
 Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny
 Kierownik: Dr hab. Andrzej Sobczak

Dodatkowe słowa kluczowe:

tytoń
 modyfikacje genetyczne
 tytoń denikotynizowany

Additional key words:

tobacco
 genetic modification
 denicotinized tobacco

Tytoń (*Nicotiana* sp.) jest jedną z najczęściej wykorzystywanych roślin modelowych w badaniach w wielu dziedzinach jak fizjologia, biochemia, biologia molekularna i inżynieria genetyczna. Tytoń był pierwszym gatunkiem roślin poddanych transformacji genetycznej - w roku 1983 roślinie tej wszczepiono gen oporności na kanamycynę. Rozwój nowoczesnych technik inżynierii genetycznej stwarza nowe, dotychczas niespotykane, perspektywy wykorzystania tej rośliny. Jak się okazuje tytoń, to nie tylko źródło rakotwórczego dymu, ale także roślina, która dzięki modyfikacjom genetycznym może zostać w pozytywny sposób wykorzystana w medycynie i naukach biologicznych. Obecnie w internetowej bazie PubMed odnotowuje się blisko trzy i pół tysiąca publikacji dotyczących transgenicznego tytoniu, z czego blisko dwieście prac zostało opublikowanych w bieżącym roku. Artykuł jest próbą podsumowania wyników dotychczasowych badań nad rolą genetycznie modyfikowanych roślin z rodzaju *Nicotiana* w przemyśle tytoniowym oraz poddaje ocenie możliwe skutki takiego działania. Równoległe ukazuje także próby zastosowania transgenicznych roślin tego gatunku we współczesnej medycynie i ochronie środowiska. Opisuje potencjalne możliwości wykorzystania genetycznie zmodyfikowanego tytoniu do produkcji szczepionek przeciwwirusowych i przeciwbakteryjnych, interferonu, przeciwciał i innych.

Wstęp

Według prawodawstwa polskiego pod pojęciem organizmu genetycznie zmodyfikowanego [19] rozumie się organizm inny niż organizm człowieka, w którym materiał genetyczny został zmieniony w sposób niezachodzący w warunkach naturalnych (wskutek krzyżowania lub naturalnej rekombinacji) w szczególności przy zastosowaniu:

a) technik rekombinacji DNA z użyciem wektorów, w tym tworzenia materiału genetycznego poprzez włączenie do wirusa, plazmidu lub każdego innego wektora cząsteczek DNA wytworzonych poza organizmem i włączenie ich do organizmu biorcy, w którym w warunkach naturalnych nie występu-

Tobacco (*Nicotiana* sp.) is of the most often used model plants for research in the field of physiology, biochemistry, molecular biology and genetic engineering. Tobacco was also the first plant subject to genetic transformation - in 1983 the plant was introduced with the kanamycin resistance gene. The internet database PubMed includes roughly 3 500 records concerning transgenic tobacco, out of which nearly 200 works were published this year. Advancement of state-of-the-art techniques of genetic engineering offers new, as yet unprecedented opportunities to take advantage of tobacco. Apparently tobacco is not only a source of carcinogenic tobacco smoke, but also a plant which due to genetic modifications may be used in a positive way in medicine and biological sciences. The aim of the article is to summarize the role of genetically modified *Nicotiana* genus plants in modern medicine and environmental protection. The publication describes the usage of transgenic plants in the tobacco industry and evaluates possible effects of such applications. Moreover, potential possibilities of deployment of genetically modified tobacco for production of anti-virus and antibacterial vaccinations, interferon, antibodies, etc. have been characterized.

ją, ale w którym są zdolne do ciągłego powielania,

b) technik stosujących bezpośrednie włączenie materiału dziedzicznego przygotowanego poza organizmem, a w szczególności: mikroiniekcji, makroiniekcji i mikrokapsułkowania,

c) metod niewystępujących w przyrodzie połączenia materiału genetycznego co najmniej dwóch różnych komórek, w wyniku których powstaje nowa komórka zdolna do przekazywania swego materiału genetycznego, odmiennego od materiału wyjściowego, komórkom potomnym.

Rośliny z rodzaju *Nicotiana* są bardzo dogodnym materiałem do transformacji ge-

Adres do korespondencji:

mgr farm. Bartosz Koszowski
 Zakład Chemii Ogólnej i Nieorganicznej,
 Katedra Chemii Ogólnej i Analitycznej,
 Wydział Farmaceutyczny i Oddział Medycyny
 Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny
 41-200 Sosnowiec, ul. Jagiellońska 4
 Tel.: +501 578 437
 Fax: (+32) 269 05 74
 e-mail: bartoszkoszowski@wp.pl

netycznych z powodu dużej podatności na transformację za pomocą bakterii *Agrobacterium* (łatwa i często wykorzystywana metoda). Ponadto, tytoń jest rośliną mało wymagającą w czasie hodowli, dość dobrze rozwijającą się w warunkach szklarniowych przy zachowaniu krótkiego czasu generacji, wynoszącego od 3 do 4 miesięcy. Ważnym czynnikiem jest duży rozmiar tej rośliny, w przypadku, którego łatwo daje się zaobserwować ewentualne zmiany fenotypowe, a także, co istotniejsze, zapewni on dużą ilość materiału, z którego można pozyskać np. zmodyfikowane białko [3,7].

Dla przemysłu papierosowego modyfikacje genetyczne tytoniu stwarzają możliwość sterowania fizjologią rośliny, w tym ingerencji na szlaki syntez alkaloidów (przede wszystkim nikotyny) i substancji aromatyzujących, skracania czasu wegetacji, wszczepiania genów odporności na choroby roślinne czy ochrony przed szkodnikami.

Celem pracy była krytyczna ocena zastosowania transgenicznego tytoniu w przemyśle papierosowym, ale także ukazanie szerokiej perspektywy wykorzystania go w medycynie i naukach biologicznych.

Zastosowanie genetycznych modyfikacji tytoniu przez przemysł papierosowy

Możliwość właściwie nieograniczonego ingerowania w metabolizm i fizjologię rośliny stanowi wielką pokusę dla producentów papierosów. Biologia molekularna jest narzędziem, która w rękach naukowców zatrudnionych przez koncerny tytoniowe, może posłużyć np. do modyfikowania, blokowania a nawet dodawania szlaków syntez wielu związków produkowanych przez roślinę. Jedną z pierwszych prób zastosowania zdobywcy nowoczesnej inżynierii genetycznej podczas hodowli tytoniu była ingerencja w szlaki syntez alkaloidów.

Składnikiem uzależniającym w dymie tytoniowym jest nikotyna, a rozwój uzależnienia u palacza jest siłą napędową przemysłu tytoniowego. Jednakże firmy tytoniowe zainwestowały znaczące środki finansowe w opracowanie produktów zawierających genetycznie zmodyfikowany tytoń o obniżonej zawartości nikotyny. Przykładami takich produktów są papierosy Next (Phillip Morris, 1989) czy Quest (Vector Tobacco Inc., 2003). Wymienione produkty początkowo były promowane jako papierosy „o mniejszej szkodliwości”. Obecnie w świetle nowych badań i regulacji prawnych, papierosy te określa się jako produkty „o zmniejszonym ryzyku” (ang. *risk reduced*) albo także jako produkty „o potencjalnie ograniczonej ekspozycji” (ang. *potentially reduced exposure products* – PREPs) [14].

Próby opracowania produktów tytoniowych o obniżonej zawartości alkaloidów (ang. *alkaloid reduced tobacco* – ART) były podejmowane już na początku XX w. Początkowo usiłowano uzyskać zmodyfikowany tytoń przez zastosowanie odpowiednich technik hodowli roślin, przez krzyżowanie różnych gatunków z rodzaju *Nicotiana*. Nikotyna była też na różne sposoby usuwana z tytoniu w procesie przetwarzania (ekstrakcja rozpuszczalnikami, destylacja z parą wodną, dezaktywacja w procesie fermenta-

cji itp.). W roku 1986 laboratoria firmy Philip Morris zweryfikowały około 100 patentów pozwalających uzyskać tzw. denikotyzowany tytoń [6]. Te klasyczne metody denikotyzowania tytoniu (jak np. ekstrakcja, destylacja) wykazywały szereg wad, ponieważ w większości przypadków prowadziły do uzyskania produktu o gorszych właściwościach organoleptycznych, m.in. o słabszym aromacie. Tytoń, uzyskany z roślin na drodze krzyżowania czy innych zabiegów hodowlanych, był również gorszy jakościowo, ponieważ szlak syntez nikotyny sprzężony był ze szlakami syntez innych związków, w tym o właściwościach aromatyzujących. W konsekwencji rozwoju biotechnologii pojawiły się próby zastosowania metod inżynierii genetycznej do obniżenia zawartości nikotyny w tytoniu poprzez zablokowanie szlaku jej syntezy. Zastosowanie metod genetycznych, przez precyzyjne zablokowanie na poziomie molekularnym tylko szlaku syntezy nikotyny, dało możliwość otrzymania tytoniu o obniżonej zawartości tego alkaloidu przy zachowaniu innych pożądanych przez konsumentów cech produktu.

Należy zadać pytanie, dlaczego firmy tytoniowe poświęcały tak wiele wysiłku i środków w opracowanie denikotyzowanego tytoniu? Odpowiedź na to pytanie nie jest oczywista. Przeciwnie to właśnie obecność nikotyny w tytoniu sprawia, że palacz sięga po kolejnego papierosa, a postępujący rozwój uzależnienia palacza przynosi firmom tytoniowym rosnące z roku na rok zyski. Można z dużym prawdopodobieństwem przypuszczać, że koncerny tytoniowe działały w produktach o obniżonej zawartości nikotynej szansę na pozyskanie nowej grupy klientów. W powszechnym przekonaniu palaczy, to właśnie nikotyna jest głównym czynnikiem toksycznym dymu tytoniowego i to w niej upatruje się największego wroga zdrowia osoby uzależnionej. W świadomości społecznej przekonanie to jest tak głęboko zakorzenione, że stworzenie produktu o obniżonej zawartości „złej” nikotynej może być dla palacza potencjalnie atrakcyjne. Przez zastosowanie prostego (ale oczywiście złudnego) zestawienia: „mniej nikotynej to mniejsza szkodliwość papierosa”, istniała z jednej strony możliwość pozyskania nowej grupy odbiorców dla tego typu produktu, a z drugiej strony możliwość wypromowania atrakcyjnego produktu skierowanego do palaczy, którzy są świadomi szkodliwości nałogowego palenia tytoniu. Taka grupa palaczy mogłaby poszukiwać produktu „mniej szkodliwego”, albo mogącego (przez mniejszą zawartość nikotynej) przyczynić się do rzucenia przez nich nałogu palenia tytoniu. Analizując tendencje na rynku tytoniowym lat osiemdziesiątych analitycy marketingowi zatrudnieni w firmach tytoniowych mogli upatrywać w nowym produkcie beznikotynowym wielką szansę na stworzenie nowych rynków zbytu.

Należy jednak zdecydowanie podkreślić, że redukcja zawartości nikotynej w tytoniu czy dymie tytoniowym nie przyczynia się do uzyskania produktu o obniżonym ryzyku zdrowotnym, w porównaniu z papierosem konwencjonalnym [5].

Zmodyfikowany genetycznie tytoń o obniżonej zawartości nikotynej zastosowano w

papierosach Quest (Vector Tobacco Inc.). Produkty oznaczone Quest 1, 2 i 3 zawierają odpowiednio 0,6, 0,3 i nie więcej niż 0,05 mg nikotynej. Tak niska zawartość nikotynej pozwala zakwalifikować papierosy Quest 3 jako beznikotynowe. Nie mniej jednak deklarowana przez producenta zawartość substancji smolistych wynosi 10 mg na papieros. Oprócz obniżonej zawartości nikotynej, papierosy Quest posiadają wszystkie cechy zwykłych papierosów: wyglądają, spalają się oraz wydzielają dym jak inne (konwencjonalne) papierosy. Palenie takich papierosów przez palaczy uzależnionych skutkuje zwykle zwiększeniem liczby wypalanych papierosów i głębszym zaciąganiem się. Omawiane papierosy są dostępne jako Full Flavour oraz jako Menthol. Firma Vector Tobacco reklamuje swoje papierosy jako „pierwszą markę, która pozwala swoim klientom cieszyć się pełnym smakiem papierosa przy jednocześnie obniżonej zawartości nikotynej” [16]. Są to papierosy przeznaczone dla dorosłych palaczy poszukujących typowych doznań związanych z paleniem papierosów przy jednocześnie ograniczonej ekspozycji na nikotynę. Firma Quest, choć obecnie jeszcze tego nie reklamuje, czyni pewne starania, aby wykorzystywać beznikotynowe papierosy jako produkty wspomagające w terapii antynikotynowej

Przeprowadzone w 2003 roku wstępne badania dotyczące przydatności papierosów Quest w walce z nałogiem palenia pozwoliły stwierdzić, że 33% osób stosujących papierosy Quest 3 zachowało abstynencję przez okres kolejnych 4 tygodni od momentu zaprzestania palenia. Ponadto badania przeprowadzono na 45 palaczach podzielonych na 3 grupy, z których pierwsza grupa paliła papierosy Quest 1, 2 i 3, druga i trzecia paliły tylko papierosy Quest 3, przy czym u palaczy z grupy drugiej dodatkowo stosowano nikotynową terapię zastępczą w postaci plastrów transdermalnych [16]. Najlepszy wynik (wyrażony jako stosunek liczby osób, które rzuciły nałóg palenia, do liczby osób, które w wyniku przeprowadzonej „terapii” z nałogiem nie zerwały) uzyskano w grupie trzeciej. Dodatkowo, odsetek osób, które stosowały papierosy Quest 3 i po 13 tygodniach od zerwania z nałogiem zachowały abstynencję wyniósł 54%. Producent omawianej marki papierosów zwrócił się już do FDA (*Food and Drug Administration*, USA) z prośbą o wskazanie wymaganych dodatkowych badań, które pozwoliłyby zarejestrować Quest jako produkt terapeutyczny w leczeniu nałogu palenia papierosów.

Oprócz prób kontrolowania zawartości nikotynej w liściach tytoniu, prace zespołów badawczych skupiają się także na zmniejszeniu zawartości specyficznych dla tytoniu nitrozoamin (ang. *tobacco specific nitrosamines* – TSNA). Ekspozycja na tytoniowe nitrozoaminy jest bezpośrednio związana z zachorowalnością palaczy na szereg chorób nowotworowych. TSNA powstają głównie w czasie procesu suszenia i fermentacji liści tytoniu poprzez utlenianie alkaloidów. Jedną z proponowanych metod obniżania zawartości nitrozoamin w tytoniu jest taka modyfikacja rośliny, aby produkowała ona w swoim organizmie zwiększone ilości oksydantów, które reagując z alkaloidami, ogra-

Tabela I

Charakterystyka zalet i wad papierosów produkowanych z genetycznie zmodyfikowanego tytoniu.

Pros and cons of the cigarettes manufactured of genetically modified tobacco.

	Papierosy produkowane z genetycznie zmodyfikowanego tytoniu		
	o obniżonej zawartości nikotyny	o podwyższonej zawartości nikotyny	o obniżonej zawartości kancerogenów
+ pro	ulatwienie zerwania z nałogiem	zmiana warunków wypalania papierosów redukcja dawki nikotyny → płytsze i krótsze zaciągnięcia → obniżenie dawki toksycznych składników dymu tytoniowego → obniżenie ryzyka zdrowotnego	obniżenie dawki kancerogennych składników dymu tytoniowego → obniżenie ryzyka zdrowotnego
- contra	zmiana warunków wypalania papierosów kompensacja dawki nikotyny → głębsze i dłuższe zaciągnięcia → wzrost dawki toksycznych składników dymu tytoniowego → wzrost ryzyka zdrowotnego	wyższy potencjał uzależniający	brak

niczałyby tworzenie się niepożądanych TSNA. Metoda opracowana przez zespół badawczy firmy Philip Morris USA Inc. stała się przedmiotem zgłoszenia patentowego [18]. Poprzez umieszczenie w genomie rośliny tytoniu sekwencji nukleotydowej kodującej polipeptyd katalizujący produkcję aktywnych form tlenu uzyskano transgeniczny tytoń posiadający zmniejszoną zawartość specyficznych dla tej rośliny nitrozoamin.

Charakterystykę korzyści i wad produktów zawierających tytoń zmodyfikowany genetycznie przedstawiono w tabeli I.

Transgeniczny tytoń a nowotwory i choroby wirusowe

Na obecnym etapie rozwoju technik inżynierii genetycznej nie wydaje się jeszcze prawdopodobne wyprodukowanie tytoniu, którego wypalanie nie powodowałoby niepożądanych efektów zdrowotnych, w tym także chorób nowotworowych. Nie mniej jednak, postęp biotechnologii stwarza możliwości wykorzystania tej rośliny jako sprzymierzeńca w walce z tego rodzajem chorób. Przykładem może być wykorzystanie tytoniu do produkcji interferonu. Interferony typu 1 (INF) należą do grupy biologicznie aktywnych cząsteczek, które posiadają właściwości hamujące replikację wirusów, a ponadto wzmagają odpowiedź układu immunologicznego. Substancje te mają bardzo wiele klinicznych zastosowań. Niestety zastosowanie ich u pacjenta wciąż wiąże się z ogromnymi kosztami. Przeprowadzono próby ekspresji genów odpowiedzialnych za produkcję interferonu przez chloroplasty genetycznie zmodyfikowanego tytoniu [1]. W wyniku eksperymentów wyhodowano rośliny, w której tkankach zawartość INF-alfa2b (popularnego składnika preparatów komercyjnych) wynosiła aż 3 mg na gram świeżych liści. Zbadano zdolność pozyskanego z genetycznie zmodyfikowanego tytoniu INF-alfa2b do hamowania replikacji wirusowej *in vivo*, w tym zdolności hamowania wczesnej postaci infekcji wirusem HIV. Zaobserwowano, że transgeniczny INF-alfa2b posiadał podobną aktywność biologiczną w porównaniu do preparatu komercyjnego. Opisano również właściwości przeciwnowotworowe i immunomodulujące roślinnego INF-alfa2b. Pozyskany z chloroplastów interferon zwiększał ekspresję białek

głównego układu zgodności tkankowej klasy I (MHC I) oraz zwiększał ilość komórek NK (ang. *natural killers*). Powyższe informacje wskazują na realną szansę przyszłego zastosowania transgenicznych interferonów pozyskanych z roślin w praktyce klinicznej u ludzi.

Immunoterapia nowotworów w oparciu o przeciwciała produkowane przez tytoń

Jedną z form terapii antynowotworowej jest immunoterapia z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych. Przeciwciała takie są specyficzne dla określonej grupy komórek, posiadających na swojej powierzchni odpowiednie antygeny. Standardowa procedura produkcji klinicznie użytecznych przeciwciał monoklonalnych jest prowadzona przy zastosowaniu hodowli komórkowych. Innym sposobem jest wytwarzanie przeciwciał w organizmach zwierząt, głównie myszy. Wspólną wadą obu wymienionych metod jest stosunkowo wysoki koszt produkcji, który w znaczący sposób wpływa na ostateczną cenę tak uzyskanych preparatów leczniczych. Przeciwciała monoklonalne nie mogą być wytwarzane z zastosowaniem hodowli bakteryjnych czy grzybowych, ponieważ organizmy te nie posiadają potranslacyjnych szlaków enzymatycznych, które pozwalają uzyskać w pełni funkcjonalne białko.

W obszarze zainteresowań badaczy poszukujących przeciwciał monoklonalnych zdolnych do niszczenia komórek nowotworowych znalazła się także *Nicotiana tabacum*. Specjalnie wyhodowany transgeniczny tytoń (*Nicotiana tabacum* cv. LAMD609) posiada zdolność do produkcji biologicznie funkcjonalnego przeciwciała monoklonalnego, oznaczonego jako BR55-2, które specyficznie wiąże się z nieproteinowym oligosacharydowym antygenem (Lewis Y), do którego nadekspresji dochodzi w komórkach nowotworowych raka piersi oraz okrężnicy.

Wprowadzenie genów odpowiedzialnych za produkcję przeciwciał BR55-2 do organizmu roślinnego pozwoliłoby w niebagatelny sposób obniżyć koszty ich produkcji, ponieważ nakłady na prowadzenie hodowli roślinnej są dużo niższe w porównaniu do hodowli zwierząt, czy prowadzenia hodowli komórkowych. W przypadku hodowli roślin transgenicznych dużo prostsze i tań-

sze jest powiększanie skali produkcji, tak ważne z komercyjnego punktu widzenia.

Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że poziom ekspresji przeciwciał w transgenicznym tytoniu był wysoki (około 30 mg białka na 1 kg świeżych liści) [2]. Otrzymane przeciwciała monoklonalne charakteryzowały się podobną specyficznością, cytotoxycznością i aktywnością w porównaniu do przeciwciał otrzymanych z hodowli mysich i mogły zostać zastosowane do prowadzenia skutecznej immunoterapii.

Tytoń został także wybrany do badań nad opracowaniem szczepionki przeciwko ludzkiej odmianie wirusa brodawczaka (HPV) będącego jedną z głównych przyczyn rozwoju raka szyjki macicy [12,20,21]. Rak szyjki macicy jest drugim najczęściej obserwowanym na świecie nowotworem występującym u kobiet. Występowanie DNA HPV obserwuje się w więcej niż 90% przypadków wszystkich nowotworów szyjki macicy, a najczęściej z typami HPV są typy 16 i 18. Wiriony papilomawirusów, do których zaliczany jest wirus HPV, są wysoce immunogenne. Udowodniono, że papilomowirusopodobne cząsteczki (VLP), zbudowane z głównego białka budującego kapsyd wirusa - L1 – są wysoce immunogenne i wywołują trwałą odporność na HPV w modelach zwierzęcych i ludzkich. Międzynarodowy zespół kierowany przez profesora *Edwarda Rybickiego* z afrykańskiego Uniwersytetu w Cape Town stara się opracować szczepionkę przeciwko HPV z wykorzystaniem transgenicznego tytoniu [12,20,21]. Wprowadzenie genu powodującego ekspresję białka HPV L1 do genomu tytoniu (*Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi*) przy użyciu bakterii *Agrobacterium*, spowodowało wytworzenie rośliny zdolnej do produkcji antygenu, mogącego posłużyć jako o wiele tańsza alternatywa do produkcji szczepionki przeciwko HPV. Obecnie są już dostępne komercyjne, poliwalentne preparaty przeciwko HPV (np. dostępny w Polsce Silgard®, MSD, USA), jednakże z uwagi na to, że produkowane są przy użyciu drogich w prowadzeniu transgenicznych hodowli drożdży czy insektów, ich cena jest bardzo wysoka i pozostają poza zasięgiem wielu pacjentek, zwłaszcza w krajach rozwijających się.

Transgeniczny tytoń a choroby autoimmunologiczne

Modyfikacja genetyczna *Nicotiana tabacum* w celu opracowania białek terapeutycznych, mogących znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób autoimmunologicznych, stała się przedmiotem badań zespołu kierowanego przez profesora *Henrego Daniell'a* [4,13]. Stworzono transgeniczne linie roślin tytoniu i sałaty, w których chloroplastach zachodziła ekspersja białka (posiadającego właściwości proteku) będącego połączeniem podjednostki B toksyny cholery i ludzkiej proinsuliny (CTB-Pins). Zawartość CTB-Pins wynosiła do 16% sumy wszystkich białek rozpuszczalnych (ang. *total soluble protein* – TSP) w tytoniu. W celu oceny skuteczności otrzymanej cząsteczki, preparat powstały przez sproszkowanie liści tytoniu zawierającego CTB-Pins podawano przez siedem tygodni per os pięcioletniemu myszom NOD (ang. *non-obese diabetic mice* – specjalnie opracowany typ myszy, używany jako model zwierzęcy w badaniach nad cukrzycą typu 1). W próbie kontrolnej podawano zwierzętom połączenia CTB-GFP (ang. GFP – *green fluorescent protein*), INF-GFP albo preparat otrzymany z nietransgenicznego tytoniu.

W grupie zwierząt, której podawano CTB-Pins wyraźnie zaobserwowano produkujące insulinę komórki beta w wyspach trzustkowych, a poziomy glukozy we krwi i moczu były niższe niż u zwierząt z grup odniesienia. Z trzustek zwierząt leczonych CTB-Pins wyizolowano ponadto wyższe ilości immunosupresyjnych cytokin, takich jak IL-4 czy IL-10, a w surowicy oznaczono podwyższone wartości stężeń IgG1. Opisowane badania stwarzają (zdaniem autorów) poważną szansę na zastosowanie opracowanej metody do taniej produkcji białek terapeutycznych, które mogłyby zostać zastosowane u człowieka do leczenia cukrzycy typu 1, a w perspektywie także innych chorób o podłożu autoimmunologicznym [13].

Transgeniczny tytoń a szczepionka przeciw *Bacillus anthracis* (wąglik)

Po ataku na World Trade Center w 2001 roku, w obliczu możliwego zagrożenia atakami bioterrorystycznymi, pojawił się w USA problem taniego, szybkiego i wydajnego sposobu uzyskiwania szczepionek przeciw mikroorganizmom chorobotwórczym, które zdaniem specjalistów mogłyby potencjalnie zostać użyte przez terrorystów. Zespół badawczy z University of Central Florida opracował metodę syntezy antygeny wywołującego immunizację przeciw bakteriom wąglika (*Bacillus anthracis*) z zastosowaniem transgenicznego tytoniu [8,22].

Bacillus anthracis wytwarza toksynę, która jest mieszaniną złożoną z trzech białek. Pierwsze białko (antygen PA) umożliwia wnikiwanie toksyny wąglika do wnętrza komórki. Antygen PA jest wysoce immunogenny. Drugie białko, czynnik EF, jest cząsteczką, która powoduje zaburzenie homeostazy komórkowej przez zależne od wapnia zwiększenie poziomu cAMP, a tym samym zakłóca komórkowe szlaki przekazywania sygnałów. Ostatnie z białek, czynnik martwicy (ang. *Lethal Factor* – LF), należy do proteaz, które przecinają kinazy z rodzi-

ny MAPKK (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase*), powodują hamowanie ich aktywności i tym samym prowadzą do zaburzenia szlaków przekazywania sygnałów w komórce, a w konsekwencji do jej apoptozy.

W wyniku prowadzonych eksperymentów gen kodujący immunogeny antygen przeciwwąglkowy (PAg) został wbudowany do materiału genetycznego znajdującego się w chloroplastach tytoniu [22]. Integracja nowego genu z genomem chloroplastu została potwierdzona metodami PCR i Southern blot. Uzyskany z roślin antygen PA charakteryzował się bardzo dobrą stabilnością. Maksymalny poziom ekspresji pożądanego genu uzyskiwano hodując roślinę w warunkach stałego oświetlenia. Ekstrakt uzyskany z transgenicznej rośliny zawierał do 25 µg/ml pełnowartościowego antygeny przeciwwąglkowego. PA z chloroplastów zmodyfikowanego tytoniu w połączeniu z białkiem LF wykazywał aktywność lityczną w stosunku do makrofagów myszy. Średnia wydajność procesu ekstrakcji czystego antygeny wynosiła 172 mg na jedną transgeniczną roślinę hodowaną w warunkach szklarniowych. Produkt uzyskany z hodowli prowadzonej na powierzchni jednego akra pozwoliłaby uzyskać około 400 milionów dawek wolnej od zanieczyszczeń szczepionki. Zdaniem autorów pracy komercyjna hodowla pozwoliłaby zwiększyć wydajność nawet o osiemnaście razy.

Kolejnym etapem badań było sprawdzenie skuteczności immunizacji myszy laboratoryjnych przy użyciu antygeny PA otrzymanego z chloroplastów transgenicznie zmodyfikowanego tytoniu [8]. Myszy laboratoryjne biorące udział w eksperymencie podzielono na dwie grupy. Pierwszej z nich podawano podskórnie antygen otrzymany z tytoniu, natomiast drugiej antygen otrzymany z hodowli *Bacillus anthracis*. Przeżywalność zwierząt po podaniu śmiertelnej dawki toksyny wąglkowej z obu porównywanych grup była stuprocentowa, co wstępnie potwierdziło potencjalną przydatność szczepionki uzyskanej w wyniku genetycznej modyfikacji tytoniu w immunizacji człowieka.

Tytoń zwalczający próchnicę

Związek między paleniem wyrobów tytoniowych a rozwojem wielu chorób jamy ustnej i chorób przyzębia jest bardzo dobrze udokumentowany. Okazało się jednak, że sam tytoń może być wykorzystany do walki z tymi chorobami. Brytyjska firma Planet Biotechnology wyprodukowała bowiem preparat który ma zastosowanie w profilaktyce próchnicy zębów oparty o zmodyfikowany genetycznie tytoń [15]. Genetyczna modyfikacja tytoniu miała polegać na wytworzeniu jego odmiany zdolnej do produkcji specyficznych przeciwciał [23]. Przeciwciała wytwarzane przez tak zmodyfikowany tytoń kumulowały się głównie w liściach rośliny, gdzie zlokalizowane były w obrębie retikulum endoplazmatycznego. Uzyskane z rośliny, a następnie oczyszczone białko stało się jednym ze składników preparatu CaroRcTM. Preparat ten zawiera specyficzne przeciwciała, które mają zdolność wiązania się z powierzchnią ściany komórkowej bakterii *Streptococcus mutans*, zasiedlających

jamę ustną i będących jednym z głównych czynników etiologicznych prowadzących do rozwoju próchnicy. Oplaszczone przez tytoniowe przeciwciała bakterie tracą naturalną zdolność do przylegania do powierzchni zębów, a tym samym przestają być zagrożeniem dla szkliwa. Preparat CaroRcTM znajduje się obecnie w II fazie badań klinicznych prowadzonych w Stanach Zjednoczonych. Wcześniej przeprowadzone na zwierzętach wstępne badania kliniczne wykazały, że zastosowanie omawianego preparatu pozwala wyeliminować bakterie na okres trwający do dwóch lat od zastosowania [9-11].

Oczyszczanie gleby i ścieków promysłowych przez transgeniczny tytoń

Zmodyfikowany genetycznie tytoń budzi zainteresowanie nie tylko wśród medyków, ale także wśród biologów zajmujących się problematyką ekologii. Z uwagi na rosnącą skalę emisji zanieczyszczeń antropogenicznych i związanego z tym zjawiska zagrożenia środowiska naturalnego, uwaga badaczy z całego świata skupia się na opracowywaniu coraz nowszych, tańszych i skuteczniejszych metod ich usuwania z otoczenia. Jednym z pomysłów jest taka modyfikacja genetyczna roślin, aby wykazywały one zwiększoną zdolność absorpcji metali ciężkich z gleby, dzięki wytwarzaniu w swoim organizmie białka metalotioneiny.

Metalotioneina (MT) odgrywa kluczową rolę w metabolizmie m.in. takich metali jak cynk, miedź, kadm, rtęć, kobalt czy bizmut. MT składa się z dwóch domen: alfa i beta. Domena alfa wiąże głównie rtęć i kadm, metale ciężkie, które przedostając się do gleby, stwarzają poważne zagrożenie dla środowiska. *Zhang* i wsp. skonstruowali zmutowany gen mysi kodujący białko MT alfa-alfa i doprowadzili do jego ekspresji w organizmie bakterii *Escherichia coli*. Białko miało tą samą trwałość, co naturalne, ale dodatkowo charakteryzowało się większą zdolnością do wiązania metali ciężkich [24]. Kolejnym krokiem badaczy było umieszczenie genu kodującego nowe białko w organizmie roślinnym. Do modyfikacji genetycznej użyto tytoniu (*Nicotiana tabacum* L. cv. NC89). Analiza *Southern blot* wykazała, że zmutowany gen MT alfa-alfa zintegrował się z genomem tytoniu, a przeprowadzona analiza *Western blot* dowiodła, że gen jest aktywny i dochodzi do jego ekspresji w uzyskanym organizmie zmodyfikowanej rośliny. Ważną obserwacją było to, że MT alfa-alfa uzyskana z tytoniu posiadała większą tolerancję na metale ciężkie niż metalotioneina naturalna. Transgeniczny tytoń posiadał większą zdolność kumulowania w korzeniach jonów Cd²⁺ z gleby niż odmiana dzika, nie zwiększając zawartości tego pierwiastka w liściach rośliny.

Wiele wysiłku poświęca się ostatnio zastosowaniu roślin do ekstrakcji i detoksykacji organicznych związków azotowych wytwarzanych przez zakłady przemysłowe. Wykorzystując transgeniczny tytoń, opracowano metodę przemian bardzo toksycznego i trudnego do utylizacji 2,4-dinitrotoluenu (2,4-DNT) do mniej toksycznej pochodnej aminowej [17]. W tym celu wprowadzono do

genomu chloroplastów tytoniu gen kodujący produkcję flawodoksyny (F1d) – białka naturalnie występującego u cyjanobakterii, wykazującego zdolność enzymatycznej przemiany związków nitrowych do aminowych pod wpływem światła. Transformowana roślina tytoniu, zawierająca w swoich chloroplastach F1d, wykazywała zwiększoną zdolność tolerancji oraz przemiany 2,4-DNT do aminopochodnych w porównaniu z odmianą dziką. Wyniki badań dowodzą, że transgeniczny tytoń, mógłby posłużyć do oczyszczania skażonych terenów ze związków nitroaromatycznych.

Podsumowanie

Niniejszy artykuł jest próbą zwięzłego podsumowania tego, jak w obliczu doniesień naukowych ostatnich lat z dziedziny genetyki i biologii molekularnej wykorzystywana jest znana w Europie od kilku stuleci roślina *Nicotiana tabacum*. Zastosowanie tytoniu w medycynie czy ochronie środowiska na pewno nie zrównoważy szkód, jakie do tej pory wywołał nałóg palenia wyrobów tytoniowych oraz szkód, jakie poczyni tym i przyszłym pokoleniom. Droga do skomercjalizowania przedstawionych pomysłów zastosowania transgenicznego tytoniu w służbie człowieka jest długa i z pewnością, z różnych przyczyn, część z nich nigdy nie opuści laboratoriów, w których powstała. Opisane w pracy nowe zastosowania tytoniu, dzięki osiągnięciom nowoczesnej inżynierii genetycznej, stawiają jednak tę roślinę w zupełnie nowym świetle. Być może w przyszłości tytoń będzie także traktowany jako roślina lecznicza, tak jak to miało miejsce w XVI w.

Piśmiennictwo

1. **Arlen P.A., Falconer R., Cherukumilli S. et al.:** Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon-alpha2b. *Plant Biotechnol. J.* 2007, 5, 511.
2. **Brodzik R., Glogowska M., Bandurska K. et al.:** Plant-derived anti-Lewis Y mAb exhibits biological activities for efficient immunotherapy against human cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, 23, 16720700.
3. **Brandle J.D., Bai D.:** Biotechnology: uses and application in tobacco improvement, [In:] Davis D. Layten and Nielsen M.T. (Eds), *Tobacco: production, chemistry and technology*, Blackwell Science Ltd., Oxford, UK 1999.
4. **Daniell H., Lee S., 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.
5. **Djordjevic M.V., Stellman S.D., Zang E.:** Doses of nicotine and lung carcinogens delivered to cigarette smokers. *J. Natl. Cancer Inst.* 2000, 92, 106.
6. **Dunsby J., Bero L.:** A nicotine delivery device without the nicotine? Tobacco industry development of low nicotine cigarettes. *Tob. Control* 2004, 13, 362.
7. **Gadani F., Ayers D., Hempfling W.:** Tobacco: a tool for plant genetic engineering research and molecular farming, Part I. *Agro-Food Industry Hi-Tech.* 1999, 6, 19.
8. **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.
9. **Ma J.K., Hikmat B., Wycoff K.:** Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nat. Med.* 1998, 4, 601.
10. **Ma J.K., Hunjan M., Smith R., Lehner T.:** Specificity of monoclonal antibodies in local passive immunization against streptococcus mutans. *Clin. Exp. Immunol.* 1998, 77, 331.
11. **Ma J.K., Lehner T.:** Prevention of colonization of *Streptococcus mutans* by topical application of monoclonal antibodies in human subjects. *Arch. Oral Biol.*, 1990, 35, 1155.
12. **Maclean J., Koekemoer M., Olivier A.J. et al.:** Optimization of human papillomavirus type 16 (HPV-16) L1 expression in plants: comparison of the suitability of different HPV-16 L1 gene variants and different cell-compartment localization. *J. Gen. Virol.* 2007, 88, 1460.
13. **Ruhlman T., Ahangari R., Devine A. et al.:** 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.
14. **Stratton K., Shetty P, Wallace R. et al.:** Committee to Assess the Science Base for Tobacco Harm Reduction, Institute of Medicine, eds. *Clearing the smoke: assessing the science base for tobacco harm reduction*. Washington DC: National Academy Press, 2001.
15. Strona internetowa firmy Planet Biotechnology: <http://www.planetbiotechnology.com/> (dostęp dnia 9 sierpnia 2007).
16. Strona internetowa firmy Vector Tobacco Inc.: <http://www.questcigs.com/> (dostęp dnia 13 sierpnia 2007).
17. **Tognetti V.B., Monti M.R., Valle E.M. et al.:** Detoxification of 2,4-dinitrotoluene by transgenic tobacco plants expressing a bacterial flavodoxin. *Environ. Sci. Technol.* 2007, 41, 4071.
18. United States Patent Application: 2006026001, <http://appft1.uspto.gov/> (dostęp dnia 13 sierpnia 2007)
19. Ustawa z dnia 22 czerwca 2001 r. O organizmach genetycznie zmodyfikowanych. (Dz. U. z dnia 25 lipca 2001 r.)
20. **Varsani A., Williamson A.L., Rose R.C. et al.:** Expression of Human papillomavirus type 16 major capsid protein in transgenic *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. *Arch. Virol.* 2003, 148, 1771.
21. **Varsani A., Williamson A.L., Stewart D. et al.:** Transient expression of Human papillomavirus type 16 L1 protein in *Nicotiana benthamiana* using an infectious tobamovirus vector. *Virus Res.* 2006, 120, 91.
22. **Watson J., Koya V., Leppla S.H., Daniell H.:** Expression of *Bacillus anthracis* protective antigen in transgenic chloroplasts of tobacco, a non-food/feed crop. *Vaccine* 2004, 22, 4374.
23. **Wycoff K.L.:** Secretory IgA antibodies from plants. *Curr. Pharm. Des.* 2005, 11, 2429.
24. **Zhang X., Zhou W., Ru B-G.:** Transgenic Tobacco with ?? Mutant Gene Has Higher Tolerance to Heavy Metals. *Acta Bot. Sin.* 2000, 42, 416.