جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مهندسی ژنوم کلروپلاست گیاهان به منظور تولید ترکیبات دارویی

رحمانی م[1]، عالمی‌سعید خ[2]، عباس‌زاده ش[3]

1، 2 و 3: به ترتیب دانشجوی کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات و دانشجوی کارشناسی‌ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دانشگاه کشاورزی و منابع‌طبیعی رامین، اهواز

چکیده

در سال‌های اخیر استفاده از بیوتکنولوژی گیاهی به منظور تولید انواع مختلف فرآورده‌های زیستی ساده و پیچیده در درمان بیماری‌های انسان، افزایش چشمگیری داشته است. مهندسی ژنوم کلروپلاست در مقایسه با ژنوم هسته‌ای به دلایلی از قبیل بالا بودن بیان ترانسژن، بیان چندین ژن در یک واقعه تراریزش و عدم انتقال ژن هدف به گیاهان ناخواسته به دلیل وراثت مادری از اهمیت بالایی برخوردار است. با توجه به بیش-بیان آنتی‌ژن‌های درمانی و پروتئین‌های دارویی در کلروپلاست‌ها (برگ‌ها) و کروموپلاست‌های تراریخته (میوه‌ها/ریشه‌ها)، این تکنولوژی می‌تواند درمان بیماری‌ها را کارآمد و آسان کند. توانایی کلروپلاست‌ها در تاخوردگی صحیح پروتئین‌ها و تشکیل پل‌های دی‌سولفیدی پروتئین‌هایی همچون پروتئین‌های خون انسان (سرم آلبومین و یا اینترفرون‌ها)، وجود چاپرون‌های دخیل در سرهم‌بندی زیرواحدهای کمپلکس پروتئین‌های اولیگومری در کلروپلاست‌ها و طبیعت پروکاریوتی آنها جهت بیان ژن‌های باکتریایی از خصوصیات جالب کلروپلاست‌هاست که آنها را مناسب تولید پروتئین‌های دارویی و درمانی کرده است. امکان خالص‌سازی پروتئین‌های دارویی از کلروپلاست‌ها با استفاده از روش‌های نوین خالص‌سازی، موجب شده که به روش‌های پرهزینه‌ای همچون کروماتوگرافی ستونی نیازی نباشد.

واژگان کلیدی: مهندسی ژنوم کلروپلاست؛ زیست داروها؛ پروتئین.

مقدمه

تولید پروتئین‌های دارویی در بافت و سلول‌های گیاهی مزایای زیادی را به دنبال دارد. علاوه بر پایین بودن هزینه تولید فرآورده‌های پروتئینی در سیستم‌های گیاهی، امکان تغییرات پس از ترجمه[1] فرآورده پروتئینی و به حداقل رساندن خطر آلودگی فرآورده را از پاتوژن‌های انسانی فراهم می‌آورند. اگر پروتئین تولیدی خوراکی باشد مراحل هزینه‌بر خالص‌سازی پروتئین نوترکیب نیز می‌تواند حذف شود. علاوه بر این مزایا، با استفاده از این سیستم امکان ذخیره‌سازی مناسب و راحت، حذف امکانات بیمارستانی جهت درمان بیماری‌ها، ضرورت مهارت‌های اجرای اقدامات تامین سلامت و استفاده از منابع قابل تجدید برای تولید مداوم آنها وجود دارد.

مهندسی ژنوم کلروپلاست گیاهی نسبت به ژنوم هسته‌ای مزایای منحصر به فرد متعددی را داراست که از مهمترین آنها می‌توان به بیان بالای پروتئین بیگانه[2] اشاره کرد. برای مثال پروتئین حاصل از بیان ژن *Cry 2 Aa2* باکتری *Bacillus thurigiensis* در کلروپلاست‌های تراریخته، بیشتر از 41/6% کل پروتئین برگ را تشکیل می‌دهد (1) و یا

[1] Post-translational modifications
[2] Foreign protein

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

اینکه پروتئین های خون انسان در کلروپلاست های تراریخته، 500 برابر بیشتر از میزان پروتئین موجود در گیاهان تراریخته هسته‌ای می‌باشند (4). ژنوم کلروپلاست گیاهان از قوانین توارثی مندلی تبعیت نمی‌کند و از طریق والد مادری به ارث می‌رسد. بنابراین امکان انتقال ژن انتقالی[1] به گونه‌های گیاهی ناخواسته و ریزسازواره‌ها[2]، از طریق دانه گرده به حداقل می‌رسد. علاوه بر این، با این روش ناهنجاری‌های احتمالی انتقال ژن همچون اثر مکانی[3] (6، 2)، که با تراریزش ژنوم هسته ای ممکن است اتفاق بیافتد حذف می شود. علاوه بر این، مشکل خاموشی ژن هم در سطح رونویسی و هم در سطح ترجمه تاکنون در کلروپلاست ها تراریخته دیده نشده است (7). کلروپلاست ها قادرند فرایند تاشوندگی[4] زیرواحدها و تشکیل پل های دی‌سولفیدی پروتئین‌های یوکاریوتی همچون اینترفرون‌ها، آنتی‌ژن واکسن‌ها و سوماتوتروپین انسانی را به شیوه درست و صحیح انجام دهند. حضور چاپرون‌ها در کلروپلاست‌ها تاشوندگی و سرهم‌بندی کمپلکس پروتئین‌های چندزیرواحدی را تسهیل می‌کنند.

عامل اصلی بالا بودن هزینه تولید پروتئین‌های دارویی، خالص‌سازی پروتئین بیگانه از عصاره استخراج شده از بافت‌ها و سلول گیاهی می‌باشد. در بکارگیری کلروپلاست‌ها، امکان استفاده از راهکارهای نوین خالص‌سازی پروتئین که در آن نیاز به استفاده از امکانات گران قیمت کروماتوگرافی ستونی است حذف می‌شود می‌تواند. علاوه بر این، تحویل خوراکی[5] پروتئین نوترکیب 90% هزینه تولید را کاهش می‌دهد.

تحویل خوراکی واکسن‌ها

مهمترین نکته در تحویل خوراکی پروتئین های جدید و یا نوترکیب استفاده از نشانگرهای قابل انتخاب[6] عاری از عامل مقاومت به آنتی‌بیوتیک می‌باشد. ژن بتائین‌آلدئیددهیدروژناز اسفناج به عنوان یک نشانگر انتخابی خوب عمل کرده و امکان انتخاب دیداری[7] سلول‌های سبز تراریخته را از سلول‌های زرد غیرتراریخته فراهم می‌کند. بتائین آلدئید سمی (BA) توسط آنزیم BADH کلروپلاست، به بتائین گلیسین غیرسمی تبدیل می شود. علاوه بر این، بتائین گلیسین به عنوان حفاظت کننده تنش‌های اسمزی نقش مهمی در گیاه ایفا کرده که باعث تحمل گیاه به نمک‌های 500 میکرومول NaCl می‌شود (9).

برای اولین بار تراریزش پایدار[8] و کارامد پلاستیدهای هویج با استفاده از بافت های غیرسبز به عنوان ریزنمونه، از طریق جنین زایی سوماتیکی[9] گزارش شد (9). هویج گیاهی است دوساله که در سال اول فاز رویشی و در سال دوم وارد فاز زایشی می شود. برداشت پیکر رویشی حاوی ژن انتقالی در پایان سال اول به دلیل عدم وجود سیستم زایشی، از انتقال ژن از طریق بذر و یا دانه گرده جلوگیری می شود. علاوه بر این، وراثت مادری ژنوم کلروپلاست به این فرایند نیز کمک می‌کند. جنین‌های سوماتیکی هویج در ابتدا تک‌سلول‌هایی بوده‌اند که از طریق جنین‌زایی[10] تکثیر شده‌اند و منبع یکنواختی را برای کشت سلول فراهم می‌کنند. تحویل خوراکی پروتئین‌های درمانی از طریق

[1] Transgene
[2] Microorganism
[3] Position effect
[4] Folding
[5] Oral delivery
[6] Selectable markers
[7] Visual selection
[8] Stable transformation
[9] Somatic embryogenesis
[10] Embryogenesis

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مصرف هویج، یکپارچگی ساختمان پروتئین‌ها را حفظ می‌کند. علاوه بر این، جنین‌های پوشش‌دار شده که برای مدت طولانی در محیط کشت زنده هستند می‌توانند در حفاظت انجمادی[1] ژن‌های هدف و پروتئین‌های حاصل از آنها مورد استفاده قرار گیرند.

. تولید آنتی‌ژن واکسن‌ها از کلروپلاست گیاهان عالی

1- آنتی‌ژن واکسن کلراتوکسین B (CTB)

کلراتوکسین B زیرواحدی از *Vibrio cholera* بوده و به خاصیت آنتی‌ژنی خوبی دارد. بیان این آنتی‌ژن در کلروپلاست ها موجب انباشتگی بالغ بر 31/1% از کل پروتئین قابل حل سلول می‌شود (2، 3). علاوه بر این، زیرواحدهای CTB سنتز شده در کلروپلاست های تراریخته، به شکل صحیح الیگومرهای فعال سرهم‌بندی شده و از لحاظ فعالیت آنتی‌ژنی مشابه به CTB معمولی بوده و فعال است. زیست‌سنجی‌های پیوندی[2] نشان داده‌اند که CTB سنتز شده از کلروپلاست‌ها به طور فعال و صحیح به پذیرنده گانگلوزید GM1غشاء روده‌ای متصل می‌شوند. همچنین این آزمایشات نشان داده اند که تاخوردگی صحیح و تشکیل باندهای دی‌سولفیدی در پنتامرها صورت می‌گیرد. بنابراین، با توجه به بالا بودن بیان ژن انتقالی و فعال بودن بیولوژیکی محصول بیان شده، می‌توان از گیاهان در تولید واکسن‌ها از مهندسی ژنوم کلروپلاست‌ها به عنوان سیستمی موثر و مفید استفاده کرد.

2-آنتی‌ژن محافظ آنتراکس

واکسنی که در حال حاضر برای آنتراکس (آنتی‌ژن حفاظتی) از آن استفاده می‌کنند از طریق عصاره عاری از سلول سویه پوشش‌دار نشده باکتری *Bacillus anthracis* تولید می‌شود. این عصاره دارای مقادیر ناچیزی از فاکتور کشنده[3] (LF) و فاکتور ورم می باشد. این فاکتورها علاوه بر سمی بودن، دارای اثرات جانبی نیز هستند. با این وجود، وجود، آنتی‌ژن حفاظتی آنتراکس که در کلروپلاست‌های تراریخته بیان شده است دارای 2/5 میلی‌گرم فاکتور ورم در هر گرم وزن تازه بافت گیاهی بوده و علاوه بر سمی نبودن فاقد اثرات جانبی است. سنجش لیزشدگی ماکروفاژ، فعال بودن بیولوژیکی این آنتی‌ژن را ثابت کرده است (تشکیل هپتامرها و اتصال آنها به پذیرنده سلول میزبان). با در نظر گرفتن میزان بیان کنونی این آنتی‌ژن (18/1% کل پروتئین قابل حل سلول) و 50% اُفت در هنگام خالص‌سازی، در هر متر مربع گیاهان ترانسپلانتوم، 400 میلیون دز از این آنتی‌ژن را می‌توان تولید کرد (8، 10، 14). بنابراین استفاده از رهیافت تراریزش کلروپلاست در تولید وسیع و تجاری این دسته از آنتی‌ژن‌ها نیز منطقی به نظر می‌رسد.

3-آنتی‌ژن واکسن طاعون

Yersinia pestis یک باکتری گرم منفی بوده و عامل بیماری طاعون می‌باشد. سه شکل متفاوت از طاعون وجود دارد که طاعون خیارکی[4] شایع‌ترین آنهاست. باکتری عامل بیماری وارد گره‌های لنفاوی شده و آماس گره‌ها را باعث باعث شده و تشکیل غده می‌دهد. واکسنی که در حال حاضر برای این بیماری در دسترس است واکسن کاملاً کشنده بوده که در مقابل فرم خیارکی تا حدودی موثر بوده اما در مقابل بقیه تاثیر بازدارندگی ندارد. جهت ایمن‌زایی در مقابل این باکتری، زیرواحد واکسن‌های مختلفی مورد ارزیابی و آزمایش قرار گرفته‌اند. Caf1 و Lcrv

[1] Cryopreservation
[2] Binding assays
[3] Lethal factor
[4] Bubonic plague

موثرترین آنتی‌ژن‌هایی هستند که تاکنون برای این باکتری شناسایی شده‌اند. F1 پروتئینی کپسول مانند با خاصیت ضد فاژی بوده که بر روی سطح باکتری قرار دارد. آنتی‌ژن v جزیی از سیستم ترشحی نوع III باکتری مذکور بوده که قسمتی از Injectosome را تشکیل می‌دهد. وقتی محققین موش‌ها را با پروتئین حاصل از اتصال آنتی‌ژن‌های F1-V تیمار کردند خاصیت ایمن‌زایی بسیار بالایی از این تیمار مشاهده شد. با بیان ژن امتزاجی F1-V در کلروپلاست‌های تراریخته، پروتئین حاصله 14/8% از کل پروتئین قابل حل سلول برگ را تشکیل داد (3).

پروتئین‌های دارویی حاصل از کلروپلاست‌ها

تاکنون پروتئین های دارویی زیادی در کلروپلاست گیاهان عالی بیان و تولید شده‌اند. کارایی و میزانِ بیان این پروتئین ها، به محل الحاق ژن هدف در ژنوم کلروپلاست، عناصر تنظیمی به کار برده شده جهت افزایش رونویسی/ترجمه و پایداری پروتئین حاصله بستگی دارد. ژن های کد کننده تمامی اسیدهای آمینه در کلروپلاست‌ها بیان شده‌اند که اکثر آنها به طور صحیح نا خورده و از لحاظ بیولوژیکی کاملاً فعال بوده‌اند.

1-فاکتور رشد انسولین[1]

فاکتور رشد انسولین (IGF) انسان نه فقط در تنظیم رشد ماهیچه‌ها و سایر بافت‌ها نقش مهمی دارد بلکه در حال حاظر خاصیت دارویی آن در درمان بیماریهایی همچون دیابت، تقویت سلامت استخوان و استخوان‌بندی صحیح از اهمیت زیادی برخوردار است. IGF پلی‌پپتیدی تک‌رشته‌ای با سه باند دی‌سولفیدی بوده که در کبد تولید می‌شود. به دلیل عدم تشکیل باندهای دی‌سولفیدی در سیتوپلاسم باکتری *E. coli*، این باکتری قادر به تولید فرم کامل و فعال IGF نمی‌باشد. از آنجا که رمزهای[2] ژنِ کد کننده IGF مناسب با محیط یوکاریوتی می‌باشند، مهندسی این ژن به منظور بهینه کردن رمزها جهت افزایش بیان آن در کلروپلاست تنباکو ضروری است. با این وجود، جالب اینجاست که میزان پروتئین حاصل از بیان ژن مهندسی شده و مهندسی نشده در گیاهان ترانسپانتوم تنباکو یکسان و 32% از کل پروتئین قابل حل سلول می‌باشد (8).

2- سرم آلبومین انسانی

سرم آلبومین انسانی (HSA)، فراوانترین پروتئین موجود در سیاهرگ‌ها بوده که حدود 60% از کل پروتئین موجود در خون را تشکیل می‌دهد. با بیان ژن مسئول HSA در کلروپلاست‌های تراریخته تنباکو، پروتئین حاصل از این ژن بالغ بر 11/1% از کل پروتئین قابل حل سلولی را تشکیل می دهد (4). این میزان 500 برابر بیشتر از بیان این ژن در هسته سلول های گیاهی می باشد. بالا بودن سطح بیان HSA موجب تشکیل اجسام گنجایشی[3] که این نه تنها از تجزیه پروتئولیتیک HSA جلوگیری می کند بلکه خالص‌سازی تک مرحله‌ای از طریق سانتریفیوژ را نیز تسهیل می‌کند.

3- اینترفرون آلفای انسانی

از اینترفرون های انسانی در درمان تومورهای کارسینوئید استفاده و نشان داده شده است که این ترکیب در کاهش اندازه تومور بسیار موثر است. این پروتئین خاصیت دارویی متعدد دیگری از قبیل جلوگیری از همانندسازی و تکثیر سلولی ویروس‌ها و بالا بردن پاسخ ایمنی بدن را نیز داراست. در حال حاضر این پروتئین در باکتری *E. coli* تولید

[1] Insulin growth factor
[2] Codon
[3] Inclusion bodies

می‌شود که به خالص‌سازی و عمل‌آوری[1] در شرایط *in vitro* نیاز دارد. بیان این پروتئین در هسته سلول‌های تنباکو بسیار پایین بود اما زمانی که این ژن در کلروپلاست‌های تراریخته همان گیاه بیان گردید، پروتئین حاصل 18/1% پروتئین قابل حل سلول را تشکیل داد (13). گذشته از این، پروتئین به دست آمده به لحاظ فیزیولوژیکی فعال بوده که این نشان دهنده این است که اینترفرون‌های سنتز شده در کلروپلاست گیاهان عالی همانند فرم‌های تجاری تولید شده از اینترون A فعال هستند.

4- پپتید ضد میکروبی

مگاینین یک عامل موضعی وسیع الطیف بوده که به عنوان یک آنتی‌بیوتیک سیستمیک، محرک التیام جراحات و به عنوان فاکتور ضد سرطان از اثربخشی بسیار خوبی برخوردار است. زمانی که آنالوگ این آنتی‌بیوتیک در کلروپلاست های تراریخته بیان شد میزان پروتئین حاصله تقریباً 21/5% از کل پروتئین محلول سلول را تشکیل داد (14). از باکتری گرم منفی *Pseudomonas aeruginosa* برای بررسی کارایی این پپتید لیز کننده استفاده و نشان داده شد که مانع رشد و تکثیر در 96% از سلول‌های نمونه مورد مطالعه گردید.

5- آنتی‌بادی‌های مونوکلونال

جهش‌یافته‌های باکتری اسپکتوکوکوس عامل اصلی پوسیدگی در دندان‌ها می‌باشند. آنتی‌بادی‌ئای تک‌کلونی Guy's B آنتی‌ژن سطح باکتری را مورد هدف قرار می‌دهند. آنتی‌بادی شیمری تک‌کلونی IgA (مشابه به Guy's) به طور موفقیت‌آمیز در کلروپلاست‌های تراریخته تنباکو با قابلیت و توانایی تشکیل باندهای دی‌سولفیدی سنتز می‌شود اما جهت تجاری‌سازی این تولید باید سطوح بیان آن افزایش یابد.

سخن آخر

سیستم کلروپلاست گیاهان جهت تولید تجاری پروتئین های دارویی و نوترکیب سیستمی بسیار مناسب است. گذشته از این، اگر دارو و یا پروتئین تولیدی به شیوه خوراکی توزیع شود هزینه خالص‌سازی پروتئین‌ها می‌تاند به طور کامل حذف شود و یا می‌توان با استفاده از راهکارهای نوین خالص‌سازی استخراج پروتئین‌ها از کلروپلاست‌ها، این هزینه را به حداقل کاهش داد.

منابع

1. De Cosa B, Moar W, Lee SB, Miller M, Daniell H. Over expression of the cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. Nat Biotechnol 2001; 19:71–4.
2. Daniell H, Lee SB, Panchal T, Wiebe P. Expression of native cholera toxin B sub-unit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. J Mol Biol 2001; 311(5):1001–9.
3. Molina A, Hervas-Stubbs S, Daniell H, Mingo-Castel AM, Veramendi J. High yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts. Plant Biotechnol 2004; 2:141–53.
4. Fernandez-San Millan A, Mingeo-Castel A, Miller M, Daniell H. A chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify human serum albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation. Plant Biotechnol 2003;1:71–9.

[1] Processing

5. Daniell H. Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. Nat Biotechnol 2002;20:581–6.
6. Daniell H, Khan M, Allison L. Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. Trends Plant Sci 2002;7:84–91.
7. Lee SB, Kwon HB, Kwon SJ, Park SC, Jeong MJ, Han SE, et al. Accumulation of trehalose within transgenic chloroplasts confers drought tolerance. Mol Breeding 2003;11:1–13.
8. Daniell H, Carmona-Sanchez O, Burns B. Chloroplast derived antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines. In: Schillberg S, *H. Daniell et al. / Vaccine 23 (2005) 1779–1783* 1783. Wiley VCH, editors. Molecular farming. Germany: Verlag publishers; 2004. p. 113–33.
9. Kumar S, Dhingra A, Daniell H. Plastid expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots and leaves confers enhanced salt tolerance. Plant Physiol 2004;136:2843–54.
10. Chebolu S, Daniell, H. Chloroplast derived vaccine antigens and biopharmaceuticals: expression, folding, assembly and functionality. Curr Trends Microbiol Immunol (in press).
11. Falconer R. Expression of Interferon alpha 2b in transgenic chloroplasts of a low-nicotine tobacco. M.S thesis, University of Central Florida, USA, 2002.
12. DeGray G, Rajasekaran K, Smith F, Sanford J, Daniell H. Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. Plant Physiol 2001; 127:852– 62.
13. Daniell H. Medical molecular pharming. In: Goodman RM, editor. Encyclopedia of plant and crop science. New York: Marcel Dekker; 2004. p. 705–10.
14. Watson J, Koya V, Leppla SH, Daniell H. Expression of Bacillus anthrax protective antigen in transgenic tobacco chloroplasts: development of an improved anthrax vaccine in a non-food/feed crop. Vaccine 2004; 22:4374–84.

Chloroplast engineering for biopharmaceuticals production

Rahmani M.[1], Alamisaeed Kh.[2] and Abbaszadeh Sh.[3]

1: M.Sc. Student of Plant Biotechnology, 2: Department of Agronomy and Plant Breeding, 3: M.Sc. Student of Genetic and Animal Breeding, Natural Resources and Agricultural Sciences University of Ramin, Ahwaz, Iran.

Abstract

In recent times, engineering of plant genomes in order to simple and complex bioproducts for therapeutic purposes had a salient increase. The chloroplast genetic engineering offers a number of unique advantages including high level of transgene expression, multi-gene expression in single transformation event and transgene containment due to maternal inheritance. Hyper expression of drugs or therapeutic proteins in transgenic chloroplasts or chromoplasts facilitates efficient therapeutic process. Ability of chloroplasts to correctly fold human blood proteins with proper disulfide bridges (human serum albumin) or presence of chaperones in chloroplasts to facilitate assembly of complex multi-subunit proteins or their prokaryotic nature to express native bacterial genes are attractive features for therapeutic protein production. Purification of therapeutic proteins

has been achieved using novel purification strategies that do not require expensive column chromatography.

Key words: Chloroplast genetic engineering, biopharmaceuticals, Protein.