



مهندسی ژنوم کلروپلاست گیاهان به منظور تولید ترکیبات دارویی

رحمانی م¹، عالمی سعید خ²، عباسزاده ش³

1، 2 و 3: به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات و دانشجوی

کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی 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 ترجمه¹ فرآورده پروتئینی و به حداقل رساندن خطر آلودگی فرآورده را از پاتوژن‌های انسانی فراهم می‌آورند. اگر پروتئین تولیدی خوراکی باشد مراحل هزینه‌بر خالص‌سازی پروتئین نو ترکیب 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 بیگانه² اشاره کرد. برای مثال پروتئین حاصل از بیان ژن *Cry 2 Aa2* باکتری *Bacillus thuringiensis* در کلروپلاست‌های تراریخته، بیشتر از 41/6% کل پروتئین برگ را تشکیل می‌دهد (1) و یا

¹ Post-translational modifications

² Foreign protein



اینکه پروتئین های خون انسان در کلروپلاست های تراریخته، 500 برابر بیشتر از میزان پروتئین موجود در گیاهان تراریخته هسته ای می باشد (4). ژنوم کلروپلاست گیاهان از قوانین توارثی مندلی تبعیت نمی کند و از طریق والد مادری به ارث می رسد. بنابراین امکان انتقال ژن انتقالی¹ به گونه های گیاهی ناخواسته و ریزسازواره ها²، از طریق دانه گرده به حداقل می رسد. علاوه بر این، با این روش ناهنجاری های احتمالی انتقال ژن همچون اثر مکانی³ (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 تاشوندگی⁴ زیرواحدها و تشکیل پل های دی سولفیدی پروتئین های یوکاریوتی همچون اینترفرون ها، آنتی ژن واکسن ها و سوماتوتروپین انسانی را به شیوه درست و صحیح انجام دهند. حضور چاپرون ها در کلروپلاست ها تاشوندگی و سرهم بندی کمپلکس پروتئین های چندزیرواحدی را تسهیل می کنند.

عامل اصلی بالا بودن هزینه تولید پروتئین های دارویی، خالص سازی پروتئین بیگانه از عصاره استخراج شده از بافت ها و سلول گیاهی می باشد. در بکارگیری کلروپلاست ها، امکان استفاده از راهکارهای نوین خالص سازی پروتئین که در آن نیاز به استفاده از امکانات گران قیمت کروماتوگرافی ستونی است حذف می شود می تواند. علاوه بر این، تحویل خوراکی⁵ پروتئین نو ترکیب 90% هزینه تولید را کاهش می دهد.

تحویل خوراکی واکسن ها

مهمترین نکته در تحویل خوراکی پروتئین های جدید و یا نو ترکیب استفاده از نشانگرهای قابل انتخاب⁶ عاری از عامل مقاومت به آنتی بیوتیک می باشد. ژن بتائین آلدئیددهیدروژناز اسفناج به عنوان یک نشانگر انتخابی خوب عمل کرده و امکان انتخاب دیداری⁷ سلول های سبز تراریخته را از سلول های زرد غیرتراریخته فراهم می کند. بتائین آلدئید سمی (BA) توسط آنزیم BADH کلروپلاست، به بتائین گلیسین غیرسمی تبدیل می شود. علاوه بر این، بتائین گلیسین به عنوان حفاظت کننده تنش های اسمزی نقش مهمی در گیاه ایفا کرده که باعث تحمل گیاه به نمک های 500 میکرومول NaCl می شود (9).

برای اولین بار تراریزش پایدار⁸ و کارآمد پلاستیدهای هویج با استفاده از بافت های غیرسبز به عنوان ریزنمونه، از طریق جنین زایی سوماتیکی⁹ 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 می کند. جنین های سوماتیکی هویج در ابتدا تک سلول هایی بوده اند که از طریق جنین زایی¹⁰ تکثیر شده اند و منبع یکنواختی را برای کشت سلول فراهم می کنند. تحویل خوراکی پروتئین های 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



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 انجمادی¹ ژن‌های هدف و پروتئین‌های حاصل از آنها مورد استفاده قرار گیرند.

تولید آنتی‌ژن واکسن‌ها از کلروپلاست گیاهان عالی

1- آنتی‌ژن واکسن کلراتوکسین (CTB)

کلراتوکسین B زیرواحدی از *Vibrio cholera* بوده و به خاصیت آنتی‌ژنی خوبی دارد. بیان این آنتی‌ژن در کلروپلاست‌ها موجب انباشتگی بالغ بر 31/1% از کل پروتئین قابل حل سلول می‌شود (2، 3). علاوه بر این، زیرواحدهای CTB سنتز شده در کلروپلاست‌های تراریخته، به شکل صحیح الیگومرهای فعال سرهم‌بندی شده و از لحاظ فعالیت آنتی‌ژنی مشابه به CTB معمولی بوده و فعال است. زیست‌سنجی‌های پیوندی² نشان داده‌اند که CTB سنتز شده از کلروپلاست‌ها به طور فعال و صحیح به پذیرنده گانگلوکید GM1 غشاء روده‌ای متصل می‌شوند. همچنین این آزمایشات نشان داده‌اند 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 کشنده³ (LF) و فاکتور ورم می‌باشد. این فاکتورها علاوه بر سمی بودن، دارای اثرات جانبی نیز هستند. با این 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 لیزشده‌گی 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% افت 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 خیارکی⁴ 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. CafI 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 ۷ جزئی 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 پروتئین‌های دارویی زیادی در کلروپلاست گیاهان عالی بیان و تولید شده‌اند. کارایی و میزان بیان این پروتئین‌ها، به محل الحاق ژن هدف در ژنوم کلروپلاست، عناصر تنظیمی به کار برده شده جهت افزایش رونویسی/ترجمه و پایداری پروتئین حاصله بستگی دارد. ژن‌های 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 انسولین¹

فاکتور رشد انسولین (IGF) انسان نه فقط در تنظیم رشد ماهیچه‌ها و سایر بافت‌ها نقش مهمی دارد بلکه در حال حاضر 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 رمزهای² ژن 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 می‌دهد (4). این میزان 500 برابر بیشتر از بیان این ژن در هسته سلول‌های گیاهی می‌باشد. بالا بودن سطح بیان HSA موجب تشکیل اجسام گنجایشی³ که این نه تنها از تجزیه پروتئولیتیک HSA جلوگیری می‌کند بلکه خالص‌سازی تک مرحله‌ای از طریق سانتریفیوژ را نیز تسهیل می‌کند.

3- اینترفرون آلفای انسانی

از اینترفرون‌های 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 عمل‌آوری¹ 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 اینترفون A فعال هستند.

4- پپتید ضد میکروبی

مگانین یک عامل موضعی وسیع‌الطیف 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 کلروپلاست‌های 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. آنتی‌بادی‌های تک‌کلونی Guy's B آنتی‌ژن سطح باکتری را مورد هدف قرار می‌دهند. آنتی‌بادی شیمیری 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 پروتئین‌های دارویی و نو ترکیب سیستمی بسیار مناسب است. گذشته از این، اگر دارو و یا پروتئین تولیدی به شیوه خوراکی توزیع شود هزینه خالص‌سازی پروتئین‌ها می‌تواند 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, Mingo-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.

Archive of SID