

مجله ایمنی زیستی

دوره ۱۴، شماره ۱، بهار ۱۴۰۰

ISSN 2716-9804 الکترونیکی، ISSN 2717-0632 چاپی

کاربرد جمینی ویروس‌های گیاهی در ساخت واکسن‌های گیاهی



[20.1001.1.27170632.1400.14.1.5.2](https://doi.org/10.1001.1.27170632.1400.14.1.5.2)

سعیده دهقانپور فراشاه^۱، مهرداد صالح‌زاده^{۲*}

۱- استادیار گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۲- دانشجوی دکترای بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، ایران

mehrdadsalehzadeh@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۹، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۲۰

صفحه ۷۸-۵۹

چکیده

گیاهان یک بستر تولید ایمن، کارآمد و ارزان هستند که از طریق آن‌ها می‌توان واکسن‌ها و سایر پروتئین‌های درمانی را برای کشورهای فقیر و در حال توسعه جهان تهیه کرد. فناوری وکتورهای بیانی مبتنی بر ویروس‌های گیاهی به سرعت به یکی از محبوب‌ترین روش‌ها برای بیان پروتئین‌های دارویی در گیاهان تبدیل شده است. در این مطالعه، مروری بر چندین واکسن خوراکی تهیه شده در دنیا مورد بررسی قرار گرفته و در ادامه سیستم پیشرفته بیانی مبتنی بر ویروس‌ها مخصوصاً جمینی ویروس‌ها در گیاهان برای ساخت واکسن بحث شده است. همچنین در این بررسی مروری بر مزایای ویروس‌های دی.ان.ای دار تک‌رشته‌ای و کوچک ارائه شده و مزایای آن‌ها برای بیان پروتئین‌های دارویی با سایر سیستم‌های بیانی در سایر ویروس‌های گیاهی مقایسه شده است. همچنین پیشرفت در زمینه طراحی چندین وکتور ویروسی بیانی مختلف مبتنی بر جمینی ویروس‌ها در دنیا و ایران ارائه شده است و نمونه‌هایی از واکسن‌ها و سایر مواد بیولوژیکی تولید شده از هر یک شرح داده شده است. در نهایت مزایا و چالش‌های تولید واکسن‌های خوراکی در علم پزشکی مورد بحث قرار گرفته است.

واژه‌های کلیدی: واکسن‌های خوراکی، ویروس‌های گیاهی، جمینی ویروس، وکتورهای بیانی.

مقدمه

جمینی ویروس‌ها (*Geminiviruses*)، ویروس‌های بیماری‌زای گیاهی با دی.ان.ای تک‌رشته‌ای دوبخشی یا تک‌بخشی (*ssDNA*) هستند که این دی.ان.ای در درون ذرات بیست‌وجهی دوقلو، قرار گرفته است. خانواده‌ی جمینی‌ویریده شامل نه جنس مختلف شامل: *Grabovirus*، *Eragrovirus*، *Curtovirus*، *Becurtovirus*، *Begomovirus*، *Capulovirus*، *Turncurtovirus*، *Topucovirus* و *Mastrevirus* است. معیارهای تشخیصی و متمایزکننده شامل ناقل، دامنه‌ی زیستگاه میزبان، سازمان‌دهی ژنوم و نوع توالی ویروسی است. در این ویروس‌ها یک بیست‌وجهی، حاوی ژنوم با ساختار دی.ان.ای تک‌رشته (*ssDNA*) است که طول ژنوم ۲/۷-۳ کیلوباز است و در صورت آلودگی گیاه، شکل همانندساز ویروس که به صورت دورشته‌ای است، در درون هسته‌ی گیاه ساخته می‌شود. ژنوم جمینی‌ویروس‌ها شامل دو جزء دی.ان.ای (در جمینی‌ویروس‌های دوبخشی شامل: دی.ان.ای A و دی.ان.ای B) و یا یک جزء دی.ان.ای (تک‌بخشی) است (Hanley-Bowdoin et al. 2014).

برای جمینی‌ویروس‌های دوبخشی، جزء دی.ان.ای A، پروتئین‌های مربوط به همانندسازی

دی.ان.ای ویروسی، پوشش پروتئینی، انتقال توسط ناقل و مهارکننده‌های ویروسی که خاموش‌کننده‌ی آر.ان.ای (viral suppressors of RNA silencing) ((VSRs)) هستند را رمزگذاری می‌کند. درحالی‌که دی.ان.ای B، پروتئین‌های دخیل در حرکت بین سلولی و درون‌سلولی ذرات ویروسی را رمزگذاری می‌کند. ویروس‌های تک‌بخشی، شامل یک جزء دی.ان.ای به‌عنوان ژنوم هستند که با دی.ان.ای A جمینی‌ویروس‌های دوبخشی همولوگ هستند، بنابراین کارکردهای حرکتی توسط ژن پروتئین پوششی یا V2 ORF انجام می‌شوند. باین‌حال، در بسیاری از موارد، بگوموویروس‌های تک‌بخشی دارای عناصر همراه با ژنوم *ssDNA*، موسوم به بتا یا آلفاستلایت هستند. اجزای دی.ان.ای ستلایتها به‌طور جزئی یا کامل برای همانندسازی، حرکت و تشکیل کپسید (پوشش پروتئینی)، به جمینی‌ویروس کمکی متکی هستند. در برخی موارد، پروتئین‌های رمزگذاری‌شده توسط اجزای این ستلایت‌ها در ویروس‌های تک‌بخشی به‌عنوان VSR عمل می‌کنند. آلفاستلایت‌ها (α DNA) دارای *ssDNA* خود همانندساز (۱۳۷۵ نوکلئوتید) با نصف اندازه‌ی جمینی‌ویروس کمکی خود هستند و به ویروس کمکی برای حرکت، پوشش‌دهی و انتقال

"دهقانپور و صالح‌زاده، کاربرد جمینی‌ویروس‌های گیاهی در ساخت واکسن‌های گیاهی"

مشتق‌شده از ژنوم بگوموویروس جدید (RecSat)، که نوترکیب اجزای دی.ان.ای آلفا و بتاستلایت سه والد است (بتاستلایت چینی پیچ خوردگی برگ زرد گوجه‌فرنگی، بتاستلایت چینی رگبرگ زرد گل ابری و آلفاستلایت ساقه‌ی پیچیده‌ی تنباکو) است، یافت شده است. اگرچه اثر مشهود RecSat روی توسعه‌ی علائم در *Nicotiana benthamiana* مشاهده نشده ولی باعث افزایش انباشت ویروس کمکی شده است و نقش بیولوژیکی دی.ان.ای‌های مداخله‌کننده‌ی ناقص را نشان می‌دهد (Chen et al. 2011).

جمینی‌ویروس‌ها به دلیل ژنوم نسبتاً کوچک خود و توانایی خود برای کنترل و برنامه‌ریزی مجدد فرآیندهای سلولی به نفع خود، موضوع جالب و مورد مطالعه در ویروس‌شناسی مولکولی هستند. ژنوم جمینی‌ویروس به دی.ان.ای و آر.ان.ای پلیمراز میزبان برای همانندسازی رونویسی، وابسته است. ژنوم ssDNA به شکل دی.ان.ای دورشته‌ای (dsDNA) همانندسازی می‌کند که گفته می‌شود با پروتئین‌های هیستون میزبان به عنوان مینی کروموزوم‌های داخل هسته، مرتبط است. به علاوه، جمینی‌ویروس‌ها منجر به خسارت‌های اقتصادی قابل توجه در تولید مواد غذایی، علوفه و محصولات فیبری شده‌اند و تأثیر

توسط ناقل وابسته هستند. آلفاستلایت‌ها، پروتئین آغازگر همانندسازی خود را رمزگذاری کرده و دارای منشأ همانندسازی مشترک با Nanoviridae هستند. بگوموویروس‌های تک‌بخشی نیز دارای ژنوم ssDNA حلقوی کوچک (با اندازه‌ی ۱/۴-۱/۳ کیلوباز) موسوم به بتاستلایت‌ها (β DNA) هستند. برخلاف آلفاستلایت‌ها، بتاستلایت‌ها، عوامل تشدیدکننده‌ی بیماری‌زایی هستند که کاملاً به ویروس کمک‌کننده برای همانندسازی، ایجاد کپسید و کارکردهای انتقال با ناقل متکی هستند (Chen et al. 2011).

اجزای ژنومیک جمینی‌ویروس‌ها سریعاً تکامل می‌یابند و نوترکیبی ژنتیکی میان اجزای مختلف ژنومیک، عامل اصلی مؤثر بر تکامل آن‌ها هستند. نکته‌ی جالب این است که نوترکیبی ژنتیکی، موجب حفظ برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین یا پروتئین-دی.ان.ای می‌شود که نقش مهم در تکامل و تنوع ایفا می‌کند. نوترکیبی بین ویروس کمکی و اجزای آلفاستلایت، در شرایط میدانی نیز ثبت شده است. به‌طور مشابه، نوترکیبی بین ویروس کمکی، ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی (TYLCCNV) و بتاستلایت‌ها، منجر به توسعه‌ی یک ویروس نوترکیب با دامنه‌ی میزبانی وسیع شده است. یک مولکول ستلایت نوترکیب

منفی روی امنیت غذایی و تغذیه‌ای در سراسر جهان گذاشته‌اند. برای مثال، خسارات شدید به پنبه در آسیا و کاساوا و ذرت در آفریقا به آلودگی جمینی ویروس‌ها نسبت داده شده است. لگوم‌ها در هند بیشتر آلوده به بگومو ویروس‌ها هستند که هر ساله موجب کاهش عملکرد و خسارت برابر با ۳۰۰ میلیون دلار می‌شوند. ویروس‌های پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی (ToLCVs) منجر به زیان اقتصادی سالانه‌ی ۱۴۰ میلیون دلار در فلوریدای آمریکا شده و در سراسر آمریکا، یک عامل محدودکننده‌ی گوجه‌فرنگی محسوب می‌شوند (Huang et al. 2009).

واکسن‌های خوراکی

تولید واکسن از طریق سیستم‌های گیاهی

در حال حاضر، سیستم‌های زیادی مانند باکتری‌ها، مخمرها و سلول‌های پستانداران برای بیان واکسن‌های نو ترکیب و پروتئین‌های درمانی در دسترس هستند اما همه سیستم‌های فوق دارای برخی معایب مانند هزینه بالا، مسائل مربوط به ایمنی و شناسایی آنتی‌ژن هدف هستند. بررسی‌ها نشان داده که تولید واکسن با استفاده از سیستم گیاهی بسیار مفید است چرا که هزینه‌های مربوط به آن کم، ایمنی آن بهتر، و فناوری اصلاح و

پردازش پس از ترجمه‌ی آن بالا است و آلودگی‌های بعدی توسط سایر عوامل بیماری‌زا در آن به‌ندرت رخ می‌دهد. تولید واکسن در سیستم‌های گیاهی جدیدترین فناوری جایگزین برای تولید واکسن در مقایسه با شیوه‌های تولید معمول واکسن است (Xiao et al. 2020). اهداف اصلی در ساخت واکسن‌های گیاهی خوراکی، تولید آنتی‌ژن در گیاهان و مصرف خوراکی این واکسن‌ها برای القای مناسب پاسخ‌های ایمنی و آنتی‌ژنی خاص است (Sohrab et al. 2017). واکسن‌های گیاهی ممکن است یک مزیت انتخابی برای خواسته‌های ویژه فراهم کنند که ممکن است به راحتی از طریق تولید معمولی واکسن برطرف نشود. یکی از این موارد تهیه واکسن ارزان قیمت برای فقرای جهان است که در کشورهای در حال توسعه زندگی می‌کنند تا ذخیره و تولید انبوه واکسن علیه بیماری‌های عفونی همه‌گیر به راحتی در دسترس باشد (Yang et al. 2011).

واکسن‌های گیاهی فعلی

شیوه‌های ساخت واکسن‌های گیاهی در برخی

ویروس‌های مهم امروزی

یک رویکرد برجسته برای طراحی واکسن بر مبنای استفاده از ذرات شبیه‌ویروسی

"دهقانپور و صالح‌زاده، کاربرد جمینی ویروس‌های گیاهی در ساخت واکسن‌های گیاهی"

ایمونوفلورسانس قابل مشاهده بودند. محققان اثبات کردند که VLP‌های تشکیل شده از نظر مورفولوژی مشابه با ویروس‌های SARS-CoV-1 بودند (Monreal et al. 2015). رویکرد مهم دیگر، ساخت واکسن‌های چند اپی‌تپی (multi-epitope protein) است که فرصتی را برای دستیابی به طراحی واکسن مناسب با انتخاب اپی‌تپ‌هایی که موجب القای پاسخ‌های ایمنی حفاظتی و قوی می‌شوند، فراهم می‌کنند. با این روش می‌توان یک واکسن بسیار ایمنی‌زا و کارآمد را تولید کرد. مطالعات مختلف اثبات کرده‌اند که پاسخ‌های ایمنی در برابر اپی‌تپ‌های مربوط به پروتئین S موجب بهبود بیماری می‌شوند و این امر نشان دهنده‌ی اهمیت طراحی منطقی واکسن‌ها برای تضمین حفاظت و ایجاد ایمنی است (Walls et al. 2020).

با توجه به مطالب فوق، کاندیدها برای تولید واکسن COVID-19 شامل MERS و SARS-CoV-1 هستند که هر دو از خویشاوندان SARS-CoV-2 هستند. بر اساس رویکردهای بیان هسته‌ای، قطعه‌ی انته‌ای آمینی پروتئین (s1) SARS-CoV-1 در گوجه‌فرنگی و تنباکو با نیکوتین پائین با استفاده از روش آگروباکتریوم بیان شد. گوجه‌فرنگی به‌صورت خوراکی در

(virus like particle, VLP) است که شامل کمپلکس‌های ماکرومولکول مشابه با ویروس‌ها هستند ولی ژنوم ویروس را ندارند. VLP‌ها دارای ساختار مشابه با ویروس‌ها هستند ولی عفونی نیستند. گزارش‌های متعدد در خصوص تولید VLP مربوط به ویروس آنفلوانزا، ویروس پاپیلومای انسانی، ویروس نقص ایمنی انسان، ویروس نوروالک، ویروس تب دره ریفت و ویروس هپاتیت B منتشر شده است. دستورالعمل‌های مربوط به آنتی‌ژن‌های SARS-CoV-1 و Middle East respiratory syndrome (MERS) بیان شده در سیستم‌های نو ترکیب که منجر به تشکیل VLP می‌شوند، حاوی راهکارهای مهم برای ساخت واکسن کووید ۱۹ هستند. مونرال و همکاران VLP‌های کورونایروس را با استفاده از سیستم بیانی مرتبط با باکولوویروس‌های ساکن در سلول‌های حشرات (سلول‌های sf9) تولید کردند که مبتنی بر پروتئین‌های ساختاری S (اسپایک)، E (غلاف)، M (غشا) و N (نوکلئوکپسید) ویروس به‌صورت جداگانه یا همزمان بود. بیان همزمان پروتئین‌های E، S و M حاصل شد که در نهایت منجر به تجمع کارآمد VLP و آزادسازی آن شد. همه‌ی این موارد با میکروسکوپی الکترونی و

اختیار موش‌ها قرار گرفت و در ادامه سطوح بالای IgA اختصاصی علیه SARS-CoV-1 تولید شد. در سرم موش‌های ایمن شده با تنباکوی تراریخته حضور پروتئین‌های IgG ضد SARS-CoV-1 گزارش شد (Pogrebnyak et al. 2005).

مطالعه‌ی دیگر مربوط به بیان پروتئین کایمیریک GFP و آمینواسیدهای ۱-۶۵۸ مربوط به پروتئین اسپایک SARS-CoV-1 (S1: GFP) با استفاده از برگ‌های تنباکو تحت بیان موقت، متمرکز بود. پس از مکان‌یابی میکروسکوپی، پروتئین فیوژن‌شده در سیتوپلاسم و مجاورت هسته مشاهده شد. پروتئین نوکلئوکپسید SARS-CoV-1 (Rn) با ۲۳ اسید آمینه به صورت موقت در *N. benthamiana* بیان شد و موجب دستیابی به سطوح بالای IgG1 و IgG2a شد (Li et al. 2009).

پروتئین نوکلئوکپسید (N) و پروتئین غشایی (M) به طور موقت در *N. benthamiana* بیان شد. مقدار عملکرد، ۳-۴ میکروگرم بر گرم وزن برگ تازه (۰/۲ درصد TSP (total soluble protein)) برای پروتئین N بود درحالی‌که عملکرد پروتئین M برابر با ۰/۱ درصد تا ۰/۱۵ درصد TSP بود. پروتئین N تخلیص‌شده با سرم انسانی حاوی آنتی‌بادی‌های اختصاصی N واکنش داد. اگرچه

هیچ‌گونه تست ایمنی‌زایی انجام نشد، این مطالعات راهنمای ارزشمندی برای انتخاب مناسب‌ترین پلتفرم‌های بیانی برای آنتی‌ژن‌های اختصاصی SARS-Cov2 هستند (Xiao et al. 2020).

وکتورهای مبتنی بر ویروس‌ها

رویکرد دیگر برای بیان پروتئین هترولوگ در گیاهان بستگی به استفاده از وکتورهای ویروسی دارد که از پیشبرهای کارآمد UTR و مکانیسم‌های همانندسازی دی.ان.ا./آر.ان.ای موجود در ویروس‌های گیاهی، استفاده می‌شود. نکته‌ی جالب این است که تحویل وکتورهای ویروسی به واسطه‌ی آگروباکتریوم، به عنوان یک استراتژی بسیار کارآمد برای تولید سریع زیست داروها با تولید بیش از ۵ گرم پروتئین در هر کیلوگرم بیومس (زیست‌توده‌ی) گیاهی تر در نظر گرفته شده است. توباموویروس‌ها (*Tobamoviruses*)، پوتکسوویروس‌ها (*Potexviruses*)، توبراویروس‌ها (*Tobraviruses*)، جمینی‌ویروس‌ها و کوموویروس‌ها، به عنوان مبنایی برای توسعه‌ی سیستم‌های بیان کارآمد و موقت در گیاهان استفاده شده‌اند. با اینحال، این فناوری، در صورت الحاق نیازمند تخلیص پروتئین هدف با توجه به حضور ترکیبات سمی (برای مثال، آلکالوئیدها) در برخی میزبان‌ها

"دهقانپور و صالح‌زاده، کاربرد جمینی‌ویروس‌های گیاهی در ساخت واکسن‌های گیاهی"

علف‌های هرز بسیار کاهش می‌یابد (Hefferon et al. 2003).

پیش از این، سازه‌های cDNA مربوط به وکتورهای بیانی ویروس‌های گیاهی که به گیاهان وارد می‌شدند، ساخت پروتئین دارویی تولیدشده به صورت موضعی در یک بافت خاص از میزبان اتفاق می‌افتاد و یک عدم هماهنگی در تولید پروتئین‌های دارویی و پخش وکتور بیانی در آلودگی طبیعی ویروس در گیاه میزبان وجود داشت. با این حال امروزه، کارآیی تولید پروتئین‌های دارویی با تلقیح وکتورهای بیانی از طریق آگرواینفیلتراسیون (agroinfiltration) به میزان قابل توجهی افزایش یافته است. این کار شامل تزریق وکتورهای بیانی به برگ‌های گیاه میزبان با سرنگ است. به‌عنوان مثال، یکی از کارهای انجام شده، تزریق سوسپانسیون حاوی *Agrobacterium tumefaciens* که ناقل ویروسی را در خود جای داده است به برگ‌های گیاهان هدف است. یکی از روش‌های دیگر تزریق سوسپانسیونی از آگروباکتریوم تحت شرایط خلاء (vacuum infiltration) به گیاهان است که اغلب به‌عنوان ابزاری برای ورود وکتورهای ویروسی به گیاهان استفاده می‌شود (Raja et al. 2008).

مانند تنباکو (*N. benthamiana*) و نیز بقایای باکتریایی به‌خصوص اندوتوکسین‌ها است که برای افزایش ایمنی‌زایی واکسن به پروتئین دارویی الحاق می‌شوند. چرا که گیاه در حضور ویروس‌ها و وکتورهای باکتریایی بیانی حاوی توکسین‌ها، شروع به تولید برخی متابولیت‌های ثانوی دفاعی می‌کند. بنابراین، در حال حاضر، این فناوری برای فرمولاسیون و تولید واکسن‌های نازال (nasal) یا قابل تزریق استفاده می‌شود (Makarkov et al. 2019).

در ابتدا، واکسن‌ها و سایر پروتئین‌های دارویی در گیاهان تراریخته تولید می‌شد، با اینحال، پیشرفت‌های اخیر در زیست‌شناسی مولکولی ویروس‌های گیاهی، یک روش جایگزین با استفاده از وکتورهای مهندسی‌شده ویروسی برای انتقال و بیان پروتئین‌های دارویی ایجاد کرد. وکتورهای بیانی در ویروس‌های گیاهی مزایای زیادی برای بیان پروتئین خارجی نسبت به گیاهان تراریخته دارند. یکی از این موارد شامل، سطح بیان بیشتر در یک دوره کوتاه مدت است. حذف پروتئین‌های حرکتی و پوششی ویروس باعث محدود شدن حرکت سلول به سلول و گیاه به گیاه ویروس می‌شود و در نتیجه احتمال انتقال پروتئین‌های دارویی به سایر خویشاوندان گیاه میزبان از جمله

وکتورهای بیانی ویروسی که برای ساخت واکسن و سایر پروتئین‌ها در گیاهان استفاده شده است، عمدتاً ویروس‌های آر.ان.ای دار با سنس مثبت مانند ویروس موزایک تنباکو (tobacco mosaic virus)، ویروس X سیب زمینی (potato virus X)، ویروس موزایک خیار (cucumber virus X) و ویروس موزایک شلغم (turnip mosaic virus) هستند. جمینی‌ویروس‌ها از جمله ویروس‌هایی هستند که امروزه به عنوان وکتورهای ژنی بالقوه در نظر گرفته می‌شوند اما به دلیل محدودیت‌هایی که در اندازه‌ی ژن خارجی درج شده تحمل می‌کنند، استفاده از آن‌ها محدود است. با این حال، به تازگی جمینی‌ویروس‌ها به عنوان ناقلین بیان بسیار موثر برای تولید واکسن‌های گیاهی به کانون توجهات بسیاری از پژوهشکده‌های بیوتکنولوژی تبدیل شده است (McCormick et al. 2008).

جمینی‌ویروس‌ها

جمینی‌ویروس‌ها با ژنوم دی.ان.ای تک رشته‌ای و حلقوی، به عنوان یک ناقل برای تولید پروتئین‌های دارویی و صنعتی استفاده شده‌اند. طول ژنوم دایره‌ای در ویروس‌های تک رشته‌ای ۲/۳-۵ کیلو جفت باز است. ژنوم این ویروس رونویسی آمبی سنس یا دو طرفه دارد و ژنوم در

این خانواده به صورت یک بخشی یا دوبخشی است. هر دو نوع جمینی‌ویروس (یک بخشی یا دوبخشی)، حاوی یک منطقه‌ی بین ژنی هستند که دارای یک ساختار حلقه ساقه است و به عنوان مبدا همانندسازی در ویروس عمل می‌کند. این ویروس‌ها همچنین حاوی پیشبرهای واگرا دوطرفه هستند (Palmer et al. 2001).

تحقیقات نشان داده است که جمینی‌ویروس‌ها از یک جد مشترک به همراه سایر ویروس‌های دی.ان.ای دار کوچک، حلقوی و تک رشته‌ای مرتبط (از جمله نانوویروس‌ها (Nanoviruses)، سیرکویروس‌ها (Circoviruses) و سیکلوویروس‌ها (Cycloviruses)) سرچشمه می‌گیرند. این گروه از ویروس‌ها مجموعه متنوعی از موجودات زنده، از گیاهان و پستانداران گرفته تا پرندگان، ماهی‌ها و حشرات را آلوده می‌کنند. به عنوان مثال همولوژی فیلوژنتیکی نزدیک بین پروتئین همانندسازی (Rep) جمینی‌ویروس‌ها و برخی از فیتوباکتری‌ها منجر به این فرضیه شده است که جمینی‌ویروس‌ها از پلاسמיד فیتوباکتری‌ها در اثر واگرایی جدا شده‌اند. به همین ترتیب، بسیاری از توالی‌های فسیلی شبه Rep در طیف وسیعی از ژنوم‌های یوکاریوتی یافت شده‌اند (Hefferon et al. 2003).

"دهقانپور و صالح‌زاده، کاربرد جمینی‌ویروس‌های گیاهی در ساخت واکسن‌های گیاهی"

جمینی‌ویروس‌ها به‌عنوان ناقلین بیانی

از آنجایی که ویروس‌ها می‌توانند در سلول‌های آلوده میزبان به تعداد زیادی تکثیر و تجمع یابند، در نتیجه به میزان فوق‌العاده‌ای از ژن درج‌شده در خود را می‌توانند بیان کنند. مطالعات زیادی در رابطه با ویروس‌ها برای تولید واکسن‌ها و سایر زیست‌داروها انجام گرفته است. مطالعات اولیه شامل جایگزینی ژن ویروسی رمزکننده‌ی پروتئین پوششی (CP) با یک ژن خارجی به همراه یک ژن گزارشگر مانند *GFP* یا *GUS* بود. حذف قاب باز خواندنی پروتئین پوششی، اندازه ژنوم ویروس را همچنان حفظ کرده و همچنین توانایی کپسید شدن ویروس یا حرکت از سلول به سلول ویروسی را غیرفعال می‌کند و در نتیجه منجر به عدم آلودگی می‌شود. جمینی‌ویروس‌هایی مانند مسستری‌ویروس نوارک ذرت (*Mastreviruses*, maize streak virus) و ویروس کوتولگی گندم (wheat dwarf virus) در سطح بالایی برای بیان پروتئین‌های ژن‌های گزارشگر در سلول‌های گیاهی گزارش شده‌اند (Paprotka et al. 2011). به دنبال این نتایج اولیه، سازه‌های جدید سازمان‌یافته‌تر شده‌اند. به‌عنوان مثال، ژن رمزکننده‌ی پروتئین تکثیری (*Rep*) مربوط به ماستری‌ویروس کوتولگی زرد لوبیا

(bean yellow dwarf virus) تحت کنترل پیشبر 35S ویروس موزاییک گل‌گلم (*cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S*) و به همراه یک ژن گزارشگر در یک پلاسمید جداگانه کلون شدند. این استراتژی *Rep* را قادر به شروع همانندسازی و بیان ژن درج‌شده می‌کند. سپس این ناقل برای بیان پروتئین واکسن انتروتوکسین B باکتری/استافیلوکوکوس در سلول‌های توتون و تنباکو به کار گرفته شد و حتی به کمک پیشبر ویروس موزاییک گل‌گلم سطح بیان تا ۵۰ برابر بیشتر از حالتی بود که از پیشبر *CaMV* استفاده نشده بود (Trinks et al. 2018). از وکتورهای مبتنی بر جمینی‌ویروس کوتولگی زرد لوبیا (bean yellow dwarf virus, BeYDV) همچنین برای بیان ژن‌های گزارشگر در سطوح بالا تحت پیشبرهای تنظیمی 35S استفاده شد. نتایج حاصل از این مطالعات قابل توجه است. با استفاده از پیشبرهای القائی یا تنظیمی، همانندسازی و بیان ژن خارجی را می‌توان در صورت تمایل کنترل کرد. این امر به جلوگیری از مسمومیت ناشی از بیان بیش از حد پروتئین‌ها در گیاه کمک می‌کند و می‌تواند پروتئین مورد علاقه را فقط در بافت‌های خاص گیاه مانند بذر تجمع دهد. طراحی وکتورهای مبتنی بر جمینی‌ویروس‌ها به طرز

به این وکتورها ویژگی‌های جدیدی ارائه شده است. مانند قاب‌های بازخواندنی که پروتئین‌های سرکوب‌کننده‌ی خاموشی ژن را رمزگذاری می‌کنند یا می‌توانند چندین قاب بازخواندنی را به صورت همزمان بیان کنند. بنابراین پروتئین‌های پیچیده‌تری مانند آنتی‌بادی‌ها را می‌توانند از یک سازه واحد تولید کنند (Hanley-Bowdoin et al. 2013).

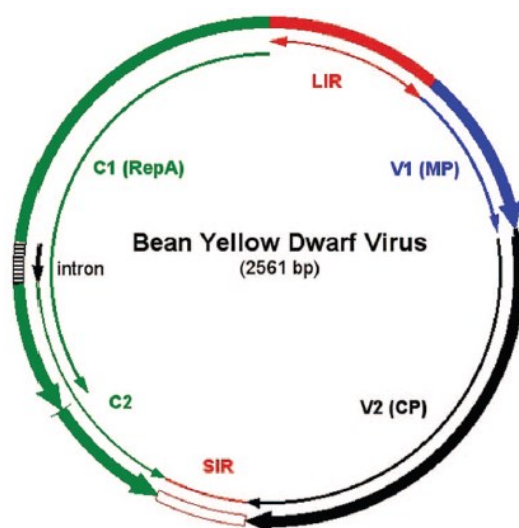
چشمگیر و با ظرفیت بالایی رشد کرده است (Hamorsky et al. 2014).

وکتورهای بیانی نسل جدید مبتنی بر

جمینی ویروس‌ها

وکتورهای مبتنی بر BeYDV

وکتورهای مبتنی بر BeYDV که امروزه تولید می‌شوند هم در طراحی و هم در انعطاف‌پذیری فیلترشده و دارای ظرفیت بالایی هستند (شکل ۱).



شکل ۱- ساختار ژنوم ویروس کوتولگی زرد لوبیا در شکل نشان داده شده است.

ژنوم دی.ان.ای تک‌رشته‌ای دایره‌ای به طول ۲۵۶۱ نانومتر با ناحیه‌ی بین ژنی بزرگ (large intergenic region, LIR) شامل یک پیشبر دوطرفه است که رونویسی دوطرفه ویروس را هدایت می‌کند. ژن‌های رشته‌ی ویریون شامل V1 (پروتئین حرکتی)، V2 (پروتئین پوششی ویروس) و ژن‌های روی رشته‌ی سنس شامل C1 به عنوان *RepA*، C1/C2 که بین آن‌ها یک ناحیه‌ی اینترون وجود دارد، رپلیکاز اصلی ویروس هستند. ویروس همچنین دارای یک ساختار ساقه و حلقه در منطقه‌ی بین ژنی است که همانندسازی ویروس از آنجا شروع می‌شود (Qiang et al. 2011).

تازه هستند. یکی از پیروزی‌های بزرگ این سیستم بیان توانایی بیان اپی‌توپ‌های متعدد و ذرات شبه

این وکتورها قادر به افزایش بازده پروتئین خارجی به اندازه یک میلی‌گرم در گرم بافت برگ

"دهقانپور و صالح‌زاده، کاربرد جمینی ویروس‌های گیاهی در ساخت واکسن‌های گیاهی"

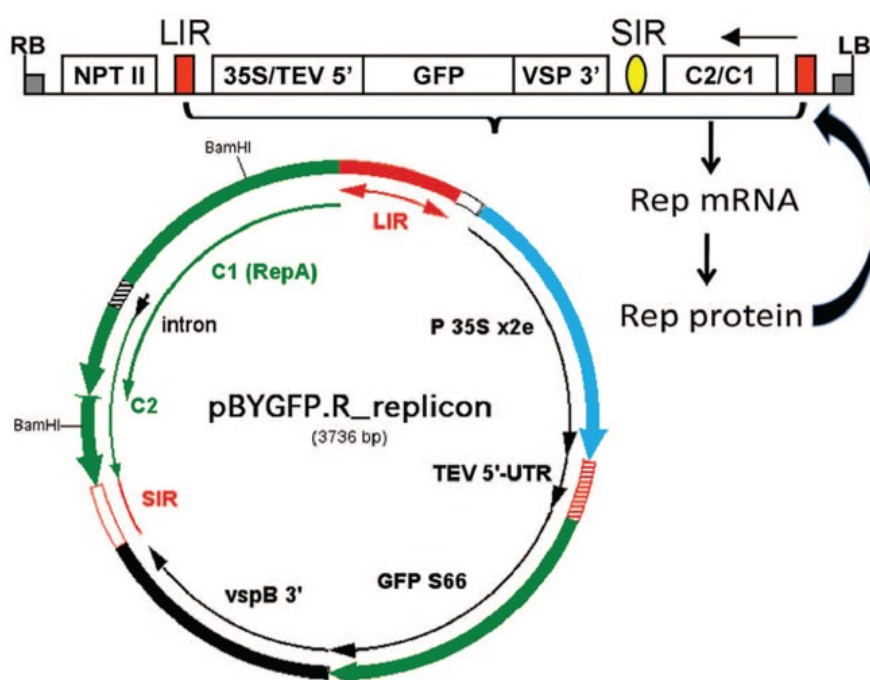
و پروتئین E ویروس نیل غربی با استفاده از همین سیستم بیانی ۰/۲۳ الی ۰/۲۷ میلی گرم در هر گرم بافت کاهو تجمع یافتند. در تمام موارد فوق، بیان این مواد بیولوژیکی ۴ روز پس از تلقیح افزایش یافت، که نشان‌دهنده‌ی ماهیت تولید سریع در این وکتور بیانی است (Leuzinger et al. 2013).

نسخه دیگری از وکتورهای بیانی BeYDV معروف به pRIC طراحی شده توسط گروه تحقیقاتی Ed Rybicki برای ساخت واکسن ویروس پاپیلومای انسانی ۱۶ (human Papillomavirus-16 (HPV-16)) بر اساس پروتئین پوششی (L1) و همچنین واکسنی برای آنتی ژن ویروس HIV-1 نوع C p24 مبتنی بر پروتئین Gag طراحی شد. برای ساخت این واکسن از سویه خفیف BeYDV استفاده شده است که از طریق یک Ti پلاسمید در سلول‌های گیاهی وارد و تکثیر می‌شود. در این حالت، تمام چارچوب‌های خواندنی مربوط به Rep بر روی رشته‌ی سیس سازه وجود دارند و ژن پروتئین پوششی و ژن مربوط به پروتئین حرکتی با یک کاست بیانی مشتق شده از pTRAc، در وکتور غیرتکثیری *A. tumefaciens* جایگزین شده‌اند (شکل ۲). در این وکتور ژن گزارشگر پروتئین فلورسنت سبز (EGFP) و همچنین آنتی ژن‌های

ویروسی جدید در گیاهان برای تعدادی از عوامل بیماری‌زای جدی است. به عنوان مثال، پروتئین پوششی ویروس نوروالسک (Norwalk virus capsid protein (NVCP)) در گیاهان با استفاده از سیستم بیانی ویروسی BeYDV می‌تواند به راحتی در طی ۴ روز پس از تلقیح، ذرات شبه ویروسی را تولید کند. نتایج مشابهی در مورد آنتی ژن هسته‌ای هپاتیت B (HbcAg) بدست آمده است. در ادامه با استفاده از این سیستم ذرات شبه ویروسی برای ساخت واکسن ویروس نیل غربی (West Nile virus) همچنین، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال برای ویروس ابولا (Ebola virus) به دست آمد (Mikhail, 2013). پروتئین‌های دارویی هم در توتون و هم در کاهو به راحتی تولید می‌شود، اما نیکوتین و ترکیبات فنولی مضر موجود در توتون نیاز به حذف قبل از تولید دارند. به عنوان مثال، NVCP در کاهو به مقدار تقریباً ۰/۲ میلی گرم در هر گرم بافت تجمع یافته است. VLP‌های به دست آمده از NVCP بسیار شبیه به آن‌هایی بود که در سلول‌های حشرات تولید می‌شوند و می‌توانند با استفاده از یک فرآیند دو مرحله‌ای به راحتی خالص شوند. علاوه بر این، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال پروتئین ویروس ابولا

۵۰ درصد برای HPV-16 افزایش دادند. بنابراین عملکرد پروتئین واکسن را افزایش داده و گامی به جلو در جهت حذف یک مانع بزرگ در داروسازی مولکولی در گیاه برداشتند (Platis et al. 2008).

مربوط به زیر واحدهای HPV و HIV را که در بالا ذکر شده است، افزایش بیان چشمگیری نشان دادند. محققین دوباره اندازه کارایی تکثیر را در *N. benthamiana* بهبود بخشیدند و بیان پروتئین را با وکتور 3 pRIC تا ۷ برابر EGFP و HIV-1 و



شکل ۲- ساختار رپلیکون BeYDV که GFP را رمزگذاری می کند.

سازه T-DNA (در بالا) که توالی آن در مرز چپ (LB) و مرز راست (RB) قرار دارد که دی.ان.ای که توسط آگروباکتریوم به سلول های گیاه منتقل شود، مشخص می کند. سازه توسط دو عنصر LIR که با بلوک های قرمز مشخص شده است قرار دارد و کاست بیان *GFP* به جای ژن V1 و V2 (شکل ۱)، بین LIR و SIR بیضی که با رنگ زرد مشخص شده است قرار می گیرد. ژن *Rep/RepA* (C1/C2) در موقعیت طبیعی خود در ژنوم BeYDV بین ناحیه ی بین ژنی کوچک و بزرگ که به ترتیب SIR و LIR نامیده می شود، قرار دارد (شکل ۱). پس از انتقال به سلول های گیاهی در هسته قرار می گیرد، در آنجا رونویسی از C1/C2 باعث تولید mRNA های رپلیکاز و ویروسی می شود که این رونوشت ها به سیتوپلاسم منتقل شده و ترجمه می شود تا پروتئین رپلیکاز تولید شود. پروتئین رپلیکاز به هسته جایی که حلقه های بنیادی LIR را در T-DNA متصل می کند وصل شده تا دی.ان.ای تک رشته را در منطقه ی بین ژنی بزرگ برش داده و سپس همانندسازی دی.ان.ای ویروسی به صورت دی.ان.ای دورشته ای آغاز می شود و رونوشت های ژن *GFP* را به وفور تولید می کند. در این بیان پیشبر 35S مربوط به ویروس CaMV که به پیشبر ویروس TEV وصل شده است میزان بیان را افزایش می دهد. در این وکتور پروتئین های سرکوبگر ویروسی (VSP) در کنار سیگنال پایان رونویسی قرار دارند (Qiang et al. 2011).

"دهقانپور و صالح‌زاده، کاربرد جمینی‌ویروس‌های گیاهی در ساخت واکسن‌های گیاهی"

وکتورهای مبتنی بر BCTV

جمینی‌ویروس دیگری که به ویروس پیچیدگی برگ چغندر قند ((beet curly top virus (BCTV)) معروف است، به‌عنوان وکتور بیانی مهندسی‌شده برای تولید واکسن طراحی شده است. در این وکتور، پیشبر ویروس موزایک رگه‌ای کاساوا ((Cassava vein mosaic virus (CsVMV)) به جای پیشبر 35S ویروس موزایک گل کلم قرار داده شده است. هنگامی که پروتئین سرکوبگر P19 فعال می‌شود، بیان ژن گزارشگر ۳۲۰ درصد در سطح آر.ان.ا. و بیان پروتئین تا ۲۴۰ درصد افزایش می‌یابد. پروتئین پوششی ویروس هپاتیت A (HAV VP1) به قطعه Fc آنتی‌بادی متصل شد و در *N. benthamiana* بیان شد. پروتئین نو ترکیب حاصل HAV VP1-Fc توسط کروماتوگرافی خالص شد و پس از تزریق صفاقی قادر به تحریک پاسخ IgG بود. همچنین نشان داده شد که سطح IFN- γ و IL-4 بر اثر واکسیناسیون افزایش می‌یابد (Chen et al. 2011).

وکتورهای مبتنی بر TYDV

Dugdale و همکاران (۲۰۱۳)، فناوری وکتورهای مبتنی بر مستری‌ویروس کوتولگی زرد توتون و تنباکو (*Mastrevirus tobacco yellow*)

(TYDV dwarf virus) را توسعه داده‌اند که پیچیدگی جدید و جالب توجهی را نسبت به وکتورهای بیان ژنی ویروسی قبلی ارائه می‌دهد. این سیستم از یک سیستم کاست دو حالت تشکیل شده است. یک کاست بیان *Rep/RepA* را تحت کنترل پیشبر *AlcA* تنظیم می‌کند. پیشبر *AlcR* و کاست بیانی دوم حاوی ژن مورد نظر درج‌شده تحت کنترل یک پیشبر القایی با اتانول است که با استفاده از اسپری اتانول فعال می‌شود. ژن موردنظر در نوعی کاست قرار می‌گیرد که به دو قسمت تقسیم می‌شود که یک اینترون مصنوعی بین آن‌ها قرار می‌گیرد. به این ترتیب، ژن موردنظر را فقط می‌توان از رپلیکون‌هایی که با جمینی‌ویروس‌ها فعال شده و با حذف اینترون‌ها بیان کرد. این توالی‌ها به نوبه خود فقط با وجود اتانول فعال می‌شوند. مقادیر زیادی از پروتئین دارویی هدف درج شده در این سیستم تولید می‌شود (۲/۵ درصد TPS) و استفاده از پیشبر القا شده توسط الکل امکان کنترل میزان بیان را به‌صورت زمانی، مکانی و وابسته به دوز فراهم می‌کند. علاوه‌براین، ثابت شده است که این سیستم با بسیاری از گونه‌های مختلف گیاهان میزبان سازگار است، و یک مزیت انتخابی نسبت به بسیاری دیگر از سیستم‌های بیان ویروس

گیاهان دارد که در حال حاضر موجود است. به عنوان مثال، پروتئین درمانی ویترونکتین (vitronectin) توسط این سیستم بیانی و با پاشیدن یک درصد اتانول به مقدار قابل توجهی تولید شده است (Dugdale et al. 2013).

سایر وکتورهای مبتنی بر جمینی ویروس‌ها و کاربردهای آن‌ها

وکتورهای بیان ژنی جمینی ویروس‌ها، با دامنه گسترده میزبانی و سهولت استفاده، علاوه بر پتانسیل خود در زمینه دارویی، برای مطالعات ژنومیک کاربردی نیز استفاده شده است. به عنوان مثال، جمینی ویروس‌ها به عنوان عوامل ویروسی خاموشی ژن (virus induced gene silencing, VIGS) مورد استفاده قرار گرفته‌اند و با کاهش تنظیم بیان ژن‌های خاص، عملکرد و فنوتیپ حاصل مشخص شده است. نمونه‌هایی از جمینی ویروس‌هایی که برای این منظور اصلاح شده‌اند، شامل ویروس پیچیدگی ساقه توتون (tobacco curly shoot virus (TbCSV)، ویروس پیچیدگی برگ کلم (cabbage leaf-curl virus (CaLCuV)، ویروس موزاییک آفریقایی کاساوا (African cassava mosaic virus (ACMV)، ویروس رگه زرد آگراتوم

(ageratum yellow vein virus (AYVV) است. وکتورهای بیانی برای ساخت واکسن بر اساس جمینی ویروس‌های دیگر نیز در دست تولید هستند. به عنوان مثال، دی.ان.ای بتاستلایت مربوط به ویروس پیچیدگی مولتان پنبه (Cotton leaf curl Multan betasatellite) نیاز به وجود ویروس کمکی (CLCuMB)) نیاز به وجود ویروس کمکی جمینی ویروس پیچیدگی برگ گوجه فرنگی (tomato leaf curl virus (ToLCV) یا ویروس پیچیدگی شدید گوجه فرنگی (beet severe curly top virus (BSCTV)) دارد. یک وکتور بیانی با جایگزینی قاب خواندنی $\beta C1$ با بخش‌هایی از پیشبر *CaMV* 35S یا پیشبر *Petunia ChsA* در این بتاستلایت مهندسی شده است. این بتاستلایت در حضور ویروس کمکی می‌تواند فعالیت ژن گزارشگر را در گیاهان تراریخته با *GUS* 35S القاء و در گیاهان غیر تراریخته گل اطلسی ژن *ChsA* که مسئول تولید رنگیزه‌های گل اطلسی است را خاموش کند (Mach. 2014).

جدول ۱ برخی پروتئین‌های مهم بیان‌شده در وکتورهای جمینی ویروس‌ها را با میزان پروتئین بیان‌شده در آن‌ها نشان می‌دهد.

"دهقانپور و صالح‌زاده، کاربرد جمینی‌ویروس‌های گیاهی در ساخت واکسن‌های گیاهی"

جدول ۱- برخی پروتئین‌های مهم بیان‌شده در وکتورهای جمینی‌ویروس‌ها

منبع	میزان بیان	وکتور ویروسی	پروتئین
Ward, et al. 1988	80 U/mg TSP	ACMV	CAT
Zhang and Mason, 2006	1.2% TSP	BeYDV	NVCP
Huang, et al. 2009	0.8 mg/g FW	BeYDV	HBcAg
Huang, et al. 2009	0.34 mg/g FW	BeYDV	NVCP
Huang, et al. 2010	0.5 mg/g FW	BeYDV dual	mAb 6D8
Regnard, et al. 2010	0.55 mg/g FW	BeYDV	HVP L1 capsid
Regnard, et al. 2010	0.003 mg/g FW	BeYDV	HIV p24

TSP: total soluble protein; FW: fresh weight

تلاش برای ساخت واکسن‌های گیاهی با استفاده از

بتاستلایت در جمینی‌ویروس‌ها

بتاستلایت مرتبط با ویروس پیچیدگی مولتان برگ پنبه یک دی.ان.ای حلقوی تک‌رشته مستقل از ژنوم ویروس و تقریباً به اندازه نیمی از اندازه دی.ان.ای ویروس کمکی است (۱۳۵۱ نوکلئوتید) و فقط یک چارچوب خوانش در رشته‌ی مکمل $\beta C1$ (۳۵۴ نوکلئوتید) دارد، که محصول پروتئینی آن یک عامل الفاکننده‌ی بیماری است (Matzeit et al. 1991). مطالعات کاربردی مختلف شیوه‌هایی را برای استفاده از بتاستلایت‌ها به‌عنوان ابزارهایی در VIGS، بیان ژن و نیز القاء مقاومت توسط جمینی‌ویروس‌ها، معرفی کرده‌اند (Pakniat-jahromi et al. 2010).

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که از CLCuMB فاقد $\beta C1$ می‌توان به‌عنوان ناقل انتقال ژن در گیاهان استفاده کرد. مایه‌زنی گیاهان مختلف با سازه‌های نوترکیب CLCuMB که در آن‌ها $\beta C1$ با ژن دیگری جایگزین شد، منجر به خاموش شدن

فعالیت‌های ژن همولوگ شد، که نشان می‌دهد از CLCuMB می‌توان به‌عنوان یک ناقل قوی برای VIGS استفاده کرد (Turnage et al. 2002). در یک پژوهش جایگزینی چارچوب خوانش $\beta C1$ در CLCuMB با بخش کوچکی از توالی پیشبر چالکون سنتاز A (مسئول تولید رنگدانه در گیاه اطلسی، chalcone synthase A) و مایه‌زنی آن با استفاده از سازه‌های عفونت‌زای بتاستلایت نوترکیب با حضور ویروس کمکی در گیاهان اطلسی سبب سرکوب ژن داخلی و کاهش رنگ گل‌های اطلسی از طریق مکانیسم خاموشی ژن شد (Kharazmi et al. 2012).

در پژوهش دیگری cDNA مربوط به لنفوسیت سلول انسانی (Bcl-2) به اندازه ۷۲۰ جفت باز در CLCuMB درج شد و در توتون و گوجه‌فرنگی در حضور جمینی‌ویروس‌های مختلف تکثیر و بیان شد که نشان داد از CLCuMB می‌توان به‌عنوان یک انتقال‌دهنده و بیان ژن‌های جانوری در گیاهان استفاده کرد (Kharazmi et al. 2016). در مطالعه

ی دیگر عطائی کچوئی و همکاران توانستند بخشی از ژن پروتئین پوششی ویروس نقص سیستم ایمنی اکتسابی انسان (HIV) را در گیاهان گوجه فرنگی و توتون با استفاده از CLCuMB فاقد چارچوب خوانش $\beta C1$ بیان کنند (Ataie et al. 2018).

محاسن و معایب واکسن های خوراکی از دید

پزشکی

تجویز واکسن های خوراکی یک روش واکسیناسیون ترجیحی ساده و بی خطر است. هزینه تولید پایین، امکان تولید محلی و حداقل پردازش و دستکاری در مواد گیاهی را فراهم می کند. کپسول سازی زیستی طبیعی، ثبات در دستگاه گوارش (GI) و ایمنی محافظ در مخاط GI از دیگر مزایای واکسن های گیاهی است. واکسن های گیاهی در مقیاس بزرگ و با هزینه ی کم تولید شده اند و هزینه پروتئین های نو ترکیب، آنزیم ها و ترکیبات دارویی، دستاوردهای قابل توجهی داشته است. در حال حاضر، ترکیبات دارویی مختلف، آنتی ژن، آنتی بادی، هورمون ها، آنزیم ها و تنظیم کننده های رشد به چندین گیاه منتقل و بیان شده اند.

یک واکسن گیاهی دارای مزایای ارزشمند بسیاری در مقایسه با واکسن های سنتی است. این مزایا شامل استفاده خوراکی از این واکسن ها به عنوان میوه و سبزی، تهیه کپسول از پودر بافت برگ خشک، عدم نیاز به هیچ ماده کمکی برای تقویت پاسخ های ایمنی، ایجاد مصونیت مخاطی در برابر مصرف خوراکی آنتی ژن ها، امکان تولید میزان فراوان واکسن، هزینه کمتر حمل و نقل و ذخیره بدون نیاز به برودت، عدم تزریق و نیاز به فرد پزشکی آموزش دیده، سهولت در بیان، تفکیک و تصفیه پروتئین، امکان ذخیره به صورت دانه و روغن و بافت خشک و بدون هیچگونه سیستم برودتی، عدم ایجاد خطر آلودگی و شیوع بیماری، احتمال انطباق و سازگاری بیشتر به ویژه در کودکان است. تولید واکسن های خوراکی بسیار مورد توجه محققان دانشگاهی و صنعتی قرار گرفته است (Huang et al. 2010).

از معایب واکسن های گیاهی می توان به عدم کنترل میزان پروتئین دارویی تولیدی در گیاه، چالش هایی در مسیر خالص سازی آن ها از گیاه، اندازه ی محدود سازه ای که در وکتورهای ویروسی می توان قرار داد و مشکلات بعدی در تست و ایمنی زائی این واکسن ها و ایجاد ایمنی مورد نظر

"دهقانپور و صالح‌زاده، کاربرد جمینی‌ویروس‌های گیاهی در ساخت واکسن‌های گیاهی"

سلولی یا خونی پس از خالص‌سازی از گیاه را نام برد (Regnard et al. 2010).

نتیجه‌گیری

وکتورهای بیانی در جمینی‌ویروس‌های گیاهی به گونه‌ای طراحی شده‌اند که به‌صورت سریع، ارزان و قوی برای تولید واکسن عمل می‌کنند. ناقلین جمینی‌ویروسی مزایای انتخابی نسبت به دیگر وکتورهای بیانی آر.ان.ای ویروس‌های گیاهی ارائه می‌دهند. به‌عنوان مثال، آن‌ها می‌توانند در طیف وسیعی از گیاهان عمل کنند و نسب به ویروس‌های آر.ان.ای دار پایداری بیشتری دارند. به نظر می‌رسد جمینی‌ویروس‌ها چندین راهکار

برای جلوگیری از خاموشی ژن توسط میزبان ایجاد کرده‌اند، مسئله‌ای که مانع بسیار بزرگی برای تولید دارو در سیستم‌های بیانی در گیاهان محسوب می‌شود. توانایی بیان چندین پروتئین به‌صورت پشت سر هم و در سطوح قابل مقایسه از یک سازه واحد می‌تواند کارایی بسیار بیشتری نسب به سایر وکتورهای ویروسی را فراهم کند. با پیشرفت تحقیق و توسعه، استفاده از وکتورهای مبتنی بر جمینی‌ویروس‌ها در ساخت ترکیبات داوریی به‌عنوان یک روش پیشرفته در تولید واکسن و سایر پروتئین‌های درمانی از گیاهان خواهند شد.

References

فهرست منابع

- Ataie Kachoie E, Behjatnia SAA, Kharazmi S. 2018.** Expression of human immuno deficiency virus type 1 (HIV-1) coat protein genes in plants using cotton leaf curl Multan betasatellite-based vector. *PLoS One*. 13: e 0190403.
- Chen Q, He J, Phoolcharoen W, Mason HS. 2011.** Geminiviral vectors based on bean yellow dwarf virus for production of vaccine antigens and monoclonal antibodies in plants. *Human Vaccin*. 7: 331–338.
- Dugdale B, Mortimer CL, Kato M, James TA, Harding RM, Dale JL. 2013.** In plant activation: An inducible, hyperexpression platform for recombinant protein production in plants. *Plant Cel*. 25: 2429–2443.
- Hanley-Bowdoin L, Settlege SB, Orozco BM, Nagar S, Robertson D. 2014.** Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Crit. Rev. Plant Science*. 18: 71–106.
- Hanley-Bowdoin L, Bejarano ER, Robertson D, Mansoor S. 2013.** Geminiviruses: Masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Natrual Review of Microbiol*. 11: 777–788.
- Hamorsky KT, Kouokam JC, Bennett LJ, Baldauf KJ, Kajiura H, Fujiyama K, Matoba N. 2014.** Rapid and scalable plant-based production of a cholera toxin B subunit variant to aid in mass vaccination against cholera outbreaks. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 7: e2046.
- Hefferon KL, Dugdale BG. 2003.** Independent expression of Rep and RepA and their roles in regulating bean yellow dwarf virus replication. *Journal of General Virology*. 84: 3465–3472.
- Huang Z, Chen Q, Hjelm B, Arntzen C, Mason HA. 2009.** DNA replicon system for rapid high-level production of virus-like particles in plants. *Biotechnology & Bioengineering*. 103: 706–714.
- Huang Z, Phoolcharoen W, Lai H, Piensook K, Cardineau G, Zeitlin L. 2010.** High-level rapid production of full-size monoclonal antibodies in plants by a single-vector DNA replicon system. *Biotechnol Bioeng*. 106: 9–17.
- Kharazmi S, Ataie Kachoie E, Behjatnia SAA. 2016.** Cotton leaf curl Multan betasatellite DNA as a tool to deliver and express the human B-cell lymphoma2 (Bcl-2) gene in plants. *Molecular Biotechnology*. 58: 362–372.
- Kharazmi S, Behjatnia SAA, Hamzehzarghani H, Niazi A. 2012.** Cotton leaf curl Multan betasatellite as a plant gene delivery vector trans-activated by taxonomically diverse geminiviruses. *Archives of Virology*. 157: 1269–1279.
- Leuzinger K, Dent M, Hurtado J, Stahnke J, Lai H, Zhou X, Chen Q. 2013.** Efficient agroinfiltration of plants for high-level transient expression of recombinant proteins. *Journal of Visualized Experiments*. 23.
- Li HY, Chye ML. 2009.** Use of GFP to investigate expression of plant-derived vaccines. *Methods in Molecular Biology*. 515: 275–285.
- Mach J. 2014.** Geminivirus vectors deliver reagents for plant genome engineering. *Plant Cell*. 26, 2.
- Makarkov AI, Golizeh M, Ruiz-Lancheros E, Gopal A, Costas-Cancelas IN, Chierzi S, Pillet S, Charland N, Landry N, Rouiller I, Wiseman PW, Ndao M, Ward BJ. 2019.** Plant-derived virus-like particle vaccines drive cross-presentation of influenza A hemagglutinin peptides by human monocyte-derived macrophages. *NPJ Vaccines*. 4, 17.
- McCormick AA, Reddy S, Reinl SJ, Cameron TI, Czerwinski DK, Vojdani F, Hanley KM, Garger SJ, White EL, Novak J. 2008.** Plant-produced idiotype vaccines for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: Safety and immunogenicity in a phase I clinical study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105, 10131–10136.
- Matzeit V, Schaefer S, Kammann M, Schalk HJ, Schell J, Gronenborn B. 1991.** Wheat dwarf virus vectors replicate and express foreign genes in cells of monocotyledonous plants. *Plant Cell*. 3: 247–58.
- Mikhail M. 2013.** Pooggin how can plant DNA viruses evade siRNA-directed DNA methylation and silencing? *Int. Journal of Molecular Science*. 14: 15233–15259.
- Monreal E, Bañuelos B, Hernández M, Fragoso G, Garate T, Sciutto E, Rosales S. 2015.** Expression of multiple *Taenia Solium Immunogens* in plant cells through a ribosomal skip mechanism. *Molecular Biotechnology*. 57: 635–643.

- Palmer KE, Rybicki EP. 2001.** Investigation of the potential of maize streak virus to act as an infectious gene vector in maize plants. *Archive of Virology*. 146: 1089–1104.
- Pakniat A, Behjatnia SAA, Karazhmi S, Shahbazi M. 2010.** Infectious clone of a new strain of tomato yellow leaf curl virus in Southern Iran. *Journal of plant Pathology*. 46: 101-115.
- Paprotka T, Deuschle K, Metzler V, Jeske H. 2011.** Conformation-selective methylation of *geminivirus* DNA. *Journal of Virology*. 85: 12001–12012.
- Platis D, Drossard J, Fischer R, Ma JK, Labrou NE. 2008.** New downstream processing strategy for the purification of monoclonal antibodies from transgenic tobacco plants. *Journal of Chromatogr.* 1211: 80–89.
- Pogrebnyak N, Golovkin M, Andrianov V, Spitsin S, Smirnov Y, Egolf R, Koprowski H. 2005.** Severe acute respiratory syndrome (SARS) S protein production in plants: Development of recombinant vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 102: 9062–9067.
- Qiang C, Junyun E, Waranyoo P, Mason HS. 2011.** Geminiviral vectors based on bean yellow dwarf virus for production of vaccine antigens and monoclonal antibodies in plants. *Human vaccine*. 7(3): 331–338.
- Raja P, Sanville BC, Buchmann RC, Bisaro DM. 2008.** Viral genome methylation as an epigenetic defense against geminiviruses *Journal of Virology*. 82: 8997–9007.
- Regnard GL, Halley-Stott RP, Tanzer FL, Hitzeroth II, Rybicki EP. 2010.** High level protein expression in plants through the use of a novel autonomously replicating geminivirus shuttle vector. *Plant Biotechnol J*. 8: 38–46.
- Sohrab SS, Suhail M, Kamal MA, Husen A, Azhar EI. 2017.** Recent development and future prospects of plant-based vaccines. *Current Drug Metabolism*. 18: 831–841.
- Turnage MA, Muangsang N, Peele CG, Robertson D. 2002.** *Geminivirus* based vectors for gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 30: 107-114
- Trinks D, Rajeswaran R, Shivaprasad PV, Akbergenov R, Oakeley EJ, Veluthambi K, Hohn T, Pooggin MM. 2018.** Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. *Journal of Virology*. 79: 2517–2527.
- Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. 2020.** Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*. 181: 281-292.
- Ward A, Etessami P, Stanley J. 1998.** Expression of a bacterial gene in plants mediated by infectious geminivirus DNA. *The EMBO Journal*. 7: 1583–1587.
- Yang X, Xie Y, Raja P, Li S, Wolf JN, Shen Q, Bisaro DM, Zhou X. 2011.** Suppression of methylation-mediated transcriptional gene silencing by β C1-SAHH protein interaction during geminivirus-beta satellite infection. *PLoS Pathog*. 7: e1002329.
- Xiao L, Lin D, Sun X, Curth U, Drosten C, Sauerhering L, Becker S, Rox K, Hilgenfeld R. 2020.** Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. *Science*. 368: 409-412.
- Zhang X, Mason H. 2006.** Bean Yellow Dwarf Virus replicons for high-level transgene expression in transgenic plants and cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 93: 271–279.

Application of Plant *Geminiviruses* in the Manufacture of Plant Based Vaccines

Saeedeh Dehghanpour Farashah¹, Mehrdad Salehzadeh^{2*}

1- Assistant Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran.

2- PhD Student of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

mehrdadsalehzadeh@gmail.com

Abstract

Plants are a safe, efficient, and inexpensive production medium through which vaccines and other therapeutic proteins can be prepared for poor and developing countries. Plant virus-based expression vector technology has quickly become one of the most popular ways to express medicinal proteins in plants. In this study, several oral vaccines prepared in the world is reviewed and then the advanced expression system based on viruses, especially *Geminiviruses* and viruses in plants to make vaccines is discussed. This review also provides an overview of the benefits of single-stranded and small-stranded DNA viruses and compares their benefits for the expression of drug proteins with other expression systems in other plant viruses. The following is a breakthrough in the design of several different viral expression vectors of mutiny, *Geminiviruses* and viruses in the world and in Iran, and examples of vaccines and other biological materials produced from each are described. Finally, the benefits and challenges of producing oral vaccines in medical science are discussed.

Keywords: Oral Vaccines, Plant Viruses, *Geminivirus*, Expression Vectors.