

Design and Expression of mGLP1-DARPin-Pen Trivalent Protein with Oral Potential for Type 2 Treatment in Tobacco Chloroplasts

Maryam Ehsasatvatan¹ and Bahram Baghban Kohnehrouz^{2,*}

1- Ph.D., Department of Plant Breeding & Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

2- Associate Professor, Department of Plant Breeding & Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

*Corresponding author ✉: bahrambaghban.kr@tabrizu.ac.ir

Citation: Ehsasatvatan, M. and Baghban Kohnehrouz, B. (2024). Design and expression of mGLP1-DARPin-Pen trivalent protein with oral potential for type 2 treatment in tobacco chloroplasts. *Plant Genetic Researches*, **10(2)**: 1-18. <http://dx.doi.org/10.22034/PGR.10.2.10>

(Received: January 12, 2024; Final Revised: February 20, 2024; Accepted: March 5, 2024; Published online: March 17, 2024)

Extended abstract

Introduction

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is characterized by progressive hyperglycemia, peripheral insulin resistance, and β -cell dysfunction. It is a chronic disease that is one of the leading causes of high mortality and morbidity rates. Therefore, the development of drugs that lower blood glucose levels in T2DM patients is crucial. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonists are increasingly being used in clinical practice for the management of type 2 diabetes mellitus. The potent glucagon-like peptide 1 (GLP-1), a natural small incretin hormone, enhances insulin secretion in a glucose-dependent manner. However, the extremely short half-life of GLP-1 and the need for its subcutaneous administration limit its clinical application. Thus, half-life extension and alternative delivery methods are highly desired. DARPin domains with a high affinity for human serum albumin (HSA) have been selected for the half-life extension of therapeutic peptides and proteins. In our previous study, we designed trivalent fusion proteins as oral candidates for long-acting GLP-1R agonists by genetically fusing a protease-resistant modified GLP-1, HSA-binding DARPin, and a Penetratin cell-penetrating peptide. The aim of this study was to develop a bioprocess for the production of long-lasting GLP-1 in tobacco chloroplasts as GLP-1 receptor agonist with potential for oral delivery in a bioencapsulated form in plant cells for the treatment of type 2 diabetes mellitus.

Materials and methods

The nucleotide sequences of the constructed fusion genes were deduced from their amino acid sequences and codon-optimized based on the codon usage of tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts. To facilitate immunogenic detection of the fusion protein, the histidine tag sequence was embedded at the 5' end of the fusion protein-encoding sequence. The final fusion protein-encoding cassette with translation control elements was subcloned into the pPRV111A plastidial vector. Transformation was performed using the particle bombardment method on tobacco leaf explants and the regeneration of transplastomic plants in selection medium containing 500 mg/l streptomycin. PCR and Southern blot analyses were used to confirm the integration of transgenes, as well as chloroplastic and cellular homoplasmy. Western blot analysis was used to assess the accumulation of the mGLP1-DARPin-Pen fusion protein in the chloroplasts of transplastomic plants. ELISA was used to estimate the fusion protein content in the leaves of the transplastomic plants.



©2023 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

Results and discussion

Tobacco chloroplasts were successfully transformed with trivalent fusion protein-coding gene using a pPRV111A chloroplastic expression vector. Homoplasmic transplastomic plants were obtained after three rounds of selection in a selection medium containing 500 mg/L spectinomycin and streptomycin. Transgene integration as well as chloroplastic and cellular homoplasmic status in transplastomic plants were confirmed by PCR and Southern blot analyses. Western blot analysis confirmed the accumulation of the mGLP1-DARPin-Pen fusion protein in the chloroplasts of the transplastomic plants. The fusion protein content estimated by ELISA was 21.8% of the total soluble protein content in the leaves of the transplastomic plants.

Conclusion

Our study aimed to express a long-lasting GLP-1R agonist as an oral candidate for type 2 diabetes treatment in tobacco chloroplasts. The expenses associated with diabetes treatment and the need for frequent subcutaneous injections of drugs are attributable to the high cost of production and purification in conventional recombinant protein production systems. By utilizing a plant expression system to produce oral analogs of medicinal peptides and proteins, the cost of production can be reduced, thereby offering an effective alternative to traditional expression and administration systems. This study presents an opportunity to develop a new biological process for the production of GLP-1-based oral drugs for the treatment of type 2 diabetes. The successful production of a functional fusion protein in tobacco chloroplast GLP-1 receptor agonist indicates that the production of functional GLP-1 in plants will facilitate the development of a low-cost, orally deliverable form of this drug as a bioencapsulated form in plant cells for the treatment of type 2 diabetes. These findings provide a promising foundation for extending the results to edible plants, such as lettuce and spinach, and for producing biological capsules containing this peptide drug with high therapeutic and economic value. Access to the mass production of any anti-diabetic molecule in plants using a plastid-based platform opens up a new area in the coming age of synthetic biology for fast and accurate assessment and examination of biopharmaceuticals or biologically active substituents. Further *in vitro* and *in vivo* confirmation of the activities observed in this study is strongly recommended, and ongoing efforts are underway in this direction.

Keywords: Chloroplast transformation, Glucagon like peptide 1, Tobacco, Transplastomic, Type 2 diabetes mellitus



طراحی و بیان پروتئین سه‌جزئی mGLP1-DARPin-Pen با پتانسیل مصرف خوراکی برای درمان دیابت نوع ۲ در کلروپلاست توتون

مریم احساسات‌وطن^۱ و بهرام باغبان کهنه‌روز^{۲*}

۱- دکتری تخصصی، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز

۲- دانشیار، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۲۲؛ تاریخ آخرین ویرایش: ۱۴۰۲/۱۲/۰۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۵؛ تاریخ انتشار برخط: ۱۴۰۲/۱۲/۲۸)

چکیده

شیوع جهانی دیابت نوع ۲ به‌طور مداوم در حال افزایش بوده و در حال حاضر هیچ درمان قطعی برای دیابت نوع ۲ وجود ندارد. پپتید شبه گلوکاگون-۱ (GLP-1) به‌عنوان یک هورمون طبیعی اینکرتینی کوچک تولید انسولین را به شیوه‌ی وابسته به گلوکز افزایش می‌دهد. با این حال، نیمه‌عمر بسیار کوتاه GLP-1 کاربرد درمانی آن را محدود می‌کند. از دارپین متصل شونده به آلبومین می‌توان برای افزایش نیمه‌عمر سرمی پروتئین‌های دارویی، پپتیدها و ترکیبات کوچک استفاده کرد. در این مطالعه، یک نسخه طولانی اثر با پتانسیل خوراکی از آگونیست گیرنده GLP-1 شامل GLP-1 مقاوم به پروتئاز، به‌صورت همجوش با دارپین متصل شونده به آلبومین و پنتراتین به‌عنوان پپتید نفوذکننده به سلول، به‌صورت کپسوله شده در کلروپلاست برای محافظت در برابر سیستم گوارش در سلول‌های گیاهی توتون بیان شد. تراریختی موفق کلروپلاست‌های توتون با ژن‌های رمزکننده پروتئین همجوشی به‌واسطه ناقل کلروپلاستی pPRV111A و با استفاده از تفنگ ژنی انجام شد. گیاهان ترانسپلاستوم هموپلاسم پس از سه دوره گزینش در محیط گزینش حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر از اسپکتینومایسین و استرپتومایسین به‌دست آمدند. درج تراژن و وضعیت هموپلاسمی در گیاهان ترانسپلاستوم توسط PCR و لکه‌گذاری سادرن تأیید گردید. آزمون لکه‌گذاری وسترن تجمع پروتئین همجوشی سه‌جزئی mGLP1-DARPin-Pen در گیاهان ترانسپلاستوم را تأیید نمود و محتوی پروتئین همجوشی تولید شده در کلروپلاست گیاهان ترانسپلاستوم با استفاده از الایزا، ۲۱/۸ درصد پروتئین محلول کل برگ برآورد شد. بیان موفق پروتئین همجوشی طراحی شده در این مطالعه نشان می‌دهد که تولید GLP-1 در گیاهان، می‌تواند یک شکل ارزان قیمت و خوراکی از این دارو را برای درمان دیابت نوع ۲ فراهم کند.

واژگان کلیدی: پپتید شبه گلوکاگون-۱، تراریختی کلروپلاستی، ترانسپلاستوم، توتون، دیابت نوع ۲

مقدمه

دیابت نوع ۲ یک بیماری شایع و یکی از علل اصلی مرگ‌ومیر در سراسر جهان است (Collaborators and Litwak et al., 2013; Årnlöv, 2020). شیوع جهانی این بیماری در سال ۲۰۲۱ حدود ۵۳۶ میلیون نفر از افراد بالغ برآورد شده است و پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۴۵، این تعداد به ۶۲۹ میلیون نفر برسد (Sun et al., 2022). علاوه بر غلظت بالای گلوکز، بیماران دیابتی، مستعد ابتلا به عوارض دیگری مانند بیماری قلبی، سکته مغزی، فشارخون بالا، نابینایی و مشکلات چشمی، نارسایی کلیه، بیماری‌های مربوط به سیستم عصبی، قطع عضو و غیره هستند. علی‌رغم پیشرفت‌های جاری در درمان دیابت، دستیابی به کنترل قند خون مطلوب اغلب دشوار بوده و هنوز تقاضای فرایندهای برای عوامل درمانی با قابلیت کاهش سطح گلوکز پلاسما و مدیریت پیشرفت بیماری وجود دارد.

یکی از گزینه‌های درمانی جدید برای درمان دیابت نوع ۲، درمان‌های مبتنی بر اینکرتین و عمدتاً با محوریت پپتید شبه گلوکاگون-۱ (GLP-1) است. پپتید GLP-1 یک هورمون طبیعی اینکرتینی کوچک است که از سلول‌های L روده باریک در پاسخ به هضم مواد غذایی ترشح می‌شود و نقش فیزیولوژیکی اصلی آن ایجاد ارتباط بین مصرف مواد مغذی با متابولیسم گلوکز از طریق شبکه‌ای از مسیرهای تنظیمی است (Mojsov, 2000). با این حال، یکی از معایب اصلی GLP-1 که کاربرد درمانی آن را محدود می‌کند، نیمه‌عمر پایین آن در شرایط فیزیولوژیکی است که به برش سریع پیوند آمیدی اسیدآمینه آلانین در موقعیت ۸ توسط آنزیم دی‌پپتیدیل پپتیداز IV (DPP-IV) و پاک‌سازی آن از طریق کلیه نسبت داده می‌شود (Eissa et al., 2021; Kieffer et al., 1995; Reed et al., 2020). از این‌رو، تحقیقات بسیاری برای شناسایی و تولید بازدارنده‌های DPP-IV (Chen et al., 2007; Kushwaha et al., 2015)، ایجاد تغییرات ساختاری در GLP-1، جستجوی آنالوگ‌های ساختاری مقاوم در برابر برش پروتئولیتیک DPP-IV (Johnson et al., 2014) و افزایش شعاع هیدرودینامیکی

آن با اتصال به پروتئین‌هایی مانند ترانسفرین (Kim et al., 2010)، آلبومین (St Onge and Miller, 2010) و پلی‌پپتیدهای شبه‌الاستین (Luginbuhl et al., 2017) انجام شده است. از سوی دیگر تجویز این دارو از طریق تزریق زیر جلدی نیز سهولت استفاده از آن را برای بیمار محدود می‌کند (Dibonaventura et al., 2010).

منطقه مخاطی روده انسان یک سطح ایده‌آل برای تحویل دارو ارائه می‌دهد. با این حال، دو چالش عمده و کلیدی که مانع از توسعه فرمولاسیون داروی پپتیدی خوراکی می‌شوند، شامل ناپایداری آن‌ها در دستگاه گوارش و توانایی محدود آن‌ها برای عبور از اپیتلیوم روده است. اگرچه از راهبرد کپسوله کردن با پلیمرهای مقاوم به اسید معده برای غلبه بر این مشکلات استفاده می‌شود، تحویل خوراکی پروتئین‌های دارویی به‌صورت کپسول زیستی در کلروپلاست و سلول‌های گیاهان نیز به‌عنوان یک رویکرد تسهیل‌کننده و مقرون‌به‌صرفه، بدون نیاز به حفظ زنجیره سرما، فرآیندهای پرهزینه خالص‌سازی و تزریق‌های مکرر معرفی شده است (Arntzen, 2015; Yusibov et al., 2023; Zarindast et al., 2011). پس از تحویل خوراکی، کپسول‌های زیستی دیواره سلولی گیاه از پروتئین‌های دارویی در برابر اسیدها و آنزیم‌های دستگاه گوارش محافظت می‌کند (Limaye et al., 2006; Xiao et al., 2016). آنزیم‌های گوارشی انسان قادر به شکستن تمام پیوندهای گلیکوزیدی در دیواره سلولی گیاه نیستند و هنگامی که سلول‌های گیاهی دست‌نخورده حاوی پروتئین‌های دارویی به روده می‌رسند، دیواره سلولی گیاه توسط میکروب‌های همزیست هضم شده و پروتئین‌های دارویی آزاد می‌شوند (Flint et al., 2012; Martens et al., 2011).

مهندسی ژنوم کلروپلاستی به‌طور عمده به‌عنوان یک رهیافت ارزشمند برای بیان ژن‌های متنوع از منابع گوناگون و همچنین ژن‌های طراحی شده و کاملاً ساختگی جهت تولید فرآورده‌های با ارزش اقتصادی بالا در حال انجام است. علاوه بر این، ماندگاری طولانی و پایداری

توتون با ژن رمزکننده پروتئین همجوشی mGLP1-DARPin-Pen از ناقل کلروپلاستی pPRV111A با شماره دسترسی U12812.1 در GenBank (Zoubenko *et al.*, 1994) استفاده شد. ناقل pPRV111A به طول ۷۲۰۰ جفت‌باز حاوی ژن شیمیر آمینوگلیکوزید ۳' - آدنیل ترانسفراز (*aadA*) (اعطاکننده مقاومت به اسپکتینومایسین / استرپتومایسین) و توالی دو ناحیه *rps12* و *rrn16* (که سبب انجام نوترکیبی هم‌تای دوگانه و درج تراژن و ژن *aadA* در بین ژن‌های *rps12* و *rrn16* کلروپلاست توتون می‌شود)، بود. پروتئین همجوشی mGLP1-DARPin-Pen با اتصال توالی تغییر یافته GLP-1 مقاوم به پروتئاز (به طول ۳۰ اسید آمینه) به دارپین متصل شونده به آلبومین (به طول ۱۲۳ اسید آمینه) برای افزایش نیمه‌عمر آن (Steiner *et al.*, 2017) و پتراتین (به طول ۱۶ اسید آمینه) به‌عنوان یک پپتید نفوذکننده به سلول (Kristensen and Nielsen, 2016) برای تسهیل عبور پروتئین همجوشی از سلول‌های اپیتلیوم روده طراحی شد. برچسب هیستیدینی جهت تسهیل تشخیص ایمونولوژیک پروتئین همجوشی طراحی شده در انتهای آمینی پروتئین همجوشی تعبیه شد. توالی نوکلئوتیدی پروتئین همجوشی با استفاده از ترجمه معکوس توالی آمینواسیدی آن بر اساس رمزهای ترجیحی کلروپلاست توتون و با محاسبه شاخص سازگاری کدون و محتوای GC، با استفاده از نرم‌افزار backtranseq (https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_backtranseq/) به دست آمد. از جایگاه‌های برش آنزیمی *XhoI* و *NcoI* به ترتیب در انتهای ۵' و ۳' توالی طراحی شده برای همسانه‌سازی ژن رمزکننده پروتئین همجوشی طراحی شده در ناقل پلاستی pPRV111A استفاده شد. توالی نوکلئوتیدی بهینه‌شده کدونی برای سنتز از طریق شرکت واسط به شرکت GenScript® کشور آمریکا ارسال و پس از سنتز در پلاسمید pBlueScript II SK(+) در جایگاه برش *EcoRV* همسانه‌سازی شد. توالی سنتز شده پس از دریافت با استفاده از آنزیم‌های برشی *XhoI* و *NcoI* در ناقل پلاستی pPRV111A برای بیان تحت راه‌انداز *rrn* توتون، ناحیه غیرترجمه‌شونده ۵' ژن ۱۰ فاز T7 و توالی

پروتئین‌های دارویی برای کاربردهای بالینی موفق این پروتئین‌ها، ضروری است. داروهای نوترکیب پروتئینی ساخته شده در کلروپلاست و ذخیره شده در سلول‌های گیاهی لیوفیلیزه، در دمای محیط پایدار بوده و در مدت بالاتری تا خوردگی صحیح و عملکرد خود را حفظ می‌کنند و در نتیجه نیاز به حفظ زنجیره سرما در طول ذخیره‌سازی و حمل‌ونقل از بین می‌رود (Ehsasatvatan and Baghban Kohnehrouz, 2023b; Ehsasatvatan and Baghban Kohnehrouz, 2023d; Su *et al.*, 2015).

گیاه توتون به دلیل قابلیت تراریختی و باززایی کارآمد و ویژگی‌های زراعی مطلوب برای تولید پروتئین‌های نوترکیب مورد توجه بوده است و به‌عنوان موفق‌ترین گیاه در تراریختی پلاستی معرفی شده است (Biemelt and Sonnewald, 2005). با اینکه در خالص‌سازی و استخراج پروتئین‌های نوترکیب گزارشی مبنی بر حضور نیکوتین در فرآورده نهایی پروتئینی دیده نشده است، در این تحقیق از رقمی با سطح آلکالوئیدی پایین برای تولید پروتئین همجوشی سه‌جزئی طراحی شده، استفاده شد. هدف این تحقیق بیان یک آنالوگ مقاوم به پروتئاز و با نیمه‌عمر بالا با پتانسیل تحویل خوراکی به‌صورت کپسوله شده در سلول‌های گیاهی برای درمان دیابت نوع ۲ بود. به این منظور پروتئین همجوشی سه‌جزئی mGLP1-DARPin-Pen شامل GLP-1 تغییر یافته مقاوم به پروتئاز، دارپین متصل شونده به آلبومین سرم انسانی برای افزایش نیمه‌عمر GLP-1 و پتراتین به‌عنوان پپتید نفوذکننده به سلول به‌صورت پروتئین همجوشی در کلروپلاست گیاه مدل توتون بیان شد. نتایج درج ژن و وضعیت هموپلاسمی گیاهان ترانسپلاستوم با استفاده از PCR و لکه‌گذاری سادرن و بیان موفق آن با استفاده از لکه‌گذاری وسترن و الایزا گزارش می‌شود.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در سال ۱۴۰۲ در آزمایشگاه مهندسی ژنتیک دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز اجرا شده است.

تهیه ناقل پلاستی حاوی ژن رمزکننده پروتئین همجوشی: در این تحقیق، به‌منظور تراریختی کلروپلاست

هر دو هفته یکبار تا ظهور گیاهچه‌های مقاوم به اسپکتینومایسین در محیط کشت انتخابی، انجام شد. به‌منظور دستیابی به هموپلاسمی، سه دوره گزینش در حضور آنتی‌بیوتیک‌های اسپکتینومایسین و استروپتومایسین انجام شد. **تأیید اولیه تراریختی با استفاده از PCR:** برای تأیید اولیه حضور تراژن و تعیین وضعیت هموپلاسمی گیاهچه‌های ترانسپلاستوم مقاوم به اسپکتینومایسین از واکنش PCR استفاده شد. به این منظور DNA کل از برگ گیاهان ترانسپلاستوم و گیاه نوع وحشی به‌عنوان شاهد منفی به‌روش CTAB (Doyle and Doyle, 1987) استخراج شد. درج تراژن در کلروپلاست توتون به روش PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن (P1/P2) طبق برنامه دمایی واسرشته‌سازی اولیه در دمای 94°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل دمای 94°C به مدت ۱ دقیقه، 52°C به مدت ۵۰ ثانیه و 72°C به مدت ۱ دقیقه و بسط نهایی در دمای 72°C به مدت ۷ دقیقه تأیید شد. برای تأیید درج کاست ژنی در ناحیه صحیح آن در ژنوم کلروپلاست (بین ژن‌های *rps7/12* و *16S rDNA*) از آغازگر طراحی شده از ژنوم کلروپلاست در بالادست و نزدیک به ناحیه نوترکیبی به‌عنوان آغازگر رفت و از آغازگر طراحی شده از ژن *aadA* به‌عنوان آغازگر برگشت (P3/P5) طبق برنامه دمایی واسرشته‌سازی اولیه در دمای 94°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل دمای 94°C به مدت ۱ دقیقه و 57°C به مدت ۱ دقیقه و بسط نهایی در دمای 72°C به مدت ۱۰ دقیقه استفاده گردید. برای تأیید درج یکپارچه کاست ژنی در گیاهان ترانسپلاستوم از آغازگرهای طراحی شده از ژنوم کلروپلاست در نواحی جناحین ناحیه درج کاست ژنی طبق برنامه دمایی واسرشته‌سازی اولیه در دمای 94°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل دمای 94°C به مدت ۱ دقیقه، 58°C به مدت ۱ دقیقه و 72°C به مدت ۳ دقیقه و بسط نهایی در دمای 72°C به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد (P3/P4). مشخصات آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق در جدول ۱ ارائه شده است. این آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Oligo نسخه ۷ طراحی شده و توسط شرکت GenScript® سنتز گردیدند.

خاتمه‌دهنده *rrnB* باکتری *E. coli* (Ehsasatvatan et al., 2022b) زیرهمسانه‌سازی شد. ناقل پلاستییدی pPRV111A دارای ژن باکتریایی مقاومت به آمپی‌سیلین است، بنابراین کلونی‌های نوترکیب در محیط کشت حاوی 100 mg/l آمپی‌سیلین گزینش شده و پس از تأیید جهت استخراج پلاسمید به‌منظور تراریختی کلروپلاست توتون استفاده شدند. **مواد گیاهی:** در این تحقیق، از گیاه توتون *Nicotiana tabacum* رقم Pereg R.2-234 (مرکز تحقیقات توتون تیرتاش، مازندران) برای تراریختی استفاده شد. برای تهیه گیاهچه‌های استریل، بذره‌های توتون به مدت ۲ دقیقه با اتانول ۷۰ درصد و سپس ۱۵ دقیقه با محلول ۲۰ درصد (v/v) هیپوکلریت سدیم تجاری (حاوی ۵ درصد کلر فعال) همراه با دو قطره توتین ضد عفونی شدند. پس از ۵ بار شستشو با آب مقطر استریل هرکدام به مدت ۵ دقیقه، بذره‌های ضد عفونی شده در محیط کشت MS با نصف غلظت نمک‌ها، همراه با ویتامین‌های B5، 100 mg/l میواینوزیتول، ۰/۷ درصد آگار و ۳ درصد ساکارز کشت شدند. تمام کشت‌ها در اتاقک رشد تحت شرایط کنترل شده با تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با میزان نور $160\ \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ و دمای $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ نگهداری شدند. از ریزنمونه‌های برگ گیاهچه‌های ۶ تا ۸ هفته‌ای در فرآیند تراریختی استفاده گردید.

انتقال ژن به کلروپلاست توتون: انتقال ژن با استفاده از تفنگ ژنی (PDS-1000/He Bio-Rad, USA) و بر اساس پارامترهای بهینه انتقال ژن به کلروپلاست توتون و با ذرات تنگستن با قطر ۰/۷ میکرومتر، ۱ میکروگرم DNA به ازای هر شلیک، فشار هلیوم شتاب‌دهنده 1100 psi و فاصله شلیک ۶ سانتی‌متری انجام شد (Ehsasatvatan et al., 2022a). ۴۸ ساعت پس از شلیک به ریزنمونه‌های برگ گیاه توتون، ریزنمونه‌ها به قطعات کوچک‌تر تقسیم شده و در محیط گزینش‌گر شامل محیط RMOP (Svab et al., 1990)، حاوی 500 mg/l اسپکتینومایسین در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و در دمای 25°C نگهداری شدند. واکنش ریزنمونه‌ها در محیط کشت تازه

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده برای تأیید اولیه درج ژن و وضعیت هموپلاسمی

Table 1. Sequences of the primers used for primary confirmation of gene integration and homoplasmy

نام آغازگر Primer name	توالی ۵'-۳' Sequence (5'-3')	Tm (°C)	طول قطعه تکثیر Amplicon size
P1	CAGCAATATCTTCATGTCC	51	433 bp
P2	GCTCAAGAATTATTGCTTGG	54	
P3	AACTAAACACGAGGGTTGC	55	4.2 kb
P4	AGTATTAGTTAGTGATCCCGAC	53	
P5	AAGAATTTGTCCACTACGTGA	53	1.8 kb

برای انجام آزمون لکه‌گذاری وسترن، نمونه‌های پروتئین استخراج شده پس از ترکیب با بافر نمونه (۲X) و قرار دادن در دمای °C ۹۵ به مدت ۵ دقیقه، روی ژل پلی‌اکریلامید ۱۲ درصد و مطابق با روش لاملی (Laemmli, 1979) تفکیک شدند. انتقال پروتئین از ژل به غشاء PVDF طبق شیوه‌نامه Bio-Rad و به وسیله دستگاه Mini transblot (Bio-Rad) به مدت ۱ ساعت و در دمای °C ۴ با ولتاژ ۱۰۰ انجام شد. تشخیص ایمونولوژیکی پروتئین همجوشی سه‌جزئی متصل به برچسب هیستیدینی با استفاده از آنتی‌بادی خرگوشی علیه برچسب هیستیدینی به‌عنوان آنتی‌بادی اولیه و آنتی‌بادی بزی ضدخرگوش متصل به HRP به‌عنوان آنتی‌بادی ثانویه با استفاده از شیوه‌نامه Bio-Rad صورت گرفت.

آزمون الایزا برای بررسی میزان تجمع پروتئین: بررسی کمی و تعیین محتوی پروتئین همجوشی سه‌جزئی در برگ گیاهان ترانسپلاستوم با استفاده از آزمون الایزا انجام شد. به این منظور، ۵۰ نانوگرم از پروتئین محلول برگ از گیاهان ترانسپلاستوم و گیاه نوع وحشی در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه الایزا ریخته شد و پلیت به مدت یک‌شب در دمای °C ۴ نگهداری شد. مکان‌های اتصال غیراختصاصی با اضافه کردن ۲۰۰ µl محلول بلوکه کننده (PBS حاوی ۰/۱ درصد توئین ۲۰ و ۱ درصد BSA) به هر چاهک و نگهداری به مدت ۲ ساعت در دمای °C ۳۷ مسدود شد. ۱۰۰ µl از محلول آنتی‌بادی خرگوشی علیه برچسب هیستیدینی رقیق شده در بافر بلوکه کننده (۱:۱۰۰۰) به‌عنوان آنتی‌بادی اولیه و سپس ۱۰۰ µl از محلول آنتی‌بادی بزی ضدخرگوش متصل به HRP رقیق شده در بافر بلوکه کننده (۱:۱۰۰۰۰) به‌عنوان آنتی‌بادی ثانویه به هر چاهک اضافه شد. در هر مرحله پلیت به مدت ۲ ساعت در دمای °C ۳۷ قرار گرفت و پس از هر مرحله، سه مرتبه شستشوی پلیت با ۲۰۰ µl

آزمون لکه‌گذاری سادرن: وضعیت هموپلاسمی گیاهان ترانسپلاستوم و همچنین یکپارچگی کاست درج شده در ژنوم کلروپلاست این گیاهان با استفاده از آزمون لکه‌گذاری سادرن تعیین شد. به این منظور، ۲ تا ۳ میکروگرم از DNA کل گیاهان ترانسپلاستوم و گیاه نوع وحشی با استفاده از آنزیم برشی *Bg/III* هضم شد. سپس DNA هضم شده به وسیله الکتروفورز با ولتاژ ۵۰ به مدت ۶ ساعت روی ژل آگارز ۰/۸ درصد تفکیک شد. انتقال DNA از ژل به غشاء نایلونی با بار مثبت به روش کاپیلاری انجام گردید. برای نشان‌دار کردن کاوشگر تهیه شده از ژن *16S rRNA* ژنوم کلروپلاست از سیستم غیررادیواکتیو DIG مطابق با شیوه‌نامه کیت PCR DIG probe synthesis kit (Roche) استفاده شد. دورگه‌سازی، مراحل شستشو و تشخیص سیگنال‌ها بر اساس شیوه‌نامه کیت DIG DNA Labeling and Detection (Roche) در دستگاه آون هیبریداسیون با دمای هیبریداسیون °C ۶۵ انجام شد. از DNA کل گیاه نوع وحشی به‌عنوان شاهد منفی استفاده گردید.

استخراج پروتئین و لکه‌گذاری وسترن: پروتئین کل محلول از برگ گیاهان ترانسپلاستوم و گیاه نوع وحشی برای استفاده از آزمون لکه‌گذاری وسترن و الایزا استخراج شد. به این منظور، ۱۰۰ میلی‌گرم از برگ تازه گیاهان ترانسپلاستوم و گیاه نوع وحشی توتون با استفاده از نیتروژن مایع پودر شده و با ۵۰۰ µl از بافر استخراج پروتئین سرد (۱X PBS با pH: ۷/۴، ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl و مخلوط مهارکننده پروتئاز ۱X) ترکیب و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای °C ۴ ورتکس شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای °C ۴ و ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی حاوی پروتئین کل محلول برگ جهت استفاده در مراحل بعد در دمای °C ۲۰- نگهداری شد. غلظت پروتئین استخراج شده به روش برادفورد تعیین شد (Bradford, 1976).

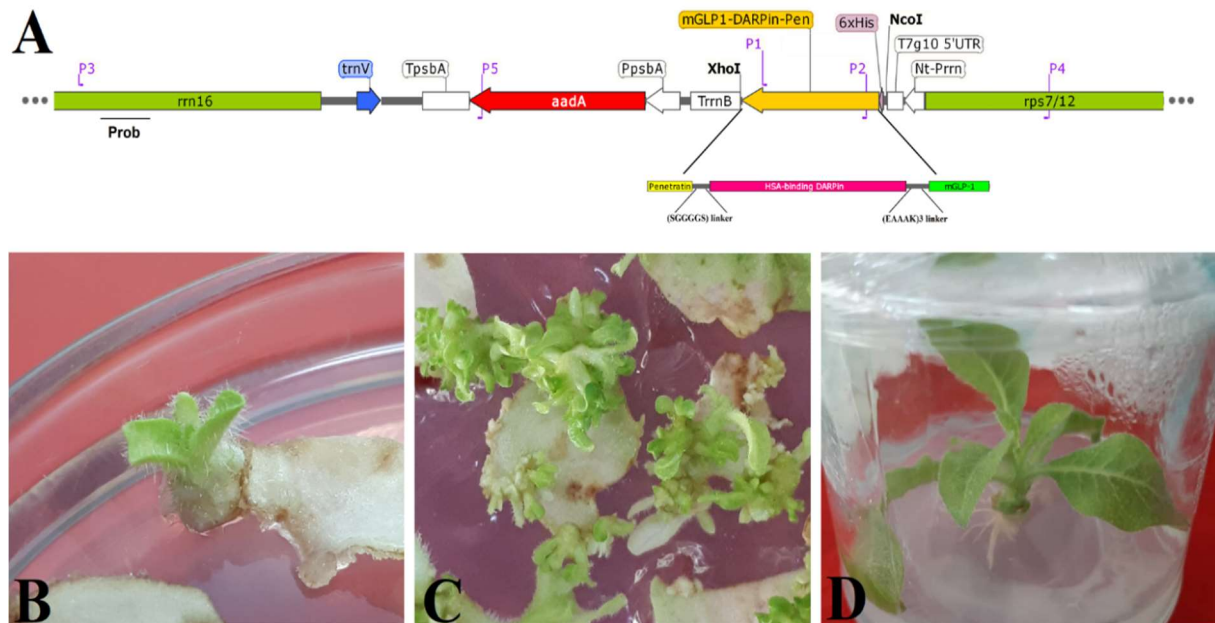
محلول شستشوی PBS-T (PBS حاوی ۰/۱ درصد توئین ۲۰) انجام شد. ۱۰۰ μ l از محلول سوبسترای TMB پراکسیداز (۲۰۰ میلی مولار بافر سیترات با pH: ۳/۹۵، ۱ درصد TMB و ۰/۰۱ درصد H_2O_2) به هر چاهک اضافه و پلیت تا زمان تشکیل رنگ در دمای محیط و تاریکی نگهداری شد. با اضافه کردن ۱۰۰ μ l اسید سولفوریک ۲ مولار به هر چاهک واکنش تشکیل رنگ متوقف و جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. این آزمایش ۲ بار و هر بار در ۳ تکرار انجام شد.

نتایج و بحث

طراحی و ساخت سازه بیانی کلروپلاستی: توالی نوکلئوتیدی بهینه‌شده پروتئین همجوشی سه جزئی mGLP1-DARPin-Pen به طول ۵۸۸ جفت‌باز در ناقل پلاستیدی pPRV111A همسانه‌سازی شد. پس از بهینه‌سازی کدونی، میزان GC در حدود ۴۴/۲۳ درصد و در محدوده قابل قبول (۳۰ تا ۷۰ درصد) و شاخص سازگاری کدونی نیز ۰/۹ و در محدوده قابل قبول (۰/۸ تا ۱) بود. پروتئین همجوشی سه جزئی طراحی شده شامل یک توالی تغییر یافته از GLP-1 حاوی جایگزینی اسید آمینه آلانین در موقعیت ۸ با گلايسین برای ایجاد مقاومت در برابر دی‌پپتیدیل ترانسفراز IV و جایگزینی اسید آمینه لیزین در موقعیت‌های ۲۶ و ۳۴ به ترتیب با اسیدهای آمینه گلوتامین و آسپارتیک اسید برای ایجاد مقاومت در برابر تریپسین بود (Xu et al., 2017). از آنجایی که انتهای آزاد آمینی GLP-1 برای فعالیت بیولوژیکی و انتهای آزاد کربوکسیلی پتراتین به‌عنوان پپتید نفوذکننده به سلول جهت تسهیل ورود پروتئین همجوشی از طریق سلول‌های اپیتلیوم روده برای عملکرد آن ضروری است، پروتئین همجوشی به گونه‌ای طراحی شد که دارپین متصل شونده به آلبومین انسانی به‌واسطه لینکر سخت (EAAAK)₃ به انتهای کربوکسیلی GLP-1 و توالی پتراتین به‌واسطه لینکر انعطاف‌پذیر (SGGGGS) به انتهای کربوکسیلی دارپین متصل شد (Ehsasatvatan and Baghban Kohnhrouz, 2023a; Ehsasatvatan and Kohnhrouz, 2023c; Ehsasatvatan and Kohnhrouz, 2024). توالی رمزکننده پروتئین همجوشی با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده

بالای پروتئین همجوشی در کلروپلاست توتون می‌باشند.

تولید گیاهان ترانسپلاستوم بیان‌کننده mGLP1-DARPin-Pen: ۳۵ تا ۴۰ روز پس از شلیک ناقل کلروپلاستی حاوی ژن رمزکننده پروتئین همجوشی سه جزئی mGLP1-DARPin-Pen، گیاهچه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در محیط گزینش حاوی ۵۰۰ mg/L اسپکتینومایسین/استرپتومایسین، ۱ mg/L BAP و ۰/۱ mg/L NAA باز زاشدند (شکل ۱B). پس از سه دوره باززایی و گزینش گیاهچه‌های مقاوم در محیط گزینش، گیاهچه‌های ۵ تا ۱۰ میلی‌متری از ریزنمونه‌های برگ‌ی جدا و برای رشد بیشتر به محیط جدید بدون تنظیم‌کننده‌های رشد منتقل شدند (شکل ۱C). پس از رشد مطلوب و دو هفته بعد از انتقال به محیط ریشه‌زایی شامل محیط RMOP بدون تنظیم‌کننده‌های رشد، گیاهچه‌های مقاوم به اسپکتینومایسین/استرپتومایسین ریشه‌های طبیعی تولید نمودند (شکل ۱D). سازگاری گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به شرایط محیطی غیراستریل در مدت بیست روز با موفقیت انجام شد. گیاهان سازگار شده در کلیه مراحل رشد و نمو رویشی و زایشی در مقایسه با گیاهان شاهد، تغییرات مورفولوژیکی و فنوتیپی نشان ندادند و همسانی فنوتیپی در مراحل رشد رویشی و زایشی اثبات گردید. با توجه به هموژن بودن گیاهان ترانسپلاستوم تجزیه و تحلیل مولکولی روی تعداد معینی (۲ تا ۳ گیاه) از گیاهان ترانسپلاستوم انجام شد.



شکل ۱- A) نقشه فیزیکی ناقل پلاستییدی حاوی ژن پروتئین همجوشی سه‌جزئی mGLP1-DARPin-Pen همراه با جایگاه‌های برش آنزیمی مورد استفاده برای همسانه‌سازی. *rps7/12*: توالی رمزکننده پروتئین ریبوزومی S12/7؛ Nt-Prm: توالی راه‌انداز ژن *rrn* توتون؛ T7g10 5'UTR: ناحیه غیرترجمه‌شونده 5' ژن 10 فاژ T7؛ 6x His: توالی ۶ آمینواسیدی برجسب هیستیدینی؛ mGLP1-DARPin-Pen: توالی رمزکننده ژن پروتئین همجوشی mGLP1-DARPin-Pen؛ *rrnB*: توالی خاتمه‌دهنده ژن *rrnB* باکتری *E. coli*؛ PpsbA: توالی راه‌انداز ژن *psbA*؛ *aadA*: توالی رمزکننده ژن آمینوگلیکوزید ۳'-آدنیلیل ترانسفراز اعطاکننده مقاومت به اسپکتینومایسین/استریتومایسین؛ TpsbA: توالی خاتمه‌دهنده ژن *psbA*؛ *rrn16*: توالی رمزکننده RNA ریبوزومی 16S پلاستییدی؛ P1 تا P5: مکان اتصال آغازگرهای مورد استفاده و prob جایگاه کاوشگر مورد استفاده در لکه‌گذاری سادرن را نشان می‌دهند. B) ظهور و رشد گیاهچه سبز و مقاوم در محیط RMOP حاوی 500 mg/l اسپکتینومایسین/استریتومایسین ۳۵ روز پس از شلیک، C) گیاهچه‌های مقاوم حاصل از دور سوم باززایی در محیط RMOP حاوی 500 mg/l اسپکتینومایسین/استریتومایسین، D) گیاه ترانسپلاستوم ریشه‌دار شده در محیط RMOP حاوی 500 mg/l اسپکتینومایسین/استریتومایسین.

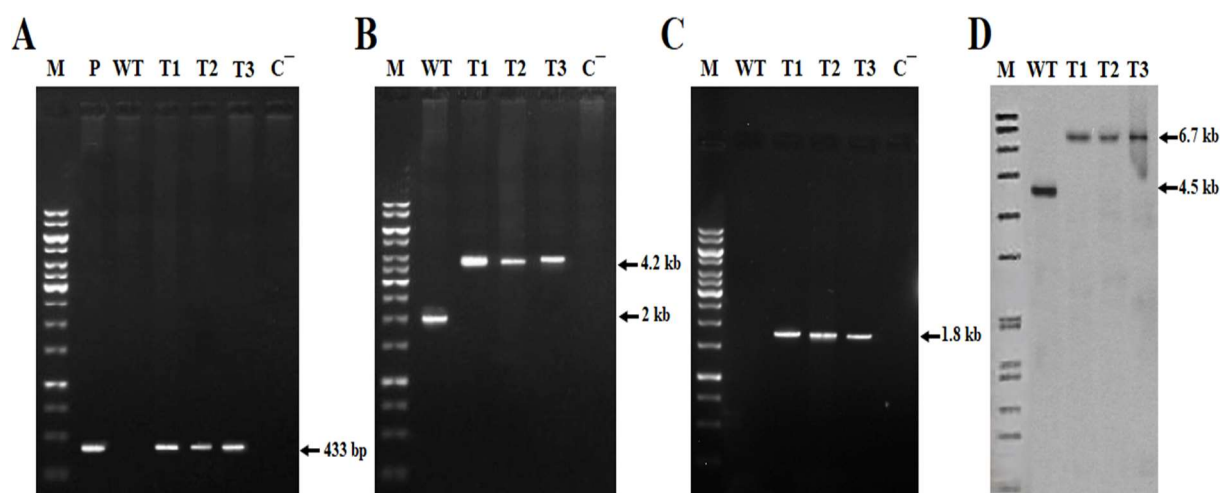
Figure 1. A) Physical map of the plastidial vector containing the mGLP1-DARPin-Pen trivalent fusion protein gene, along with the restriction site used in cloning. *rps7/12*: ribosomal S12/7 protein encoding sequence, Nt-Prm: ribosomal RNA operon promoter from tobacco; T7g10 5' UTR: 5' untranslated region of bacteriophage T7 gene 10; 6x His: histidine tag sequence, mGLP1-DARPin-Pen: coding sequence of mGLP1-DARPin-Pen fusion protein, TrnB: *rrnB* 3' untranslated region from *E. coli*; PpsbA: promoter and 5' UTR of *psbA* gene; *aadA*: aminoglycoside 3'-adenylyltransferase gene; TpsbA: terminator of *psbA* gene. *rrn16*: plastidial 16s rRNA encoding sequence, P1-P5: annealing sites of primers used, prob: site of designed prob. B) The appearance and growth of the green and resistant seedlings on RMOP medium containing 500 mg/l spectinomycin 35 days after shooting. C) resistant seedlings obtained from the third round of regeneration on RMOP medium containing 500 mg/l streptomycin /spectinomycin, D) rooted transplastomic plants in MS medium containing 500 mg/l streptomycin/spectinomycin 3 months after shooting.

حالی‌که در گیاه نوع وحشی تکثیر می‌شود که نشان از عدم حضور ژن مذکور در ژنوم آن است (شکل ۲A). از یک جفت آغازگر طراحی شده از ژنوم کلروپلاست در نواحی نزدیک به ناحیه درج کاست ژنی (P3/P4) برای تأیید حضور یکپارچه و کامل کاست بیانی در ژنوم کلروپلاست گیاهان ترانسپلاستوم استفاده شد. در گیاهان

تأیید درج ژن و وضعیت هموپلاسمی: حضور ژن رمزکننده پروتئین همجوشی mGLP1-DARPin-Pen با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده از تراژن تأیید شد (جدول ۱). گیاهان ترانسپلاستوم قطعه‌ای با اندازه 433 bp و هم‌اندازه با قطعه تکثیر شده از پلاسמיד مورد استفاده در تراریختی به‌عنوان شاهد مثبت تکثیر کردند، در

برای تأیید دقیق مولکولی درج کامل کاست بیانی کلروپلاستی در ژنوم کلروپلاست و هموپلاسمی صد درصدی گیاهان ترانسپلاستوم توتون از آزمون لکه‌گذاری سادرن استفاده شد. با استفاده از کاوشگر تهیه شده از ناحیه *rrn16* ژنوم کلروپلاست توتون و DNA کل سلولی هضم شده با *BglIII* در گیاهان ترانسپلاستوم قطعه‌ای با اندازه kb ۶/۷ مشاهده شد، در صورتی که در گیاه شاهد قطعه‌ای با اندازه kb ۴/۵ مشاهده گردید که نشان‌دهنده عدم حضور کاست بیانی در ژنوم کلروپلاست این گیاهان است (شکل ۲D). عدم مشاهده قطعه kb ۴/۵ در گیاهان ترانسپلاستوم تأیید کننده هموپلاسمی صد درصدی این گیاهان است.

ترانسپلاستوم، قطعه‌ای با اندازه تقریبی kb ۴/۲ تکثیر شد، در حالی که در گیاه نوع وحشی فقط یک قطعه DNA با اندازه تقریبی kb ۲ تکثیر شد و عدم وجود قطعه kb ۲ در گیاهان ترانسپلاستوم تأیید اولیه‌ای بر هموپلاسمی این گیاهان می‌باشد (شکل ۲B). در واکنش‌های PCR با استفاده از آغازگرهای طراحی شده از ژنوم کلروپلاست در ناحیه نزدیک به ناحیه درج کاست ژنی به‌عنوان آغازگر رفت (P3) و آغازگر طراحی شده از ژن *aada* به‌عنوان آغازگر برگشت (P5) در تمام گیاهان ترانسپلاستوم قطعه‌ای با اندازه تقریبی kb ۱/۸ تکثیر شد، در حالی که گیاهان شاهد قادر به تولید هیچ قطعه DNA با این جفت آغازگر نبودند (شکل ۲C).

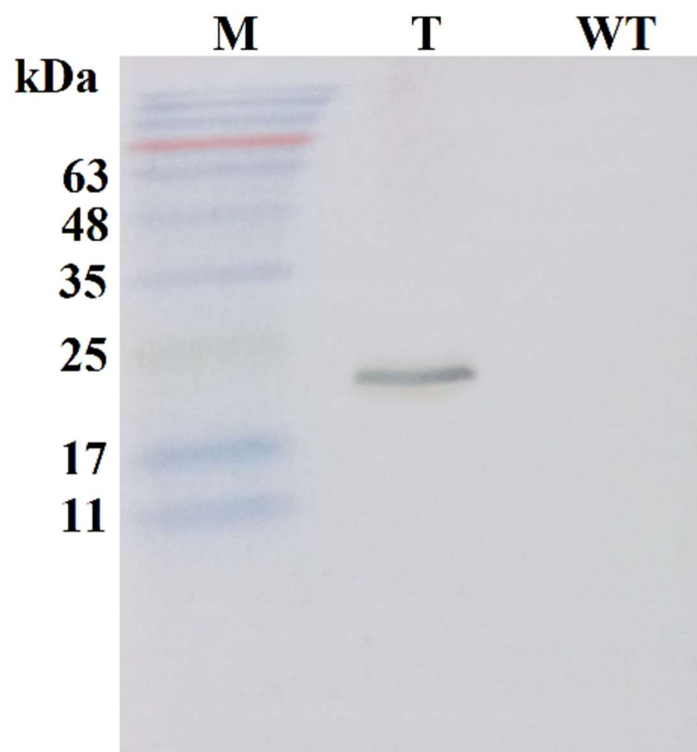


شکل ۲- آنالیزهای مولکولی گیاهان ترانسپلاستوم، (A) تکثیر PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن پروتئین همجوشی، (B) تکثیر PCR با استفاده از آغازگرهای طراحی شده از ژنوم کلروپلاست در نواحی دو طرف ناحیه درج کاست ژنی، (C) تکثیر PCR با استفاده از آغازگر رفت از ژنوم کلروپلاست نزدیک به ناحیه درج کاست ژنی و آغازگر برگشت از ژن *aada*. M: نشانگر وزن مولکولی 1 kb DNA Ladder (Fermentas)، P: پلاسمید نوترکیب استفاده شده در تراریختی، WT: گیاهان نوع وحشی، T1، T2 و T3: گیاهان ترانسپلاستوم، C⁻: واکنش بدون DNA به‌عنوان شاهد منفی. (D) آزمون لکه‌گذاری سادرن گیاهان ترانسپلاستوم توتون. M: نشانگر وزن مولکولی VII نشان‌دار شده با DIG (Roche)، WT: گیاه توتون نوع وحشی، T1، T2 و T3: گیاهان ترانسپلاستوم.

Figure 2. Molecular analysis of transplastomic plants: A) PCR amplification using fusion protein-specific primers, B) PCR amplification with flanking sequence primers, C) PCR amplification using a forward primer from the chloroplast genome near the insertion site of the gene cassette and reverse primer from the *aadA* gene. M: 1 kb DNA Ladder (Fermentas) molecular weight marker; P: recombinant vector used in transgenesis; WT: non-transgenic tobacco plants as control; T1, T2, and T3: Transplastomic plants; C⁻: DNA-free reaction as a negative control. D) Southern blotting of transplastomic tobacco plants; M: DIG-labeled molecular marker VII; WT: wild-type tobacco plant; T1, T2, and T3: Transplastomic plants.

با استفاده از آزمون الایزا میزان تجمع پروتئین همجوشی mGLP1-DARPin-Pen در برگ گیاهان ترانسپلاستوم توتون تعیین شد. تجمع پروتئین در برگ گیاهان ترانسپلاستوم به صورت درصد پروتئین mGLP1-DARPin-Pen در پروتئین کل محلول برگ در ۳ تکرار محاسبه شد. محتوی پروتئین همجوشی mGLP1-DARPin-Pen در گیاهان ترانسپلاستوم ۲۱/۸ درصد از پروتئین کل محلول برگ و معادل با ۳/۶ mg/g وزن تر برگ برآورد شد. طبق انتظار، عدم مشاهده سیگنال در آزمون الایزا گیاه نوع وحشی نشان‌دهنده عدم وجود پروتئین همجوشی mGLP1-DARPin-Pen در این گیاهان است.

تجمع و بیان پروتئین همجوشی mGLP1-DARPin-Pen در گیاهان ترانسپلاستوم: بیان و تجمع پروتئین همجوشی mGLP1-DARPin-Pen در برگ گیاهان ترانسپلاستوم توتون توسط آزمون لکه‌گذاری وسترن و آزمون الایزا با استفاده از پروتئین کل محلول برگ بررسی شد. آزمون لکه‌گذاری وسترن با استفاده از آنتی‌بادی علیه برچسب هیستدینی نوار مورد انتظار با اندازه تقریبی ۲۲ کیلودالتون مربوط به پروتئین همجوشی mGLP1-DARPin-Pen را در نمونه‌های مربوط به پروتئین کل محلول برگ گیاهان ترانسپلاستوم توتون نشان داد. نوار متناظر در گیاه نوع وحشی مشاهده نشد که نشان‌دهنده عدم وجود پروتئین هدف در این گیاهان است (شکل ۳).



شکل ۳- بیان و تجمع پروتئین همجوشی mGLP1-DARPin-Pen در گیاهان ترانسپلاستوم توتون با استفاده از پروتئین محلول کل برگ با استفاده از آنالیز لکه‌گذاری وسترن، M: نشانگر پروتئینی (Pre-stained Protein Ladder (PR911654, Sinaclone)، T: گیاه ترانسپلاستوم بیان‌کننده mGLP1-DARPin-Pen: گیاه توتون نوع وحشی. نوار حدود ۲۲ kDa پروتئین همجوشی mGLP1-DARPin-Pen را نشان می‌دهد.

Figure 3. Expression and accumulation of the mGLP1-DARPin-Pen fusion protein in tobacco transplastomic plants using Western blot analysis, M: pre-stained molecular mass markers (PR911654, Sinaclone), T: transplastomic tobacco plant, WT: wild-type tobacco plant. The corresponding band of 22 kDa indicates the DARPin G3 protein.

در تحقیق حاضر، بیان یک آگونیست جدید گیرنده GLP-1 طولانی اثر با پتانسیل تحویل خوراکی در درمان دیابت نوع ۲ در کلروپلاست گیاه توتون گزارش می‌شود. پروتئین طراحی شده سه جزئی شامل یک GLP-1 تغییر یافته حاوی جایگزینی آمینواسیدی برای ایجاد مقاومت در برابر برخی از پروتئازها، یک دارپین متصل شونده به آلبومین سرم انسانی برای افزایش نیمه عمر GLP-1 در پلاسما و پتراتین به عنوان یک پپتید نفوذکننده به سلول برای تسهیل عبور پروتئین همجوشی از سلول‌های اپیتلیوم روده است. بیان موفق و با سطوح نسبتاً بالای پروتئین همجوشی mGLP1-DARPin-Pen در کلروپلاست گیاه توتون با استفاده از ناقل کلروپلاستی pPRV111A و کاست بیانی حاوی عناصر تنظیمی بهینه شده به دست آمد. سنجش‌های تشخیصی ایمونولوژیک با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی علیه برجسب هیستیدینی، بیان و تجمع پروتئین همجوشی mGLP1-DARPin-Pen را در کلروپلاست توتون ترانسپلاستوم نشان داد. بر این اساس میزان تجمع mGLP1-DARPin-Pen به میزان ۲۱/۸ درصد از پروتئین محلول کل سلولی تخمین زده شد.

امروزه، درمان‌های مبتنی بر GLP-1 به طور فزاینده‌ای توجه ویژه‌ای را برای درمان دیابت نوع ۲ به خود جلب کرده‌اند. با این حال، نیمه عمر پایین GLP-1 در شرایط فیزیولوژیکی، کاربرد درمانی آن را محدود کرده و منجر به تلاش‌های بسیاری برای رفع این محدودیت و تولید پپتیدهای طولانی اثر شده است (Eissa et al., 2021; Reed et al., 2020). به این منظور، انواع جایگزینی در انتهای آمینی GLP-1، به ویژه اسید آمینه آلانین در موقعیت ۸ انجام شده و واکنش با گیرنده و پایداری متابولیک آن‌ها مورد بررسی قرار گرفته است. اگزندین-۴ به عنوان یک آگونیست گیرنده GLP-1 دارای گلایسین به جای آلانین در موقعیت ۸ است و مقاومت فوق‌العاده‌ای در برابر DPP-IV ارائه می‌دهد (Thum et al., 2002). لیراگلو تید حاوی یک زنجیره پالمیتویل در لیزین ۲۶ از طریق فاصله‌انداز ۷-گلو تامیل و جایگزینی اسید آمینه آرژنین در موقعیت ۳۴ است

علاوه بر این، نیمه عمر GLP-1 را می‌توان از طریق اتصال به پذیرنده‌های Fc جنینی (FcRn) و یا آلبومین سرم انسانی (HSA) که منجر به افزایش حجم هیدرودینامیکی پپتید و پاک‌سازی کلیوی کندتر می‌شود به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش داد (Kontermann, 2016; Strohl, 2015). نیمه عمر HSA در گردش خون به طور متوسط ۱۹ روز است و به طور گسترده‌ای برای بهبود ویژگی‌های فارماکوکینتیک پپتیدها و یا پروتئین‌های دارویی استفاده شده است (Kratz, 2016; Yang et al., 2008). آلبیگلو تید با نام تجاری Eperzan، یک دایمر از توالی GLP-1 تغییر یافته متصل به آلبومین سرم انسانی است (Bush et al., 2009) که با جایگزینی آلانین ۸ با گلایسین و نیز بخشی از یک ماکرومولکول، در برابر DPP-IV مقاوم شده و نیمه عمر پلاسما آن تا ۵ روز افزایش یافته و مناسب برای دوز یک‌بار در هفته می‌باشد (Madsbad et al., 2011). پروتئین‌های تکرار آنکرین طراحی شده (دارپین‌ها) که پروتئین‌های طراحی شده مشتق از پروتئین‌های تکرار آنکرینی طبیعی با وزن مولکولی کمتر از ۲۰ کیلودالتون و پایداری دمایی و ترمودینامیکی بالا و همچنین اختصاصیت و میل ترکیبی بالا نسبت به پروتئین‌های هدف هستند می‌توانند به عنوان جایگزینی برای داربست‌های مبتنی بر آنتی‌بادی استفاده شوند (Caputi and Navarra, 2020). دارپین‌ها به شکل محلول و با عملکرد بالا در سیستم‌های بیانی باکتری (Zahnd et al., 2007)، مخمر (Goldstein et al., 2015) و گیاه (Ehsasatvatan et al., 2022b) قابل بیان و تولید هستند. دارپین‌ها با میل ترکیبی بالا نسبت به HSA

افزایش داده است (Daniell, 2006; Daniell *et al.*, 2009; Scotti *et al.*, 2012). مهم‌تر اینکه، پروتئین‌های دارویی بیان شده در کلروپلاست‌ها و لیوفیلیزه شده را می‌توان در دمای محیط و به‌طور پایدار به‌صورت طولانی‌مدت و بدون کاهش عملکرد، ذخیره و نگهداری کرد (Ehsasatvatan and Kohnehrouz, 2023d; Herzog *et al.*, 2017; Su *et al.*, 2015).

کاوان و همکاران (Kwon *et al.*, 2013) در مطالعه‌ای، بیان اگزندین-۴ به‌عنوان آگونیست گیرنده GLP-1 را به‌صورت پروتئین همجوشی با زیرواحد B توکسین وبا (CTB) در کلروپلاست توتون برای تسهیل تحویل خوراکی دارو از طریق مخاط روده با استفاده از توانایی پتامر CTB برای اتصال به گیرنده‌های GM1 روی اپیتلیوم روده و کپسوله کردن آن در سلول‌های گیاهی برای حفاظت در سیستم گوارش بررسی کردند. سلول‌های تیمار شده با CTB-EX4 تولید و خالص‌سازی شده از توتون، در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده، افزایش ۲/۵ برابری انسولین را نشان دادند (Kwon *et al.*, 2013).

پپتیدهای نفوذکننده به سلول از جمله پنتراتین، Tat و الیگوارژنین‌ها به‌عنوان سیستم‌های پیشرفته دارورسانی برای تحویل خوراکی ترکیبات مختلف استفاده می‌شوند (Kristensen and Nielsen, 2016; Rizzuti *et al.*, 2015). در یک مطالعه اخیر، اثر پنتراتین بر برهم‌کنش‌های سلولی و بافتی اگزندین-۴ و آنالوگ آنتاگونیست آن (اگزندین ۹-۳۹) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که پنتراتین اتصال و درونی‌سازی اگزندین (۹-۳۹) در شرایط آزمایشگاهی و همچنین جذب در تومور در شرایط *in vivo* را افزایش می‌دهد (Collado Camps *et al.*, 2023). بر پایه این گزارش‌های مستدل، در این مطالعه نیز از پنتراتین به‌عنوان پپتید نفوذکننده به سلول استفاده شد.

از آنجایی‌که هزینه فعلی درمان با آگونیست‌های GLP-1 بین ۱۸۰۰ تا ۲۲۰۰ دلار در سال متغیر است، تولید آگونیست‌های عملکردی GLP-1 در گیاهان، تهیه فرم ارزان‌قیمت قابل مصرف خوراکی از این دارو را برای درمان دیابت نوع ۲ تسهیل می‌کند.

می‌توانند برای افزایش نیمه‌عمر پپتیدها و پروتئین‌ها استفاده شوند (Stumpp *et al.*, 2020). دارپین MP0250 که VEGF و فاکتور رشد هیپاتوسیت (HGF) را برای درمان سرطان ریه غیرسلولی کوچک با جهش در EGFR (NSCLC) هدف قرار می‌دهد (Grząsko *et al.*, 2019)، شامل دو دارپین متصل شونده به آلبومین است که منجر به افزایش نیمه‌عمر سرم و افزایش بالقوه نفوذ به تومور این دارپین چندکاره می‌شوند (Rodon *et al.*, 2015).

داروهای پپتیدی و پروتئینی بخش منحصربه‌فرد و حیاتی بازار دارویی بوده و دارای مزایای کلیدی نسبت به داروهای مولکولی کوچک هستند. پپتیدهای دارویی در طول ذخیره‌سازی و یا در تجویز خوراکی به‌شدت مستعد تخریب پروتئولیتیک هستند (McGregor, 2008)، از این‌رو، اغلب به‌صورت تزریقی تجویز می‌شوند. همچنین، این پپتیدها به‌دلیل ماندگاری کوتاه پس از خالص‌سازی و یا سنتز شیمیایی، بایستی در شرایط سرما نگهداری شوند و تزریق‌های مکرر این داروها برای اغلب بیماران نامطلوب است (Hamman and Steenekamp, 2011). تحویل خوراکی داروها راه ترجیحی تجویز دارو در انسان محسوب می‌شود، اگرچه تجویز خوراکی پپتیدها و پروتئین‌ها اغلب به‌دلیل قابلیت دسترسی زیستی ضعیف و یا متابولیسم سریع دشوار است (Brown *et al.*, 2020). فرمول‌های خوراکی که به‌راحتی خارج از محیط‌های مراقبت‌های بهداشتی تجویز می‌شوند، برای استفاده طولانی‌مدت ایده‌آل بوده و در صورت بروز واکنش‌های نامطلوب به‌راحتی می‌توان آن را قطع کرد. علاوه‌بر این، نگهداری قرص‌ها و سایر اشکال دوز جامد حاوی مواد فعال دارویی در مقایسه با فرم‌های دارویی استریل تسهیل شده است (Darji *et al.*, 2018). رهیافت‌های مختلفی برای غلبه بر برخی موانع و توسعه سیستم‌های انتقال خوراکی ایمن و مؤثر برای پروتئین‌ها توسعه یافته است (Gleeson *et al.*, 2021; Mahato *et al.*, 2002; Shah *et al.*, 2003). پیشرفت‌های اخیر در مهندسی ژنتیک پتانسیل استفاده از کلروپلاست‌های گیاهی را برای بیان بالا، مقرون‌به‌صرفه و مقیاس‌پذیر پروتئین‌های نو ترکیب

دیابت نوع ۲ ایجاد می‌کند. با توجه به تولید موفق پروتئین همجوشی عملکردی در گیاه مدل توتون، می‌توان نتایج این تحقیق را به گیاهان خوراکی از جمله کاهو و اسفناج تعمیم و تولید کپسول‌های زیستی از این داروی پپتیدی با ارزش درمانی و اقتصادی بالا را توسعه داد.

سپاسگزاری

این مقاله از طرح پسادکتری دانشگاه تبریز با شماره قرارداد ۴۸۲۹/ص استخراج گردیده است. از آزمایشگاه مهندسی ژنتیک دانشگاه تبریز به‌خاطر تأمین امکانات لازم برای اجرای این تحقیق قدردانی می‌گردد.

هزینه‌های بالای درمان و نیاز به تزریق‌های مکرر زیرجلدی داروهای مرتبط با درمان دیابت به‌دلیل هزینه بالای تولید و خالص‌سازی در سیستم‌های رایج تولید پروتئین‌های نوترکیب می‌باشد. بهره‌گیری از سیستم بیان گیاهی و تولید آنالوگ‌های خوراکی پپتیدها و پروتئین‌های دارویی با کاهش هزینه‌های تولید می‌تواند جایگزین مؤثری برای سیستم‌های بیان و تجویز متداول باشد. در این تحقیق، تولید پروتئین همجوشی سه‌جزئی به‌عنوان آگونیست طولانی اثر گیرنده GLP-1 در کلروپلاست گیاه توتون فرصتی تازه و چالشی برای توسعه فرآیند زیستی جدید برای تولید داروهای خوراکی مبتنی بر GLP-1 در درمان

References

- Arntzen, C. (2015). Plant-made pharmaceuticals: from 'edible vaccines' to ebola therapeutics. *Plant Biotechnology Journal*, **13**: 1013.
- Biemelt, S. and Sonnewald, U. (2005). *Molecular Farming in Plants*. Nature Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group, London, UK.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248-254.
- Brown, T.D., Whitehead, K.A. and Mitragotri, S. (2020). Materials for oral delivery of proteins and peptides. *Nature Reviews Materials*, **5**: 127-148.
- Bush, M., Matthews, J., De Boever, E., Dobbins, R., Hodge, R., Walker, S., Holland, M., Gutierrez, M. and Stewart, M. (2009). Safety, tolerability, pharmacodynamics and pharmacokinetics of albiglutide, a long-acting glucagon-like peptide-1 mimetic, in healthy subjects. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, **11**: 498-505.
- Caputi, A.P. and Navarra, P. (2020). Beyond antibodies: ankyrins and DARPins. From basic research to drug approval. *Current Opinion Pharmacology*, **51**: 93-101.
- Chen, P., Caldwell, C.G., Mathvink, R.J., Leiting, B., Marsilio, F., Patel, R.A., Wu, J.K., He, H., Lyons, K.A. and Thornberry, N.A. (2007). Imidazopiperidine amides as dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment of diabetes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **17**: 5853-5857.
- Collaborators, G. and Ärnlöv, J. (2020). Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, **396**: 1223-1249.
- Collado Camps, E., van Lith, S.A., Kip, A., Frielink, C., Joosten, L., Brock, R. and Gotthardt, M. (2023). Conjugation to a cell-penetrating peptide drives the tumour accumulation of the GLP1R antagonist exendin (9-39). *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, **50**: 996-1004.
- Daniell, H. (2006). Production of biopharmaceuticals and vaccines in plants via the chloroplast genome. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, **1**: 1071-1079.
- Daniell, H., Singh, N.D., Mason, H. and Streatfield, S.J. (2009). Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. *Trends in Plant Science*, **14**: 669-679.
- Darji, M.A., Lalge, R.M., Marathe, S.P., Mulay, T.D., Fatima, T., Alshammari, A., Lee, H.K., Repka, M.A. and Narasimha Murthy, S. (2018). Excipient stability in oral solid dosage forms: a review. *Aaps Pharmscitech*, **19**: 12-26.

- Dibonaventura, M.D., Wagner, J.S., Girman, C.J., Brodovicz, K., Zhang, Q., Qiu, Y., Pentakota, S.R. and Radican, L.** (2010). Multinational Internet-based survey of patient preference for newer oral or injectable Type 2 diabetes medication. *Patient Prefer Adherence*, **4**: 397-406.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L.** (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, *Phytochemical Bulletin*, **19**: 11-15.
- Ehsasatvatan, M. and Baghban Kohnehrouz, B.** (2024). A new trivalent recombinant protein for type 2 diabetes mellitus with oral delivery potential: design, expression, and experimental validation. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*.1-16.
- Ehsasatvatan, M. and Baghban Kohnehrouz, B.** (2023a). Designing and computational analyzing of chimeric long-lasting GLP-1 receptor agonists for type 2 diabetes. *Scientific Reports*, **13**: 17778.
- Ehsasatvatan, M. and Baghban Kohnehrouz, B.** (2023b). Homoplasmic stability and cytoplasmic inheritance of DARPin G3 scaffold protein in generative and vegetative propagation of transplastic tobacco plants. *Plant Genetic Researches*, **9**: 1-14 (In Persian).
- Ehsasatvatan, M. and Kohnehrouz, B.** (2023c). Effect of linker's length and sequence on the structure and stability of mGLP-1-DARPin fusion protein for treatment of type 2 diabetes: a computational study. *Yafteh*, **25**: 26-47 (In Persian).
- Ehsasatvatan, M. and Kohnehrouz, B.B.** (2023d). The lyophilized chloroplasts store synthetic DARPin G3 as bioactive encapsulated organelles. *Journal of Biological Engineering*, **17**: 63.
- Ehsasatvatan, M., Kohnehrouz, B.B., Gholizadeh, A., Ofoghi, H. and Shanebandi, D.** (2022a). Physical and biologically effective parameters in developing transplastomic tobacco plants by particle bombardment method using PDS-1000/He. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, **10**: 237-252 (In Persian).
- Ehsasatvatan, M., Kohnehrouz, B.B., Gholizadeh, A., Ofoghi, H. and Shanebandi, D.** (2022b). The production of the first functional antibody mimetic in higher plants: the chloroplast makes the DARPin G3 for HER2 imaging in oncology. *Biological Research*, **55**: 1-18.
- Eissa, N.G., Elsabahy, M. and Allam, A.** (2021). Engineering of smart nanoconstructs for delivery of glucagon-like peptide-1 analogs. *International Journal of Pharmaceutics*, **597**: 1-13.
- Elbrønd, B., Jakobsen, G., Larsen, S., Agersø, H., Jensen, L.B., Rolan, P., Sturis, J., Hatorp, V. and Zdravkovic, M.** (2002). Pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and tolerability of a single-dose of NN2211, a long-acting glucagon-like peptide 1 derivative, in healthy male subjects. *Diabetes Care*, **25**: 1398-1404.
- Flint, H.J., Scott, K.P., Duncan, S.H., Louis, P. and Forano, E.** (2012). Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes*, **3**: 289-306.
- Gleeson, J.P., Fein, K.C. and Whitehead, K.A.** (2021). Oral delivery of peptide therapeutics in infants: Challenges and opportunities. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **173**: 112-124.
- Goldstein, R., Sosabowski, J., Livanos, M., Leyton, J., Vigor, K., Bhavsar, G., Nagy-Davidescu, G., Rashid, M., Miranda, E. and Yeung, J.** (2015). Development of the designed ankyrin repeat protein (DARPin) G3 for HER2 molecular imaging. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, **42**: 288-301.
- Grząsko, N., Knop, S., Goldschmidt, H., Raab, M.S., Dürig, J., Bringen, S., D'Agostino, M., Gamberi, B., Rivolti, E. and Vacca, A.** (2019). The MP0250-CP201 mirror study: a phase 2 study update of MP0250 plus bortezomib and dexamethasone in relapse/refractory multiple myeloma (RRMM) patients previously exposed to proteasome inhibitors and immunomodulatory drugs. *Blood*, **134**: 1899.
- Hamman, J.H., and Steenekamp, J.H.** (2011). Oral peptide drug delivery: strategies to overcome challenges. In: Castanho, M. and Santos, N.C., Eds., *Peptide Drug Discovery and Development: Translational Research in Academia and Industry*, pp. 71-90. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, GE.

- Herzog, R.W., Nichols, T.C., Su, J., Zhang, B., Sherman, A., Merricks, E.P., Raymer, R., Perrin, G.Q., Häger, M. and Wiinberg, B.** (2017). Oral tolerance induction in hemophilia B dogs fed with transplastomic lettuce. *Molecular Therapy*, **25**: 512-522.
- Johnson, L.M., Barrick, S., Hager, M.V., McFedries, A., Homan, E.A., Rabaglia, M.E., Keller, M.P., Attie, A.D., Saghatelian, A. and Bisello, A.** (2014). A potent α/β -peptide analogue of GLP-1 with prolonged action in vivo. *Journal of the American Chemical Society*, **136**: 12848-12851.
- Kieffer, T.J., McIntosh, C.H. and Pederson, R.A.** (1995). Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology*, **136**: 3585-3596.
- Kim, B.J., Zhou, J., Martin, B., Carlson, O.D., Maudsley, S., Greig, N.H., Mattson, M.P., Ladenheim, E.E., Wustner, J. and Turner, A.** (2010). Transferrin fusion technology: a novel approach to prolonging biological half-life of insulinotropic peptides. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **334**: 682-692.
- Kontermann, R.E.** (2016). Half-life extended biotherapeutics. *Expert Opinion on Biological Therapy*, **16**: 903-915.
- Kratz, F.** (2008). Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *J Control Release*, **132**: 171-183.
- Kristensen, M., and Nielsen, H.M.** (2016). Cell-penetrating peptides as carriers for oral delivery of biopharmaceuticals. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, **118**: 99-106.
- Kushwaha, R.N., Srivastava, R., Mishra, A., Rawat, A.K., Srivastava, A.K., Haq, W. and Katti, S.B.** (2015). Design, synthesis, biological screening, and molecular docking studies of piperazine-derived constrained inhibitors of DPP-IV for the treatment of type 2 diabetes. *Chemical Biology & Drug Design*, **85**: 439-446.
- Kwon, K.C., Nityanandam, R., New, J.S. and Daniell, H.** (2013). Oral delivery of bioencapsulated exendin-4 expressed in chloroplasts lowers blood glucose level in mice and stimulates insulin secretion in beta-TC 6 cells. *Plant biotechnology journal*, **11**: 77-86.
- Laemmli, U.** (1979). Slab gel electrophoresis: SDS-PAGE with discontinuous buffers. *Nature*, **227**: 680-685.
- Limaye, A., Koya, V., Samsam, M. and Daniell, H.** (2006). Receptor-mediated oral delivery of a bioencapsulated green fluorescent protein expressed in transgenic chloroplasts into the mouse circulatory system. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **20**: 959.
- Litwak, L., Goh, S.-Y., Hussein, Z., Malek, R., Prusty, V. and Khamseh, M.E.** (2013). Prevalence of diabetes complications in people with type 2 diabetes mellitus and its association with baseline characteristics in the multinational A1chieve study. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, **5**: 1-10.
- Luginbuhl, K.M., Schaal, J.L., Umstead, B., Mastroia, E.M., Li, X., Banskota, S., Arnold, S., Feinglos, M., D'Alessio, D. and Chilkoti, A.** (2017). One-week glucose control via zero-order release kinetics from an injectable depot of glucagon-like peptide-1 fused to a thermosensitive biopolymer. *Nature Biomedical Engineering*, **1**: 1-14.
- Madsbad, S., Kielgast, U., Asmar, M., Deacon, C.F., Torekov, S.S. and Holst, J.** (2011). An overview of once-weekly glucagon-like peptide-1 receptor agonists—available efficacy and safety data and perspectives for the future. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, **13**: 394-407.
- Madsen, K., Knudsen, L.B., Agersoe, H., Nielsen, P.F., Thøgersen, H., Wilken, M. and Johansen, N.L.** (2007). Structure–activity and protraction relationship of long-acting glucagon-like peptide-1 derivatives: importance of fatty acid length, polarity, and bulkiness. *Journal of Medicinal Chemistry*, **50**: 6126-6132.
- Mahato, R.I., Narang, A.S., Thoma, L. and Miller, D.D.** (2003). Emerging trends in oral delivery of peptide and protein drugs. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, **20**: 153-214.

- Martens, E.C., Lowe, E.C., Chiang, H., Pudlo, N.A., Wu, M., McNulty, N.P., Abbott, D.W., Henrissat, B., Gilbert, H.J. and Bolam, D.N.** (2011). Recognition and degradation of plant cell wall polysaccharides by two human gut symbionts. *PLoS Biology*, **9**: 1-16.
- McGregor, D.P.** (2008). Discovering and improving novel peptide therapeutics. *Current Opinion in Pharmacology*, **8**: 616-619.
- Mojsov, S.** (2000). Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and the control of glucose metabolism in mammals and teleost fish. *American Zoologist*, **40**: 246-258.
- Reed, J., Bain, S. and Kanamarlapudi, V.** (2020). Recent advances in understanding the role of glucagon-like peptide 1. *F1000Res*, **9**: 239-253.
- Rizzuti, M., Nizzardo, M., Zanetta, C., Ramirez, A. and Corti, S.** (2015). Therapeutic applications of the cell-penetrating HIV-1 Tat peptide. *Drug Discovery Today*, **20**: 76-85.
- Rodon, J., Omlin, A., Herbschleb, K.H., Garcia-Corbacho, J., Steiner, J., Dolado, I., Zitt, C., Feurstein, D., Turner, D. and Dawson, K.M.** (2015). Abstract B25: First-in-human Phase I study to evaluate MP0250, a DARPIn blocking HGF and VEGF, in patients with advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*, **39**: 145-154.
- Scotti, N., Rigano, M.M. and Cardi, T.** (2012). Production of foreign proteins using plastid transformation. *Biotechnology Advances*, **30**: 387-397.
- Shah, R.B., Ahsan, F. and Khan, M.A.** (2002). Oral delivery of proteins: progress and prognostication. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, **19**: 2416-2448.
- St Onge, E.L., and Miller, S.A.** (2010). Albiglutide: a new GLP-1 analog for the treatment of type 2 diabetes. *Expert Opinion on Biological Therapy*. **10**: 801-806
- Steiner, D., Merz, F.W., Sonderegger, I., Gulotti-Georgieva, M., Villemagne, D., Phillips, D.J., Forrer, P., Stumpp, M.T., Zitt, C. and Binz, H.K.** (2017). Half-life extension using serum albumin-binding DARPIn® domains. *Protein Engineering, Design and Selection*, **30**: 583-591.
- Strohl, W.R.** (2015). Fusion proteins for half-life extension of biologics as a strategy to make biobetters. *BioDrugs*, **29**: 215-239.
- Stumpp, M.T., Dawson, K.M. and Binz, H.K.** (2020). Beyond antibodies: the DARPIn(®) drug platform. *BioDrugs*, **34**: 423-433.
- Su, J., Zhu, L., Sherman, A., Wang, X., Lin, S., Kamesh, A., Norikane, J.H., Streatfield, S.J., Herzog, R.W. and Daniell, H.** (2015). Low cost industrial production of coagulation factor IX bioencapsulated in lettuce cells for oral tolerance induction in hemophilia B. *Biomaterials*, **70**: 84-93.
- Sun, H., Saeedi, P., Karuranga, S., Pinkepank, M., Ogurtsova, K., Duncan, B.B., Stein, C., Basit, A., Chan, J.C. and Mbanya, J.C.** (2022). IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **183**: 109119.
- Svab, Z., Hajdukiewicz, P. and Maliga, P.** (1990). Stable transformation of plastids in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **87**: 8526-8530.
- Takahashi, S., Furusawa, H., Ueda, T. and Okahata, Y.** (2013). Translation enhancer improves the ribosome liberation from translation initiation. *Journal of the American Chemical Society*, **135**: 13096-13106.
- Thum, A., Hupe-Sodmann, K., Göke, R., Voigt, K., Göke, B. and McGregor, G.** (2002). Endoproteolysis by isolated membrane peptidases reveal metabolic stability of glucagon-like peptide-1 analogs, exendins-3 and-4. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, **110**: 113-118.
- Xiao, Y., Kwon, K.C., Hoffman, B.E., Kamesh, A., Jones, N.T., Herzog, R.W. and Daniell, H.** (2016). Low cost delivery of proteins bioencapsulated in plant cells to human non-immune or immune modulatory cells. *Biomaterials*, **80**: 68-79.

- Xu, F., Wang, K.Y., Wang, N., Li, G. and Liu, D.** (2017). Modified human glucagon-like peptide-1 (GLP-1) produced in *E. coli* has a long-acting therapeutic effect in type 2 diabetic mice. *PLoS One*, **12**: 0181939.
- Yang, H., Liu, L. and Xu, F.** (2016). The promises and challenges of fusion constructs in protein biochemistry and enzymology. *Appl Microbiol Biotechnol*, **100**: 8273-8281.
- Yusibov, V., Streatfield, S.J. and Kushnir, N.** (2011). Clinical development of plant-produced recombinant pharmaceuticals: vaccines, antibodies and beyond. *Human Vaccines*, **7**: 313-321.
- Zahnd, C., Amstutz, P. and Plückthun, A.** (2007). Ribosome display: selecting and evolving proteins in vitro that specifically bind to a target. *Nature Methods*, **4**: 269-279.
- Zoubenko, O.V., Allison, L.A., Svab, Z. and Maliga, P.** (1994). Efficient targeting of foreign genes into the tobacco plastid genome. *Nucleic Acids Research*, **22**: 3819-3824.
- Zarindast, Z., Nazarian-Firouzabadi, F. and Khademi, M.** (2023). Expression and antimicrobial activity assessment of CBD-alfAFP recombinant peptide produced in tobacco hairy roots against plant pathogens. *Plant Genetic Researches*, **10**: 43-60 (In Persian).