

طراحی و ساخت یک پلاسمید عرضه سطحی حاوی قطعه ژنی رمزگذار پروتئین E6 نو ترکیب ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۸ جهت بیان در مخمر *Yarrowia lipolytica*

محدثه کوهی چاپان^۱، دکتر سولماز منیری جواد حصاری^{۲*}، دکتر فرشاد درویشی
هرزویلی^۳، دکتر کاترین مادزاک^۴

۱. کارشناس ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.
۲. استادیار گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.
۳. استاد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران.
۴. محقق بالارته، انستیتو تحقیقات ملی کشاورزی، غذا و محیط، دانشگاه Prais-Saclay، پاریس، فرانسه.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۰۵

خلاصه

مقدمه: ویروس‌های پاپیلومای انسانی (HPV) با بیش از ۱۰۰ تیپ، به دو دسته با ریسک پایین و بالا تقسیم می‌شوند که تیپ‌های ۱۶ و ۱۸ به تنهایی در ۷۰٪ موارد سرطان گردنه رحم دخیل‌اند. در حال حاضر، توسعه پروتئین‌های نو ترکیب HPV با هدف واکسیناسیون یا درمان مورد توجه دانشمندان می‌باشد. از این رو، مطالعه حاضر با هدف ساخت یک پلاسمید نو ترکیب عرضه‌کننده در سطح رمزگذار پروتئین E6 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۸ انجام شد.

روش کار: قطعه ژنی رمزگذار پروتئین E6 تیپ ۱۸ ویروس پاپیلومای انسانی (HPV18) با استفاده از DNA فرد مبتلا به ویروس به‌عنوان الگو، با روش PCR آشیانه‌ای مورد تکثیر قرار گرفت و پس از برش آنزیمی دوگانه Hind III و Sfi I، به درون پلاسمید عرضه‌کننده در سطح pINA1317-YLCWP110 همسانه‌سازی شد.

یافته‌ها: روش‌های مولکولی نظیر PCR و برش آنزیمی دوگانه صحت همسانه‌سازی پلاسمید نو ترکیب pINA1317-YLCWP110-E6 را مورد تأیید قرار داد. همچنین، نتایج به‌دست آمده از تعیین توالی به‌روش سنگر و هم‌ردیفی با داده‌های موجود در بانک ژن منجر به تأیید نهایی صحت توالی، ترادف و چارچوب قرار گرفتن قطعه ژنی در جایگاه مناسب گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه، همسانه‌سازی موفق قطعه ژنی رمزگذار پروتئین E6 ویروس HPV18 را در پلاسمید عرضه‌کننده در سطح pINA1317-YLCWP110-E6 در جایگاه و جهت مناسب مورد تأیید قرار داد. این پلاسمید در صورت بیان در میزبان مخمری *Yarrowia lipolytica*، قابلیت استفاده به‌عنوان واکسن، مارکر مولکولی یا جنبه درمانی خواهد داشت.

کلمات کلیدی: پروتئین E6 نو ترکیب، پلاسمید عرضه‌کننده در سطح، تیپ ۱۸، ویروس پاپیلومای انسانی، همسانه‌سازی

* نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر سولماز منیری جواد حصاری؛ دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران. تلفن: ۰۴۱-۳۱۴۵۲۰۶۱
پست الکترونیک: solmazmoniri@gmail.com

مقدمه

ویروس پاپیلومای انسانی (HPV)^۱ متعلق به خانواده papillomaviridae، دارای اندازه کوچک (۵۵-۵۲ نانومیلی‌متر)، از ویروس‌های DNA دار دو رشته‌ای حلقوی، بدون پوشش، با کپسید ۲۰ وجهی^۲ و با طول ژنوم تقریباً ۸۰۰۰ جفت باز است که سلول‌های اپی‌تلیال پوست، مخاط دهان و آنونیتال را درگیر می‌کند (۱-۳). این ویروس یکی از عوامل ایجاد سرطان از راه مقاربت جنسی به‌خصوص در زنان می‌باشد که تقریباً سهم ۵٪ در سرطان‌زایی دارد. از جمله سرطان‌هایی که ویروس پاپیلومای انسانی عامل ایجاد آن است می‌توان به سرطان‌های آلت تناسلی مردانه، سر و گردن، واژن، مقعد و به‌خصوص دهانه رحم که رابطه مستقیمی با ابتلاء به ویروس HPV دارد، اشاره کرد (۲، ۴، ۵).

سرطان دهانه رحم به‌عنوان رایج‌ترین و چهارمین سرطان شایع بین زنان است که سلامت زنان را تهدید می‌کند (۶-۸). عفونت مزمن توسط ویروس پاپیلومای انسانی پرخطر و ادغام ژنوم HPV در DNA کروموزومی میزبان سلول‌های اپی‌تلیال دهانه رحم از موارد مهم اولیه در پیشرفت نئوپلاستیک ضایعات دهانه رحم است. از آنجایی‌که دو نوع سلول اپی‌تلیال در این ناحیه قرار دارد، سرطان دهانه رحم به دو شکل می‌تواند بروز کند. مخاط و پوست، شایع‌ترین مناطق عفونت HPV هستند (۹).

در آمریکا تقریباً ۷۹ میلیون فرد به HPV مبتلا هستند و سالانه تقریباً ۱۴ میلیون فرد جدید به ویروس HPV مبتلا می‌شوند که نزدیک نیمی از آنها مربوط به افراد در سنین ۱۵-۲۴ سال هستند. طبق برآوردی که در سال ۲۰۱۷ توسط اعضای آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطانی بر روی شیوع جهانی ویروس پاپیلومای انسانی صورت گرفت، این ویروس سالانه ۵۷۰۰۰۰ زن را در جهان مبتلا کرده و عامل بروز ۵٪ از کل سرطان‌ها می‌باشد. ۸۰٪ از افراد فعال جنسی در طول زندگی، به ویروس HPV مبتلا می‌شوند، ولی اکثر آنها از ابتلاء خود به این ویروس مطلع نیستند (۱۳-۱۰).

آمار دقیقی از اپیدمیولوژی HPV در ایران منتشر نشده است و در اکثر مقالات منتشر شده، مطالعات بر روی تعداد محدودی از افراد مبتلا به سرطان دهانه رحم در مقایسه با نمونه‌های زنان مراجعه‌کننده به پاپ‌اسمیر انجام گرفته است. در مطالعه بهرام‌آبادی و همکاران (۲۰۲۱) در جنوب شرق ایران بر روی نمونه‌های پاپ‌اسمیر به‌دست آمده از سال ۲۰۲۰-۲۰۱۸، ۳۷/۷٪ از بیماران HPV مثبت بودند. در میان موارد مثبت، ۶۲٪ از افراد تنها به یک ژنوتیپ HPV آلوده بوده و ۳۸/۲٪ از افراد آلودگی با ژنوتیپ‌های HPV متعدد را نشان دادند. در نمونه‌های آلوده با سویه‌های متعدد، ۳۱ ژنوتیپ HPV گزارش شد که ۴ ژنوتیپ شایع آنها HPV6، HPV16، HPV53 و HPV51 بودند (۱۴). در مطالعه کشه و همکار (۲۰۱۹)، شیوع ژنوتیپ‌های HPV در جمعیت ایرانی بررسی شد. شایع‌ترین ژنوتیپ‌های کم‌خطر در افراد مورد مطالعه HPV6 و HPV11 بودند و ژنوتیپ‌های پرخطر بیشتر HPV16 و HPV52 بودند. بیشترین میزان آلودگی با ویروس در محدوده سنی ۳۰-۴۴ سال همراه با یک پیک در بازه سنی ۳۲-۳۰ سال مشاهده گردید (۱۵). همچنین در مطالعه ثابت و همکاران (۲۰۲۱) که بر روی نمونه‌های جمع‌آوری شده از ۳ گروه در خراسان (خراسان رضوی و شمالی، خراسان جنوبی، گروه توریست) انجام شد، شیوع HPV در گروه اول ۴۸/۴٪، در گروه دوم ۱۹/۹٪ و در گروه سوم ۳۳/۶٪ و ۴ ژنوتیپ شایع ویروس، HPV6، HPV11، HPV16 و HPV51 گزارش شد (۱۶). با وجود گزارشات متعدد در جمعیت‌های محدود، اطلاعات موجود در پایگاه اینترنتی مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی دانشگاه شهید بهشتی، درصد آلودگی زنان ایرانی ۱۵-۴۵ سال را بر مبنای گزارش وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی ۶٪ اعلام نموده است. این عدد تقریباً مشابه کشورهای همسایه مانند ترکیه بوده، اما میزان بروز سرطان سرویکس به‌دلیل عادات و سبک زندگی و ژنتیک ویروس‌های HPV موجود در ایران کمتر می‌باشد. همچنین، یک مرور سیستماتیک بر روی ۱۴ مطالعه در ایران توسط این مرکز تحقیقاتی گزارش شده است که شیوع HPV را در بین زنان سالم

¹ Human Papilloma Virus

² Icosahedral

در استان‌های مختلف ایران ۹/۴٪ اعلام نموده است و در این میان، شیوع HPV16، ۲/۳٪ و شیوع HPV18 برابر ۱/۷٪ گزارش شده است (۱۷).

HPV سلول‌های اپی‌تلیال را از طریق سایش آلوده می‌کند و متعاقباً باعث دیسپلازی دهانه رحم و نئوپلازی اپی‌تلیال داخلی دهانه رحم (CIN¹) می‌شود که به‌دلیل مداوم بودن عفونت پاپیلوما ویروس پرخطر (HR-HPV)، به‌طور معمول به سرطان دهانه رحم تبدیل می‌شود. برای شروع عفونت، ویروس باید بتواند در سلول میزبان ادغام شود. پس از ادغام ویروس در سلول میزبان، یک سری حوادث ژنتیکی در سلول‌های اپی‌تلیال پایه اتفاق افتاده و به‌طور مستقیم امکان تکثیر ویروس را فراهم می‌کند. در نهایت، این وقایع محیطی مناسب برای پیشرفت نئوپلاستیک فراهم می‌نماید (۱۸).

روند پیشرفت سرطان دهانه رحم آهسته است و می‌تواند به چندین مرحله تقسیم شود. مرحله اولیه عفونت HPV از طریق بالینی قابل تشخیص است، اما در اکثر موارد، معمولاً بدون تشخیص می‌ماند و به‌دلیل پاک‌سازی ویروسی در طی ۱-۲ سال، بدون مداخله درمانی از بین می‌رود (۳)، اما در صورت عدم شناسایی ویروس در مراحل اولیه و ابقای آن در سلول‌های میزبان، مراحل بعدی عفونت و سرطان‌زایی رخ می‌دهد. با وجود پیش‌گیری‌ها و درمان‌های مختلف مانند غربالگری HPV، واکسن‌های پیش‌گیری‌کننده HPV، جراحی، رادیوتراپی و شیمی‌درمانی، بار بیماری در سراسر جهان همچنان سنگین است (۳).

در حال حاضر ۳ نوع واکسن پیش‌گیری‌کننده بر پایه استفاده از VLPs^۲ مونتاژ شده از بیان پروتئین نوترکیب L1، به‌صورت تجاری در دسترس هستند و برای استفاده در بسیاری از کشورها تأیید شده است که عبارتند از: Gardasil؛ یک واکسن ۴ ظرفیتی (4vHPV) که HPV6، HPV11، HPV16 و HPV18 را مورد هدف قرار می‌دهد، Cervarix؛ یک واکسن ۲ ظرفیتی (2vHPV) که HPV16 و HPV18 را مورد هدف قرار می‌دهد، Gardasil 9؛ یک واکسن ۹ ظرفیتی

(9vHPV) که HPV6، HPV31، HPV11، HPV18، HPV16، HPV58، HPV52، HPV45 و HPV33 را مورد هدف قرار می‌دهد (۳، ۱۷، ۱۹، ۲۰).

اگرچه این واکسن‌ها در اغلب موارد در پیش‌گیری از عفونت HPV مؤثرند، اما مزایای محدودی در برابر تخریب عفونت‌های قبلی دارند. واکسن‌های درمانی از این نظر با واکسن‌های پیش‌گیری متفاوت هستند که هدف آنها، تحریک ایمنی سلولی و از بین بردن سلول‌های آلوده به جای آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده می‌باشد. بنابراین، تحریک پاسخ ایمنی به واسطه سلول و تخریب سلول‌های آلوده به جای تولید آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده، منجر به افزایش رغبت به تولید واکسن‌های درمانی شده است. این واکسن‌ها می‌توانند تأثیر چشم‌گیری بر میزان مرگ‌ومیر ناشی از عفونت HPV داشته باشند. پروتئین‌های E5، E6 و E7 ویروس تومورژنیک بوده و بسیاری از مطالعات به‌منظور تهیه واکسن درمانی بر روی آنها متمرکز است (۱۷، ۲۱).

پروتئین E6 ویروس پاپیلوما انسانی، به‌عنوان یکی از دو آنکوپروتئین با قدرت تومورزایی در ژنوم ویروس است (۲۲). این پروتئین یک پروتئین هسته‌ای با ۱۵۰ آمینواسید، در سیتوپلاسم ساخته شده و از طریق توالی (NLS)^۳ به درون هسته منتقل می‌شود. چند عملکردی بودن آن، از ویژگی‌های مهم آن محسوب می‌شود که تقریباً با ۳۰ زیرواحد مختلف پروتئینی سلول ارتباط دارد و تمام جنبه‌های فعالیت E6، از نقش در چرخه زندگی ویروس گرفته تا پیشرفت بدخیمی را شامل می‌شود (۲۳). آنکوپروتئین E6 با اتصال به توالی کوتاه غنی از لوسین (LXXLL) یوبی‌کوئیتین لیگاز وابسته به E6 (E6AP) درون بافتی و تخریب پروتئوزومی پروتئین سرکوبگر تومور p53، در تومورهای اپی‌تلیالی ناشی از ویروس‌های پاپیلوما انسانی پرخطر نظیر سرطان دهانه رحم و سرطان سر و گردن و همچنین از طریق فعال‌سازی بیان MYC و تلومراز، باعث افزایش میزان بقا سلولی می‌شود. با توجه به نقش پروتئین p53 در فرآیندهای مختلف سلولی هم‌چون حفظ ثبات و پایداری

¹ cervical intra-epithelial neoplasia

² virus-like particles

³ Nuclear Localization Signal

pINA1317- *Yarrowia lipolytica* به نام YICWP110 ساختند. پلاسمید pINA1317 مورد استفاده در این مطالعه، دارای یک پروموتور نوترکیب برای بیان هترولوگ در مخمر *Yarrowia lipolytica* است. در پلاسمیدهای قبلی، پروموتورها وابسته به القاء توسط القاگرهای خاص یا بیان در فاز رشد مخمر بودند که بیان پروتئین نوترکیب را در این میزبان با محدودیت‌هایی مواجه می‌ساخت. برای مقابله با این محدودیت‌ها، از یک پروموتور سنتزی به نام hp4d استفاده شد که فعالیت رونویسی آن مشابه پروموتورهای قبلی در حالت القاء شده کامل می‌باشد، اما توسط منابع کربن و نیتروژن محدود نشده و نیازی به القاء شدن توسط القاگر ندارد. همچنین، تولید پروتئین نوترکیب توسط این پروموتور پس از فاز رشد و در فاز سکون رخ می‌دهد. این پلاسمید دارای راندمان ترانسفورماسیون بالا، پایداری بالاتر ترانسفورمانتها و سطح بالای ترشح پروتئین‌های فعال می‌باشد. به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد این پلاسمید، از آن برای ساخت پلاسمید جدید برای عرضه در سطح مخمر *Yarrowia lipolytica* استفاده شد؛ بدین‌منظور ابتدا ۳۳۳ جفت باز رمزگذار انتهایی کربوکسیلی YICWP1 از DNA ژنومی *Yarrowia lipolytica* همسانه‌سازی شد. سپس قسمت همسانه‌سازی شده به درون پلاسمید pINA1317 وارد گردید. یافته‌ها نشان دادند که پلاسمید جدید می‌تواند یک پلاسمید خوب برای عرضه در سطح بر روی میزبان مخمری *Yarrowia lipolytica* باشد (شکل ۱) (۳۲).

ژنوم، طول عمر، سوخت‌وساز و مهم‌تر از همه در سرکوب تومور، در صورت عدم فعالیت E6، P53 افزایش یافته و از طریق القاء آپوپتوز قبل از تکثیر ویروس، منجر به از بین رفتن سلول آلوده می‌گردد (۲۴). پروتئین E6 به‌عنوان یک پروتئین ترانسفورم‌کننده، علاوه بر P53، بر عامل آپوپتوتیک دیگری مانند BAK^۱ تأثیر می‌گذارد. BAK که به همراه BAX در غشای خارجی میتوکندری قرار دارند، در صورت فعال شدن با ایجاد روزنه در غشا خارجی میتوکندری، موجب آپوپتوز و مرگ سلولی می‌شود. به‌علاوه پروتئین E6 با اتصال به پروتئین‌های حاوی دمین PDZ^۲، از طریق موتیف متصل شونده به PDZ در پایانه C-ترمینال خود، آنها را تخریب می‌کند. هم‌چنین، پروتئین E6 با فعال‌سازی STAT3^۳ منجر به پیشرفت چرخه سلولی می‌شود (۲۵، ۲۶).

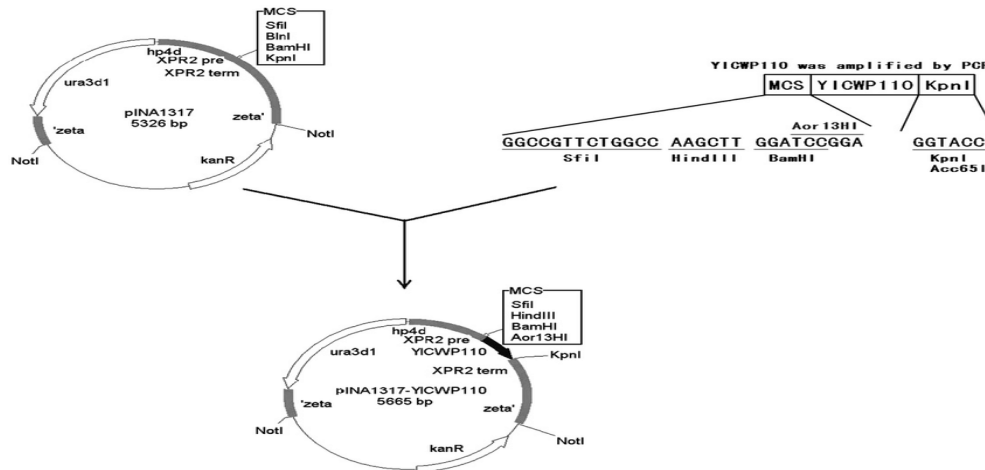
در حال حاضر سیستم‌های بیانی مختلفی به‌منظور تولید پروتئین‌های نوترکیب مورد استفاده قرار می‌گیرند. در تولید پروتئین‌های نوترکیب یوکاریوتی، میزبان پروکاریوتی به‌عنوان یک سیستم بیانی هترولوگ از مزایای سادگی، ارزان قیمت بودن و سرعت بالای تکثیر میزبان برخوردار است، اما در انجام تغییرات پس از ترجمه‌ای پروتئین‌های یوکاریوتی دچار محدودیت می‌باشد (۲۷، ۲۸). از سوی دیگر، سیستم بیانی پستانداران فاقد این محدودیت بوده، ولی مراحل تولید پروتئین نوترکیب در این سیستم پیچیدگی بیشتری داشته و با محدودیت هزینه‌های بالا و دشواری تخلیص پروتئین نوترکیب از مجموعه پروتئین‌های میزبان روبه‌رو است (۱۷، ۲۷، ۲۹). در این میان، میزبان مخمری یک سیستم بیانی همولوگ نسبتاً ساده و ارزان محسوب می‌شود که قادر به انجام تغییرات پس از ترجمه‌ای یوکاریوتی نیز می‌باشد (۳۰، ۳۱). یوو و همکاران (۲۰۰۸) یک پلاسمید عرضه‌کننده در سطح مخمر

^۱ Bcl-2 homologous antagonist/killer

^۲ PDZ ترکیب حرف اول نام سه پروتئین به نام‌های PSD95 post synaptic density protein (Dlg1), synaptic density protein zonula occludens-1 protein(zo-1) tumor suppressor

است که حضور این دمین اولین بار در آنها کشف شده است.

^۳ Signal Transducer and Activator of Transcription



شکل ۱- روش ایجاد پلاسمید عرضه سطحی **pINA1317-YICWP110**. در سمت چپ ساختار پلاسمید **pINA1317** به تصویر کشیده شده است. در سمت راست، قطعه ژنی رمزگذار ۱۱۰ آمینواسید انتهای کربوکسیل **YICWP** پس از تکثیر توسط **PCR** در یک پلاسمید ناقل همسانه‌سازی شده است. سرانجام، قطعه ژنی **YICWP110** پس از برش آنزیمی محدودگر دوگانه از پلاسمید ناقل خارج شده و در داخل پلاسمید **pINA1317** درج شده است (۳۲).

تکثیر قطعه ژنی رمزگذار پروتئین E6 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۸ با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای^۱، تکثیر نواحی خارجی تر نسبت به توالی مورد نظر با استفاده از آغازگرهای (متابیون، آلمان) خارجی رفت و برگشت، در دستگاه ترموسایکلر (Labcyler، آلمان) با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA الگو، آغازگرهای خارجی رفت و برگشت هر کدام به مقدار ۱ میکرولیتر، ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس (امپلیکون، دانمارک) و ۶ میکرولیتر آب دیونیزه انجام گرفت. در این واکنش، DNA استخراج شده از نمونه پاپاسمیر زن آلوده به HPV18 به‌عنوان الگو استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز طبق برنامه دنا تورا سیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و در ۳۵ تکرار انجام شد. سپس، تکثیر قطعه رمزگذار پروتئین E6 با استفاده از محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز خارجی به‌عنوان الگو و آغازگرهای داخلی رفت و برگشت انجام شد. این واکنش در حجم ۱۰۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر DNA الگو، آغازگرهای داخلی

هدف این مطالعه، طراحی و ساخت یک وکتور بیانی عرضه‌کننده در سطح رمزگذار پروتئین تومورژنیک E6 HPV18 جهت بیان در میزبان مخمری *Yarrowia lipolytica* می‌باشد. چنین وکتوری علاوه بر فراهم ساختن امکان بیان در یک میزبان همولوگ و برخورداری از مزایای سیستم بیانی مخمری، به دلیل هدایت پروتئین نو ترکیب سنتز شده به سطح سلول، مشکلات مربوط به تخلیص پروتئین مورد نظر را از مجموعه پروتئین‌های سلول میزبان مرتفع می‌سازد.

روش کار

در این پژوهش، برای دستیابی به توالی قطعه ژنی رمزگذار پروتئین E6 ویروس پاپیلومای انسانی، از بانک ژنی موجود در پایگاه اینترنتی NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) استفاده شد. هم‌چنین، برای طراحی آغازگرها و بررسی دقیق‌تر آنها از نرم‌افزارهای Gene runner 6.5.48 (<http://generunner.net>) و BLAST و بررسی نتایج تعیین توالی از نرم‌افزار Chromas 2.6.6 (<http://technelysium.com.au/wp/chromas>) استفاده گردید.

¹ Nested-PCR

سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه در ۳۰ چرخه انجام گرفت. در نهایت، کیت تخلیص DNA (GeneJET PlasmidMiniprep, Thermo Scientific) برای تخلیص مولکول DNA مورد استفاده قرار گرفت.

رفت و برگشت هر کدام به حجم ۲/۵ میکرولیتر، ۵۰ میکرولیتر مسترمیکس و ۳۵ میکرولیتر آب دیونیزه طبق برنامه دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای داخلی و خارجی

آغازگرها	توالی آغازگرها
18F	5'GAAACACACCACAATACCATG3'
18R	5'CGTCTGTACCTTCTGGATC3'
186F	5'TGAGAAACGGCCGTTCTGGCCATGGCGCGCTTTGAG3'
186R	5'TACTTAAAGCTTTACTTGTGTTTCTCTGCGTCG3'

Scientific، آمریکا) و بافر مربوطه ترکیب و در دمای ۲۲ درجه به مدت یک ساعت انکوبه گردید. جهت اطمینان از فرآیند اتصال دو قطعه، ترکیب فوق به یخچال ۴ درجه به مدت ۲۴ ساعت منتقل شد تا فعالیت آنزیم تکمیل گردد و سرانجام پلاسمید نوترکیب pINA1317-YICWP110-E6 تشکیل شود.

ترانسفورماسیون محصول لایگیشن به دست آمده،

به درون میزبان باکتریایی E.coli TOP10

در این مرحله، محصول واکنش لایگیشن به دست آمده در مرحله قبل به درون میزبان باکتریایی E.coli TOP10 ترانسفورم شد. انتخاب کلونی‌های ترانسفورم شده از طریق کشت محصول ترانسفورماسیون بر روی پلیت دارای آنتی‌بیوتیک کانامایسین انجام و کلونی‌های به دست آمده مورد تکثیر و ذخیره‌سازی قرار گرفتند. سرانجام کلونی‌های مورد نظر در محیط کشت مایع حاوی کانامایسین تکثیر شده و DNA پلاسمیدی استخراج شد.

انتخاب کلنی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب با

استفاده از روش‌های مولکولی

جهت اطمینان از صحت انجام همسانه‌سازی، پلاسمید به دست آمده در چند مرحله مورد بررسی قرار گرفت. بررسی‌های اولیه توسط کلنی-PCR انجام شد. سپس، جهت اطمینان بیشتر، پلاسمید به دست آمده تحت برش آنزیمی با استفاده از آنزیم محدودگر NotI قرار گرفت. این آنزیم دارای دو جایگاه برشی بر روی بدنه

تکثیر و آماده‌سازی پلاسمید pINA1317-YICWP110

به منظور دست‌یابی به مقادیر کافی از پلاسمید pINA1317-YICWP110 برای همسانه‌سازی، پلاسمید مورد نظر به درون میزبان باکتریایی E.coli TOP10 ترانسفورم شد. انتخاب کلونی‌های ترانسفورم شده با کشت محصول ترانسفورماسیون بر روی پلیت دارای آنتی‌بیوتیک کانامایسین انجام گرفت. کلونی‌های مورد نظر در محیط کشت مایع حاوی کانامایسین تکثیر شده و استخراج پلاسمید (GeneJET Plasmid Miniprep, Thermo Scientific، آمریکا) انجام گرفت.

انتقال قطعه ژنی رمزگذار پروتئین E6 به درون

پلاسمید pINA1317-YICWP110

برش قطعه ژنی رمزگذار پروتئین E6 و پلاسمید pINA1317-YICWP110، با استفاده از دو آنزیم محدودگر HindIII و SfiI (ThermoScientific، آمریکا) به صورت متوالی انجام شد. بعد از هر برش آنزیمی، غیرفعال‌سازی آنزیم مورد نظر با استفاده از گرماگذاری در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. سپس، محصول برش آنزیمی با استفاده از کیت تخلیص DNA، شستشو داده و تخلیص شد. در نهایت، قطعات برش خورده قطعه ژنی رمزگذار پروتئین E6 و پلاسمید pINA1317-YICWP110 به نسبت ۵ به ۱ با آنزیم T4 لیگاز (Thermo

وکتور می‌باشد که برش با آن به دو قطعه با طول متفاوت منجر می‌گردد.

توالی‌یابی سنگر

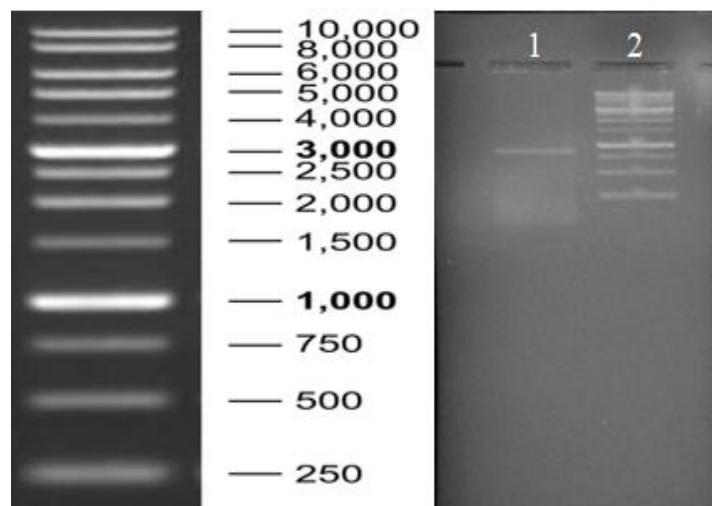
پس از تأیید همسانه‌سازی قطعه ژنی رمزگذار پروتئین E6 در پلاسمید pINA1317-YICWP110 با استفاده از روش‌های مولکولی، جهت اطمینان از صحت توالی و چارچوب قرار گرفتن قطعه ژنی همسانه‌سازی شده در جایگاه مناسب، پلاسمید نوترکیب pINA1317-YICWP110-E6 به روش سنگر توسط شرکت پیشگام تعیین توالی شد. در نهایت، توالی به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار Chromas و هم-ردیفی با داده‌های موجود در بانک ژن مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

قطعه ژنی رمزگذار پروتئین E6 ویروس پاپیلوما‌ی انسانی تیپ ۱۸ با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز خارجی

با استفاده از آغازگرهای خارجی، تکثیر نواحی خارجی‌تر نسبت به توالی مورد نظر صورت گرفت. محصول این واکنش، ۸۵۲bp طول دارد. جهت اطمینان از صحت انجام این واکنش، ۵ میکرولیتر از محصول واکنش PCR روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شد. همان‌طور که در شکل قابل مشاهده است، باند مدنظر در محدوده ۷۵۰ تا ۱۰۰۰ جفت‌بازی نسبت به مارکر وزن مولکولی DNA قرار دارد (شکل ۱).

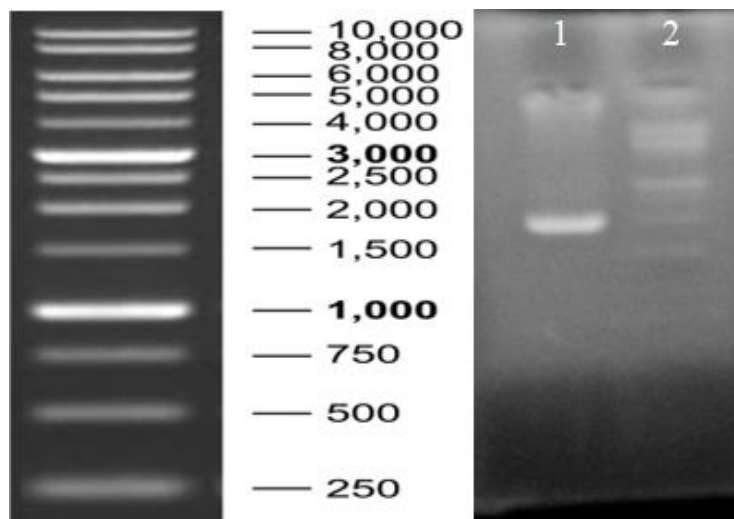


شکل ۱- محصول واکنش PCR خارجی تکثیر کننده قطعه ژنی رمزگذار پروتئین E6

آنزیم‌های محدودگر فراهم شده است. جهت اطمینان از صحت انجام این واکنش، ۵ میکرولیتر از محصول واکنش PCR روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شد. همان‌طور که در شکل قابل مشاهده است، باند مورد نظر در محدوده ۲۵۰-۵۰۰ جفت‌بازی نسبت به مارکر وزن مولکولی DNA قرار دارد (شکل ۲).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز داخلی

محصول به‌دست آمده از واکنش PCR خارجی، به عنوان الگو، در واکنش PCR داخلی مورد استفاده قرار گرفت. محصول این واکنش ۴۹۲ جفت‌باز طول دارد و شامل قطعه ژنی رمزگذار پروتئین E6 است که در دو طرف آن توالی‌های مورد نیاز جهت برش توسط



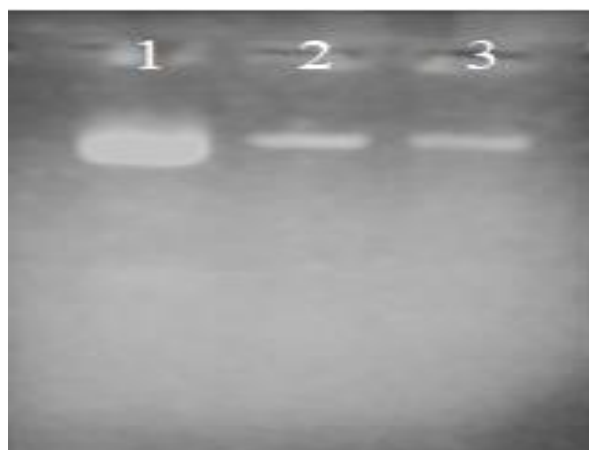
شکل ۲- محصول واکنش PCR داخلی تکثیر کننده قطعه ژنی رمزگذار پروتئین E6

برش آنزیمی دوگانه پلاسمید pINA1317- YICWP110 با استفاده از آنزیم‌های محدودگر SfiI و HindIII

پلاسمید pINA1317-YICWP110 پس از برش متوالی با آنزیم‌های محدودکننده، به همراه پلاسمید برش نخورده بر روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شد. همان‌طور که در تصویر مشاهده می‌شود، باند مربوط به برش آنزیمی دوگانه (ستون ۳) نسبت به باند برش تک آنزیمی (ستون ۲) کوتاه‌تر می‌باشد (شکل ۳).

استخراج DNA پلاسمیدی pINA1317- YICWP110

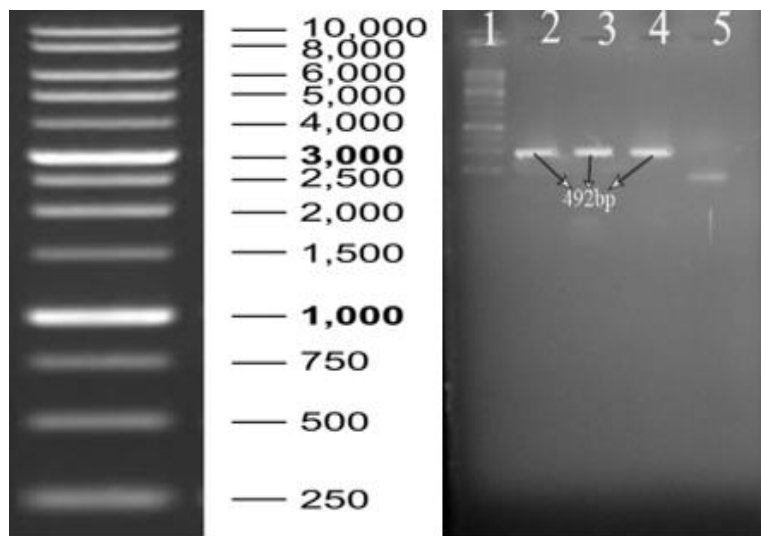
به منظور انجام همسانه‌سازی، DNA پلاسمید pINA1317-YICWP110 طبق پروتکل شرکت سازنده استخراج و بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد. طول این پلاسمید ۵۶۶۵ جفت‌باز می‌باشد و باند مربوط به آن در محدوده ۶۰۰۰-۵۰۰۰ جفت‌بازی نسبت به مارکر وزن مولکولی DNA قابل مشاهده است.



شکل ۳- برش پلاسمید pINA1317-YICWP110 توسط آنزیم‌های محدودگر. ۱: پلاسمید برش نخورده، ۲: پلاسمید برش خورده با آنزیم محدودگر SfiI، ۳: پلاسمید پس از برش آنزیمی دوگانه.

ترانسفورماسیون محصول لایگیشن قطعه ژنی رمزگذار پروتئین HPV18 E6 به درون پلاسمید pINA1317-**E. coli** YICWP110، به درون میزبان باکتریایی **TOP10** در این مرحله، محصول به دست آمده از واکنش اتصال قطعه ژنی رمزگذار پروتئین HPV18 E6 با پلاسمید pINA1317-YICWP110، به درون میزبان باکتریایی **E. coli** TOP10 ترانسفورم و کلونی‌های به دست آمده برای بررسی‌های مولکولی همسانه‌سازی انتخاب شدند.

کلنی-PCR بر روی کلنی‌های حاصل از ترانسفورماسیون به منظور بررسی سریع حضور قطعه ژنی رمزگذار پروتئین HPV18 E6 درون کلنی‌های حاصل از ترانسفورماسیون، واکنش کلنی-PCR انجام شد. باندهای چاهک‌های ۲، ۳ و ۴ حاکی از حضور پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه رمزگذار پروتئین E6 در کلنی‌های مورد مطالعه می‌باشد (شکل ۴).

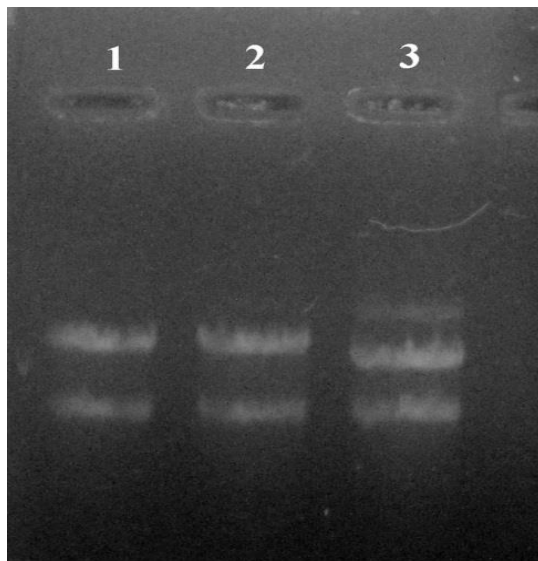


شکل ۴- کلنی-PCR تأییدکننده حضور قطعه ژنی رمزگذار پروتئین E6 درون کلنی‌های حاصل از ترانسفورماسیون. ستون ۱: مارکر وزن مولکولی DNA، ستون‌های ۲، ۳ و ۴: کلونی‌های مثبت، ستون ۵: کلنی منفی.

طول یکی از قطعات که شامل منطقه خارج از محل همسانه‌سازی می‌باشد، در پلاسمیدهای نوترکیب و غیرنوترکیب یکسان است (باند پایینی). طول قطعه دوم که در بردارنده منطقه همسانه‌سازی قطعه ژنی رمزگذار پروتئین HPV18 E6 می‌باشد، در پلاسمید نوترکیب pINA1317-YICWP110-E6 نسبت به پلاسمید غیرنوترکیب بیشتر بوده و باند مربوط به آن در الکتروفورز ژل آگارز بالاتر مشاهده می‌گردد (شکل ۵).

برش پلاسمید pINA1317-YICWP110-E6 نوترکیب توسط آنزیم NotI

پس از تأیید حضور قطعه ژنی رمزگذار پروتئین E6 HPV18 درون کلنی‌های حاصل از ترانسفورماسیون، استخراج DNA پلاسمیدی از کشت مایع کلنی‌های مثبت انجام شد. سپس این پلاسمیدها و پلاسمید غیرنوترکیب توسط آنزیم محدودگر NotI برش یافتند که منجر به ایجاد دو قطعه با طول متفاوت گردید.



شکل ۵- برش آنزیمی DNA پلاسمیدی توسط آنزیم NotI. ۱ و ۲: پلاسمیدهای pINA1317-YICWP110-E6 نو ترکیب. ۳: پلاسمید غیر نو ترکیب pINA1317-YICWP110

فعال‌سازی ایمنی مبتنی بر سلول‌های T، از اثرات درمانی واکسن‌های مذکور برای بهبود بیماری افراد آلوده به ویروس بهره‌مند گردند (۳، ۱۷، ۱۹، ۲۰، ۳۳). در این راستا، استفاده از مدل حیوانی که در آن تحریک سلول‌های ایمنی T با آنتی‌ژن غیرساختاری، تومورهای موجود را کنترل کرده بود، اثربخشی بالقوه واکسن درمانی علیه آلودگی پاپیلوما ویروس را نشان داد (۳۴). در مطالعه بوریسویک و همکاران (۱۹۹۶) و کوفمان و همکاران (۲۰۰۲) که فازهای کلینیکی واکسن مبتنی بر ویروس MVA^۱ را به‌عنوان پلاسمید بیان‌کننده قطعات ژنی رمزگذار پروتئین‌های E6 و E7 تیپ‌های ۱۸ و ۱۶ ویروس پاپیلوما‌ی انسانی مورد مطالعه قرار دادند، نتایج حاکی از بیان موفق پروتئین‌های E6 و E7 تیپ‌های ۱۶ و ۱۸ ویروس پاپیلوما‌ی انسانی مورد مطالعه قرار دادند، نتایج حاکی از بیان موفق پروتئین‌های E6 و E7 تیپ‌های ۱۶ و ۱۸ ویروس پاپیلوما‌ی انسانی و ایجاد CTL^۲‌های اختصاصی علیه ویروس در ۲۸٪ از بیماران دارای سرطان پیشرفته گردنه رحم در فاز اول و دوم تحقیق و دست‌کم ۴۰٪ کاهش در زخم‌های بافتی ایجاد شده در ۸۳٪ از بیماران در سنین بین ۴۲-۵۴ سال بود (۳۵، ۳۶). در رویکرد دیگری، سلول‌های دندریتیکی در معرض آنتی‌ژن انکوپروتئین E7 تیپ‌های ۱۶ و ۱۸ ویروس پاپیلوما‌ی انسانی و با همراهی KLH^۳ (نوعی مولکول ردیاب

بررسی نتیجه تعیین توالی، با استفاده از نرم‌افزار Chromas و بررسی هم‌ردیفی آن

پس از تأیید همسانه‌سازی قطعه ژنی رمزگذار پروتئین HPV18 E6 به درون پلاسمید pINA1317-YICWP110، توالی پلاسمید نو ترکیب pINA1317-YICWP110-E6 به‌روش سنگر تعیین و با داده‌های موجود در بانک ژنی پایگاه NCBI مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان دادند در طی همسانه‌سازی، صحت توالی DNA حفظ شده و قطعه ژنی در جایگاه صحیح به درون پلاسمید pINA1317-YICWP110 همسانه‌سازی شده است (پیوست).

بحث

آلودگی افراد با تیپ‌های ریسک بالای HPV نقش مهمی در ایجاد سرطان به‌ویژه در دستگاه ادراری-تناسلی ایفا می‌کند. واکسن‌های اولیه بر علیه این ویروس معمولاً بر پایه پروتئین‌های ساختاری ویروس، طراحی شده‌اند و نقش پیش‌گیری‌کننده دارند (۱۷). با توجه به نقش انکوپروتئین‌های E5، E6 و E7 ویروس پاپیلوما‌ی انسانی در توسعه سرطان‌های ناشی از HPV، اخیراً بخشی از تحقیقات بر روی بیماری‌زایی HPV، به توسعه واکسن‌های مبتنی بر این انکوپروتئین‌ها اختصاص یافته است تا علاوه بر پیش‌گیری از ابتلاء به ویروس، از طریق

¹ Modified Vaccinia virus Ankara

² Cytotoxic T lymphocyte

³ Keyhole limpet hemocyanin

ایمونولوژیکی) قرار گرفت. این واکسن در سال ۲۰۰۸ در ۱۰ بیمار مبتلا به سرطان گردنه رحم بررسی شد و نتیجه آن، تولید سلول‌های CD4+ اختصاصی علیه پروتئین E7 در تمام بیماران و همچنین تحمل ایمنی مناسب واکسیناسیون با کمترین میزان سمیت بود (۳۷). همچنین در مطالعه بالدوین و همکاران (۲۰۰۳)، یک واکسن پپتید مصنوعی E6 و E7 HPV16 توانست به‌طور جدی تعداد و فعالیت سلول‌های CD4⁺ T و CD8⁺ خاص HPV16 را برای یک طیف گسترده‌ای از اپی‌توپ‌ها در تمام بیماران مورد مطالعه افزایش دهد که نشان‌دهنده پتانسیل این واکسن برای ایمونوتراپی در آلودگی‌های پیشرونده، ضایعات و بدخیمی‌های ناشی از HPV16 بود (۳۸). میزان‌های مخمری از دیرباز به منظور تولید پروتئین‌های نوترکیب کوچک یوکاریوتی، به‌ویژه پروتئین‌های ویروسی مورد استفاده بوده‌اند. چنانچه واکسن گارداسیل به‌عنوان اولین واکسن مورد استفاده بر علیه HPV نیز در میزان مخمری *Saccharomyces cerevisiae* تولید شده است (۱۷، ۳۹، ۴۰). دگنهارت و همکار (۲۰۰۱)، وکتورهای نوترکیب E6-pCRII تیپ ۶ و ۱۸ ویروس پاپیلومای انسانی را ساختند. آنها از سیستم دو هیبریدی مخمر برای غربالگری کتابخانه cDNA استفاده کردند (۴۱). میرشهابی و همکاران (۲۰۱۲)، انکوپروتئین E6 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶ را در وکتور pTZ57R/T- E6 جهت تولید وکتور بیانی همسانه‌سازی کردند و در نهایت، ژن هدف در یک ناقل بیانی یوکاریوتی pcDNA3 ساب کلون گردید (۴۲). همچنین، منیری و همکاران (۲۰۲۰)، همسانه‌سازی انکوپروتئین‌های E6 و E7 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۸ را در وکتور بیانی pPiczaB به‌منظور بیان در مخمر *Pichia pastoris* انجام دادند (۴۳، ۴۴). نتایج تحقیقات مختلف در این زمینه نشان می‌دهد که با وجود در دسترس بودن انواع تجاری مختلف از پروتئین‌های HPV با کاربرد تشخیصی، پیشگیری و درمانی، تحقیقات برای بهبود روش‌های تولید و عرضه پروتئین‌های مذکور به سلول‌ها و افراد با کمترین هزینه و بیشترین بازدهی ادامه دارد. نقش مؤثر واکسن‌های در حال توسعه مبتنی بر

انکوپروتئین‌های ویروسی در کنترل بیماری‌های مرتبط با HPV از یک‌سو و مزایای سیستم‌های بیانی عرضه سطحی از سوی دیگر، منجر به طراحی و ساخت یک سازه بیانی عرضه‌کننده در سطح رمزگذار پروتئین E6 HPV18 جهت بیان در میزبان مخمری در تحقیق حاضر گردید تا در کنار بهره جستن از مزایای سیستم بیانی یوکاریوتی و سادگی سیستم مخمری نسبت به سیستم‌های بیانی یوکاریوت‌های عالی، به‌دلیل عرضه پروتئین نوترکیب در سطح سلول میزبان، مشکلات مربوط به جداسازی محصول پروتئینی نوترکیب از سایر پروتئین‌های درون سلول نیز مرتفع گردد.

نتیجه‌گیری

پلاسمیدهای عرضه‌کننده در سطح، به‌دلیل عرضه پروتئین مورد نظر در سطح سلول میزبان بیان‌کننده، از اهمیت به‌سزایی در تولید پروتئین‌های نوترکیب، با هدف کاربرد به‌عنوان واکسن یا ارائه به سیستم ایمنی برخوردارند. با توجه به نقش مؤثر واکسیناسیون در پیش‌گیری از ابتلاء به HPV و عدم واکسیناسیون سراسری بر علیه این ویروس در ایران ساخت وکتورهای بیانی به‌منظور تولید پروتئین‌های نوترکیب این ویروس اهمیت ویژه‌ای دارند. در این مطالعه یک پلاسمید عرضه‌کننده در سطح نوترکیب (-YICWP110-pINA1317-E6) طراحی و ساخته شد که از قابلیت بیان در میزبان مخمری *Yarrowia lipolytica* برخوردار است. بررسی‌های مولکولی و تعیین توالی نوکلئوتیدی پلاسمید به‌دست آمده، همسانه‌سازی موفق قطعه ژنی رمزگذار پروتئین E6 HPV18 در جایگاه مناسب، با حفظ صحت توالی و ترادف نوکلئوتیدی را مورد تأیید قرار داد. با استفاده از این پلاسمید می‌توان به‌طور همزمان از مزایای عرضه پروتئین نوترکیب در سطح سلول میزبان، بیان پروتئین در سیستم همولوگ یوکاریوتی و سهولت تولید پروتئین در مخمر نسبت به یوکاریوت‌های عالی برخوردار شد. بیان پلاسمید pINA1317-E6-YICWP110 نوترکیب می‌تواند پروتئین E6 HPV18 را به‌منظور استفاده به‌عنوان واکسن یا درمان افراد آلوده فراهم نماید.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از جناب آقای دکتر ناصر پولادی و جناب آقای دکتر داود فرج زاده که با سعه صدر، امکانات

آزمایشگاهی خود را در اختیار گروه پژوهشی این مقاله گذاشتند، سپاس و قدردانی می شود.

منابع

1. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature reviews cancer* 2002; 2(5):342-50.
2. Ma B, Maraj B, Tran NP, Knoff J, Chen A, Alvarez RD, et al. Emerging human papillomavirus vaccines. *Expert opinion on emerging drugs* 2012; 17(4):469-92.
3. Wang R, Pan W, Jin L, Huang W, Li Y, Wu D, et al. Human papillomavirus vaccine against cervical cancer: Opportunity and challenge. *Cancer letters* 2020; 471:88-102.
4. Roden RB, Stern PL. Opportunities and challenges for human papillomavirus vaccination in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2018; 18(4):240-54.
5. Moniri Javadhesari S, Khakpour K, Pourseif S, Mozaffari H. Common Genotypes of Human Papillomavirus in East Azerbaijan Population using HPV Direct Flow CHIP Kit. *Iran J Obstet Gynecol Infertil* 2020; 23(5):18-25.
6. Malary M, Moosazadeh M, Hamzehgardeshi Z, Afshari M, Moghaddasifar I, Afsharimoghaddam A. The prevalence of cervical human papillomavirus infection and the most at-risk genotypes among Iranian healthy women: A systematic review and meta-analysis. *International journal of preventive medicine* 2016; 7.
7. de Sanjose S, Brotons M, Pavon MA. The natural history of human papillomavirus infection. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology* 2018; 47:2-13.
8. Chabeda A, Yanez RJ, Lamprecht R, Meyers AE, Rybicki EP, Hitzeroth II. Therapeutic vaccines for high-risk HPV-associated diseases. *Papillomavirus research* 2018; 5:46-58.
9. Mirkovic J, Howitt BE, Roncarati P, Demoulin S, Suarez-Carmona M, Hubert P, et al. Carcinogenic HPV infection in the cervical squamo-columnar junction. *The Journal of pathology* 2015; 236(3):265-71.
10. Mena M, Frias-Gomez J, Taberna M, Quirós B, Marquez S, Clavero O, et al. Epidemiology of human papillomavirus-related oropharyngeal cancer in a classically low-burden region of southern Europe. *Scientific reports* 2020; 10(1):1-11.
11. Vorsters A, Bosch FX, Bonanni P, Franco EL, Baay M, Simas C, et al. Prevention and control of HPV infection and HPV-related cancers in Colombia-a meeting report. *BMC proceedings* 2020; 14(9):1-13.
12. Alemany L, Saunier M, Alvarado-Cabrero I, Quiros B, Salmeron J, Shin HR, et al. Human papillomavirus DNA prevalence and type distribution in anal carcinomas worldwide. *International journal of cancer* 2015; 136(1):98-107.
13. Haręza DA, Wilczyński JR, Paradowska E. Human papillomaviruses as infectious agents in gynecological cancers. oncogenic properties of viral proteins. *International Journal of Molecular Sciences* 2022; 23(3):1818.
14. Bahramabadi R, Honarvar Z, Iranpour M, Arababadi MK, Dehesh T, Dabiri B, et al. Epidemiological Study of Various HPV Strains in Cervical Fluid Samples in South-Eastern Iran, 2018–2020. *Archives of Iranian Medicine* 2021; 24(9):678.
15. Kesheh MM, Keyvani H. The prevalence of HPV genotypes in Iranian population: An Update. *Iranian journal of pathology* 2019; 14(3):197.
16. Sabet F, Mosavat A, Ghezdasht SA, Basharkhah S, Shamsian SA, Abbasnia S, et al. Prevalence, genotypes and phylogenetic analysis of human papillomaviruses (HPV) in northeast Iran. *International journal of infectious diseases* 2021; 103:480-8.
17. Moniri Javadhesari S, Pourseif S, Khakpour K. Nucleic acid vaccines for human papillomavirus; prevention or treatment. *Iran J Obstet Gynecol Infertil* 2019; 22(7):77-88.
18. Aggarwal P. HPV Infection: Pathogenesis and Detection. In *Preventive Oncology for the Gynecologist* 2019:101-115.
19. Cheng L, Wang Y, Du J. Human papillomavirus vaccines: an updated review. *Vaccines* 2020; 8(3):391.
20. Derstenfeld A, Cullingham K, Ran ZC, Litvinov IV. Review of evidence and recommendation for human papillomavirus (HPV) vaccination of Canadian males over the age of 26 years. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery* 2020; 24(3):285-91.
21. Wang D, Liu X, Wei M, Qian C, Song S, Chen J, et al. Rational design of a multi-valent human papillomavirus vaccine by capsomere-hybrid co-assembly of virus-like particles. *Nature communications* 2020; 11(1):1-15.
22. Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, De Sanjosé S, Fakhry C, Monk BJ, et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nature reviews Disease primers* 2016; 2(1):1-20.
23. Howie HL, Katzenellenbogen RA, Galloway DA. Papillomavirus E6 proteins. *Virology* 2009; 384(2):324-34.
24. Pol SB, Klingelutz AJ. Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology* 2013; 445(1-2):115-37.
25. Thomas M, Banks L. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *Journal of General Virology* 1999; 80(6):1513-7.

26. Alibek K, Irving S, Sautbayeva Z, Kakpenova A, Bekmurzayeva A, Baiken Y, et al. Disruption of Bcl-2 and Bcl-xL by viral proteins as a possible cause of cancer. *Infectious agents and cancer* 2014; 9(1):1-13.
27. Owczarek B, Gerszberg A, Hnatuszko-Konka K. A brief reminder of systems of production and chromatography-based recovery of recombinant protein biopharmaceuticals. *BioMed research international* 2019; 2019.
28. Wei HY, Jiang LF, Xue YH, Fang DY, Guo HY. Secreted expression of dengue virus type 2 full-length envelope glycoprotein in *Pichia pastoris*. *Journal of virological methods* 2003; 109(1):17-23.
29. Dumont J, Euwart D, Mei B, Estes S, Kshirsagar R. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Critical reviews in biotechnology* 2016; 36(6):1110-22.
30. Nielsen J. Production of biopharmaceutical proteins by yeast: advances through metabolic engineering. *Bioengineered* 2013; 4(4):207-11.
31. Lin K, Roosinovich E, Ma B, Hung CF, Wu TC. Therapeutic hpv DNA vaccines. *Immunologic research* 2010; 47(1):86-112.
32. Yue L, Chi Z, Wang L, Liu J, Madzak C, Li J, et al. Construction of a new plasmid for surface display on cells of *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Microbiological Methods* 2008; 72(2):116-23.
33. Trimble CL, Clark RA, Thoburn C, Hanson NC, Tassello J, Frosina D, et al. Human papillomavirus 16-associated cervical intraepithelial neoplasia in humans excludes CD8 T cells from dysplastic epithelium. *The Journal of Immunology* 2010; 185(11):7107-14.
34. De Jong A, O'Neill T, Khan AY, Kwappenberg KM, Chisholm SE, Whittle NR, et al. Enhancement of human papillomavirus (HPV) type 16 E6 and E7-specific T-cell immunity in healthy volunteers through vaccination with TA-CIN, an HPV16 L2E7E6 fusion protein vaccine. *Vaccine* 2002; 20(29-30):3456-64.
35. Borysiewicz LK, Fiander A, Nimako M, Man S, Wilkinson GW, Westmoreland D, et al. A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *The Lancet* 1996; 347(9014):1523-7.
36. Kaufmann AM, Stern PL, Rankin EM, Sommer H, Nuessler V, Schneider A, et al. Safety and immunogenicity of TA-HPV, a recombinant vaccinia virus expressing modified human papillomavirus (HPV)-16 and HPV-18 E6 and E7 genes, in women with progressive cervical cancer. *Clinical Cancer Research* 2002; 8(12):3676-85.
37. Santin AD, Bellone S, Palmieri M, Zanolini A, Ravaggi A, Siegel ER, et al. Human papillomavirus type 16 and 18 E7-pulsed dendritic cell vaccination of stage IB or IIA cervical cancer patients: a phase I escalating-dose trial. *Journal of virology* 2008; 82(4):1968-79.
38. Baldwin PJ, van der Burg SH, Boswell CM, Offringa R, Hickling JK, Dobson J, et al. Vaccinia-expressed human papillomavirus 16 and 18 e6 and e7 as a therapeutic vaccination for vulval and vaginal intraepithelial neoplasia. *Clinical Cancer Research* 2003; 9(14):5205-13.
39. Zheng Y, Wang Z, Ji X, Sheng J. Display of a sucrose isomerase on the cell surface of *Yarrowia lipolytica* for synthesis of isomaltulose from sugar cane by-products. *3 Biotech* 2019; 9(5):1-7.
40. Bazan SB, de Alencar Muniz Chaves A, Aires KA, Cianciarullo AM, Garcea RL, Ho PL. Expression and characterization of HPV-16 L1 capsid protein in *Pichia pastoris*. *Archives of virology* 2009; 154(10):1609-17.
41. Degenhardt YY, Silverstein SJ. Gps2, a protein partner for human papillomavirus E6 proteins. *Journal of virology* 2001; 75(1):151-60.
42. Mirshahabi H, Soleimanjahi H, Pourpak Z, Meshkat Z, Hassan ZM. Production of human papilloma virus type 16 e6 oncoprotein as a recombinant protein in eukaryotic cells. *Iranian journal of cancer prevention* 2012; 5(1):16.
43. Khakpour K. Designing and amplification of an Expression vector for E6 Protein of human papillomavirus type 18 in yeast [Master's thesis]. Iran. Faculty of Basic Science, Azarbaijan Shahid Madani University; 2020.
44. Pourseif S. Constructing a cassette for the expression of E7 protein of human papillomavirus type 18 in *pichia pastoris* [Master's thesis]. Iran. Faculty of Basic Science, Azarbaijan Shahid Madani University; 2020.

