NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.11/43 , 2021

Scan online to view this article

Design of Eukaryotic Vector Harboring L1-E7 Polyepitope Fusion Construct of High Risk Human Papillomaviruses

Elnaz Abbasifarid[1], Azam Bolhassani[*2], Shiva Irani[1], Fattah Sotoodehnejadnematalahi[1]

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Abstract:

Aim and Background: Human Papillomaviruses (HPV) infection was known to be the leading cause of cervical cancer. Cervical cancer is the fourth most common cancer among women in the world. Designing a DNA vaccine with therapeutic properties as well as prevention can have a significant impact on reducing morbidity and mortality.

Materials and Methods: Gene sequences including the immunogenic and conserved epitopes of L1 and E7 proteins of high-risk papillomaviruses were designed. After synthesis of the L1-E7 fusion construct in pUC57 cloning vector, its subcloning was performed in pcDNA3.1 (-) eukaryotic vector. The concentration and purity of the recombinant pcDNA-L1E7 plasmid was determined by NanoDrop spectrophotometry.

Results: The gene sequence after cutting from pUC57-L1E7 by *Bam*HI/*Hind*III restriction enzymes, was subcloned in the same cloning site of pcDNA3.1 (-) vector. The presence of gene was confirmed by digestion with *Bam*HI/*Hind*III enzymes, as a 639 bp fragment on 1% agarose gel. The recombinant pcDNA-L1E7 plasmid was purified by endotoxin-free extraction kit for isolation of bacterial lipopolysaccharide. The concentration of the purified DNA was obtained about 1474 ng/ µl.

Conclusion: Cloning of the L1-E7 fusion construct in the eukaryotic vector was successful. In the next steps, the recombinant vector will be used for gene vaccine studies *in vivo*.

Key Words: Human papillomavirus, L1 protein, E7 protein, Eukaryotic expression vector, Iau Science.

Corresponding author:
Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
Email: azam.bolhassani@yahoo.com

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.44.1.5]

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۱ - شماره۴۴ - پاییز ۱۴۰۰
NCMBJ
مقاله پژوهشی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

طراحی وکتور یوکاریوتی حامل ساختار فیوژن پلی‌اپی‌توپی L1-E7 ویروس‌های پاپیلومای انسانی پر خطر

النازعباسی‌فرید[۱]، اعظم بوالحسنی*[۲]، شیوا ایرانی[۱]، فتاح ستوده‌نژاد نعمت‌الهی[۱]

۱. گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. بخش هپاتیت و ایدز، انستیتوپاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: آلودگی به HPV به‌عنوان اصلی‌ترین دلیل سرطان دهانه رحم شناخته می‌شود. این سرطان در دنیا، چهارمین سرطان شایع در میان زنان است. طراحی DNA واکسنی که علاوه‌بر پیشگیری، ویژگی‌های درمانی نیز داشته باشد می‌تواند در کاهش ابتلا و مرگ و میر تأثیر چشمگیری داشته باشد.

مواد و روش‌ها: توالی ژنی شامل اپی‌توپ‌های ایمونوژنیک و حفاظت شده پروتئین‌های L1 و E7 ویروس‌های پاپیلومای انسانی پر خطر طراحی گردید. پس از سنتز ساختار فیوژن L1-E7 در وکتور کلونینگ pUC57، ساب کلون کردن آن در وکتور یوکاریوتی pcDNA3.1(-) انجام شد. غلظت و خلوص پلاسمید نوترکیب pcDNA-L1E7 توسط اسپکتروفتومتری نانودراپ تعیین شد.

یافته‌ها: توالی ژنی موردنظر پس از برش از pUC57-L1E7 توسط آنزیم‌های محدود الاثر *BamH*I/*Hind*III، در جایگاه مشابه وکتور pcDNA3.1(-) ساب کلون شد. تأیید حضور ژن در وکتور توسط هضم آنزیمی با *BamH*I/*Hind*III، قطعه ۶۳۹ جفت بازی مربوط به ژن را روی ژل آگارز ۱ درصد نشان داد. پلاسمید نوترکیب pcDNA-L1E7 توسط کیت استخراج فاقد اندوتوکسین به منظور جداسازی لیپوپلی‌ساکارید باکتری تخلیص شد. غلظت DNA تخلیص شده، حدود ۱۴۷۴ نانوگرم/ میکرولیتر به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری: کلونینگ ساختار فیوژن L1-E7 در وکتور یوکاریوتی با موفقیت انجام گرفت. در مراحل بعدی از وکتور نوترکیب برای تحقیقات درون تنی واکسن ژنی استفاده خواهد شد.

واژگان کلیدی: ویروس پاپیلومای انسانی، پروتئین L1، پروتئین E7، وکتور بیان یوکاریوتی،Iau Science.

مقدمه

سرطان یکی از بیماری‌هایی است که همواره زندگی بشر را محدود کرده است. براساس برآوردهای آژانس بین المللی تحقیقات سرطان (IARC)، انتظار می‌رود که تا سال ۲۰۳۰ بار جهانی این بیماری به ۲۱/۴ میلیون مورد جدید ابتلا و ۳۱/۲ میلیون مرگ و میر افزایش یابد. سرطان دهانه رحم (Cervical Cancer) چهارمین سرطان شایع در زنان است (۱). به گزارش سازمان بهداشت جهانی تنها در سال ۲۰۱۸، ۵۷۰۰۰۰ مورد جدید ابتلا تشخیص داده شده است که حدود ۶/۶ درصد از همه سرطان‌های زنان را تشکیل می‌دهد. کمابیش ۹۰ درصد مرگ و میر ناشی از سرطان دهانه رحم در کشورهای کم درآمد و متوسط رخ می‌دهد. بالا بودن آمار مبتلایان به این نوع سرطان ضرورت انجام تحقیقات بیش‌تر برای پی بردن به روش‌های درمانی مؤثرتر را آشکار می‌سازد. با توجه به پیچیدگی مکانیسم و وجود

نویسنده مسئول:
بخش هپاتیت و ایدز، انستیتوپاستور ایران، تهران، ایران
پست الکترونیکی: azam.bolhassani@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۰۱

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-11-02]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.44.1.5]

عوامل متعدد در ایجاد سرطان تاکنون درمان قطعی برای این بیماری یافت نشده است اما امروزه از روش‌های درمانی مختلفی برای درمان سرطان دهانه رحم استفاده می‌شود که مشکلات عمده روشهای موجود، تهاجمی بودن، عدم اختصاصی بودن درمان، ناکارآمدی درمان‌ها در مراحل پیشرفته و کاهش جدی در کیفیت زندگی بیماران است (۳،۲). سرطان دهانه رحم با توجه به شکل ظاهری سلول-های سرطانی در زیر میکروسکوپ طبقه بندی می شود. انواع اصلی سرطان دهانه رحم شامل کارسینوم سلول-سنگفرشی و آدنوکارسینوما هستند. دهانه رحم از یک لایه اپیتلیوم خارجی و سلول‌های اپیتلیوم استوانه‌ای تشکیل شده است که موکوس را به کانال داخلی دهانه رحم ترشح می‌کنند. انتقال موکوس بین این دو جمعیت سلولی توسط اتصال ماکولار صورت می‌گیرد که به‌شدت در معرض عفونت‌های ویروسی قرار دارد. به این ترتیب تومورهایی که در بافت سطحی دهانه رحم ایجاد می‌شوند اغلب از نوع کارسینوماهای مربوط به سلول‌های سنگفرشی است که در اثر ابتلا به عفونت‌های ویروسی ایجاد شده و حدود ۸۰-۸۵ درصد از سرطان‌های مهاجم دهانه رحم را تشکیل می‌دهند (۴).

ویروس پاپیلوما یک گروه بزرگ از ویروس‌های بدون پوشش هستند که توانایی القاء تومور در سلول‌های پوششی را دارند و می‌تواند در قسمت‌های مختلف بدن زگیل‌ها یا توده‌هایی را ایجاد کنند. تاکنون ۲۲۱ نوع از انواع HPV شناسایی شده است که این تعداد هم‌چنین روبه افزایش است. ویروس HPV ۴۵-۵۵ نانومتر قطر دارد و ماده ژنتیکی آن به شکل DNA دو رشته‌ای و حلقوی است (۵). در دهه ۱۹۸۰ محققان دریافتند که HPV16 و HPV18 (از نوع ویروس-های سرطان‌زای پرخطر) هر دو نقش عمده‌ای را در ایجاد سرطان دهانه رحم دارند و در طول دو دهه بعد نقش سرطان‌زاییHPV به‌صورت گسترده‌ای در انواع دیگر سرطان‌ها مورد بررسی قرار گرفت و به اثبات رسید. در مجموع ۱۵ نوع HPV پرخطر شناسایی شده‌اند که شامل تایپ‌های ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۳۵، ۴۵، ۵۱، ۵۲، ۵۵، ۵۸، ۵۹، ۶۸، ۷۳، ۸۲ و ۸۳ می‌شوند (۶). ژنوم ویروس HPV شامل سه بخش می‌شود: ناحیه Early که۵۰ درصد از ژنوم را در بر گرفته و شامل E1 ، E2، E4-E7 است. ناحیه Late که شامل توالی کد کننده L1 (پروتئین اصلی کپسید ویروس) و L2 (جز دوم سازنده کپسید ویروس) است که حدود ۴۰ درصد از ژنوم را اشغال کرده است و ناحیه تنظیمی که شامل ۱۰ درصد از توالی ژنوم می‌شود (۷). واکسن‌هایی که هم‌اکنون برای ویروس پاپیلوما استفاده می‌شوند (گارداسیل و سرواریکس) واکسن‌های پیشگیری کننده هستند که به-صورت نوترکیب تهیه می‌شوند و در آن‌ها از پروتئین اصلی کپسید یعنی L1 برای تولید ذرات شبه ویروسی (VLP) استفاده می‌شود. واکسن‌هایی براساس VLP میزان زیادی از آنتی‌بادی را علیه پروتئین L1 در بدن ایجاد می‌کنند و به این طریق ایمنی علیه ویروس ایجاد می‌شود (۸). در آسیب-های مربوط به دهانه رحم که به‌وسیلهٔ HPV ایجاد می‌شوند افزایش تکثیر سلول‌های اپیتلیالی به بیان انکوژن‌های E6 و E7 نسبت داده می‌شود. پروتئین‌های E6 و E7 می‌توانند سلول‌ها را در محیط کشت نامیرا کنند و با فعال کردن انکوژن‌ها در سلول‌ها تغییرهای اساسی ایجاد کنند. بنابراین پروتئین‌های E6 و E7 در سلول‌های توموری می‌توانند اهداف درمانی مناسبی جهت طراحی واکسن‌های درمانی علیه سرطان دهانه رحم باشند. نتایج حاصل از ایمونوتراپی با استفاده از آنتی‌ژن‌های HPV علیه سرطان دهانه رحم نشان داده است که ایمنی‌زایی با E6 وE7 منجر به کنترل رشد تومور می‌شود. این مطالعه‌ها هم‌چنین نشان داده است که در این روش لنفوسیت T کشنده (CTL) به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های ایمنی تأثیرگذار عمل می‌کند. از آنجا که CTL ها به‌صورت اختصاصی علیه آنتی‌ژن‌های توموری عمل می‌کنند، می‌توانند در شرایط *in vivo* در بدن انسان رشد تومور را متوقف کنند (۷). از سوی دیگر سلول‌های T $CD4^+$ جهت تحریک هم‌زمان برای ایجاد پاسخ مناسب از سوی سلول‌های T $CD8^+$ مورد نیاز هستند. با درنظر گرفتن پپتیدهای مناسب می‌توان اقدام به تولید واکسن‌هایی کرد که قادر هستند توسط MHC-I و MHC-II ارائه شوند و از این طریق پاسخ‌های CTL و لنفوسیت T کمکی (HTL) مناسب را ایجاد کنند. به این ترتیب می‌توان از این روش-های درمانی در کنار روش‌های درمانی معمول برای از بین بردن آنچه از تومور به جا مانده است و جلوگیری از بازگشت تومور بهره گرفت (۱۰،۹).

واکسن‌های DNA یی مزایایی بر مدل‌های قدیمی واکسن دارند. این واکسن‌ها ایمنی و پایداری بیش‌تری دارند، هم-چنین تولید آن‌ها آسان‌تر است. به‌وسیله این واکسن‌ها می‌توان چندین آنتی‌ژن را مورد هدف قرار داد و از این طریق پاسخ ایمنی مناسب را ایجاد کرد (۱۱،۱۰). در مطالعه حاضر اقدام به تولید DNA وکتوری گردیده است که حامل اپی‌توپ‌های ایمنوژنیک پروتئین‌های L1 و E7 ویروس

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-11-02]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.44.1.5]

پاپیلومای انسانی است. توالی ارائه شده در این سازه توانایی اتصال به MHC-I و MHC-II را دارد. این سازه در آینده جهت تزریق درون تنی به‌عنوان DNA واکسن مورد استفاده قرار خواهد گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه ساختار پلی پپتید

در مطالعه قبلی ما (۱۱) با استفاده از روش های *in silico* دو اپی‌توپ از پروتئین های مربوط به L1 در دو سویه کم خطر HPV (۶،۱۱) و شانزده سویه پرخطر HPV (۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۱، ۵۲، ۵۵، ۵۸، ۵۹، ۶۸، ۷۳، ۸۲ و ۸۳) انتخاب شدند. هم‌چنین ۱۰ اپی‌توپ از پروتئین E7 مربوط به پنج سویه پرخطر HPV (۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳ و ۴۵) که طبق داده‌های مرکز اطلاعات HPV بیش‌ترین تأثیر را بر روی سرطان دهانه رحم داشتند، انتخاب شدند. اپی‌توپ‌های انتخابی قابلیت اتصال به MHC-I و MHC-II را داشتند و توسط سرویس دهنده NetMHCpan 4.0 و NetMHCII 2.3 مورد بررسی قرار گرفتند. هم‌چنین از نظر پاسخ ایمنی B cell نیز توسط نرم‌افزار Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0 بررسی شدند. موارد دیگری از قبیل آزمون حفظ شدگی توالی‌ها، آزمون پوشش جمعیتی، پیش‌بینی بیوانفورماتیک تولید سایتوکاین‌ها (IL-10 و IFN- γ)، ایمنی‌زایی، آلرژی‌زایی، آنتی ژنیسیته، توانایی همولیتیک، بررسی واکنش متقاطع با آنتی‌ژن‌های میزبان و آزمون داکینگ مولکولی در مورد اپی‌توپ‌های انتخابی انجام گرفت. جهت تشکیل ساختار پلی‌اپی‌توپ از ارتباط دهنده AAY (آلانین-آلانین-تیروزین) برای اتصال اپی‌توپ‌های انتخابی به یکدیگر استفاده شد.

جهت اطمینان از اپی‌توپ‌های طراحی شده و نتایج به‌دست آمده از بانک اطلاعاتی IEDB استفاده شد. جستجو براساس اپی‌توپ‌های خطی انجام شد. آزمون‌های مربوط به T cell و B cell مدنظر قرار داده شد. آنتی‌ژن‌های HPV در مورد پروتئین‌های L1 و E7 و محدود به MHC-I و MHC-II بررسی شدند. این جستجو در میزبان انسانی و برای هر نوع بیماری درنظر گرفته شد. در نهایت توالی پپتیدی اپی‌توپی فیوژن L1E7 توسط نرم‌افزار آنلاین EMBOSS Backtranseq به‌صورت توالی DNA ترجمه گردید.

طراحی وکتور کلونینگ pUC57-L1E7

سازه ۱۲ اپی‌توپی از پروتئین‌های L1 و E7 براساس سویه-های انتخابی و در نظر گرفته شدن اتصال‌به MHC-I و MHC-II طراحی شد. جایگاه برش آنزیمی *Bam*HI در سمت ′۵ و جایگاه برش آنزیمی *Hind*III در سمت ′۳ سازه جهت ساب کلون کردن به وکتور بیانی یوکاریوتی در توالی طراحی شده در نظر گرفته شد. وکتور کلونینگ pUC57L1E7 با ژن مقاومت‌به آمپی‌سیلین و پروموتر lac توسط شرکت بیومتیک کانادا سنتز شد.

کلون کردن فیوژن L1E7 در وکتور pcDNA 3.1

برای کلون کردن قطعه ژنی L1E7 در وکتور بیانی یوکاریوتی pcDNA3.1(-)، ابتدا قطعه توسط آنزیم‌های *Bam*HI/*Hind*III (شرکت Thermo Scientific) به روش هضم آنزیمی از pUC57-L1E7 خارج شد و به روش ساب کلون وارد وکتور pcDNA3.1(-) گردید. وکتور pcDNA3.1(-) یک وکتور بیانی یوکاریوتی، دارای پروموتر و توالی افزاینده سایتومگالوویروس است. هم‌چنین این وکتور دارای ژن مقاومت‌به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین است. از آنجایی که وکتور pcDNA3.1(-) دارای جایگاه برش آنزیمی *Bam*HI/*Hind*III است، وکتور مورد نظر با آنزیم-های محدود کننده برش داده شد. پس از نمونه‌گذاری پلاسمیدهای pcDNA3.1 و pUC57-L1E7 هضم شده در داخل چاهک ژل آگارز، پلاسمید خطی شده pcDNA3.1 و فیوژن L1E7 به روش استخراج از ژل توسط GEL/PCR Purification Mini Kit (FAVORGEN) خالص سازی شد. با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase (Fermentas)، قطعه L1E7 وارد وکتور تخلیص شده pcDNA3.1(-) گردید.

پس از الحاق، ترنسفورماسیون pcDNA-L1E7 در باکتری *E.coli* سویه DH5α به‌منظور تکثیر وکتور نوترکیب انجام گرفت.

تأیید ساب کلون کردن فیوژن L1E7 در pcDNA3.1(-)

پس از استخراج pcDNA-L1E7 توسط کیت استخراج DNA (FAVORGEN) جهت تأیید پلاسمید نوترکیب pcDNA-L1E7، ابتدا وکتور pcDNA-L1E7 تحت هضم آنزیمی دوگانه توسط *Bam*HI/*Hind*III قرار گرفت. سپس الکتروفورز آگارز یک درصد برای نمونه هضم شده انجام

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.44.1.5]

گرفت. برای ارزیابی اندازه مولکولی قطعه‌های ناشی از هضم آنزیمی از شاخص اندازه مولکولیKb ۱۰ استفاده شد. بعلاوه تعیین توالی ژن به‌روش سنگر توسط شرکت پیشگام انجام شد.

استخراج pcDNA-L1E7 فاقد اندوتوکسین در مقیاس زیاد

جهت تهیه pcDNA-L1E7 فاقد لیپوپلی‌ساکارید باکتری، ابتدا یک کشت باکتری ۸۰۰ میلی‌لیتر LB Broth حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین تهیه شد. میزان ۸۰۰ میکرولیتر از کشت اولیه باکتری تحت شرایط استریل به محیط کشت اضافه شد. برای مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور ۳۷ ^{o}C با دور ۳۰۰ در دقیقه قرار گرفت. در مرحله بعد رسوب‌گیری به‌وسیلهٔ سانتریفیوژ با دور g ۵۰۰۰ ، برای مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس با استفاده از کیت استخراج پلازمید عاری از اندوتوکسین (Macherey Nagel, Germany) اقدام به استخراج پلاسمید شد. غلظت و خلوص پلاسمید نوترکیب درنهایت توسط اسپکتروفتومتری نانودراپ تعیین شد. در پایان جهت اطمینان از صحت پلاسمید استخراج شده، الکتروفورز در ژل آگارز ۱٪ انجام گرفت.

نتایج

طراحی و تهیه ساختار ژنی پلی اپی توپی L1-E7

براساس مطالعه‌های قبلی ما (۱۱-۱۳)، اپی‌توپ‌هایی با بیش‌ترین پوشش آللی و سویه‌ای به‌عنوان اپی‌توپ‌های مناسب MHC-I و MHC-II انتخاب شدند. نشان داده شده است که نواحی زیادی از قطعه طراحی شده قابلیت پاسخ ایمنی B cell را دارند. اپی‌توپ‌های انتخابی از L1 بیش‌ترین تعداد سویه‌ها را پوشش می‌دهند. پوشش جمعیتی در نقاط مختلف و به‌طور کلی در جهان بررسی شد و نتایج نشان داد که اپی‌توپ‌های انتخابی حداقل ۴۶٪ و حداکثر ۹۹٪ جمعیت جهان را پوشش می‌دهند. نتایج پیش‌بینی تولید سایتوکاین‌ها نشان داد که تمام اپی‌توپ‌ها توانایی القاء IFN- γ را دارند و ۱۱ اپی‌توپ القاء کننده IL-4 هستند. هم‌چنین توالی‌های انتخابی آلرژی‌زا و یا سمی نبودند. داده‌ها نشان دادند که اپی‌توپ‌ها به‌میزان مناسبی ایمونوژن هستند. نتایج نشان داد که پپتیدهای انتخابی همولیتیک نبوده (hemolytic probability<1) و هیچ واکنش متقاطعی با پروتئوم انسان ندارند.

در این مطالعه، ساختار نهایی پلی‌اپی‌توپی شامل ۱۲ اپی‌توپ ایمنوژنیک و حفاظت شده L1، E7 (جدول ۱) در نهایت طراحی و برای سنتز سفارش داده شد (شکل ۱).

تهیه و تأیید pUC57-L1E7 از سویه باکتری

وکتور pUC57 با ژن مقاومت به آمپی‌سیلین ۲۷۱۰ bp طول دارد. با اضافه شدن فیوژن L1E7 در وکتور پس از سنتز، وکتوری با اندازه حدود ۳۳۱۳ bp ایجاد می‌شود (شکل ۲).

بعد از طی مراحل تکثیر pUC57-L1E7 در باکتری *E.coli* سویه DH5α، استخراج پلاسمید و هضم آنزیمی دوگانه بر روی وکتور توسط *Bam*HI/*Hind*III انجام شد. برش آنزیمی منجر به آشکارسازی دو قطعه به طول ۲۶۷۴ جفت باز مربوط به وکتور خطی شده و ۶۳۹ جفت باز مربوط به قطعه الحاقی L1E7 بر روی ژل آگارز ۱ درصد شد (شکل ۳).

کلون کردن فیوژن L1E7 در وکتور pcDNA3.1(-) و *تخلیص پلاسمید نوترکیب pcDNA-L1E7 فاقد اندوتوکسین:*

وکتور pcDNA3.1(-) با ژن مقاومت به آمپی‌سیلین ۵۴۲۷ جفت باز دارد. پس از برش قطعه ژنی از pUC57 با آنزیم‌های *Bam*HI/*Hind*III و الحاق قطعه ژنی L1E7 به درون وکتور بیانی pcDNA3.1(-)، وکتوری با اندازه ۶۰۴۸ جفت باز ایجاد شد (شکل ۴). تکثیر و استخراج وکتور pcDNA-L1E7 از باکتری *E.coli* سویه DH5α به میزان زیاد و به صورت فاقد اندوتوکسین انجام شد. غلظت pcDNA-L1E7 استخراج شده توسط نانودراپ حدود ۱۴۷۴ نانوگرم/ میکرولیتر به‌دست آمد. جهت تأیید وجود قطعه در وکتور، برش آنزیمی وکتور حامل توسط *Bam*HI/*Hind*III انجام شد. دو قطعه به طول ۵۴۲۷ جفت باز مربوط به وکتور خطی شده و ۶۳۹ جفت باز مربوط به قطعه الحاقی L1E7 بر روی ژل آگارز مشخص شد (شکل ۵).

بحث

واکسن‌هایی که هم‌اکنون برای مقابله با HPV به‌طور گسترده استفاده می‌شوند شامل Gardasil (۱۶و ۱۸)، Cervarix (۶، ۱۱، ۱۶ و ۱۸) و Gardasil-9 (۶، ۱۱، ۱۶،

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.44.1.5]

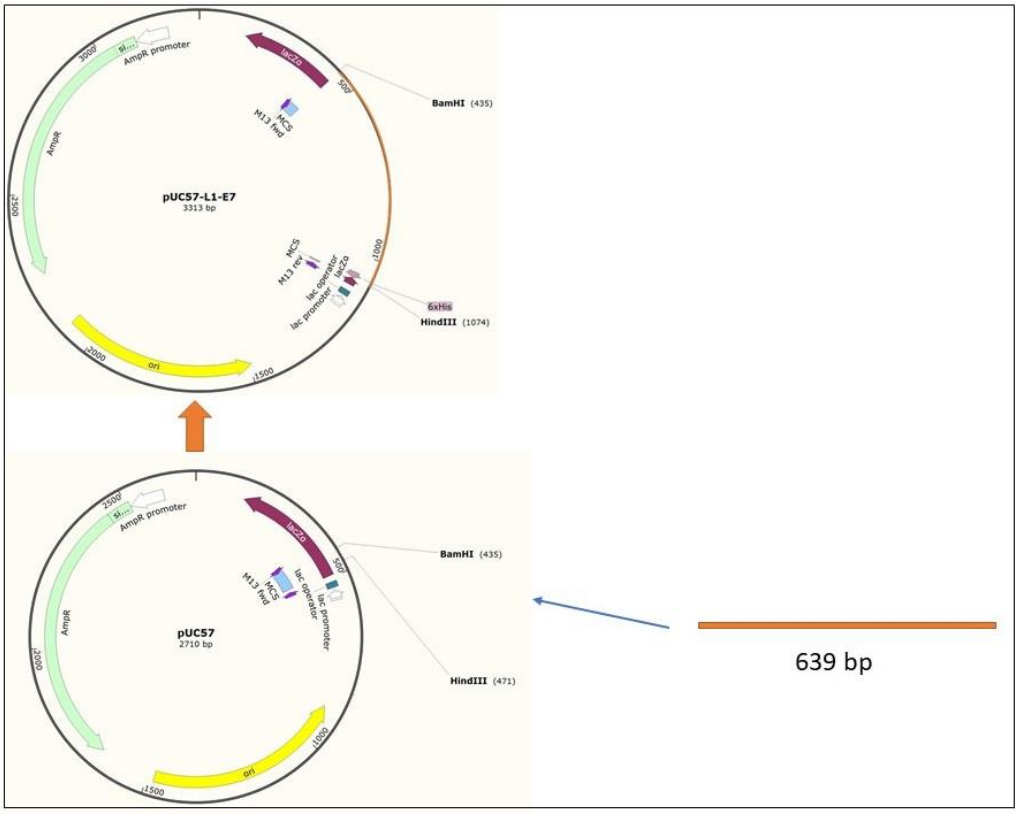
جدول ۱. اپی‌توپ‌های انتخابی مربوط به پروتئین‌های L1 و E7

پروتئین ویروسی	توالی	نوع MHC متصل شونده
L1	DLDQFPLGRKFLLQ	MHC-I
	NQLFVTVVDTTRSTN	MHC-II
E7	AEPDRAHYNIVTF (HPV16)	MHC-I
	HGPKATVQDIVLHL (HPV18)	MHC-I
	KPDTSNYNIVTF (HPV31)	MHC-I
	RPDGQAQPATADYYI (HPV33)	MHC-I
	RTLQQLFLSFV (HPV45)	MHC-I
	TLHEYMLDLQPETTD (HPV16)	MHC-II
	LRAFQQLFLNTLSFV (HPV18)	MHC-II
	PTLQDYVLDLQPEAT (HPV31)	MHC-II
	LKEYVLDLYPEPTDL (HPV33)	MHC-II
	LQQLFLSTLSFVCPW (HPV45)	MHC-II

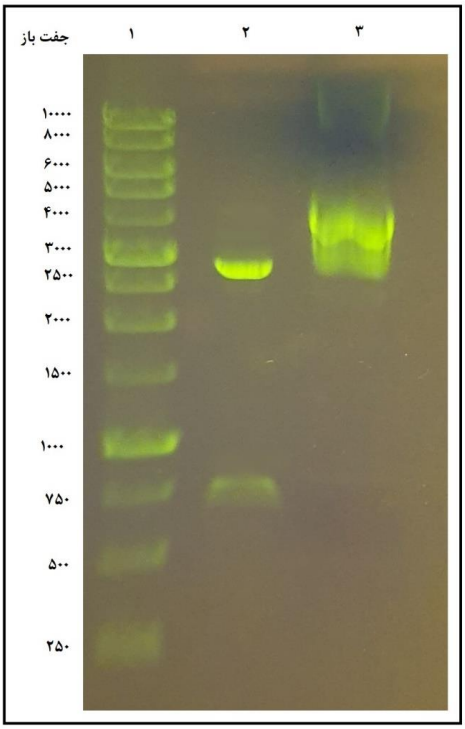
شکل ۱. سازه پپتیدی پلی‌اپی‌توپی L1E7 و توالی DNA مربوط به آن: ۱) سازه پپتیدی L1E7 با انتهای ×6 His-tag۲) توالی ژنی L1E7 به‌همراه جایگاه‌های آنزیم‌های محدود کننده

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.44.1.5]



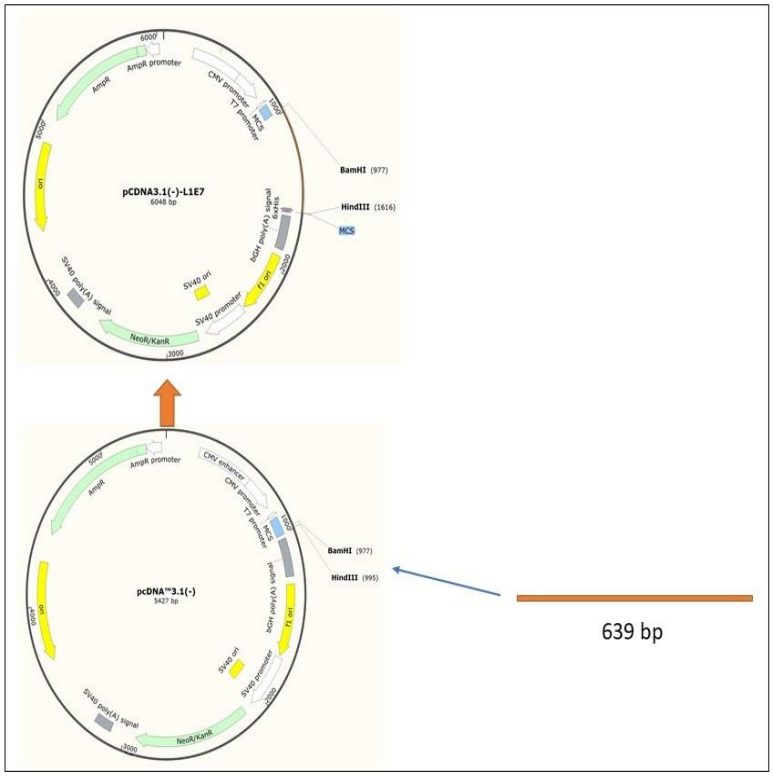
شکل۲. طراحی وکتور حامل فیوژن pUC57-L1E7: وکتور pUC57 حامل فیوژن L1E7 با اندازه ۳۳۱۳ جفت باز طراحی و سنتز شد.



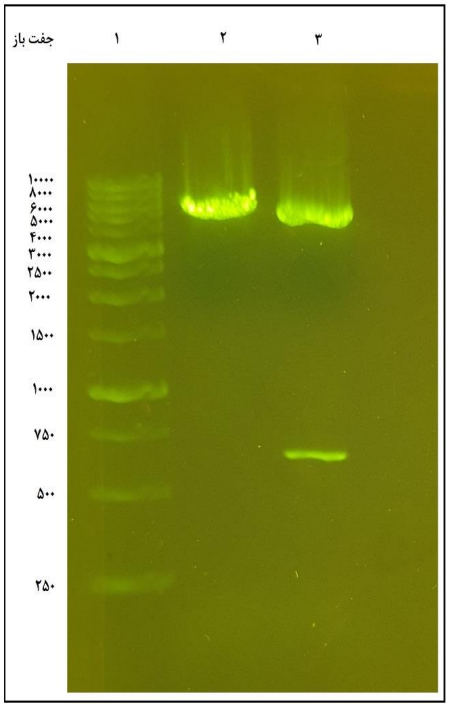
شکل ۳. الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ مربوط به وکتور pUC57-L1E7 هضم شده با آنزیم *BamHI/HindIII*: ستون ۱- شاخص اندازه مولکولی ۱۰kb (فرمنتاز)، ستون ۲- تأیید وکتور pUC57-L1E7 توسط هضم آنزیمی با *BamHI/HindIII*: باند حدود ۶۳۹ جفت بازی مربوط به فیوژن L1E7 روی ژل آگارز مشاهده شد، ستون ۳- وکتور تخلیص شده pUC57-L1E7.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.44.1.5]



شکل ۴. مدل شماتیک وکتور pcDNA-L1E7 با اندازه ۶۰۴۸ جفت باز



شکل ۵. الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ مربوط به وکتور pcDNA-L1E7 هضم شده با آنزیم *BamHI/HindIII*: ستون۱- شاخص اندازه مولکولی kb ۱۰(فرمنتاز)، ستون ۲- وکتور تخلیص شده pcDNA-L1E7، ستون ۳- تأیید وکتور pcDNA-L1E7 توسط هضم آنزیمی با *BamHI/HindIII*: باند حدود ۶۳۹ جفت بازی مربوط به فیوژن L1E7 روی ژل آگارز مشاهده شد.

۱۸، ۳۱، ۳۳، ۴۵، ۵۲ و ۵۸) هستند. این واکسن‌ها با استفاده از ترکیب ۳۶۰ کپی از پروتئین اصلی کپسید (L1) به‌صورت ذرات شبه ویروسی (VLP) ایجاد می‌شوند. واکسن‌های موجود در بازار پروفیلاکتیک هستند و با تزریق این واکسن‌ها آنتی‌بادی‌های خنثی کننده ویروس در بدن

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.44.1.5]

تولید می‌شوند (۱۵،۱۴). واکسن‌هایی که در حال حاضر استفاده می‌شوند قادر به مقابله با عفونت‌های پیشین نیستند و هم‌چنین سلول‌های آلوده را نیز حذف نمی‌کنند. علاوه‌بر این، تولید و انتقال این واکسن‌ها هزینه‌بر است و به‌همین دلیل در کشورهایی با درآمد کم و یا فقیر کاربرد گسترده‌ای ندارند (۱۶). از این‌رو علاوه‌بر در دسترس بودن برای عموم مردم، نیاز به واکسنی که درمانی باشد و قادر به ایجاد پاسخ سلول‌های $CD8^+$ T و $CD4^+$ باشد همواره احساس می‌شود. ژن‌های E6 و E7 اغلب تنها ژن‌های ویروسی هستند که در سلول‌های سرطانی به‌طور پیوسته بیان می‌شوند، از این‌رو اهداف درمانی مناسبی برای ایمونوتراپی سرطان دهانه رحم هستند (۱۷). در این مطالعه اقدام به طراحی یک سازه بر پایه وکتور pcDNA3.1(-) شد که حاوی نواحی ایمونوژنیک پروتئین اصلی ساختاری HPV (L1) و یک پروتئین انکوژنیک HPV (E7) است. براساس نتایج به‌دست آمده از بررسی‌های بیوانفورماتیک، این ساختار توانایی تولید B cell، CTL و HTL را دارد. در مطالعه حاضر، ابتدا سازه ژنی پلی‌اپی‌توپی فیوژن L1E7 در وکتور pUC57 طراحی و سنتز شد. سپس ساب کلون کردن L1E7 در وکتور بیانی یوکاریوتی pcDNA3.1(-) انجام شد. درنهایت سازه pcDNA-L1E7 به‌صورت فاقد اندوتوکسین باکتری تهیه شد. نتایج هضم آنزیمی وکتور نوترکیب با *Bam*HI/*Hind*III حضور باند حدود ۶۳۹ جفت بازی را نشان داد.

از آنجایی که L1 و E7 برای تولید واکسن مورد توجه قرار گرفتند، ابتدا اقدام به تولید ذرات شبه ویروسی با ترکیب این دو پروتئین صورت گرفت. Schafer و همکاران در سال ۱۹۹۹ اقدام به تولید CVLP (Chimeric Papilomavirus-like particles) کردند. از $L1\Delta CE7_{1-55}$ و $L1\Delta CE7_{1-60}$ استفاده کردند و نتایج نشان داد که ترکیب L1 و E7 به‌صورت VLP قابلیت تولید CTL و حذف سلول‌های توموری را دارد (۱۸). در سال ۲۰۰۱ Kaufmann و همکاران از CVLP طراحی شده برای HPV16 به منظور القای پاسخ ایمنی در شرایط برون تنی (*in vitro*) استفاده کردند. در مطالعه آن‌ها نشان داده شد که HPV16 L1ΔCE7 CVLPs توانایی القاء پاسخ HLA محدود به CTL را در شرایط برون تنی دارند (۱۹). با گسترش بحث DNA واکسن‌ها، طراحی این واکسن‌ها برای HPV مورد توجه قرار گرفت.

مطالعه‌های قبلی که به طراحی DNA واکسن‌ها در مقابله با HPV پرداخته‌اند، از پروتئین‌های ساختاری (L1، L2 و یا ترکیبی از آن‌ها) یا پروتئین‌های انکوژن (E5، E6، E7 و یاترکیبی از آن‌ها) در طراحی سازه استفاده کرده‌اند. در این مطالعه برای نخستین بار از ترکیب دو پروتئین اصلی L1 و E7 به‌طور هم‌زمان در طراحی ساختار DNAیی استفاده شده است. Panahi و همکاران در سال ۲۰۱۹ اقدام‌به طراحی سازه‌های DNA به‌صورت E5+E6، E6+E7، E5+E7 و E5+E6+E7 کردند. توالی‌ها از سویه‌های ۱۶، ۱۸، ۳۱ و ۴۵ انتخاب شدند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که پلی‌پپتید با توالی E5+E6+E7 و هم‌چنین ترکیب پلی‌پپتید و DNA به‌صورت E5+E6+E7 polypeptide DNA/E5+E6+E7 بیش‌ترین میزان ایمنی را در موش‌های C57BL/6 حامل تومور TC-1 ایجاد کردند (۱۲). Namvar و همکاران نیز در سال ۲۰۱۹ از پروتئین‌های ساختاری L1 و L2 برای طراحی پپتید واکسن استفاده کردند. نتایج مطالعه‌های آن‌ها نشان داد که ترکیب پپتیدهای انتخابی L1 و L2 (L1+L2) میزان ایمنی بیش‌تری ایجاد کرده و توانایی بیش‌تری در کاهش و به تأخیر افتادن رشد سلول‌های توموری دارد (۱۳). در مطالعه حاضر، هر دو اپی‌توپ‌های ایمنوژنیک و حفاظت شده L1 و E7 به‌صورت فیوژن در ساختار یک وکتور بیانی یوکاریوتی بکار برده شدند. وکتور تخلیص شده حاصل در آینده به‌عنوان واکسن DNAیی تحت شرایط درون تنی مورد استفاده قرار خواهد گرفت.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه پس از انتخاب نواحی ایمونوژنیک، سازه L1-E7 طراحی و در وکتور بیانی یوکاریوتی ساب کلون شد. سازه مذکور با هدف کاربرد به‌عنوان واکسن طراحی گردید. نتایج تعیین غلظت و خلوص با اسپکتروفتومتری نانودراپ نشان داد که پس از خالص سازی پلاسمید به‌صورت فاقد اندوتوکسین، pcDNA-L1E7 غلظت و خلوص مناسبی دارد. در مطالعه‌های آینده، از این ساختار به‌عنوان DNA واکسن برای مطالعه‌های درون تنی استفاده خواهد شد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.44.1.5]

منابع

1. Hill EK. Updates in Cervical Cancer Treatment. Clinical Obstetrics and Gynecology. 2020;63(1):3-11.

2. Human Papillomavirus - World Health Organization.

3. Yang Y-C, Chang T-Y, Chen T-C, Lin W-S, Lin C-L, Lee Y-J. Replication of results from a cervical cancer genome-wide association study in Taiwanese women. Scientific Reports. 2018;8(1):15319.

4. Small Jr W, Bacon MA, Bajaj A, Chuang LT, Fisher BJ, Harkenrider MM, et al. Cervical cancer: a global health crisis. Cancer. 2017;123(13):2404-12.

5. Morshed K, Polz-Gruszka D, Szymański M, Polz-Dacewicz M. Human papillomavirus (HPV)–structure, epidemiology and pathogenesis. Otolaryngologia Polska. 2014;68(5):213-9.

6. Mühr LSA, Eklund C, Dillner J. Towards quality and order in human papillomavirus research . Virology. 2018;519:74-6.

7. Borysiewicz L, Fiander A, Nimako M, Man S, Wilkinson GWG, 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. 1٧,-١٥٢٣:(٩٠١٤)٣٤٧;٩٩٦

8. Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy D, Schiller J. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1992;89(24):12180-4.

9. Bagarazzi ML, Yan J, Morrow MP, Shen X, Parker RL, Lee JC, et al. Immunotherapy against HPV16/18 generates potent TH1 and cytotoxic cellular immune responses. Science translational medicine. 2012;4(155):155ra38-ra38.

10. Ma W, Melief CJ, van der Burg SH .Control of immune escaped human papilloma virus is regained after therapeutic vaccination. Current opinion in virology. 2017;23:16-22.

11. Elnaz Abbasifarid AB, Shiva Irani, Fattah Sotoodehnejadnematalahi. In silico and in vitro analysis of a multiepitope L1-E7 fusion construct for vaccine development against human papillomaviruses Letters in Drug Design & Discovery (Submitted). 2021.

12. Panahi HA, Bolhassani A, Javadi G, Noormohammadi Z, Agi E. Development of multiepitope therapeutic vaccines against the most prevalent high-risk human papillomaviruses. Immunotherapy. 2020;12(7):459-79.

13. Namvar A, Bolhassani A, Javadi G, Noormohammadi Z. In silico/In vivo analysis of high-risk papillomavirus L1 and L2 conserved sequences for development of cross-subtype prophylactic vaccine. Scientific reports. 2019;9(1):1-22.

14. Schiller J, Lowy D. Explanations for the high potency of HPV prophylactic vaccines. Vaccine. 2018.

15. Brisson M, Kim JJ, Canfell K, Drolet M, Gingras G, Burger EA, et al. Impact of HPV vaccination and cervical screening on cervical cancer elimination: a comparative modelling analysis in 78 low-income and lower-middle-income countries. The Lancet. 2020;395(10224):575-90.

16. Che Y, Yang Y, Suo J, An Y, Wang X. Induction of systemic immune responses and reversion of immunosuppression in the tumor microenvironment by a therapeutic vaccine for cervical cancer. Cancer Immunology, Immunotherapy. 2020:1-14.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.44.1.5]

17. Wick DA, Webb JR. A novel, broad spectrum therapeutic HPV vaccine targeting the E7 proteins of HPV16, 18, 31, 45 and 52 that elicits potent E7-specific CD8T cell immunity and regression of large, established, E7-expressing TC-1 tumors. Vaccine. 2011;29(44):7857-66.

18. Schäfer K, Müller M, Faath S, Henn A, Osen W, Zentgraf H, et al. Immune response to human papillomavirus 16 L1E7 chimeric virus-like particles: induction of cytotoxic T cells and specific tumor protection. International journal of cancer. 1999;81(6):881-8.

19. Kaufmann A, Nieland J, Schinz M, Nonn M, Gabelsberger J, Meissner H, et al. HPV16 L1E7 chimeric virus-like particles induce specific HLA-restricted T cells in humans after in vitro vaccination. International journal of cancer. 2001;92(2):285-93.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.44.1.5]

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1400.11.44.1.5]