NCMBJ | VOLUME 16 | ISSUE 62 | MAY 2026 |

ORIGINAL ARTICLE |

Construction of an Expression Vector Carrying the Human Papillomavirus Type 16 Oncogene *E5* and Evaluation of Its Expression in an *E. coli* Expression System|

Fahimeh Ezzatizadeh[1], Azam Bolhassani[2*], Fattah Sotoodehnejadnematalahi[1], Abolfazl Fateh[3]

1- Department of Biology, SR.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Department of Hepatitis, AIDS and Blood-borne Diseases, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

3- Department of Mycobacteriology and Pulmonary Research, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

***Corresponding Author:** Dr Azam Bolhassani, Department of Hepatitis, AIDS and Blood-borne Diseases, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran; **Email:** azam.bolhassani@yahoo.com, A_bolhasani@pasteur.ac.ir

| Received | 23/07/2024 | Revised | 25/07/2025 | Accepted | 29/07/2025

| Abstract |

Background and Aim: Human papillomavirus type 16 (HPV16) oncoproteins play a pivotal role not only in the severity of HPV-related diseases but also in the early diagnosis of virus-induced cancers. This study aimed to clone the HPV16 E5 oncogene into a prokaryotic expression vector and assess its expression in an Escherichia coli *(E. coli)* system, with the future goal of facilitating its purification and functional characterization.

Materials and Methods: In this study, the HPV16 E5 gene was cloned into the pET28a prokaryotic expression vector (plasmid expression T7). Then, expression of the recombinant E5 protein was analyzed in the *E. coli* expression system using SDS-PAGE and western blotting techniques.

Results: Our results showed that the E5 gene, which is approximately 240 base pairs in size and was cloned into the pET28a(+) vector, was expressed in *E. coli* BL21 under the following conditions: 37° C, 0.5 mM IPTG, and 18 hours post-induction. SDS-PAGE and western blot analysis confirmed a distinct protein band at approximately 10 kDa, consistent with the expected size of the recombinant E5 protein.

Conclusion: The successful expression of the hydrophobic E5 oncoprotein in a bacterial system, despite the absence of post-translational modifications such as phosphorylation and glycosylation, suggests the purification of this protein for evaluation of its function in vaccine design in the future.

| Keywords |

HPV16|
E5 oncoprotein|
Cloning|
Recombinant protein expression|
Escherichia coli expression system|

| Iau Science |

NCMBJ
New Cellular and Molecular Biotechnology Journal
ISSN : 2228-6926

مقالهٔ اصیل پژوهشی |

ساخت وکتور بیانیِ حاملِ انکوژن *E5* ویروس پاپیلومای انسانی و بررسی بیان آن در سیستم بیانیِ *E. coli*|

فهیمه عزتی زاده[۱]، اعظم بوالحسنی[۲*]، فتاح ستوده نژاد نعمت اللهی[۱]، ابوالفضل فاتح[۳]

۱- گروه زیست‌شناسی سلولی‌ومولکولی، دانشکدهٔ علوم و فناوری‌های همگرا، واحد علوم‌وتحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- بخش هپاتیت، ایدز و ویروس‌های منتقله از خون، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۳- بخش سل و تحقیقاتِ ریوی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

***نویسندهٔ مسئول:** دکتر اعظم بوالحسنی، بخش هپاتیت، ایدز و ویروس‌های منتقله از خون، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران؛ **پست الکترونیکی:** azam.bolhassani@yahoo.com, A_bolhasani@pasteur.ac.ir

| تاریخ دریافت | ۱۴۰۳/۰۵/۰۲ | تاریخ ویرایش | ۱۴۰۴/۰۵/۰۳ | تاریخ پذیرش | ۱۴۰۴/۰۵/۰۷ |

| چکیـــده

زمینه و هدف: نقشِ کلیدیِ انکوپروتئین‌های ویروسِ پاپیلومای انسانیِ نوعِ ۱۶ (HPV16) در شدتِ بیماری و حتی تشخیصِ زودهنگامِ سرطان‌های مرتبط با HPV16 بررسی شده است. هدف و تمرکزِ مطالعهٔ حاضر روی کلونینگ و بیان یکی از انکوژن‌های ویروس تحتِ عنوانِ *E5* در سیستم *E. coli* به‌منظور تخلیص و تعیینِ عملکردِ آن در آینده می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، کلون کردن ژنِ *E5* ویروسِ پاپیلومای انسانی نوعِ ۱۶ در وکتورِ بیانِ پروکاریوتی pET28a (plasmid expression T7) انجام شد. سپس، بیانِ پروتئینِ نوترکیبِ E5 در سیستمِ بیانیِ *E. coli* با استفاده از روش‌های SDS-PAGE و وسترن بلات موردبررسی قرار گرفت.

نتایج: نتایج ما نشان دادند که ژنِ *E5* کلون‌شده در وکتورِ بیانیِ pET28a (+) با اندازهٔ ۲۴۰ جفت‌باز، قادر به بیان در سیستمِ *اشرشیاکلی* سویهٔ BL21 تحتِ شرایطِ دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، غلظتِ ۰/۵ میلی‌مولار IPTG و ۱۸ ساعت پس از القاست. آنالیزِ SDS-PAGE و وسترن بلات حضور باندِ ۱۰ کیلودالتونیِ مربوط به بیانِ پروتئینِ نوترکیبِ E5 را تأیید کردند.

نتیجه‌گیری: با توجه به بیانِ پروتئینِ E5 غنی از اسیدآمینه‌های آب‌گریز در سیستمِ بیانیِ باکتری و عدم‌نیاز به مدیفیکاسیون در این پروتئین نظیرِ فسفریلاسیون و گلیکوزیلاسیون، تخلیصِ پروتئینِ نوترکیب به‌منظورِ ارزیابیِ عملکردِ آن در طراحیِ واکسن در آینده صورت خواهد گرفت.

|واژگان کلیدی|

|HPV16
|انکوپروتئین E5
|کلونینگ
|بیان پروتئین نوترکیب
|سیستم بیانی *اشرشیاکلی*

|علوم Iau|

۱ | مقدمه

سرطان دهانه رحم، چهارمین علتِ مرگِ ناشی از سرطان در زنانِ جهان است و البته ۷۰ درصد موارد در کشورهای درحال توسعه رخ می‌دهد. این بیماری به‌علتِ عفونتِ مداوم توسطِ برخی از عفونت‌های انکوژنیکِ ویروسِ پاپیلومای انسانی (HPV) با انواعِ سویهٔ پُرخطرِ این ویروس (۱۶ و ۱۸ در بیشتر موارد) مرتبط است (۱ و ۲).

ویروسِ پاپیلومای انسانی، گروهِ کوچکی از ویروس‌های بدونِ پوشش متعلق به خانواد پاپیلوما ویریده[1] و بسیار شبیه به ویروسِ پولیوما[2] هستند. ژنومِ این ویروس، از نوعِ DNA دو رشته‌ایِ حلقوی، شامل یک ناحیهٔ کنترلیِ غیررمزکننده (NCCR) و نواحیِ رمزکنندهٔ اولیه[3] و ثانویه[4] است.

در این ویروس، پروتئین‌های تنظیم‌کنندهٔ E1، E2، E4، E5، E6 و E7 در بیان‌ژن‌ها، تکثیر و پاتوژنز بیماری نقش داشته و توسطِ نواحیِ اولیه کُد می‌شوند (۳ و ۴).

سویه‌های مختلفِ HPV دارای دو پروتئینِ ساختاریِ L1 و L2 است که به‌وسیلهٔ نواحیِ ثانویه رمزگذاری می‌شوند. این دو پروتئین مسئولِ ساختِ پوششِ ویروسی هستند (۳ و ۴). یافته‌های پژوهشی نشان می‌دهند که سویه‌های مختلف عاملِ ایجادکنندهٔ انواعِ تومورِ خوش‌خیم و بدخیم در پوست (HPV پوستی) و بافت‌های مخاطی (HPV مخاطی) انسان است که به دو نوعِ پُرخطر (High risk; HR) و کم‌خطر (Low risk; LR) تقسیم‌بندی می‌شوند (۵).

انواعِ سویه‌های پُرخطرِ HPV شاملِ ۱۶، ۱۸، ۲۶، ۳۱، ۳۳، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۱، ۵۲، ۵۳، ۵۶، ۵۸، ۵۹، ۶۶، ۶۸، ۷۳ و ۸۲ می‌باشد. این سویه‌ها با سرطان‌های سرویکس، واژن، مقعد، آلتِ تناسلی، سروگردن مرتبط هستند. انواعِ سویه‌های کم‌خطر نیز شاملِ ۶، ۱۱، ۴۰، ۴۲، ۴۳، ۴۴، ۵۴، ۶۱، ۷۲ و ۸۱ بوده و عاملِ ایجادِ زگیل‌های خوش‌خیمِ تناسلی هستند (۶).

با توجه به عوارضِ بالقوّهٔ ابتلای به این نوع ویروس‌ها، تولیدِ واکسنِ پیشگیرانه و درمانیِ HPV از جایگاهِ ویژه‌ای برخوردار است (۷). بسیاری از انواعِ ویروس‌های پاپیلوما، پروتئین‌های E5را رمزگذاری می‌کنند. پروتئین‌های E5 از نظر اندازه KDa ۱۰بوده و از حدودِ ۴۰ تا ۸۵ اسیدآمینه تشکیل شده است. این پروتئین غنی از اسیدآمینه‌های آب‌گریز هستند و جایگاهِ قرارگیریِ آن درون‌سلولی است (۸).

در یک مطالعه مشاهده شد که حدودِ ۶۰ درصد از مبتلایان به سرطانِ دهانهٔ رحم (HPV-16 مثبت)، پروتئینِ E5را بیان کردند (۹). پروتئینِ E5 می‌تواند باعثِ افزایشِ عملکردِ پروتئین‌های E6 و E7 شود و به پیشرفتِ تومور کمک کند. پژوهش‌ها گزارش کرده‌اند که بیان یا عدم‌بیانِ E5 می‌تواند عاملِ تبدیلِ ضایعاتِ خوش‌خیم به ضایعاتِ بدخیم باشد (۱۰). از طرفی پروتئینِ E5 انتقالِ سیگنال با واسطهٔ فاکتورِ رشد به هسته را افزایش می‌دهد. در نتیجه، این پروتئین تکثیرِ سلولی را افزایش می‌دهد و می‌تواند منجر به ایجادِ سلول‌های نئوپلاستیک و توموری شود (۱۱).

بیانِ هم‌زمانِ پروتئین‌های E5، E6 و E7 در HPV، منجر به لغوِ مسیرهای هموستازِ سلولی، تغییرِ مسیرِ سلولی به سمتِ رشد و تکثیر، فرار از سیستم‌ایمنی، تأخیرِ تمایز، مهارِ آپوپتوز، بی‌ثباتیِ ژنوم و در نتیجه نامیراییِ سلولِ آلوده می‌شود (۱۲). با توجه به نقشِ تومورزاییِ پروتئینِ E5ویروسِ HPV-16، اصلاح و بهبود از طریقِ مسیرهای داخلِ سلولی می‌تواند به‌عنوانِ یک کاندیدِ درمانی برای سرطانِ رحم درنظر گرفته شود (۱۳). زمانی که آزمایش بینِ افرادِ سالم و بیمارانِ مبتلا به سرطانِ دهانهٔ رحم صورت گرفت، اپی‌توپ‌های کوچک در پروتئینِ E5 توانستند آنتی‌بادی‌های IgG و IgA در بیمارانِ مبتلا را القا کنند (۱۴). بدین ترتیب، با توجه به فعالیت‌های E5 ویروسِ HPV در مسیرهای سلولی و ایجادِ سرطان، این پروتئین برای مطالعه‌های مختلف موردبررسی قرار گرفته است.

امروزه تولیدِ تجاریِ پروتئین‌ها با تکیه بر مهندسیِ ژنتیک در سیستم‌های بیانیِ مختلف درحال گسترش است به‌طوری که محصولاتِ تولیدشده بخشِ مهمی از نیازهای جوامع را دربرمی‌گیرند. یک سیستمِ بیانیِ مطلوب تنها درصورتی می‌تواند کاربردی شود که ازنظرِ بهره‌وری، زیست‌فعالی و حفظِ ویژگی‌های فیزیکی-شیمیاییِ پروتئینِ هدف مطلوب باشد (۱۵).

انواعِ سیستم‌های بیانی با استفاده از سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی و همچنین سیستم‌های ترجمهٔ *in-vitro*، می‌توانند برایِ تولیدِ پروتئین درنظر گرفته شوند. یک

[1] Papillomaviride
[2] Polyoma
[3] Early
[4] Late

سیستمِ بیان‌کنندهٔ پروتئین‌های نوترکیب باید بتواند تولیدِ بالا، آسانیِ تخلیصِ پروتئین، بیشترین فعالیتِ بیولوژیکی و کمترین زمانِ تولید را باهم ترکیب کند (۱۶).

سیستم‌های باکتریایی از اولین سیستم‌های مورداستفاده برای تولیدِ پروتئینِ نوترکیب محسوب می‌شوند. گسترده‌ترین میزبانِ مورداستفاده در این نوع سیستم *اشرشیا کلی* (*E. coli*) می‌باشد که رواجِ استفاده از آن مربوط به کوتاه‌بودنِ زمانِ تقسیمِ سلولی و ویژگی‌های مناسبِ فیزیولوژی و ژنتیکیِ آن می‌باشد، به‌طوری که توالی و ژنتیکِ کاملِ آن وجود دارد. این ویژگی‌ها، کلونینگِ ژن و کشتِ آن را ساده می‌کند (۱۷ و ۱۸). نرخِ رشدِ بالای این باکتری، به‌همراهِ تواناییِ بیانِ سطوحِ بالای پروتئین، به این سویه بهره‌وریِ حجمیِ بالا می‌بخشد (۱۴). تقریباً ۴۰ درصدِ پروتئین‌های نوترکیب در باکتری‌ها تولید می‌شوند که از این میزان، ۳۹ درصدِ آن در *E. coli* بیان می‌گردد (۱۹). سیستمِ *E. coli* برای بیانِ پروتئین‌های غیرگلیکوزیله بسیار عالی است (۲۰).

در پژوهشِ حالِ حاضر، هدف ساختِ وکتورِ بیانیِ پروکاریوتی (pET) حاملِ انکوژنِ *E5* ویروسِ پاپیلومای انسانی و بررسیِ بیانِ آن در سیستمِ بیانیِ *E. coli* می‌باشد. با توجه به مزایای بیان‌شده در موردِ سیستمِ بیانیِ پروکاریوتی، *E. coli* به‌عنوانِ میزبانی مناسب جهتِ تولیدِ پروتئینِ E5 درنظر گرفته شد (۲۱). از طرفی، pET به‌عنوان یکی از قدرتمندترین سیستم‌های بیانی به‌منظورِ کلون و بیانِ پروتئین‌های نوترکیب در *E. coli* استفاده می‌شود. در حقیقت زمانی که ژنِ هدف در داخلِ وکتور کلون می‌شود، رونویسی تحتِ کنترلِ پروموترِ قویِ باکتریوفاژِ T7 انجام می‌گیرد. در ادامه، RNAپلیمرازِ باکتریوفاژِ T7 که در ژنومِ باکتری قرار دارد، به‌صورت کاملاً اختصاصی به پروموترِ خود متصل می‌شود و رونویسی انجام می‌گردد. سپس پروموتر توسطِ القاگر یا آنتی‌رپرسورایزوپروپیل‌بتا-دی-۱تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) القاشده و بیانِ بالایی از محصول به‌دست می‌آید (۲۲).

۲| مواد و روش‌ها

۲-۱| طراحی و سنتزِ ژنِ *E5*

طراحیِ وکتورِ کلونینگِ حاملِ ژنِ E5 سویهٔ HPV-16 به‌عنوان اولین مرحلهٔ مطالعه انجام شد. بدین منظور، ابتدا توالیِ نوکلئوتیدیِ ژنِ E5 سویهٔ HPV16 (Reference Sequence:K02718) از پایگاه‌داده‌های ژنتیکیِ NCBI (www.ncbi.nlm.noh.gov) دریافت و پس از بررسیِ توالی و تعیینِ آنزیم‌های محدودالاثر در نرم‌افزارِ Snap Gene، جهتِ سنتز در وکتورِ کلونینگِ pUC57 به شرکتِ Biomatik کانادا سفارش داده شد.

۲-۲| تکثیرِ پلاسمیدِ حاویِ ژن و pET28a در باکتریِ *اشرشیاکلی* سویهٔ DH5α

ابتدا ژن توسطِ شرکت سنتز شد و تأیید توسطِ توالی و هضمِ آنزیمی صورت گرفت و مدارکِ آن ارسال شد. در زمانِ کلون‌کردن با روشِ هضمِ آنزیمی و مشاهدهٔ باندِ ژنِ موردنظر تأیید شد. جهتِ تکثیرِ پلاسمیدِ pUC57 حاویِ ژنِ *E5* سویهٔ HPV-16، ابتدا وکتورِ نوترکیبِ pUC57 حاملِ ژن به کمکِ روشِ شوکِ حرارتی به سویهٔ DH5α باکتریِ *اشرشیاکلی* (به‌عنوانِ میزبانِ اولیه) منتقل شد. تک‌کلونیِ حاصل از ترنسفورماسیونِ باکتری بر رویِ محیط‌کشتِ جامدِ باکتری Luriq-Bertani(LB)-agar حاویِ آنتی‌بیوتیکِ آمپی‌سیلین (Sigma, Germany)، به‌طورِ تصادفی انتخاب و پس از کشت در محیطِ مایعِ LB، استخراجِ DNA پلاسمید با استفاده از کیتِ استخراجِ DNA پلاسمید (Favorgen, Taiwan) بر طبقِ دستورالعملِ شرکتِ سازنده انجام شد. مطابقِ روشِ بالا، تهیهٔ پلاسمیدِ بیانیِ pET28a (شرکتِ addgene) از استوکِ باکتریِ حاملِ پلاسمیدِ ذخیره‌شده در فریزرِ ۷۰- درجهٔ سانتی‌گراد نیز انجام شد.

۲-۳| کلون کردنِ ژنِ *E5* در وکتورِ بیانی

به‌منظورِ هضمِ آنزیمی، وکتورِ بیانیِ pET28a (+) و pUC57 حاویِ ژنِ *E5* تحتِ اثرِ آنزیم‌های محدودالاثر NheI/BamHI (Fermentas, Germany) به‌مدتِ یک ساعت در دمایِ ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند. در ادامه، کیفیتِ محصولاتِ بالا به کمکِ الکتروفورزِ ژلِ آگارز ۱/۵ درصد موردبررسی قرار گرفتند. پس از مشاهدهٔ باند ۲۴۰ جفت‌بازی ژنِ *E5* و باندِ پلاسمیدِ بیانیِ pET خطی‌شده (۵۳۶۹ جفت‌باز)، این محصولاتِ ژنی از روی ژل توسطِ کیتِ استخراجِ پلاسمید FavorPrep (Favorgen, Taiwan) تخلیص شدند. پس از جداسازیِ باندها، کمیّت آن‌ها توسطِ اسپکتروفتومتریِ نانوداپ تعیین و براساسِ نسبتِ مولی ۱:۷ (ژن:وکتور) الحاقِ ژن در وکتورِ خطی‌شده با استفاده از T4 DNA ligase (Fermentas, Germany) صورت گرفت. در نهایت ترنسفورماسیونِ باکتریِ مستعدِ DH5α توسطِ محصولِ الحاق

صورت گرفت. پس از کشتِ تک‌کلونی‌ها در محیط‌کشتِ مایعِ باکتریِ حاملِ آنتی‌بیوتیک (کانامایسین)، استخراجِ پلاسمیدها و تأییدِ حضورِ ژن به روشِ هضمِ آنزیمی و در نهایت توالی‌یابی با روشِ سنگر انجام شد.

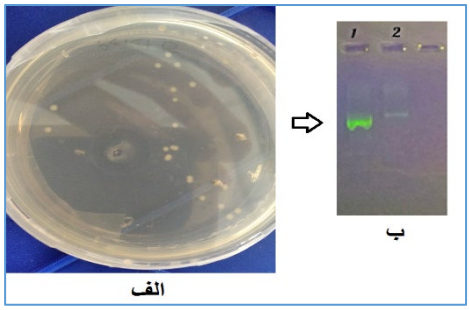
۲-۴| ترانسفورماسیونِ باکتری‌های بیانیِ اشرشیاکلی با پلاسمیدِ نوترکیب و القایِ بیانِ پروتئین

در این مرحله، ترنسفورماسیونِ باکتریِ مستعدِ *اشرشیاکلی* سویه‌های BL21 و Rosetta با پلاسمیدِ نوترکیبِ pET-28a حاویِ ژن *E5* (pET-E5) به کمکِ روشِ شوکِ حرارتی انجام شد. پس از حصولِ تک‌کلونی‌های باکتریِ نوترکیب، کشتِ شبانهٔ دو تک‌کلونی از هر سویهٔ باکتری در دمایِ ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد در محیط‌کشتِ مایعِ LB حاملِ آنتی‌بیوتیکِ کانامایسین انجام شد. روزِ بعد، میزانِ حجمیِ ۱:۱۰۰ از باکتریِ رشدیافته به محیطِ TY2X (Merck, Germany) تلقیح شد. پس از رسیدنِ جذبِ نوری در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر به حدودِ ۰/۶-۰/۷، القایِ بیانِ پروتئین با استفاده از القاگرِ IPTG (۰/۵ و ۱ میلی‌مولار؛ Sigma، Germany) انجام شد. نمونه‌گیری توسطِ تهیهٔ رسوبِ باکتری با استفاده از سانتریفوژ (۱۰۰۰۰ دور در دقیقه) قبل از القا و در دو، چهار و ۱۶-۱۸ ساعت پس از القایِ IPTG انجام شد. آنالیزِ بیانِ پروتئینِ نوترکیبِ E5 توسطِ تکنیکِ SDS-PAGE و وسترن‌بلات انجام شد.

۳| نتایج

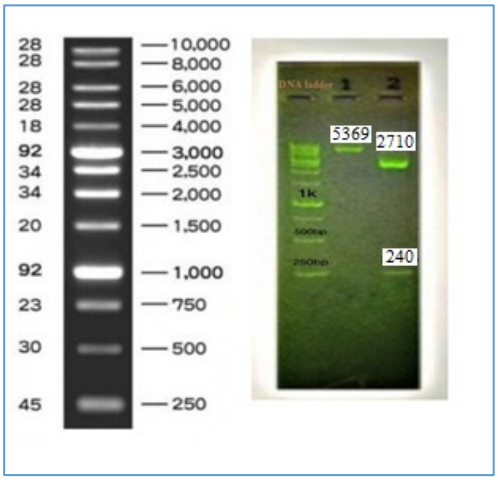
۳-۱| کلون کردنِ ژنِ *E5* در وکتورِ بیانیِ pET28a

ابتدا تکثیرِ وکتورِ کلونینگِ حاملِ ژنِ *E5* (pUC57-E5) در باکتریِ DH5α انجام شد. شکل ۱ (الف و ب) به‌ترتیبِ تک‌کلونیِ حاصل از ترنسفورماسیون و پلاسمیدِ استخراج‌شده از باکتری را نشان می‌دهد.



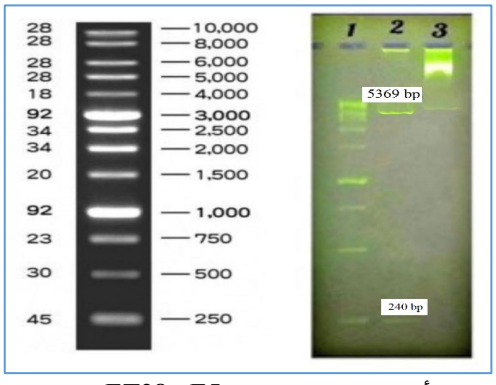
شکل ۱- الف. تک‌کلونیِ حاصل از ترنسفورماسیونِ باکتری با پلاسمیدِ pUC57-E5، ب. محصولِ استخراجِ پلاسمید توسط کیت: ستونِ ۱) الوت ۱، ستونِ ۲) الوت ۲. اندازهٔ پلاسمید حدودِ ۲۹۵۰ جفت‌باز می‌باشد.

هضمِ آنزیمیِ وکتورِ pUC57-E5 حضورِ ژنِ *E5* با اندازهٔ ۲۴۰ جفت‌باز را نشان داد که پس از استخراج از ژل به وکتورِ خطی‌شدهٔ pET28a با اندازهٔ ۵۳۶۹ جفت‌باز الحاق شد (شکل ۲).



شکل ۲- هضمِ آنزیمیِ پلاسمیدِ pET28a (ستونِ ۱) و pUC57-E5 (ستونِ ۲) با آنزیم‌های NheI/BamHI. ladder DNA با اندازهٔ مولکولیِ ۱kb (Fermentas, Germany) است.

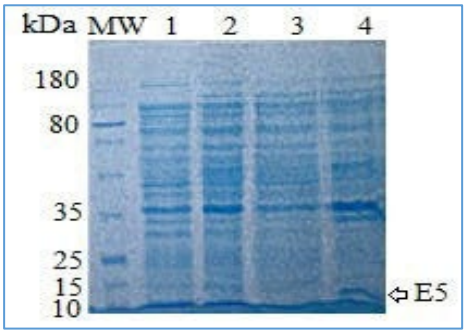
پس از الحاقِ ژن در وکتورِ خطی‌شدهٔ pET توسطِ آنزیمِ لیگاز در دمایِ ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدتِ ۱۶-۱۸ ساعت، ترنسفورماسیونِ باکتریِ DH5α با محصولِ الحاق انجام و استخراجِ پلاسمید از تک‌کلونی انجام شد سپس تأییدِ آن توسطِ آنزیم‌های محدودالاثر صورت گرفت. حضورِ باندِ ۲۴۰ جفت‌بازی نشانگر حضورِ ژنِ *E5* در وکتورِ pET28a بود (شکل ۳).



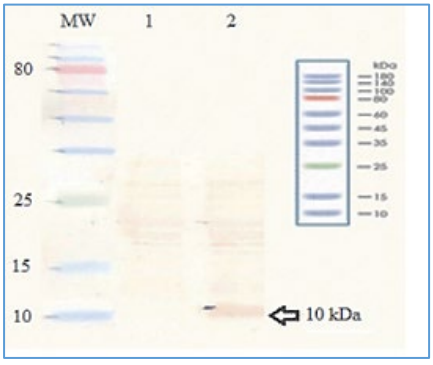
شکل ۳- تأییدِ پلاسمیدِ نوترکیبِ pET28a-E5 با روشِ هضمِ آنزیمی (ستونِ ۲) در کنارِ پلاسمیدِ هضم‌نشده (ستونِ ۳). ستونِ ۱ DNA ladder با اندازهٔ مولکولیِ ۱ کیلوباز (Fermentas, Germany) می‌باشد.

۳-۲| القا و بیانِ پروتئینِ نوترکیب

در ابتدا، ترنسفورماسیونِ دو باکتریِ بیانیِ Rosetta و BL21 با پلاسمیدِ نوترکیبِ pET-E5 انجام شد. نتایج حاکی از بیانِ پروتئین تحتِ شرایطِ دمایی ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، IPTG نیم میلی‌مولار و ۱۶-۱۸ ساعت پس از القا بود که فقط در سویهٔ باکتریِ BL21 انجام شد. هیچ بیانی در سویهٔ Rosetta مشاهده نشد (شکلِ ۴ آنالیزِ SDS-PAGE برای بیانِ پروتئینِ E5 در زمان‌های مختلف پس از القا در سویهٔ بیانیِ BL21 را نشان می‌دهد). بیانِ پروتئین در ۱۶-۱۸ ساعت پس از القا قابل‌مشاهده است. بیانِ پروتئین در این زمان توسطِ آنالیزِ وسترن‌بلات با استفاده از آنتی‌بادیِ ضدّ His-tag کونژوگه به پِراُکسیداز (Abcam، آمریکا) تأیید شد (شکل ۵).



شکل ۴- آنالیزِ SDS-PAGE برایِ بیانِ پروتئینِ نوترکیبِ E5 در سویهٔ *E. coli* در زمان‌های مختلف پس از القا با IPTG: ستونِ ۱) رسوبِ باکتری قبلِ القا، ستون‌های ۲ تا ۴ به‌ترتیبِ رسوبِ باکتری در زمان‌های ۲ (ستونِ ۲)، ۴ (ستونِ ۳) و ۱۶ (ستونِ ۴) ساعت پس از القا؛ MW مارکرِ وزنِ مولکولی (۱۰-۱۸۰ کیلودالتون، فِرمنتاز).



شکل ۵- آنالیزِ وسترن‌بلات: ستونِ ۱) رسوبِ باکتری قبلِ القا، ستونِ ۲) رسوبِ باکتری ۱۶-۱۸ ساعت بعد از القا؛ باند حدودِ ۱۰ کیلودالتون با استفاده از آنتی‌بادیِ ضدّ His-tag قابل‌مشاهده است.

۴| بحث

سرطان‌های انسانی با عفونت‌های ویروسی در ارتباط هستند. در این زمینه ویروس‌های مختلفی در چندین مرحله از فرایندهای سرطان‌زایی شرکت دارند. از میانِ انواعِ ویروس‌ها، ویروسِ پاپیلومای انسانی عامل ۳۰ درصد از سرطان‌های وابسته به عواملِ عفونی است که این ویروسِ عفونی قابلیتِ انتقال از طریقِ تماسِ جنسی را دارد. در میانِ پروتئین‌های HPV شناخته‌شده، پروتئینِ E5کمتر موردِ مطالعه قرار گرفته است. پروتئینِ E5 در عفونت و نِئوپلازی به‌وسیلهٔ توقفِ رشدِ طبیعیِ سلول، در تنظیم و عملکردِ پروتئین‌های E6 و E7 می‌تواند نقش داشته باشد (۲۲).

پروتئینِ E5 ویروسِ پاپیلومای انسانی به‌تنهایی یک انکوژنِ ضعیف است، درحالی‌که توانِ بالقوّهٔ ترانسفورمِ HPV برعهدهٔ E6 و E7 است و پروتئینِ E5 می‌تواند کمک‌کننده باشد (۲۳). از طرفی اهمیتِ بیولوژیکیِ پروتئینِ E5 به‌نظر می‌رسد در افزایشِ سیگنال‌های تکثیرِ سلولی باشد (۲۴). مطالعه‌های برون‌تنی (*in-vitro*) و درون‌تنی (*in-vivo*) نشان می‌دهند که بیانِ بیش‌ازحدِ E5 در سلول‌های سرطانِ دهانهٔ رحم مانند SiHa و HeLa، موجبِ افزایشِ چشمگیرِ تکثیرِ سلولی، مهاجرت و تهاجمِ سلولی می‌شود. این اثرها از طریقِ مهارِ بیانِ E-cadherin (فاکتورِ کلیدی در چسبندگیِ سلولی) و فعال‌سازیِ مسیرهای سیگنالینگِ مرتبط با رشدِ سلولی تحقق می‌یابد، در واقع بیانِ پروتئینِ E5، سلولِ آلوده را قادر می‌سازد تا از رشدِ کنترل‌شده فرار کند که از جمله مزیت‌های این پروتئین برای استفاده از آن به‌عنوانِ آنتی‌ژن در طراحیِ واکسن است (۲۵).

مطالعه‌های برون‌تنی و مدل‌های حیوانی نشان داده‌اند که E5 از طریقِ برهم‌کُنش با گیرندهٔ فاکتورِ رشدِ اپیدرمال (EGFR) و سایرِ مسیرهای پیام‌رسانی، تکثیرِ غیرطبیعی را تسهیل می‌کند (۲۶ و ۲۷).

به‌علاوه غربالگریِ دوره‌ایِ ضایعاتِ دهانهٔ رحم برای بیانِ E5 می‌تواند کمکِ بسیارِ زیادی در درکِ پیش‌آگهیِ بیماری باشد. غیر از هدف قرار دادنِ E5، آنتاگونیست‌های EGF-R نیز می‌توانند برایِ درمانِ سرطانِ سرویکال مورداستفاده قرار گیرند؛ زیرا که فعالیت‌های E5 عمدتاً از طریقِ EGF-Rاست و درحالی‌که نقشِ HPV E6/E7 به‌طورِ کامل

موردمطالعه قرار گرفته است، مکانیسم‌های E5 هنوز درحالِ کشف است و به مطالعه‌های بیشتری نیاز دارد (۱۳).

مونخاراس-آویلا[1] و همکاران در سالِ ۲۰۱۸ نقشِ پروتئینِ E5 ویروسِ HPV16 را در مهارِ اتوفاژیِ سلولِ میزبان نشان می‌دهد. نتایج بیانگرِ آن است که HPV16 E5 با کاهشِ بیانِ گیرندهٔ KGF (KGFR)، مسیرِ اتوفاژیِ القاشده توسطِ KGF را به‌طورِ مؤثری سرکوب می‌کند. علاوه‌بر این، در شرایطی که اتوفاژی به‌صورتِ مستقل از KGFR و از طریقِ محرومیتِ سرمی القا می‌شود، HPV16E5 با کاهشِ رونویسیِ ژن‌های اصلیِ درگیر در اتوفاژی (از جمله اهدافِ مستقیمِ p53) عمل می‌کند. اگرچه این پروتئین تأثیرِ قابل‌توجهی بر بیانِ p53 ندارد، اما نتایج از کاهشِ بیان‌ژن‌های هدفِ p53 حاکی از مهارِ عملکردیِ p53 توسطِ E5 است. این یافته‌ها نشان می‌دهند که E5از طریقِ دو مکانیسم: کاهشِ سیگنالینگِ KGFR و مهارِ عملکردیِ p53 فرایندِ اتوفاژی را سرکوب می‌کند و ممکن است در اختلالِ تمایزِ اپی‌تلیال و بقای سلول‌های آلوده نقشِ مهمی داشته باشد (۲۸).

نامور[2] و همکاران با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی، دو ساختارِ جداگانه طراحی کردند که حاملِ بخش‌های مهم (اپی‌توپ‌ها) از پروتئین‌های E5 و E7 چهار نوعِ پُرخطرِ ویروسِ HPV بودند. نتایجِ بررسیِ ایمنی‌زاییِ این ساختارها نشان دادند که این طراحی منجر به تحریکِ سیستم‌ایمنیِ نوع Th1 می‌شود. به عبارت دیگر، این ساختارها به گونه‌ای طراحی شده‌اند که می‌توانند پاسخِ ایمنیِ سلولیِ خاصی را در بدن فعال کنند (۲۹).

درحال‌حاضر، تولیدِ پروتئین در کمیّت و کیفیّتِ مناسب برای اهدافِ درمانی یک نیازِ ضروری است؛ بنابراین سیستم‌های بیانیِ مختلف، برای تولیدِ پروتئینِ نوترکیب توسعه یافتند. به‌منظورِ تولیدِ پروتئینِ نوترکیب انتخابِ میزبانِ مناسب بسیار مهم است (۳۰).

به‌طور کلی دو نوع سیستمِ بیانی شاملِ: سیستم‌های بیانی فاقدِ سلول[3] و سیستم‌های بیانیِ مبتنی‌بر سلول[4] وجود دارد. سیستم‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی دو دستهٔ عمومی از سیستم‌های مبتنی‌بر سلول هستند. به‌طورِ معمول مدیریتِ سیستم‌های پروکاریوت آسان بوده و برای بیشترِ اهداف رضایت‌بخش هستند (۳۱). باکتریِ *E. coli* یکی از اولین و وسیع‌ترین میزبان‌هایی است که برای تولیدِ پروتئین‌های نوترکیب استفاده می‌شود. مزایای این باکتریِ میزبان عبارت است از: قابلیتِ بیانِ پروتئین‌های پروکاریوتی و یوکاریوتیِ گوناگون، تکثیرِ سریع (حدودِ ۳۰ دقیقه) با بهره‌مندی از محیط‌کشتِ ساده و ارزان‌قیمت (۳۱). مطالعه‌های گوناگونی در ارتباط با به‌کارگیریِ این سیستمِ بیانی جهتِ تولیدِ پروتئین‌های نوترکیب به‌عنوانِ دارو یا واکسن انجام شده است، به‌عنوان مثال آزامان[5] و همکاران در سالِ ۲۰۱۰ تولیدِ اینترفرونِ آلفا را در باکتریِ *اشرشیاکلی* بهینه‌سازی و غلظتِ نیم میلی‌مولار IPTG و دمایِ ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد را به‌عنوانِ شرایطِ بهینه معرفی کردند (۳۳). غلامی[6] و همکاران در سالِ ۲۰۱۷ بهینه‌سازیِ تولیدِ NGF-B نوترکیب را در باکتریِ *اشرشیاکلی* در مقیاسِ آزمایشگاهی انجام دادند و بهترین غلظتِ القاگر IPTG، دمای پس از القا و زمانِ پس از القا را به‌ترتیب یک میلی‌مولار، ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و ۲ ساعت به‌دست آوردند (۳۱).

به‌منظورِ بهینه‌سازیِ بیانِ پروتئینِ نوترکیبِ فعال‌کنندهٔ پلاسمینوژنِ بافتی در باکتریِ *اشرشیاکلی* سویهٔ BL21 فاضلی[7] و همکاران در سالِ ۲۰۱۹ اقدام به بهینه‌سازیِ بافرِ لیزکننده نمودند و نتایج نشان دادند که این بهینه‌سازی باعثِ جلوگیری از تجمعِ اولیهٔ اینکلوژن‌بادی‌ها و بهبودِ بیان شده است (۳۴).

حامل‌های بیانیِ متعددی در پروکاریوت‌ها وجود دارند که از مهم‌ترینِ آن‌ها می‌توان به pET32a، pET28a و pET21a اشاره نمود که از این میان pET28a به‌دلیلِ دارا بودنِ یک جایگاهِ His-tag و ژنِ مقاومت به آنتی‌بیوتیکِ کانامایسین بسیار پُرکاربرد است (۳۴). وجودِ دو Histidin tag در این وکتور، قدرتِ شناساییِ پروتئینِ موردنظر را نسبت به سایرِ حامل‌ها دوچندان می‌کند. زمانی که ژنِ هدف در داخلِ وکتور کلون شود، رونویسی تحتِ کنترلِ پروموترِ قویِ باکتریوفاژِ T7 انجام می‌گیرد. در ادامه، RNAپلیمرازِ باکتریوفاژِ T7 که در ژنومِ باکتری قرار دارد، به‌صورتِ کاملاً اختصاصی به پروموترِ خود متصل و رونویسی انجام خواهد

[1] Monjarás-Ávila
[2] Namvar
[3] Cell free expression systems
[4] Cell-based expression systems
[5] Azaman
[6] Gholami
[7] Fazeli

گرفت. سپس پروموتر توسطِ IPTGالقا گشته و بیانِ بالایی از محصول به‌دست می‌آید (۳۵).

نتایجِ بیانِ موفقِ ژنِ *E5* ویروسِ HPV16 در وکتورِ pET28a(+) و سویهٔ BL21(DE3) مطابق با مطالعه‌های پیشین است که با تأییدِ SDS-PAGE و وسترن‌بلات حضورِ پروتئینِ نوترکیب با وزنِ حدودِ ۱۰ کیلودالتون را نشان داده‌اند (۳۶). همچنین استفاده از سویه‌های مختلفِ E. coli و بهینه‌سازیِ شرایطِ کشت و القا، به افزایشِ کارایی بیانِ پروتئین کمک کرده است (۳۷). این یافته‌ها زمینهٔ مناسبی را برایِ تخلیص و بررسیِ عملکردِ پروتئینِ E5 در مطالعه‌های عملکردی و طراحیِ واکسن فراهم می‌کند.

بنابراین در مطالعهٔ حاضر از پلاسمیدِ pET28a که می‌تواند ژنِ موردنظر را به‌طورِ اختصاصی و به مقدارِ زیاد در سویه‌های باکتریِ *اشرشیاکلی* بیان کند استفاده شد. در مطالعهٔ حاضر غلظتِ IPTG (۰/۵ و ۱ میلی‌مولار)، زمان پس از القا با القاگرِ IPTG (۲، ۴ و ۱۶ ساعت) و دو سویهٔ باکتریِ *اشرشیاکلی* (Rosetta و BL21) به‌منظورِ بررسیِ بیان‌ژنِ E5استفاده شد. نتایج نشان دادند که با استفاده از باکتریِ *اشرشیاکلی* سویهٔ BL21 در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و زمانِ ۱۶ ساعت پس از القا بیشترین بیانِ پروتئین حاصل می‌شود.

نتایج این پژوهش نشان دادند که با وجودِ هیدروفوبیسیتیِ بالایِ پروتئینِ E5 و عدم‌وجودِ مدیفیکاسیون در این پروتئین، سیستمِ *E. coli* به‌عنوانِ یک سیستمِ مناسب بوده است که پروتئینِ بیان‌شده به‌طورِ موفقیت‌آمیزی بیان شده است. مرحلهٔ بعدی، تخلیصِ پروتئین است که در آیندهٔ نزدیک به‌منظورِ بررسیِ عملکردِ E5 در سلول بایستی صورت گیرد. در سال‌های اخیر، استراتژی‌های متعددی برای افزایشِ بازدهیِ میزانِ حلالیّتِ پروتئین‌ها در سیستمِ باکتری به‌منظورِ تخلیصِ پروتئین با تاخوردگی و شکلِ مناسب به‌کار گرفته شده است (۳۸).

۵| نتیجه‌گیری

نتایج مطالعهٔ حاضر نشان دادند که پروتئینِ نوترکیبِ E5 با اسیدآمینه‌های آبگریز قادر به بیان در سیستمِ *E. coli* سویهٔ BL21 می‌باشد که باندِ حدودِ ۱۰ کیلودالتونیِ آن توسطِ آنالیزِ وسترن‌بلات با آنتی‌بادیِ ضدّ His-tag تأیید شد. به‌منظورِ تأییدِ اختصاصی‌بودنِ بیانِ پروتئینِ هدف، آنالیزِ وسترن‌بلات با استفاده از آنتی‌بادیِ مونوکلونال ضدّ His-tagانجام شد که حضورِ یک نوارِ واضح و مشخص در همان موقعیت (حدودِ ۱۰ کیلودالتون) را نشان داد. این امر بیانگرِ آن است که توالیِ His-tagدر انتهای پروتئین حفظ شده و دسترسیِ آنتی‌بادی به آن فراهم بوده است، که به نوبهٔ خود بیانِ صحیح و ساختارِ مناسبِ پروتئینِ نوترکیب را تأیید می‌کند. به‌طور کلی، نتایجِ مطالعهٔ حاضر نشان می‌دهند که سیستمِ *E. coli* BL21 (DE3) می‌تواند به‌عنوان زیرساختی کارآمد برای بیانِ پروتئین‌های کوچک و نسبتاً آب‌گریز مورداستفاده قرار گیرد. این یافته می‌تواند مبنایی برای مطالعه‌های بعدی درخصوصِ خالص‌سازی، بررسیِ عملکردِ زیستی و کاربردهای درمانی و طراحیِ دارو یا تشخیصیِ پروتئینِ E5باشد.

۶| ملاحظات اخلاقی

مطالعه به کُد اخلاق نیاز ندارد. هیچ مطالعهٔ حیوانی یا انسانی صورت نگرفته است.

۷| تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصلِ بخشی از رسالهٔ دکتری است؛ بدین‌وسیله از سرکار خانم آگی (کارشناسِ آزمایشگاهِ مرکزِ درمانِ جامعِ هموفیلیِ ایران) و سرکار خانم مرادی (دانشجوی دکتریِ انستیتو پاستورِ ایران) که در انجامِ این پژوهش همکاری نمودند، تقدیر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

۸| تعارض منافع

هیچ تعارضِ منافعی وجود ندارد.

۹| سهم نویسندگان

فهیمه عزتی زاده انجامِ آزمایش و نگارشِ مقاله را برعهده داشته است. اعظم بوالحسنی، فتاح ستوده نژاد نعمت اللهی و ابوالفضل فاتح ، هدایت، مشاورهٔ پایان‌نامه و ویرایشِ مقاله را به‌عهده داشته‌اند.

۱۰| کد اخلاق

ندارد.

| Extended Abstract

Human papillomavirus type 16 (HPV16 E5) participates in the early stages of carcinogenesis and may represent a promising target for therapeutic vaccine development. Therefore, the production of recombinant E5 protein is essential for further functional, immunological, and translational studies. The present study aimed to construct a prokaryotic expression vector carrying the HPV16 *E5* gene and to evaluate its expression in an Escherichia coli expression system. The HPV16 *E5* gene was synthesized in the pUC57 vector, and then subcloned into the pET28a (+) expression vector using restriction enzymes. Next, the recombinant plasmid was transformed into *E. coli* DH5α cells for amplification and verification. Following confirmation of successful cloning, the recombinant construct was introduced into *E. coli* BL21 and Rosetta expression strains. After that, protein expression was induced using 0.5 and 1 mM IPTG and evaluated at different post-induction time points. Finally, expression of the recombinant E5 protein was analyzed by SDS-PAGE and confirmed by western blotting using an anti-His tag antibody. The results demonstrated successful cloning of the 240-bp *E5* gene into the pET28a (+) vector. A distinct protein band with an approximate molecular weight of 10 kDa was observed following induction with 0.5 mM IPTG at 37°C for 18 h in the BL21 strain, whereas no detectable expression was observed in the Rosetta strain. Western blot analysis further confirmed the identity of the recombinant protein. The successful expression of the highly hydrophobic HPV16 E5 protein in *E. coli* BL21 demonstrates the suitability of this bacterial host for producing the recombinant E5 protein. These findings establish a foundation for subsequent purification and characterization studies and support future investigations into the biological role of E5 in HPV-associated carcinogenesis. Furthermore, the recombinant protein generated in this study may contribute to the development of novel diagnostic tools, therapeutic strategies, and HPV vaccine candidates.

| **Keywords**: HPV16, E5 oncoprotein, Cloning, Recombinant protein expression, *Escherichia coli* expression system, Western blotting

| منابع

1. International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory [Internet]. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer; [cited 2023 Feb 22]. Available from: https://gco.iarc.fr/
2. Pan American Health Organization. Plan of action for cervical cancer prevention and control 2018–2030. Washington (DC): Pan American Health Organization; 2018.
3.zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nat Rev Cancer. 2002;2(5):342-50.
4.Dalianis T. Human papillomavirus and oropharyngeal cancer, the epidemics, and significance of additional clinical biomarkers for prediction of response to therapy (Review). Int J Oncol. 2014;44(6):1799-805. doi:10.3892/ijo.2014.2355.
5.Tommasino M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. Semin Cancer Biol. 2014;26:13-21. doi:10.1016/j.semcancer.2014.02.002.
6.Pimenta JM, Galindo C, Jenkins D, Taylor SM. Estimate of the global burden of cervical adenocarcinoma and potential impact of prophylactic human papillomavirus vaccination. BMC Cancer. 2013;13:553. doi:10.1186/1471-2407-13-553.
7. Wakabayashi MT, Da Silva DM, Potkul RK, Kast WM. Comparison of human papillomavirus type 16 L1 chimeric virus-like particles versus L1/L2 chimeric virus-like particles in tumor prevention. Intervirology. 2002;45(4-6):300–307. doi:10.1159/000067921
8.DiMaio D, Petti LM. The E5 proteins. Virology. 2013;445(1-2):99-114. doi:10.1016/j.virol.2013.05.006.
9. Chang JL, Tsao YP, Liu DW, Huang SJ, Lee WH, Chen SL. The expression of HPV-16 E5 protein in squamous neoplastic changes in the uterine cervix. *J Biomed Sci*. 2001 Mar-Apr;8(2):206-13. doi:10.1159/000054034.
10. Maufort JP, Shai A, Pitot HC, Lambert PF. A role for HPV16 E5 in cervical carcinogenesis. *Cancer Res*. 2010 Apr 1;70(7):2924-2931. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3436.
11.Kersemaekers AMF, van de Vijver MJ, Kenter GG, Fleuren GJ. Oncogene alterations in carcinomas of the uterine cervix: overexpression of the epidermal growth factor receptor is associated with poor prognosis. *Clin Cancer Res*. 1999 Mar;5(3):577-586.
12.Basukala O, Banks L. The Not-So-Good, the Bad and the Ugly: HPV E5, E6 and E7 Oncoproteins in the Orchestration of Carcinogenesis. Viruses. 2021;13(10):1892. doi:10.3390/v13101892.
13.Ganguly N. Human papillomavirus-16 E5 protein: oncogenic role and therapeutic value. Cell Oncol (Dordr). 2012;35(2):67-76. doi:10.1007/s13402-011-0065-1.
14.Dillner J. Mapping of linear epitopes of human papillomavirus type 16: the E1, E2, E4, E5, E6 and E7 open reading frames. Int J Cancer. 1990;46(4):703-711. doi:10.1002/ijc.2910460426.
15.Yin J, Li G, Ren X, Herrler G. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. J Biotechnol. 2007;127(3):335-347. doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.07.012.
16.Magistrelli G, Malinge P, Elson G, Fischer N. Episomal vectors for rapid expression and purification of proteins in mammalian cells. In: Protein Purification. London: IntechOpen; 2012. doi:10.5772/29539
17.Casadaban MJ, Martinez-Arias A, Shapira SK, Chou J. Beta-galactosidase gene fusions for analyzing gene expression in Escherichia coli and yeast. Methods Enzymol. 1983; 100:293-308. doi:10.1016/0076-6879(83)00063-4.
18.Shatzman AR, Rosenberg M. Expression, identification, and characterization of recombinant gene products in Escherichia coli. Methods Enzymol. 1987; 152:661-673. doi:10.1016/0076-6879(87)52072-9.
19.Rader RA. Expression systems for process and product improvement. BioProcess Int. 2008;6(Suppl 4):4-9.
20.Kyratsous CA, Silverstein SJ, DeLong CR, Panagiotidis CA. Chaperone-fusion expression plasmid vectors for improved solubility of recombinant proteins in Escherichia coli. Gene. 2009;440(1-2):9-15. doi: 10.1016/j.gene.2009.03.011.
21.Sodoyer R. Expression systems for the production of recombinant pharmaceuticals. BioDrugs. 2004;18(1):51-62. doi:10.2165/00063030-200418010-00005.
22.Yang DH, Wildeman AG, Sharom FJ. Overexpression, purification, and structural analysis of the hydrophobic E5 protein from human papillomavirus type 16. Protein Expr Purif. 2003;30(1):1-10. doi:10.1016/S1046-5928(03)00049-4.
23.Rai M, Padh H. Expression systems for production of heterologous proteins. Curr Sci. 2001;80(9):1121-1128.
24.Rezaei L, Ayat H, Ahadi AM. Design and construction of pET32b (+) Rh expression vector based on pET system to facilitate purification. Cell Mol Res (Iran J Biol). 2021;34(2):208-218.
25.Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnol Adv. 2009;27(3):297-306. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.01.008.
26.Venuti A, Paolini F, Nasir L, Corteggio A, Roperto S, Campo MS, Borzacchiello G. Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. Mol Cancer. 2011;10:140.
27. Gutierrez-Xicotencatl L, Pedroza-Saavedra A, Chihu-Amparan L, Salazar-Piña A, Maldonado-Gama M, Esquivel-Guadarrama F. Cellular functions of HPV16 E5 oncoprotein during oncogenic

transformation. Mol Cancer Res. 2021;19(2):167-179. doi:10.1158/1541-7786.MCR-20-0491.
28.Monjarás-Ávila C, Bernal-Silva S, Bach H. Development of novel single-chain antibodies against the hydrophobic HPV-16 E5 protein. Biomed Res Int. 2018;2018:5809028. doi:10.1155/2018/5809028. PMID: 30027096; PMCID: PMC6031085.
29.Namvar A, Panahi HA, Agi E, Bolhassani A. Development of HPV 16, 18, 31, 45 E5 and E7 peptides-based vaccines predicted by immunoinformatics tools. Biotechnol Lett. 2020;42(3):403-418.
30.Etebar F, Hosseini SH. Phylogenetic analysis of C-type lectin from Toxocara canis infective larvae and comparison with the C-type lectin family in the immune system of mouse and human. Iran J Parasitol. 2018;13(1):49-57. doi:10.18502/ijpa.v13i1.2531.
31.Gholami Tilko P, Hajihassan Z, Moghimi H. Optimization of recombinant beta-NGF expression in Escherichia coli using response surface methodology. Prep Biochem Biotechnol. 2017;47(4):406-413. doi:10.1080/10826068.2016.1252927.
32.Fazeli B, Akbari V, Barkhordari A, Mir Mohammad Sadeghi H. Improvement of soluble production of reteplase in Escherichia coli by optimization of chemical chaperones in lysis buffer. Adv Biomed Res. 2019;8:65. doi:10.4103/2277-9175.266813.
33.Ge B, Qin S, Han L, Lin H, Qin J. Antioxidant properties of recombinant allophycocyanin expressed in Escherichia coli. J Photochem Photobiol B. 2006;84(3):175-180.
doi:10.1016/j.jphotobiol.2006.02.006.
34.Vatan Dost J, Hasanabadi S. Study of recombinant protein expression systems: introduction of S2 cells as an efficient expression system. J Sabzevar Univ Med Sci. 2016;23(1):169-182.
35.Rezaei S, Talebi AF. Progress in Escherichia coli production of recombinant proteins. New Cell Mol Biotechnol J. 2020;10(38):9-28.
36. Shi QF, Wei XL, Li H, Wang BN, Zhang WD, Jiang ZH, et al. Prokaryotic expression and identification of human papillomavirus type 16 E5 protein. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao = J South Med Univ. 2006;26(1):31-35.
37.Bahmani B, Aminibayat Z, Ranjbar MM, Bakhtiari N, Zarnani AH. Production of recombinant polyepitopic HPV16-E6 antigen: the effects of various strains and expression conditions. J Microbiol Biol. 2022;11(43):31-44.
38.Liao S, Deng D, Zhang W, Hu X, Wang W, Wang H, Lu Y, Wang S, Meng L, Ma D. Human papillomavirus 16/18 E5 promotes cervical cancer cell proliferation, migration and invasion in vitro and accelerates tumor growth in vivo. Oncol Rep. 2013;29(1):95-102. doi:10.3892/or.2012.2106.