

طراحی و تولید واکسن فیوژ شده جدید متشکل از پروتئین E7 و سم کلستریدیوم تتانی

محسن جوکار (MSc)^۱، ندا عسلی (MSc)^۲، آیلر جمالی (PhD)^۳، محسن فرهادی (MSc)^۴، یعقوب صفدری (PhD)^۱، یعقوب یزدانی (PhD)^{۲*}

۱- گروه زیست فناوری پزشکی، دانشکده فناوری های نوین علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان

۲- مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی و بیماری های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان

۳- گروه مهندسی نرم افزار، دانشکده مهندسی کامپیوتر، دانشگاه صنعتی شاهرود

دریافت: ۹۵/۶/۲۵، اصلاح: ۹۵/۷/۶، پذیرش: ۹۵/۹/۲۳

خلاصه

سابقه و هدف: سرطان گردن رحم از مهمترین عوامل مرگ و میر در زنان است. ویروس پاپیلومای انسانی در بیش از ۹۸٪ موارد این سرطان یافت شده است. پروتئین E7 آنتی ژن ضعیف در تحریک پاسخ ایمنی است. ناقل های پروتئینی نظیر سم تتانی رویکردی جدید در افزایش پاسخ ایمنی بر علیه آنتی ژن های ضعیف است. هدف از این مطالعه تولید پروتئین فیوژ شده جدید متشکل از پروتئین E7 و سم کلستریدیوم تتانی می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی پروتئین فیوژ شده E7 و سم تتانوس در سیستم بیانی باکتریایی تولید گردید. توالی مربوط به هر یک از قطعات از پایگاه اطلاعاتی NCBI بدست آمد. وزن مولکولی پروتئین نوترکیب و حضور شاخصه های آنتی ژنی بوسیله آزمون های الکتروفورز بر روی ژل آکریل آمید و وسترن بلات مورد بررسی قرار گرفت. پایگاه تجزیه و تحلیل ایمنی زایی اپیتوپ ها به منظور بررسی پتانسیل ایمنی زایی پروتئین فیوژ شده مورد استفاده قرار گرفت.

یافته ها: حضور باند ۴۲ کیلو دالتونی در آزمون های الکتروفورز و شاخصه های آنتی ژنی در آزمون وسترن بلات حاکی از تولید پروتئین نوترکیب است. بررسی نرم افزاری حاکی از پایدار بودن ساختار مولکولی پروتئین نوترکیب (شاخصه پایداری برابر با ۳۱/۱۴) و ایمنی زایی قابل قبول آن می باشد (پتانسیل تحریک پاسخ ایمنی برابر با ۰/۷۳).

نتیجه گیری: در این مطالعه فرم پایدار و کارآمد از پروتئین فیوژ شده با ساختار پروتئین E7 و سم کلستریدیوم تتانی تولید گردید.

واژه های کلیدی: سرطان گردن رحم، پروتئین E7 ویروس پاپیلومای انسانی، پروتئین نوترکیب، سم کلستریدیوم تتانی.

مقدمه

سرطان گردن رحم یک سرطان با پیشرفت آهسته می باشد که در دستگاه تناسلی روی می دهد (۱). ژنوم ویروس پاپیلومای انسانی تقریباً در ۹۸ درصد موارد این سرطان یافت شده است که این احتمال دخالت این ویروس را در بروز سرطان گردن رحم مطرح می نماید (۲). در میان پروتئین های ویروسی، پروتئین E6 و E7 نقش بسیار مهمی را در شکل گیری حالت سرطانی در سلول های آلوده ایفا می نمایند (۳). این پروتئین ها در انتقال پیام سلولی و تنظیم چرخه سلولی ایفای نقش می نمایند (۴). شیمی درمانی و رادیوتراپی شایعترین استراتژی های درمانی در تقابل با تمامی انواع سرطان ها می باشد (۵). کارایی پایین، اثرات جانبی مخرب بر سلول های سالم مجاور و کاهش دادن کارایی مغز استخوان در تولید سلول های خونی برخی از مهمترین اثرات منفی این نوع درمان ها می باشد (۶). امروزه استفاده از ترکیبات بیولوژیک، به عنوان یک استراتژی درمانی نوین و ایمن در کنترل دامنه وسیعی از بیماریها از قبیل عفونت های میکروبی و سرطان مطرح می باشد (۷و۸). بهره گیری از واکسن ها یک رویه جدید در درمان سرطان گردن رحم می باشد که در آن بر مبنای بهره گیری از سیستم ایمنی، سلولهای سرطانی

بصورت اختصاصی مورد هدف قرار می گیرند و لذا اثرات جانبی در این روش درمانی به حداقل ممکن کاهش می یابد (۹و۱۰). مطالعات اولیه در مدل های حیوانی حاکی از آن است که پروتئین E7 دارای خاصیت ایمنی زایی پایین بوده و پاسخ ایمنی ضعیفی را ایجاد می نماید (۱۱و۱۲). از لحاظ تئوریک استفاده از ایمونوژن های قدرتمند به عنوان ناقل (Hapten-Carrier) می تواند پاسخ ایمنی قابل قبولی را بر علیه آنتی ژن های با خاصیت ایمنی زایی پایین ایجاد نماید (۱۳). سم کلستریدیوم تتانی یک مثال از این نوع ناقلین آنتی ژنی می باشد. دومین ناحیه آمینی قطعه C از سم کلستریدیوم (DOM1) در فعال سازی لنفوسیت های T کشنده (Cytotoxic) ایفای نقش می نماید (۱۴). هدف از این مطالعه تولید یک پروتئین فیوژ شده نوترکیب با ساختار مولکولی پروتئین E7 و سم تتانوس (DOM1) به عنوان یک واکسن مفید احتمالی در جهت افزایش پاسخ ایمنی بر علیه آنتی ژن E7 و درمان سرطان ناحیه رحم است. تولید پروتئین نوترکیب با استفاده از تکنولوژی DNA در سیستم بیانی باکتریایی صورت گرفت.

این مقاله حاصل پایان نامه محسن جوکار دانشجوی کارشناسی ارشد زیست فناوری پزشکی و طرح تحقیقاتی به شماره ۹۲۰۹۱۲۱۶۰ دانشگاه علوم پزشکی گلستان می باشد.

*مسئول مقاله: دکتر یعقوب یزدانی

آدرس: گرگان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی و بیماریهای عفونی. تلفن: ۰۷۱-۳۲۴۳۰۵۶۳

E-mail: yazdani@goums.ac.ir

مواد و روش‌ها

طراحی و بهینه سازی سازه ژنی کد کننده پروتئین فیوژ شده: ساختار نوکلئوتیدی مربوط به پروتئین فیوژ شده از انتهای آمینی به ترتیب شامل برجسب هیسیدین (His tag)، جایگاه برشی آنزیم انتروکیناز، توالی نخستین دومین از سم تتانوس، توالی رابط سخت (Rigid linker) و توالی مربوط به پروتئین E7 می باشد. در نهایت توالی مربوط به جایگاه های برشی آنزیم های Xho و NcoI در دو انتهای توالی کدکننده اضافه گردید. اطلاعات مربوط به هر یک از توالی ها از پایگاه اطلاعاتی NCBI بدست آمد.

بمنظور بیان حداکثری و پایدار پروتئین فیوژ شده، توالی کد کننده پروتئین فیوژ شده بهینه سازی گردید. بهینه سازی با استفاده از نرم افزار DNA2 به گونه ای انجام پذیرفت که کدون هایی که بیشترین سازگاری را برای بیان داشتند انتخاب شد. محتوای توالی GC و شاخص سازگاری کدون (Codon =CAI) و adaptation index (نیز مورد بررسی قرار گرفت. نرم افزارهای ITASSER و PSIPRED برای پیش بینی ساختار فضایی و میزان پایداری احتمالی پروتئین فیوژ شده مورد استفاده قرار گرفت (۱۷-۱۵).

برای پیش بینی میزان کارایی و پتانسیل القاء پاسخ ایمنی توسط پروتئین فیوژ شده پایگاه تجزیه و تحلیل ایمنی زایی اپیتوپ ها (IEDB) استفاده شد (۱۸). در نهایت توالی بهینه شده برای ساخت در وکتور تکثیر PUC 57 سفارش داده شد (Shin gene).

بیان پروتئین فیوژ شده نوترکیب: وکتور بیانی PET-28a و باکتری BL21 از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سپس توالی کد کننده به محل کلونینگ وکتور بیانی PET-28a منتقل گردید. بمنظور ارزیابی و تایید فرایند انتقال ژن از آزمون تکثیر ژنی مستقیم بر روی کلونی ها (Direct Clony PCR) با استفاده از پرایمر های T7 بهره گیری شد. سپس وکتور های بیانی تایید شده با استفاده از فرایند شوک حرارتی به درون باکتری های مستعد (Competent) BL21 منتقل گردید. بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از IPTG یک میلی مولار القاء گردید.

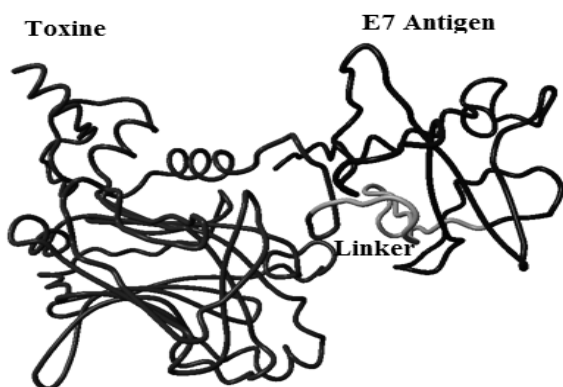
الگوی بیان پروتئین نوترکیب، ۵ تا ۶ ساعت پس از آن با استفاده از آزمون های الکتروفورز بر روی ژل آکریل آمید (SDS-PAGE) و وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۹). الکتروفورز بر روی ژل ۱۲ درصد و برای رنگ آمیزی از رنگ بروموفنل بلو استفاده شد. در آزمون وسترن بلات از آنتی بادی اولیه ضد E7 (Santa Cruz) و آنتی بادی ثانویه گونزوگه شده با HRP ضد IgG موشی (Sigma) استفاده شد.

یافته ها

بهینه سازی و شبیه سازی توالی کد کننده پروتئین نوترکیب: بعد از بهینه سازی، پیش بینی های نرم افزاری نشان داد که شاخص سازگاری کدون (CAI) از ۶۲ درصد به ۸۳ درصد و محتوای GC از ۳۳ درصد به ۴۹ درصد افزایش یافته است. پیش بینی ساختمان ثانویه نیز نشان می دهد که رابط سخت منجر به شکل گیری یک ساختار آلفا هلیکس بین دو بخش مختلف پروتئین فیوژ شده می شود (شکل ۱). پیش بینی ها همچنین نشان می دهد آرایش فضایی مربوط به ساختار

فضایی پروتئین فیوژ شده در دو بخش مربوط به E7 و سم هیچگونه اثر منفی فضایی بر یکدیگر ندارند. علاوه بر این شاخص ثبات پروتئین (Instability Index) در حدود ۳۱/۱۴ محاسبه گردید.

پیش بینی های مربوط به اتصال به مولکول سازگار نسجی کلاس یک در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان می دهد که پروتئین فیوژ شده از کارایی بالای برای برای تحریک پاسخ ایمنی برخوردار است. نمره مربوط به تحریک پاسخ ایمنی از طریق مولکول های سازگار نسجی کلاس یک در حدود ۰/۷۳ محاسبه گردید.



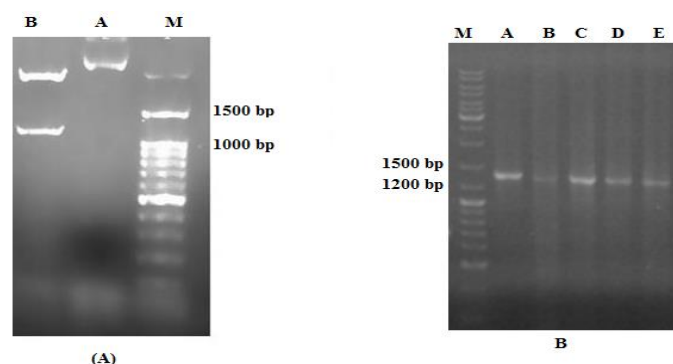
شکل ۱. ساختار سه بعدی پروتئین فیوژ شده نوترکیب. شکل گیری ساختار آلفا هلیکس بین دو بخش E7 و سم تتانی

مقایسه آل های مختلف HLA بیانگر این است که آل های بیشتری از HLA-A در قیاس با HLA-B توانایی ارائه شاخصه های آنتی ژنی (اپیتوپ) مربوط به پروتئین نوترکیب را دارا است. همچنین بررسی ساب تیپ های مختلف HLA نشان می دهد آل های HLA-B*08:01 و HLA-A*02:06 به ترتیب بیشترین پتانسیل را در تحریک پاسخ ایمنی دارا می باشد. الگوی برشی وکتور بیانی نوترکیب تولید شده (PET-28a) حاکی از حضور یک باند تقریباً ۱۲۰۰ جفت بازی می باشد که کاملاً با اندازه نوکلئوتیدی توالی طراحی شده همخوانی دارد (شکل ۲، بخش A). علاوه بر این نتایج حاصل از آزمون تکثیر ژنی، باندی در حدود ۱۳۶۰ جفت بازی را نشان می دهد که ۱۱۸۱ جفت باز آن مربوط به توالی طراحی شده و ۱۷۷ جفت باز آن مربوط به محل اتصال پرایمرهای T7 است (شکل ۲، بخش B). این یافته ها نشان می دهد که توالی مربوط به قطعه طراحی شده بصورت صحیح در محل کلونینگ وکتور بیانی وارد شده است.

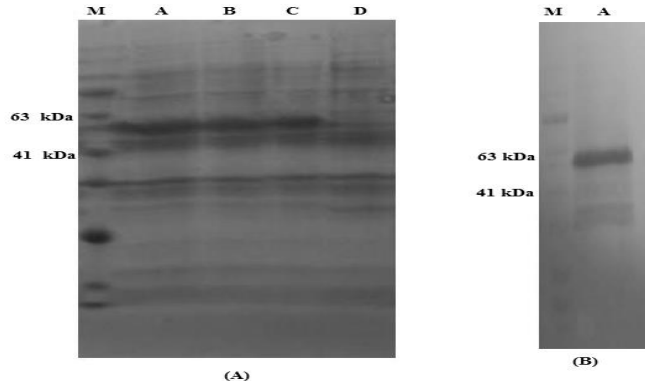
تولید پروتئین فیوژ شده نوترکیب: ارزیابی تولید پروتئین نوترکیب با استفاده از آزمون های الکتروفورز بر روی ژل آکریل آمید (SDS-PAGE) و وسترن بلات صورت پذیرفت. باندی پروتئینی نزدیک به ۴۲ کیلودالتون که کاملاً همخوان با پروتئین نوترکیب می باشد در الگوی الکتروفورز مشاهده شد (وزن تقریبی هر اسید آمینه ۱۱۰ دالتون محاسبه گردید) (شکل ۳، بخش A). علاوه بر این نتایج حاصل از وسترن بلات نشان می دهد که پروتئین مد نظر دارای شاخصه های آنتی ژنی مربوط به E7 نیز می باشد (شکل ۳، بخش B). در نهایت این یافته ها نشان دهنده تولید موفقیت آمیز پروتئین نوترکیب است.

جدول ۱. پیش بینی میل پیوندی شاخصه های آنتی ژنی مربوط به پروتئین نوترکیب برای آلل های مختلف مولکول های HLA کلاس یک. شاخصه هایی که مقدار IC50 آنها کمتر است دارای میل پیوندی بالاتری برای مولکول های HLA می باشند.

Allele	Seq_num	Start	End	Length	Peptide	ic50
HLA-A*02:01	۱	۳۰۵	۳۱۳	۹	YMLDLQPET	۲۰/۵۶
HLA-A*02:01	۱	۱۷۹	۱۸۷	۹	YLANKWVFI	۲۲/۶۵
HLA-A*02:01	۱	۳۷۱	۳۷۹	۹	LLMGTLGIV	۲۶/۱۳
HLA-A*02:06	۱	۱۰۳	۱۱۱	۹	FTVSFWLRV	۱۰/۳۴
HLA-A*02:06	۱	۱۷۹	۱۸۷	۹	YLANKWVFI	۳۰/۳۸
HLA-A*02:06	۱	۳۷۱	۳۷۹	۹	LLMGTLGIV	۳۴/۱۶
HLA-A*02:06	۱	۱۳۸	۱۴۶	۹	LSIGSGWSV	۴۵/۵۶
HLA-A*11:01	۱	۱۰۵	۱۱۳	۹	VSFWLRVPK	۱۲/۴۵
HLA-A*23:01	۱	۱۷۸	۱۸۶	۹	AYLANKWVF	۱۵/۱۲
HLA-A*24:02	۱	۱۷۸	۱۸۶	۹	AYLANKWVF	۴۰/۰۵
HLA-B*08:01	۱	۱۳۲	۱۴۰	۹	SMKKHSLSI	۹/۲۶



شکل ۲. الگوی الکتروفورز وکتور pET 28 نوترکیب برش خورده شده و تکثیر ژنی مستقیم بر روی کلنی. (A) ردیف شماره A نشانگر وکتور غیر برش خورده است. حضور باند تقریباً ۱۲۰۰ جفت بازی در ردیف شماره B بیانگر حضور قطعه طراحی شده است. (B) الگوی تکثیر ژنی مستقیم بر روی کلنیهای ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب pET 28. باند نزدیک به ۱۳۶۰ جفت بازی در ردیف های شماره A تا E بیانگر ورود موفقیت آمیز قطعه نوترکیب طراحی شده به محل کلونینگ وکتور بیانی pET 28 است.



شکل ۳. الگوی بیان پروتئین های تولیدی در باکتری BL21 ترانسفورم شده. (A) ردیف D نمایانگر پروتئین های تولیدی در باکتری غیر ترانسفورم شده است. ردیف M مارکر مولکولی است. ردیف های A تا C الگوی بیان پروتئین های تولیدی در باکتریهای ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب می باشد. (B) بررسی پروتئین های تولیدی با استفاده از آنتی بادی منوکلونال ضد E7. ردیف A بیانگر پروتئین های تولیدی در باکتری ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب است. ردیف M مارکر مولکولی است.

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه، پس از بهینه سازی توالی کد کننده میزان CAI و درصد GC به ترتیب ۸۳ درصد و ۴۹ درصد تعیین گردید. شاخصه میزان پایداری پروتئین فیوژ شده نیز ۱۴/۳۱ محاسبه گردید که منطبق با دستورالعمل شرکت سرویس دهنده برای پایدار بودن ساختمان پروتئین فیوژ شده قابل قبول می باشد. الگوی بیان پروتئین فیوژ شده بر روی ژل الکتروفورز حاکی از حضور باندی در حدود ۴۲ کیلو دالتون می باشد که اندازه ای برابر با پروتئین طراحی شده دارد. ایمنی زایی از مهمترین چالش های موجود بر سر راه طراحی واکسن بر علیه آنتی ژن ها می باشد و در این بین استفاده از ناقلین (Carrier) با خاصیت ایمنی زایی بالا نظیر قطعه C سم تتانوس (Fragment C) یک رویکرد بسیار موثر برای افزایش ایمنی زایی آنتی ژن ها می باشد. با خاصیت ایمنی زایی پایین نظیر E7 می باشد (۲۰).

بررسی ها بر روی پروتئین کوژوگه با ساختار سم وبا (OSP) و فرم نوترکیب زنجیره سنگین سم تتانی نشان می دهد که این واکسن نه تنها قادر به تحریک پاسخ ایمنی همورال بر ضد سم وبا می باشد بلکه پاسخ خاطره ایمنی نیز ایجاد می نماید (۲۱). مطالعه هم راستای دیگر که بر روی واکسنی با ترکیب ساختاری آنتی ژن Her-2 (آنتی ژن سرطان پستان) و قطعه C سم تتانی صورت پذیرفته بود، نشان می دهد این واکسن قادر به ایجاد پاسخ ایمنی قابل ملاحظه ای بر علیه سلول های سرطانی است (۲۲). بنابراین پروتئین فیوژ شده با ساختار آنتی ژن E7 و بخش C سم تتانی، می تواند به عنوان یک واکسن احتمالی کارآمد جهت محافظت یا مقابله با سرطان گردن رحم حاصل از ویروس پاپیلومای انسانی عمل نماید.

امروزه سیستم های بیانی متعددی برای تولید پروتئین نوترکیب مطرح می باشند که استفاده از هر یک بستگی به هدف و ساختار پروتئینی مولکول هدف دارد. سیستم بیانی باکتریایی به دلیل تولید حجم انبوه، مقرون به صرفه بودن و عدم تاثیر بر خاصیت ایمنی زایی بویژه بر علیه شاخصه های آنتی ژنی خطی جزو بهترین سیستم های بیانی می باشد (۲۳ و ۲۴). در این مطالعه بمنظور تخلیص بهتر پروتئین نوترکیب از برچسب هیستیدین (His Tag) در بخش آمینی استفاده شد (۲۵) و همچنین برای جداکردن توالی هیستیدین بعد از خالص سازی، جایگاه برش آنزیم انتروکیناز قبل از توالی پروتئین نوترکیب قرار داده شد (۲۶). برای حفظ ساختار فضایی و عدم تداخل در عملکرد شاخصه های آنتی ژنی دو بخش سمی و E7 بوسیله یک رابط سخت (Rigid linker) به یکدیگر متصل شدند (۲۶). بهینه سازی توالی کد کننده پروتئین فیوژ شده قبل از فرآیند کلونینگ تضمین کننده تولید موفقیت آمیز پروتئین نوترکیب می باشد. مناسب ترین میزان سازگاری کدون های خوانش برابر با ۱۰۰ درصد می باشد. بنابراین هرچه این عدد نزدیکتر به ۱۰۰ باشد میزان بیان پروتئین نوترکیب افزایش می یابد. درصد GC توالی کدکننده باید به گونه ای بالا باشد که منجر به پایداری ساختار کد کننده

شود و همچنین نباید آنقدر پایین باشد که منجر به اتصال غیر اختصاصی گردد. بررسی ایی توبی پروتئین بیان شده نشان می دهد که این پروتئین دارای اپیتوپ های مربوط به پروتئین E7 نیز می باشد که این خود تاییدی دیگر بر تولید موفقیت آمیز پروتئین فیوژ شده است. از لحاظ تئوریک شاخصه های آنتی ژنی غیر همپوشان هیچ اثر منفی بر شناسایی شدن یکدیگر توسط سیستم ایمنی ندارند. پیش بینی ساختار سه بعدی پروتئین فیوژ شده نشان می دهد دو بخش سمی و بخش مربوط به E7 توسط ساختار سخت آلفا هلیکس از یکدیگر جدا شده اند به گونه ای که هیچ همپوشانی با یکدیگر ندارند. یکی دیگر از عوامل تاثیرگذار در کیفیت پاسخ ایمنی بر علیه واکسن ها، گنجینه مولکول های HLA است. بررسی ها نشان می دهد هرچه شاخصه های آنتی ژنی میل پیوندی بیشتر و طیف ارائه کننده مولکولهای HLA بیشتر باشد پاسخ ایمنی بر علیه آن شاخصه ها بیشتر خواهد بود (۲۷).

پردازش و عرضه آنتی ژنها از مسیر مولکول های سازگار نسجی کلاس یک، مسیر اصلی فعال شدن لنفوسای های کشنده TCD8 می باشد (۲۸). بررسی های دقیق نشان می دهد اهمیت میل پیوندی شاخه های آنتی ژنی برای اتصال به مولکول های HLA کلاس یک حتی بیشتر از کمک سلول های T کمکی می باشد (۲۷). نتایج مطالعه گویای این مسئله می باشد که پروتئین طراحی شده از پتانسیل بالایی برای عرضه آنتی ژنی برخوردار است. نمره تحریک پاسخ ایمنی برای پروتئین طراحی شده نزدیک به ۰/۷۳ محاسبه شد که مطابق با دستورالعمل شرکت سرویس دهنده، نمره ای قابل قبول برای تحریک پاسخ ایمنی است. با توجه به عدم وجود داده های بانکی جامع در خصوص نوع بیان و میل پیوندی مولکول های HLA پر فرکانس جمعیت ایرانی برای اتصال به اپیتوپ های مختلف، این آلال ها مورد بررسی قرار نگرفتند که از آن می شود به عنوان محدودیت این مطالعه یاد کرد.

نوع گنجینه لنفوسیتی عامل تاثیر گذار دیگر در کیفیت پاسخ ایمنی بر علیه واکسن ها می باشد که در این مطالعه نیز مورد بررسی قرار گرفته نشده است. با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه و محدودیت های اشاره شده، پیشنهاد می گردد مطالعات بیشتری در خصوص کیفیت پاسخ ایمنی بر علیه این واکسن در مدل های آزمایشگاهی (Invitro) و مدل های حیوانی (In vivo) صورت پذیرد. برپایه مطالعه صورت گرفته در منابع علمی موجود، این مطالعه نخستین مورد در خصوص طراحی و تولید فرم کارآمد پروتئین فیوژ شده نوترکیب با ساختار پروتئین E7 و بخش القاء کننده پاسخ ایمنی سم تتانوس می باشد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی گلستان جهت حمایت مالی از این تحقیق، تشکر و قدردانی می گردد.

In Silico Modeling and Production of New Vaccine Consisting of E7 Antigen Conjugated with Tetanus Toxin

M. Jokar (MSc)¹, N. Asali (MSc)², A. Jamali (PhD)², M. Farhadi (MSc)³, Y. Safdari (PhD)¹, Y. Yazdani (PhD)^{*2}

1.Department of Medical Biotechnology, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, I.R.Iran

2.Laboratory Sciences and Infectious Diseases Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, I.R.Iran

3.Department of Computer Engineering, Shahrood University of Thechnology, Shahrood, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 19(1); Jan 2017; PP: 68-74

Received: Sep 15th 2016, Revised: Sep 27th 2016, Accepted: Nov 26th 2016.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: The cervical cancer is one of the main causes of death in women. Human Papilloma Virus (HPV) has been isolated in more than 98% of cervical cancer cases. The E7 has low capacity for induction immune response. Carrier proteins such as tetanus toxin are new approaches for increasing immune response against low immunogenic antigens. The aim of this study is production of new recombinant protein consisting of E7 antigen and tetanus toxin.

METHODS: This study is experimental study and recombinant fusion protein consisting of E7 and tetanus toxin produced in bacterial expression system. The coding sequence of fusion protein obtained from NCBI. Molecular weight and epitopes verified using *Polyacrylamide gel* and western blot analysis. For prediction of immunogenicity, epitope database and analysis resource (IEDB) was used.

FINDINGS: The presence of 42 kDa band in electrophoresis and epitopes in western blot analysis confirmed production of recombinant fusion protein. In silico modeling show that recombinant protein is stable (The parameter instability index (II) was near to 31.14) and has acceptable function in induction immune response (score of eliciting an immune response was close to 0.73).

CONCLUSION: This study was focused on modeling, optimization and production recombinant fusion protein consisting of E7 protein and tetanus toxin.

KEY WORDS: *Cervical cancer, Human papilloma virus E7, Recombinant protein, Tetanus toxin.*

Please cite this article as follows:

Jokar M, Asali N, Jamali A, Farhadi M, Safdari Y, Yazdani Y. In Silico Modeling and Production of New Vaccine Consisting of E7 Antigen Conjugated with Tetanus Toxin. J Babol Univ Med Sci. 2017;19(1):68-74.

*Corresponding author: Y. Yazdani (PhD)

Address: Laboratory Sciences and Infectious Diseases Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, I.R.Iran

Tel: +98 17 32430563

E-mail: yazdani@goums.ac.ir

References

- 1.Long HJ. Management of metastatic cervical cancer: review of the literature. *J Clin Oncol*. 2007;25(20):2966-74
- 2.Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999;189(1):12-9.
- 3.Chiantore MV, Mangino G, Iuliano M, Zangrillo MS, De Lillis I, Vaccari G, et al. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins affect the expression of cancer-related microRNAs: additional evidence in HPV-induced tumorigenesis. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016;142(8):1751-63
- 4.zur HH. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(9):690-8.
- 5.Green JA, Kirwan JM, Tierney JF, Symonds P, Fresco L, Collingwood M et al. Survival and recurrence after concomitant chemotherapy and radiotherapy for cancer of the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2001;358(9284):781-6.
- 6.Burstein HJ. Side effects of chemotherapy. Case 1. Radiation recall dermatitis from gemcitabine. *J Clin Oncol*. 2000;18(3):693-4
- 7.Javaheri-Kermani M, Farazmandfar T, Ajami A, Yazdani Y. Impact of hepcidin antimicrobial peptide on iron overload in tuberculosis patients. *Scand J Infect Dis*. 2014;46(10):693-6.
- 8.Yazdani Y, Sadeghi H, Alimohammadian M, et al. Expression of an innate immune element (mouse hepcidin-1) in baculovirus expression system and the comparison of its function with synthetic human hepcidin-25. *Iran J Pharm Res*. 2011;10(3):559-68.
- 9.Ling M, Kanayama M, Roden R, Wu TC. Preventive and therapeutic vaccines for human papillomavirus-associated cervical cancers. *J Biomed Sci*. 2000;7(5):341-56.
- 10.Yang A, Jeang J, Cheng K, Cheng T, Yang B, Wu TC, et al. Current state in the development of candidate therapeutic HPV vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2016;15(8):989-1007.
- 11.de JA, 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.
- 12.Lin K, Doolan K, Hung CF, Wu TC. Perspectives for preventive and therapeutic HPV vaccines. *J Formos Med Assoc*. 2010;109(1):4-24
- 13.Torres OB, Alving CR, Matyas GR. Synthesis of hapten-protein conjugate vaccines with reproducible hapten densities. *Method Mol Biol*. 2016;1403:695-710.
- 14.Stevenson FK, Ottensmeier CH, Johnson P, Delin Zhu, Sarah L. Buchan Katy J, McCann, et al. DNA vaccines to attack cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(2):14646-52.
- 15.Elena C, Ravasi P, Castelli ME, Peiru S, Menzella HG. Expression of codon optimized genes in microbial systems: current industrial applications and perspectives. *Front Microbiol*. 2014;5:21.
- 16.Roy S, Maheshwari N, Chauhan R, Sen NK, Sharma A. Structure prediction and functional characterization of secondary metabolite proteins of *Ocimum*. *Bioinformation*. 2011;6(8):315-9.
- 17.McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*. 2000;16(4):404-5
- 18.Immune Epitope Database (IEDB). Available from:<http://www.iedb.org/>
- 19.Yazdani Y, Keyhanvar N, Kalhor HR, Rezaei A. Functional analyses of recombinant mouse hepcidin-1 in cell culture and animal model. *Biotechnol Lett*. 2013;35(8):1191-7
- 20.Alving CR, Matyas GR, Torres O, Jalah R, Beck Z. Adjuvants for vaccines to drugs of abuse and addiction. *Vaccine*. 2014;32(42):5382-9.

21. Sayeed MA, Bufano MK, Xu P, Richelle C. Charles, Mohammad Murshid Alam et al. A Cholera Conjugate Vaccine Containing O-specific Polysaccharide (OSP) of *V. cholerae* O1 Inaba and Recombinant Fragment of Tetanus Toxin Heavy Chain (OSP:rTTHc) Induces Serum, Memory and Lamina Proprial Responses against OSP and Is Protective in Mice. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(7):e0003881.
22. Chotprakaikiat W, Allen A, Bui-Minh D, Harden E, Jobsri J, Cavallo F, et al. A plant-expressed conjugate vaccine breaks CD4(+) tolerance and induces potent immunity against metastatic Her2(+) breast cancer. *Oncoimmunol* 2016;5(6):1166323.
23. Sorensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 2005;115(2):113-28.
24. Miroux B, Walker JE. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol*. 1996;260(3):289-98.
25. Hengen P. Purification of His-Tag fusion proteins from *Escherichia coli*. *Trends Biochem Sci*. 1995;20(7):285-6.
26. Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2003;60(5):523-33.
27. Franco A, Tilly DA, Gramaglia I, Croft M, Cipolla L, Meldal M, et al. Epitope affinity for MHC class I determines helper requirement for CTL priming. *Nat Immunol*. 2000;1(2):145-50.
28. Nakamura K, Okuyama R. Immunotherapy for advanced melanoma: Current knowledge and future directions. *J Dermatol Sci*. 2016;83(2):87-94.