

Examination of MHC-1 Expression by J774 Macrophage Cells Treated with Recombinant Protein HIV-1 Tat 49-59 / HPV16, 18, 6, 11 E7 In Vitro

Tahora Mousavi¹,
Reza Valadan²,
Alireza Rafiei³,
Mohammadreza Haghshenas⁴

¹ Assistant Professor, Molecular and Cell Biology Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Assistant Professor, Department of Immunology, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Professor, Department of Immunology, Molecular and Cell Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Professor, Molecular and Cell Biology Research Center, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received March 15, 2021 ; Accepted June 16, 2021)

Abstract

Background and purpose: Human papillomavirus (HPV) is one of the infectious agents that causes genital and non-genital warts and skin cancers in humans. The E7 protein of this virus is one of the small oncoproteins that may be the main target in therapeutic vaccines. E7 protein with HIV-1 Tat peptide (49-59), plays a protective role that cause immune Th1 and CTLs response. The aim of this study was to design a recombinant HIV-1 Tat 49-59 / HPV16, 18, 6, 11 E7 protein in vitro and the function of this antigen for MHC-1 expression.

Materials and methods: In this study, macrophage cell line J774 was used to evaluate the expression of MHC-1 and the function of Tat peptide in delivery of recombinant protein to the surface of MHC-1. J744 mouse macrophage cell line was treated by 10, 50, and 100 µg of each of the proteins with and without Tat peptide. After 24 hours, the cells were collected and then analyzed by flow cytometry.

Results: In this study, J774 cells were treated and analyzed by E7-Tat and E7 proteins at different concentrations. The study showed that 10 µg of E7-Tat protein increased the expression of MHC-1, while at higher concentrations of this protein, the expression of MHC-1 molecule decreased considerably compared to the group without Tat peptide.

Conclusion: E7-Tat protein at lower concentrations can act as a stimulant for increasing the MHC-1 expression and could be used in therapeutic vaccines.

Keywords: MHC1 expression, J774 cells, HIV-1 Tat 49-59 peptide, HPV16, 18, 6, 11 E7 recombinant protein, therapeutic vaccine

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31(198): 40-47 (Persian).

* **Corresponding Author: Mohammadreza Haghshenas**- Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: haghshenas2001@yahoo.com)

بررسی بیان MHC1 توسط سلول ماکروفاژ J774 تریت شده با پروتئین نو ترکیب HIV-1 Tat 49-59/HPV16, 18, 6, 11 E7 در محیط آزمایشگاهی

طهورا موسوی¹
رضا ولدان²
علیرضا رفیعی³
محمد رضا حق شناس⁴

چکیده

سابقه و هدف: پاپیلوما ویروس انسانی (HPV) از جمله عوامل عفونی است که در انسان منجر به زگیل و بدخیمی های پوستی ژنیتال و غیر ژنیتال می شود. پروتئین E7 این ویروس، انکو پروتئین کوچکی است که هدف اصلی در واکنش های درمانی محسوب می شود. پروتئین E7 به همراه HIV-1 پپتید Tat (49-59) نقش حفاظتی ایفا نموده که منجر به پاسخ ایمنی CTLs و Th1 ها می شود. هدف از این مطالعه طراحی پروتئین نو ترکیب HIV-1 Tat 49-59/HPV16, 18, 6, 11 E7 در محیط آزمایشگاهی بود تا بتوان عملکرد این آنتی ژن را در بیان MHC1 مورد بررسی قرار داد.

مواد و روش ها: در این مطالعه جهت بررسی بیان MHC1 و همچنین عملکرد پپتید Tat در عرضه پروتئین نو ترکیب به سطح MHC1 از رده سلولی ماکروفاژ J774 استفاده شد. رده سلولی ماکروفاژ موشی J744 با غلظت های 10، 50 و 100 میکروگرم از هر یک از پروتئین های دارای پپتید Tat و فاقد پپتید Tat تیمار شدند. پس از 24 ساعت سلول ها جمع آوری و سپس توسط دستگاه فلوسایتومتری خوانش شد.

یافته ها: در این بررسی سلول های J774 با پروتئین های E7-Tat و E7 در غلظت های مختلف تریت و مورد ارزیابی قرار گرفتند. این مطالعه نشان می دهد که غلظت 10 میکروگرم از پروتئین E7-Tat منجر به افزایش بیان MHC1 شده است، در حالی که در غلظت های بالاتر از این پروتئین، بیان مولکول MHC1 نسبت به گروه فاقد Tat کاهش چشمگیری داشته است. **استنتاج:** بررسی این مطالعه نشان می دهد که پروتئین E7-Tat در غلظت های پایین تر می تواند به عنوان محرکی در جهت افزایش بیان MHC1 عمل کند و به نظر می رسد که می تواند در واکنش های تراپوتیک مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: بیان MHC1، سلول های J774، پپتید HIV-1 Tat 49-59، پروتئین نو ترکیب HIV-1 Tat 49-59/HPV16, 18, 6, 11 E7، واکنش درمانی

مقدمه

پاپیلوما ویروس انسانی (HPV) از جمله ویروس های فاقد انولوپ بوده که با ژنوم حلقوی حدود 8 کیلو

مؤلف مسئول: محمد رضا حق شناس - ساری: کیلومتر 17 جاده فرح آباد، مجمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی
Email: Haghshenas2001@yahoo.com

1. استادیار، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی مولکولی، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

2. استادیار، گروه ایمنونولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

3. استاد، گروه ایمنونولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

4. استاد، گروه میکروبی شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: 1399/12/5 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1399/12/11 تاریخ تصویب: 1400/3/26

ورود به APC ها مستقیماً در سطح MHC1 هدایت کند و منجر به افزایش تولید سلول‌های CD8+ اختصاصی شود (9). از جمله مهم‌ترین APC ها می‌توان به دندریتیک سل‌های نشأت گرفته از مونوسیت‌ها (MDDC)، سلول‌های T بلاست (TCB) و سلول‌های B لنفوبلاستوئید (BLCL) اشاره نمود که نقش مهمی در پاسخ ایمنی علیه عفونت‌های ویروسی، فعال‌سازی لنفوسیت‌های T و کموکاین‌های β^2 وابسته به بیان بالای MHC1، ترشح مولکول‌های CD40، CD80، CD86 و همچنین تولید سایتوکاین‌های (IL-1 β ، TNF- α ، IL-12، IL-15) ایفا می‌کند (10). یکی از مشکلات واکسن‌های پروتئینی و پپتیدی این است که ممکن است پپتیدها تغییر شکل پیدا کنند و نتوانند پاسخ ایمنی قوی را تحریک کنند. از طرفی این پروتئین‌ها داخل اندوزم رفته و مسیر MHC2 را فعال می‌کنند و قادر نیستند پاسخ T-Cell سایتوتوکسیک قوی را القاء کنند. بنابراین برای این که پروتئین وارد سیتوزول شده و مسیر MHC1 را طی کند نیاز به استفاده از یک پپتید نافذ سلول از جمله توالی پپتیدی و یا پروتئینی Tat است که ورود پروتئین را به این مسیر افزایش دهد (11).

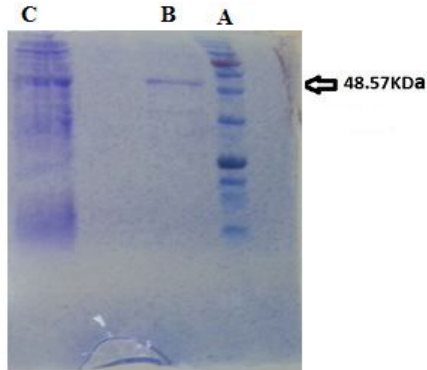
در این مطالعه از توالی‌های E7 به‌عنوان پروتئین‌های کاندید واکسن استفاده شد. پروتئین‌های E7 از جمله پروتئین‌های غیر ساختاری ویروس بوده که در قسمت درونی ویروس قرار دارند و در پاسخ ایمنی سلولی حائز اهمیت هستند. هدف از این مطالعه طراحی آنتی ژن جدیدی علیه سلول‌های توموری HPV در محیط آزمایشگاهی است که با اتصال پپتید کاتیونیک HIV-1 Tat 49-59 به قسمت N ترمینال پروتئین نو ترکیب E7 11، 6، 18، 16 HPV بتوان بیان MHC1 و همچنین عملکرد این پپتید را در ارائه پروتئین نو ترکیب به MHC1 مورد بررسی قرار داد.

تنظیم‌کننده غیرساختاری (E1, E2, E4, E5, E6, E7) ناحیه اولیه و ناحیه تاخیری را کد می‌نماید که از میان این پروتئین‌ها، E7, E6 نقش بسزایی در اختلال چرخه سلولی و تومورزایی ایفا می‌کنند (1). تا کنون بیش از 200 نوع تایپ مختلف از این ویروس شناسایی شده که در بسیاری از مهره داران از جمله انسان منجر به زگیل و بدخیمی‌های پوستی ژنیتال و غیر ژنیتال می‌شوند (2). تایپ‌های پرخطر این ویروس شامل (16، 18، 31، 35، 39، 45، 51، 52، 56، 59 و ..) و تایپ‌های کم خطر شامل (4، 3، 43، 44، 43، 42، 40، 11، 6، 54 و ..) می‌باشد (3، 4). تایپ‌های 16 و 18 تقریباً 70 درصد با سرطان سرویکس در ارتباط می‌باشد در حالی که تایپ‌های کم خطر 6 و 11 حدود 100-96 درصد با زگیل‌های تناسلی در ارتباط است (5). به‌طور کلی سرطان سرویکس دومین سرطان شایع در میان زنان می‌باشد. سالانه 493000 نفر به این بیماری مبتلا شده و حدود 273000 نفر جان خود را از دست می‌دهند که این میزان در بیش از 80 درصد کشورهای پیشرفته رخ می‌دهد. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که DNA HPV در بسیاری از سرطان‌ها از جمله سرطان دهان و مجاری تنفسی، پستان، مقعد، مری و سرویکس مشاهده می‌شود (6، 7). سال‌هاست که بررسی‌ها بر روی واکسن‌های مختلف پروتئینی صورت گرفته است، به‌طوری که این پروتئین‌ها با اتصال به شیار MHC1 بتوانند به‌عنوان واکسنی موثر در درمان بیماران مبتلا به HPV کاربرد داشته باشد. یکی از استراتژی‌هایی که برای دسترسی به پپتیدها به سیستم ایمنی بدن و پاسخ ایمنی اختصاصی علیه این پروتئین‌ها به کار گرفته می‌شود استفاده از پپتید نافذ سلول یا CPP¹ می‌باشد (8). یکی از این پپتیدها HIV-1 Tat می‌باشد که اخیراً بررسی‌های متعددی بر روی آن انجام گرفته است. این پروتئین محلول و بسیار کوچک حاوی 101-86 اسید آمینه می‌باشد که قادر است آنتی ژن را از طریق

1. macrophage-inflamatory protein (MIP)-1 α , MIP-1 β RANTES

1. cell-penetrating peptide

مواد و روش ها



تصویر شماره 1: بیان و تخلیص پروتئین HIV-1 Tat 49-59/HPV16, 18, 6, 11 E7
A: لدر، B: تخلیص پروتئین نو ترکیب با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی (سایز 48/57 کیلودالتون)، C: پروتئین بیان شده نو ترکیب

کشت سلول

در این مطالعه جهت بیان MHC1 و همچنین عملکرد پپتید Tat در ارائه پروتئین نو ترکیب به MHC1 از رده سلولی ماکروفاژ J774 استفاده شد. محیط کشت مورد استفاده جهت رشد و تکثیر این رده سلولی حاوی محیط Roswell Park Memorial Institute (RPMI) همراه 10 درصد سرم جنین گاو fetal bovine serum (FBS) و رقت 1:100 آنتی بیوتیک در انکوباسیون با شرایط CO₂ 5% و رطوبت مناسب می باشد.

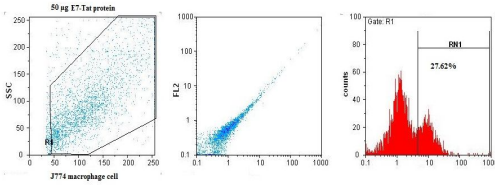
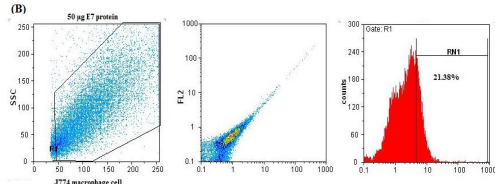
بررسی بیان و عرضه کنندگی آنتی ژن بر سطح MHC1 رده سلولی ماکروفاژ موشی J744 در محیط کشت RPMI به همراه آنتی بیوتیک کشت داده شد. سپس توسط اسکرابر جمع آوری شد و در پلیت های 24 خانه به تعداد 5×10^5 کاشته شدند و به مقدار 700-500 میکرولیتر از محیط کشت فاقد سرم به آن اضافه شد. پس از طی 24 ساعت هر یک از چاهک ها به صورت داپلیکیت با غلظت های 10، 50 و 100 میکروگرم از هر یک از پروتئین های دارای پپتید Tat و فاقد پپتید Tat تربیت شدند. همچنین گروه کنترل (فاقد تربیت) نیز در نظر گرفته شد. پس از طی 24 ساعت از تربیت، سلول ها جمع آوری شده و با دور 3000 به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ شد. جهت خوانش توسط دستگاه فلوسایتومتری، نمونه و ایزو تایپ

طراحی پلازمید حاوی ژن های HIV-1 Tat 49-59/HPV16, 18, 6, 11 E7 و HPV16, 18, 6, 11 E7 واکسن طراحی شده شامل توالی از ژن های E7 تایپ های HPV16, 18, 6, 11 بود که در پلازمید pET22 ملحق شده و توسط لینکر مناسب (گلاسیسین - سرین) از قسمت N ترمینال به پپتید HIV-1 Tat(49-59) و از قسمت C ترمینال به His tag متصل شد. این ساختار توسط شرکت بیومتیک کانادا سنتز شد. جهت به دست آوردن توالی ژنی فاقد پپتید Tat، هضم آنزیمی پلازمید pET22 مورد نظر توسط آنزیم های Xho1 و Nco1 انجام شد و ژن فاقد توالی Tat در پلازمید pET28 کلون شد. تولید پروتئین های نو ترکیب HIV-1 Tat 49-59/HPV16, 18, 6, 11 E7 و HPV16, 18, 6, 11 E7 جهت بیان پروتئین های نو ترکیب HIV-1 Tat 49-59/HPV16, 18, 6, 11 E7 و HPV16, 18, 6, 11 E7 از سویه *E. coli* (BL21) در محیط حاوی آنتی بیوتیک های اختصاصی (آمپی سیلین و کانامایسین) استفاده شد و در دمای 37 درجه سانتی گراد با دور 170 rpm در دستگاه انکوباسیون قرار گرفت. پس از رسیدن OD باکتری به 0/6-0/8، محیط کشت باکتری توسط IPTG (Isopropyl-D-thiogalactoside) به میزان 0/1-0/5 میلی مولار القا شد و سپس جهت بیان پروتئین به مدت 16 ساعت در دمای 37 درجه در انکوباسیون قرار گرفت. پس از آن سانتریفیوژ با دور 6000 به مدت 15 دقیقه در دمای 4 درجه صورت گرفت و سپس پلت باکتری با بافر حل کننده حاوی [50mM Tris-HCL PH=7.5, 1.5M NaCl, 20mM Imidazol, Urea 8M, Guanidine 6M, 5mM 2ME, and 2% Triton100x] لیز شد. سپس تخلیص پروتئین حل شده توسط ایمیدازول 500 میلی مولار و ستون Ni-NTA و کروماتوگرافی تمایلی صورت گرفت و پس از دیالیز و تایید با SDS PAGE جهت کار در کشت سلول آماده شد (12) (تصویر شماره 1).

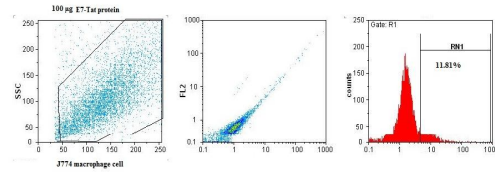
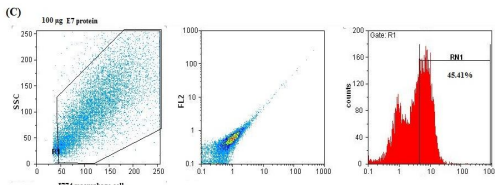
MHC1 به عنوان کنترل و نمونه به همراه آنتی‌بادی MHC1 به عنوان نمونه اصلی توسط دستگاه خوانش شد.

یافته ها

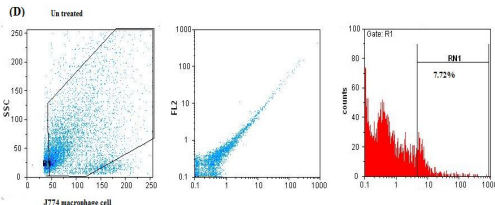
نمودار شماره 1 نشان می‌دهد که تریت سلول‌های J774 با پروتئین E7 به میزان 10 میکروگرم منجر به بیان MHC1 به میزان 28/32 درصد می‌گردد، این در حالی است که تریت این سلول‌ها با پروتئین E7-Tat به میزان 61/67 میکروگرم منجر به بیان MHC1 به میزان 2 درصد می‌شود. از طرفی نمودار شماره 2 در خصوص تریت سلول‌های J774 با پروتئین E7 و پروتئین E7-Tat نشان دهنده این است که بیان MHC1 در سلول‌های J774 به ترتیب به میزان 21/38 درصد و 27/62 درصد خواهد بود. همچنین نمودار شماره 3 نشان می‌دهد که در غلظت 100 میکروگرم از پروتئین E7-Tat تریت شده با سلول‌های J774، میزان بیان MHC در مقایسه با 100 میکروگرم از پروتئین E7 کاهش می‌یابد (11/81 درصد در مقابل 45/41 درصد). به‌طور کلی نتایج این مطالعه بیان‌گر آن است که تریت سلول‌های J774 با غلظت بالای پروتئین E7-Tat منجر به کاهش بیان MHC1 می‌شود که این نتایج با غلظت‌های مختلف و همچنین گروه کنترل (7/72 درصد) (نمودار شماره 4) مقایسه شده‌اند. بنابراین پروتئین E7-Tat در غلظت‌های پایین‌تر می‌تواند به عنوان محرکی در جهت افزایش بیان MHC1 عمل کند.



نمودار شماره 2: تریت سلول‌های J774 با غلظت 50 میکروگرم از پروتئین‌های E7 و E7-Tat



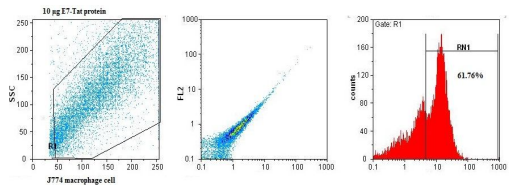
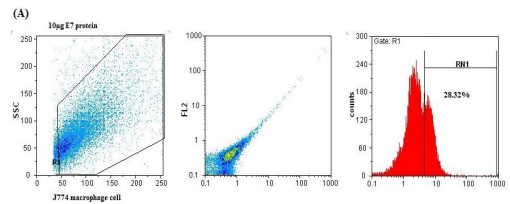
نمودار شماره 3: تریت سلول‌های J774 با غلظت 100 میکروگرم از پروتئین‌های E7 و E7-Tat



نمودار شماره 4: سلول‌های J774 تریت نشده (کنترل)

بحث

مطالعه حاضر نشان می‌دهد که فیوژن پروتئین HIV-1 Tat 49-59/HPV16, 18, 6, 11 E7 مناسب منجر به افزایش بیان MHC1 شده بنابراین می‌تواند در عرضه آنتی‌ژن به MHC1 از طریق مسیر سیتوزول موثر باشد. امروزه مطالعات بسیاری در رابطه با



نمودار شماره 1: تریت سلول‌های J774 با غلظت 10 میکروگرم از پروتئین‌های E7 و E7-Tat

Tat 49-57/E749-57 و ادجونت mGM-CSF (به عنوان ادجونت ضد توموری) جهت واکسیناسیون علیه HPV16 استفاده کردند، مشاهده شد که این واکسیناسیون منجر به افزایش پاسخ ایمنی علیه E7 HPV16 شده و پاسخ ضد توموری علیه سلول‌های TC-1 ایفا می‌کند (17). در دیگر مطالعه انجام شده توسط Zhao و همکارانش که از فیوژن پروتئین Tat-gp96 در واکسیناسیون استفاده کردند، مشخص شد که پپتید Tat منجر به دریافت gp96 توسط APCها شده و باعث القا بیش تر MHC1 و نیز پاسخ CTLها می‌شود (18). همچنین مطالعات نشان می‌دهد که پپتید Tat در شرایط آزمایشگاهی با اتصال مستقیم به سطح سلول و القای ماکروپینوسیتوز به عنوان یک سیستم انتقال پروتئین به سلول‌های محیط کشت استفاده می‌شود و در بافت زنده می‌تواند به عنوان درمان سرطان در واکسن‌های تراپئوتیک مورد استفاده قرار گیرد (19). یکی از دلایلی که امروزه واکسن‌های پیشگیری‌کننده جزو برنامه عمومی واکسیناسیون در اغلب کشورها از جمله ایران محسوب نمی‌شوند هزینه بالا جهت واکسیناسیون می‌باشد. با توجه به این که در واکسن‌های موجود تنها از پروتئین LI استفاده شده که القاکننده ایمنی همورال می‌باشد، لذا این واکسن‌ها تنها جنبه پیشگیری دارند. با توجه به اهمیت سرطان سرویکس و همچنین رشد روز افزون آن در جامعه، لذا تحقیقات زیادی بر روی واکسن‌های مختلف درمانی و پیشگیری علیه این نوع سرطان متمرکز شده است. با توجه به عملکرد پپتید Tat در این مطالعه انتظار می‌رود که بتوان از این نوع آنتی‌ژن در واکسن‌های درمانی استفاده نمود.

سپاسگزاری

این طرح حاصل قسمتی از پایان نامه با کد مصوب IR.MAZUMS.REC.96.3049 می‌باشد. لذا از معاونت محترم تحقیقات فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران به دلیل حمایت‌هایشان تشکر و قدردانی می‌گردد.

ساخت یک واکسن درمانی و همگانی برای درمان سرطان‌های ناشی از HPV صورت گرفته است. شناسایی توالی‌هایی از آنتی‌ژن‌های ویروس که در اتصال به آنتی‌بادی‌ها نقش دارند، در برخی کاربردهای بیومدیکال مانند طراحی واکسن مفید است. با توجه به این که در مطالعات مختلفی که روی نمونه‌های سرطانی سرویکس، واژینال و حفره دهانی انجام شد، تایپ‌های غالب پرخطر شامل ۱۶، ۱۸ و تایپ‌های کم‌خطر غالب شامل ۶ و ۱۱ گزارش شده است (۱۴، ۱۳). بنابراین در این مطالعه یک ساختمان منتخب حاوی پروتئین E7 تایپ‌های (۱۶، ۱۸، ۶، ۱۱) به همراه توالی 11 اسید آمینه‌ای Tat که توسط لینکر به هم متصل شده‌اند به عنوان واکسن پپتید نسل جدید همگانی در نظر گرفته شد تا بتواند به عنوان یک واکسن درمانی عمل کند.

بررسی‌ها نشان می‌دهند که Tat HIV-1 از جمله پپتیدهای کاتیونیک است که قادر است ماکرومولکول‌های پروتئینی، پپتیدی و لیپوزومی تا وزن 200-20 کیلودالتون را از طریق مسیر سیتوزول به درون سلول وارد کرده و آن‌ها را به MHC1 عرضه نماید و باعث افزایش سلول‌های CD8+ می‌گردد. در بررسی انجام شده نشان دادند که فیوژن پروتئین همراه پپتید Tat به دلیل ایمن بودن و همچنین اثربخشی که دارد می‌تواند در القا ایمنی سلولی و ایمونوتراپی موثر واقع شود (15). در مطالعه انجام شده توسط WOO و همکارانش که از توالی Tat جهت فیوژن به پروتئین (carcinoembryonic) CEA به همراه ادجونت CPG-ODN استفاده کردند؛ پس از ارزیابی در موش آزمایشگاهی مشاهده کردند که این ترکیب منجر به افزایش پاسخ CTL، اینترفرون گاما، افزایش Th1 و همچنین افزایش IgG2a در مقایسه با CPG-ODN، CEA-CPG-ODN و یا CEA-Tat به تنهایی شده است. به نظر می‌رسد که CD8 + T Cell ها و سلول‌های NK به عنوان افکتورهای اصلی هستند که به همراه CEA-Tat دارای اثرات ضد توموری می‌باشد (16). در مطالعه دیگری که توسط Tang و همکارانش از نانوذره

References

1. Pappa KI, Kontostathi G, Lygirou V, Zoidakis J, Anagnou NP. Novel structural approaches concerning HPV proteins: Insight into targeted therapies for cervical cancer. *Oncol Rep* 2018; 39(4): 1547-1554.
2. Mousavi T, Saravi SS, Valadan R, Haghshenas MR, Rafiei A, Jafarpour H, et al. Different types of adjuvants in prophylactic and therapeutic human papillomavirus vaccines in laboratory animals: a systematic review. *Arch Virol* 2019; 165(2): 263-284.
3. Mousavi T, Rafiei A, Haghshenas MR, Sadeghian-Kiadehi SF, Valadan R. Molecular prevalence and phylogenetic analysis of human papillomavirus in normal cervical samples from northern Iran. *Gene Rep* 2020; 21:100958.
4. Schiffman M, Clifford G, Buonaguro FM. Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. *Infect Agent Cancer* 2009; 4(1): 8.
5. Wigle J, Coast E, Watson-Jones D. Human papillomavirus (HPV) vaccine implementation in low and middle-income countries (LMICs): health system experiences and prospects. *Vaccine* 2013; 31(37): 3811-3817.
6. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer C, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55(4): 244-265.
7. 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): 12-19.
8. Tang J, Yin R, Tian Y, Huang Z, Shi J, Fu X, et al. A novel self-assembled nanoparticle vaccine with HIV-1 Tat 49- 5HPV16 E7 49- 57 fusion peptide and GM-CSF DNA elicits potent and prolonged CD8(+) T cell-dependent anti-tumor immunity in mice. *Vaccine* 2012; 30(6): 1071-1082.
9. Alipour S, Mahdavi A, Abdoli A. The effects of CpG-ODNs and Chitosan adjuvants on the elicitation of immune responses induced by the HIV-1-Tat-based candidate vaccines in mice. *Pathog Dis* 2017; 75(20): 1-9.
10. Fanales-Belasio E, Moretti S, Nappi F, Barillari G, Micheletti F, Cafaro A, et al. Native HIV-1 Tat protein targets monocyte-derived dendritic cells and enhances their maturation, function, and antigen-specific T cell responses. *J Immunol* 2002; 168(1): 197-206.
11. Mohammadi M, Dehghani P, Mohseninia A, Roozbehani M, Hemphill A, Hesamizadeh K. Incorporation of the Tat cell penetrating peptide into nanofibers improves the respective antitumor immune response. *J Cell Physiol* 2021; 236(2): 1401-1417.
12. Mousavi T, Valadan R, Rafiei A, Abbasi A, Haghshenas MR. A Novel Recombinant Protein Vaccine Containing the Different E7 Proteins of the HPV16, 18, 6, 11 E7 Linked to the HIV-1 Tat (47-57) Improve Cytotoxic Immune Responses. *Research Square* 2020; 1-21
13. Taghizadeh E, Taheri F, Abdolkarimi H, Renani PG, Hayat SMG. Distribution of human papillomavirus genotypes among women in Mashhad, Iran. *Intervirolgy* 2017; 60(1-2): 38-42.
14. Akhondnezhad M, Haghshenas MR, Ghasemi M, Mousavi T. The prevalence and genotyping of human papillomavirus in patients with oral tumors in health centers and clinics of

- Mazandaran in Iran. *Virus Disease* 2018; 29(3): 297-302.
15. Cafaro A, Tripiciano A, Picconi O, Sgadari C, Moretti S, Buttò S, et al. Anti-Tat Immunity in HIV-1 Infection: Effects of Naturally Occurring and Vaccine-Induced Antibodies Against Tat on the Course of the Disease. *Vaccines* 2019; 7(3): 99.
16. Woo SJ, Kim CH, Park MY, Kim HS, Sohn HJ, Park JS, et al. Co administration of carcinoembryonic antigen and HIV TAT fusion protein with CpG oligodeoxynucleotide induces potent antitumor immunity. *Cancer Science* 2008; 99(5): 1034-1039.
17. Tang J, Yin R, Tian Y, Huang Z, Shi J, Fu X, et al. A novel self-assembled nanoparticle vaccine with HIV-1 Tat49-57/HPV16 E749-57 fusion peptide and GM-CSF DNA elicits potent and prolonged CD8+ T cell-dependent anti-tumor immunity in mice. *Vaccine* 2012; 30(6): 1071-1082.
18. Zhao B, Wang Y, Zhang Y, Li Y, Zhang X, Xu Y, et al. TAT-mediated gp96 transduction to APCs enhances gp96-induced antiviral and antitumor T cell responses. *Vaccine* 2013; 31(3): 545-552.
19. Chen X, Lai J, Pan Q, Tang Z, Yu Y, Zang G. The delivery of HBcAg via Tat-PTD enhances specific immune response and inhibits Hepatitis B virus replication in transgenic mice. *Vaccine* 2010; 28(23): 3913-3919.