



## Cloning and Expression of *IL-15* Gene in *E. coli*, Rosetta (DE3) Strain

### ARTICLE INFO

#### Article Type

Original Research

#### Authors

Bahrololoumi Shapour Abadi M.<sup>1</sup>  
Pharm D,  
Arashkia A.<sup>1</sup> PhD,  
Mohajel N.<sup>1</sup> PhD,  
Roohvand F.<sup>1</sup> PhD,  
Azadmanesh K.<sup>\*1</sup> PhD

#### How to cite this article

Bahrololoumi Shapour Abadi M, Arashkia A, Mohajel N, Roohvand F, Azadmanesh K. Cloning and Expression of *IL-15* Gene in *E. coli*, Rosetta (DE3) Strain. Pathobiology Research. 2020;23(1):27-32.

### ABSTRACT

Interleukin 15 (IL-15) is a cytokine that, due to its physiological activity, can play a role in anti-cancer therapies. It shows positive effect on Natural Killer cells differentiation, proliferation, activation, and surveillance and also on surveillance of memory CD8<sup>+</sup> T cells. However, the expression and purification yield of recombinant *IL-15* is low. So, it worth improving the production conditions of this useful protein. Therefore in the present study, cloning and expression of human *IL-15* are reported in *E. coli*, strain Rosetta (DE3) which is different from previous bacterial hosts BL21 strain. This strain (Rosetta DE3) has the potential to use codons rarely used by bacteria and consequently, the expressed protein can be more similar to the human protein. First, the human *IL-15* coding sequence was synthesized, and then the sequence was cloned into pET28a plasmid. Confirming the accuracy of the final construct was done by colony PCR, restriction analysis (which was done using BamHI and XhoI restriction enzymes and the expected 391bp band was observed) and sequencing. Then, the recombinant construct was transformed into competent *E. coli* Rosetta (DE3) bacteria. Expression was done in OD<sub>600</sub> of 0.6 in the presence of 1mM Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Protein characterization was done by SDS-PAGE and then by western blotting using a specific commercial anti-*IL-15* antibody. The 15kDa band on the gel and blot, showed the presence of *IL-15*. Densitometry by Fiji software determined 37% production yield. It is expected a suitable function from this produced recombinant cytokine due to expression in *E. coli* Rosetta (DE3) in future studies.

**Keywords** Interleukin-15; Cloning and Expression; *Escherichia coli* Rosetta (DE3) Strain

### CITATION LINKS

[1] Identification and distribution of Acanthamoeba species ... [2] Novel Acanthamoeba 18S rRNA ... [3] Isolation and genotyping of Acanthamoeba ... [4] Isolation and molecular characterization of ... [5] Genotyping of Acanthamoeba isolates and ... [6] Isolation and genotyping of ... [7] Pathogenesis of Acanthamoeba ... [8] Distribution of Acanthamoeba genotypes ... [9] Ophthalmology hospital wards ... [10] Isolation of Acanthamoeba ... [11] Standardized method ... [12] Characterisation and differentiation of pathogenic ... [13] Acanthamoeba castellanii: High antibody ... [14] Balamuthia and Acanthamoeba-binding antibodies in West African human ... [15] Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living ... [16] Diagnosis and management of Acanthamoeba ... [17] Comparison of PCR, microscopic examination and culture for the early diagnosis and characterization of Acanthamoeba isolates from ocular ... [18] Role of confocal microscopy in the diagnosis of fungal and acanthamoeba ... [19] Genotyping of Acanthamoeba species isolated from keratitis patients by PCR sequencing methods in Tehran ... [20] Detection of Acanthamoeba from fresh water using polymerase chain ... [21] Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of acanthamoebae from humans with keratitis and from sewage ... [22] Current status of Acanthamoeba in Iran: a narrative review ... [23] An update on Acanthamoeba keratitis: diagnosis, pathogenesis and ... [24] Isolation and genotyping of Acanthamoeba ... [25] Genotyping of Acanthamoeba isolated from surface and stagnant waters of Qazvin, Central ... [26] Occurrence of Potentially Pathogenic Bacterial-Endosymbionts in Acanthamoeba ... [27] The role of domestic tap water in Acanthamoeba contamination in contact lens ... [28] Isolation of potentially pathogenic strains of Acanthamoeba in wild squirrels from the Canary Islands ... [29] Identification and quantification of the Acanthamoeba species and genotypes from reservoirs in Taiwan by ... [30] Molecular characterization of pathogenic Acanthamoeba isolated from drinking and recreational water in East ... [31] Isolation and molecular characterization of Acanthamoeba genotypes isolated from soil sources of public and recreational areas in ...

<sup>1</sup>Molecular Virology Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

#### \*Correspondence

Address: Pasteur Institute of Iran (IPI), No.69, Pasteur Avenue, Tehran, Iran  
Phone: +98 (21) 64112251  
Fax: +98 (21) 64112251  
azadmanesh@pasteur.ac.ir

#### Article History

Received: July 2, 2019  
Accepted: May 22, 2020  
ePublished: June 22, 2020

## کلونینگ و بیان ژن اینترلوکین ۱۵ در باکتری *E. coli* سویه Rosetta (DE3)

مینا بحرالعلومى شاپورآبادى Pharm D

بخش ویروس شناسی مولکولی، انستیتوپاستور ایران، تهران، ایران

آرش آرش کیا PhD

بخش ویروس شناسی مولکولی، انستیتوپاستور ایران، تهران، ایران

نصیر محجل PhD

بخش ویروس شناسی مولکولی، انستیتوپاستور ایران، تهران، ایران

فرزین روحوند PhD

بخش ویروس شناسی مولکولی، انستیتوپاستور ایران، تهران، ایران

کیهان آزادمنش\* PhD

بخش ویروس شناسی مولکولی، انستیتوپاستور ایران، تهران، ایران

### چکیده

اینترلوکین ۱۵ (IL-15)، سایتوکاینی است که به واسطه فعالیت‌های فیزیولوژیکی آن می‌تواند در درمان‌های ضدسرطان نقش ایفا کند. IL-15 باعث تمایز، تکثیر، فعال شدن و بقای سلول‌های کشته طبیعی می‌شود و بقای لنفوسیت‌های T خاطره‌ای را بهبود می‌بخشد. از آنجایی که راندمان تولید و تخلیص این سایتوکاین عمدتاً پایین است، علی‌رغم پیشرفت‌های اخیر، همچنان بهینه‌کردن شرایط تولید، ارزشمند است. بنابراین در مطالعه حاضر، اقدام به کلون و بیان ژن IL-15 انسانی در باکتری متفاوت با سویه‌های قبلی شد و به جای بیان در باکتری *E. coli* سویه رایج BL21، از سویه Rosetta (DE3) استفاده شد که قادر است با استفاده از کدون‌های نادری که در باکتری کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرند، بیان ژن‌های یوکاریوتی را بهتر از سویه‌های دیگر انجام دهد، به طوری که پروتئین بیان‌شده شباهت بیشتری به پروتئین انسانی داشته باشد. پس از سنتز ژن IL-15، توالی مورد نظر در وکتور بیانی باکتریال pET28a کلون شد و پس از تایید با کلنی‌PCR، هضم آنزیمی با آنزیم‌های BamHI و XhoI و مشاهده باند ۳۹۱ بازی روی ژل آگارز و تعیین توالی، در باکتری *E. coli* سویه Rosetta (DE) ترانسفورم شد. القای بیان در جذب نوری ۶/۰ در OD600 و در حضور امیلی‌مولار ایزوپروپیل-بتا-دی-تیوگلاکتوپیرانوزید (IPTG) انجام شد. مشاهده باند ۱۵ کیلو دالتونی روی ژل SDS-PAGE و سپس انجام وسترن بلات به کمک آنتی‌بادی اختصاصی تجاری علیه IL-15، نشان از درستی فرآیند بیان داشت. راندمان بیان به کمک دانسیتومتری با نرم‌افزار Fiji حدود ۳۷٪ تخمین زده شد. با توجه به اینکه بیان ژن انسانی IL-15 در سویه باکتریایی *E. coli* Rosetta (DE3) انجام شده است، انتظار می‌رود که در مطالعات بعدی، عملکرد مناسبی از خود نشان دهد.

کلیدواژه‌ها: اینترلوکین-۱۵، کلون و بیان، اشریشیا کلی سویه Rosetta (DE3)

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۰۲

\*نویسنده مسئول: azadmanesh@pasteur.ac.ir

### مقدمه

سایتوکاین‌ها نقش مهمی در تنظیم پاسخ سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی بازی می‌کنند. اینترلوکین ۱۵ (IL-15)، سایتوکاینی از خانواده دسته سایتوکاین‌های دارای مارپیچ آلفا (alpha-helix bundle cytokine) است که شامل IL-2 نیز می‌شود [1]. IL-15 قادر است با فعال کردن سلول‌های کشته طبیعی (NK cells) و همین‌طور سلول‌های دندریتیک، پاسخ سیستم ایمنی را بهبود

بخشد و علاوه بر این در بقای سلول‌های T خاطره‌ای CD8+ نیز نقش اساسی و محوری ایفا کند [2, 3]. اینترلوکین ۱۵ به رسپتور سه قسمتی ویژه‌ای بر روی سلول‌های NK و T اتصال می‌یابد که اشتراکاتی با رسپتور IL-2 دارد. رسپتور IL-15 و IL-2 شامل سه قسمت  $\alpha$ ،  $\beta$  و  $\gamma$  است که دو زیرواحد  $\beta$  و  $\gamma$  مشترک و زیرواحد  $\alpha$  اختصاصی هر یک از اینترلوکین‌های IL-2 یا IL-15 است [4]. به علت وجود تشابه در رسپتورها، ابتدا به نظر می‌رسید که عملکرد بیولوژیکی IL-15 و IL-2 یکسان باشد. در واقع تا حدودی نیز همین‌طور است، به نحوی که هر دو سایتوکاین باعث تکثیر سلول‌های T می‌شوند و تولید لنفوسیت T سیتوتوکسیک (CTL) را القا می‌کنند و موجب بقای سلول‌های NK می‌شوند. اما در مواردی نیز عملکرد این دو سایتوکاین با هم متفاوت است، از جمله اینکه IL-2 باعث بقای سلول‌های T تنظیم‌کننده (Treg) می‌شود تا در جلوگیری از بیماری‌های خودایمن کمک‌کننده باشد، در حالی که همان‌طور که اشاره شد IL-15 در بقای سلول‌های T خاطره‌ای CD8+ نقش ایفا می‌کند تا مبارزه با پاتوژن‌ها به صورت موثرتری صورت گیرد [5]. همچنین IL-15 در تمایز، تکثیر، فعال شدن و بقای سلول‌های NK نیز نقش ویژه‌ای ایفا می‌کند [6]. از تفاوت‌های دیگر IL-15 و IL-2 آن است که براساس مطالعات سم‌شناسی، عبور و نشت IL-15 از مویرگ‌های خونی، برخلاف IL-2، بسیار اندک است [7]. بنابراین با توجه به عملکردهای مذکور برای IL-15، به نظر می‌رسد این سایتوکاین بتواند در مبارزه با سرطان نقش ویژه‌ای ایفا کند [7].

در چندین مطالعه پره‌کلینیکال بر روی موش، مصرف مستقیم IL-15 آثار ضدتوموری نشان داده است [8, 9]. علاوه بر این در سرطان‌های متاستاتیک IL-15 در فاز یک کارآزمایی بالینی در ملانوما متاستاتیک بدخیم و کارسینومای کلیه مورد بررسی قرار گرفته (NCT01021059) و آثار ضدسرطانی آن مطالعه شده است. همچنین آثار درمانی IL-15 به‌تنهایی یا در ترکیب با درمان‌های دیگر، هم‌اکنون در چندین مطالعه کارآزمایی بالینی دیگر نیز در حال بررسی است [7]. از IL-15 به‌عنوان ادجوانت واکسن‌های ضدسرطان نیز استفاده شده است. از جمله در ویروس نیوکاسل بیان‌کننده IL-15 که در موش توانسته است جلوی رشد ملانوما را بگیرد [10]. همچنین DNA واکسن کدکننده IL-15 علیه بروسلوز توانسته است فعالیت سلول‌های T را در موش افزایش دهد [11]. آخرین مطالعات در حیطه IL-15، روی کمپلکس‌های ارایه‌دهنده به شکل ترنس متمرکز شده است که IL-15 در اتصال به زیرواحد  $\alpha$  رسپتور خود سنتز و به سلول‌های هدف عرضه می‌شود و در این حالت از فارماکوکینتیک و اثربخشی بهتری نسبت به اینترلوکین آزاد برخوردار است [12]. یکی از این کمپلکس‌ها که توسط شرکت آلتور بیوساینس ساخته شده است (Alt-803, IL-15 Superagonist)، هم‌اکنون فاز ۲ کارآزمایی بالینی برای سرطان مثانه (NCT02138734) را پشت سر می‌گذارد [13].

ثانیه،  $55^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ ثانیه و  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت یک دقیقه و در نهایت  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۷ دقیقه با پرایمرهای یونیورسال پرموتور T7 و T7 ترمیناتور و همچنین آنالیز هضم آنزیمی با آنزیمهای محدودکننده BamHI و XhoI به مدت ۱ ساعت و در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  انجام شد و باندهای مورد نظر روی ژل آگارز ۱٪ به کمک الکتروفورز، طبق پروتکل استاندارد انجام و مشاهده شدند [21].

پلاسمید نوترکیب ساخته شده، درون باکتری کامپنت *E. coli* سویه Rosetta (DE3) ترانسفورم شد. سپس باکتری ترانسفورم شده درون ۸۰۰ میلی لیتر محیط کشت لوریا برات (مرک؛ آلمان) در حضور ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر آنتی بیوتیک کانامایسین و ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر کلرامفنیکل رشد داده شد. زمانی که رشد باکتریایی به حدی رسید که جذب نوری در  $\text{OD}_{600}$  به ۰/۶ رسید، القا به کمک ایزوپروپیل-بتا-دی-تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG؛ مرک، آلمان) در غلظت ۱ میلی مولار در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  و درون انکوباتور شیکردار انجام شد. پس از سه ساعت، رسوب باکتری به کمک سانتریفیوژ با سرعت ۴۰۰۰g و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  جدا شد و پس از شست و شو با بافر فسفات سالیین (PBS) با همان شرایط قبلی سانتریفیوژ، در فریزر  $-70^{\circ}\text{C}$  نگهداری شد.

برای بیان پروتئین از تحلیل تصویر به کمک نرم افزار باز متن Fiji بهره گرفته شد. به طور خلاصه، پس از به دست آوردن تصویر ژل مربوطه به کمک یک دوربین تجاری، تصویر حاصل به تصویر ۳۲ بیتی تبدیل و پیش زمینه آن برای کاهش نسبت نویز به پیک از آن کاسته شد. در مرحله بعدی نسبت سطح زیر نمودار مربوط به باند پروتئین مورد نظر به سطح زیر نمودار کل پیکها اندازه گیری شد که متناسب با نسبت بیان پروتئین به پروتئین کل است [22].

برای تایید پروتئین بیان شده، ابتدا SDS-PAGE انجام شد. به این صورت که ۱ میلی لیتر از محیط حاوی باکتری قبل و بعد از القا، روی ژل پلی اکریل آمید ۱۲/۵٪ ران و پس از رنگ آمیزی ژل با رنگ کوماسی برلیانت بلو، باند مورد نظر مشاهده شد. سپس برای تایید نهایی، وسترن بلات انجام شد. بدین منظور، پس از SDS-PAGE، باندها روی کاغذ پلی وینیلیدین فلوراید (PVDF؛ Roche، آلمان) منتقل و سپس طبق پروتکل استاندارد [21]، ابتدا با آنتی بادی اولیه Anti-IL-15 (R&D) به رقت ۱:۱۰۰۰ به مدت ۲ ساعت و سپس با آنتی بادی ثانویه متصل به آنزیم HRP علیه آنتی بادی انسانی تولید شده در موش (mouse anti-human HRP conjugate) به رقت ۱:۲۰۰۰ به مدت یک ساعت رنگ آمیزی شدند. پس از شست و شوهای لازم با PBS حاوی ۱٪  $\text{H}_2\text{O}_2$  و ۲٪  $\text{DAB}$ ، سیگما آلد ریچ، باندها به کمک ۳، ۳' دی آمینوبنزیدين (DAB)؛ سیگما آلد ریچ، ایالات متحده) انجام شد. بدین صورت که ۷ میلی گرم DAB درون ۱۰ میلی لیتر PBS حل و سپس در حضور ۱۴ میکرو لیتر پراکسید هیدروژن، بر روی غشا ریخته شد. پس از حدود یک دقیقه انکوباسیون در تاریکی، باند مورد نظر مشاهده شد [21].

به طور کلی راندمان تولید این سایتوکاین به شکل نوترکیب چندان بالا نیست و متأسفانه، پایین بودن حلالیت آن نیز علاوه بر سطوح پایین بیان، تا مدت ها تولید این سایتوکاین در *in vitro* را به تاخیر انداخت [14, 15]. با این حال IL-15 انسانی نوترکیب تاکنون در چندین سیستم بیانی از جمله در باکتری و سیستم یوکاریوتی بیان شده است [14, 16, 17]. ولی راندمان چندان رضایت بخش نبوده است. از این رو بهینه کردن شرایط تولید این سایتوکاین که اخیراً مصارف تحقیقاتی بالایی پیدا کرده و همچنین آثار درمانی آن به شدت در حال بررسی است، ارزش خاص خود را دارد.

شرکت نوواژن سویه ای از باکتری *E. coli* به نام Rosetta را در اختیار پژوهشگران قرار داده است که مشتقی از سویه BL21 است و جهش هایی در آن صورت گرفته که قادر است tRNAهای مربوط به کدون های نادر در باکتری را بیان کند [18, 19]. از آنجایی که حدود ۲۰٪ کدون های ژن IL-15 انسانی، جزء کدون های نادر است [20]، در این مطالعه برای اولین بار این سویه بیانی برای تولید IL-15 انسانی انتخاب شد تا بیان بهینه ای از این سایتوکاین حاصل شود. بنابراین نوآوری این مطالعه مربوط به استفاده از سویه ای از *E. coli* یعنی Rosetta (DE3) برای بیان این سایتوکاین بود که بر مبنای فرضیات امکان بازدهی بهتری در بیان این پروتئین داشته و تاکنون برای بیان این سایتوکاین مورد استفاده قرار نگرفته باشد.

## مواد و روش ها

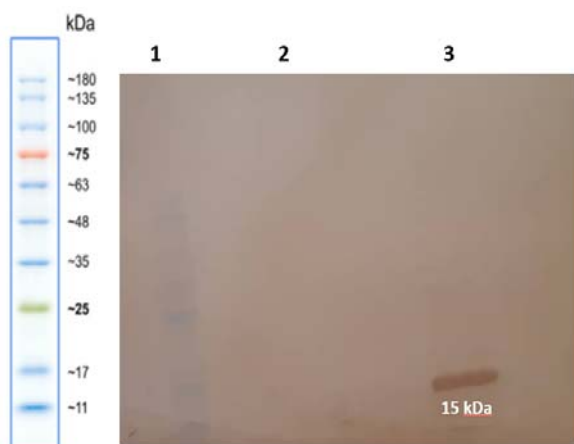
باکتری *E. coli* سویه DH5-alpha برای تکثیر پلاسمیدها استفاده شد. پلاسمید بیانی pET28a (نوواژن؛ ایران) برای کلون کردن توالی مورد نظر مورد استفاده قرار گرفت. به عنوان میزبان بیانی، باکتری *E. coli* سویه Rosetta (DE3) (نوواژن؛ ایران) مورد استفاده قرار گرفت که بیان پروتئین هایی را که حاوی کدون هایی هستند که به ندرت در *E. coli* مورد استفاده قرار می گیرند (کدون های نادر) را بهبود می دهد [19]. به علت حضور چنین کدون هایی در توالی IL-15، سویه Rosetta (DE3) به عنوان سویه باکتری بیانی کننده IL-15 در این مطالعه برگزیده شده است [20].

برای کلون کردن ژن *IL-15* درون وکتور باکتریایی، ابتدا ژن *IL-15* (Accession No. NP\_000576.1) با افزودن جایگاه های برش مناسب (SmaI-NheI-HindIII) به دو انتهای آن توسط شرکت بیوماتیک و درون پلاسمید pUC57 سنتز شد. سپس قطعه حاوی ژن با آنزیم های محدودکننده BamHI و HindIII برش داده شد. پس از برش وکتور بیانی pET28a با همان آنزیم ها، طبق پروتکل استاندارد، ژن مورد نظر به کمک آنزیم لیگاز T4 درون وکتور کلون شد [21].

به منظور تایید کلونینگ، واکنش زنجیره ای پلیمرز با برنامه دمایی  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت ۵ دقیقه،  $30^{\circ}\text{C}$  سیکل به صورت  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰

## یافته‌ها

تایید نهایی پروتئین بیان‌شده به کمک وسترن بلات انجام شد. بدین منظور پس از اینکه رسوب امیلی‌لیتر محیط حاوی باکتری در مراحل قبل و بعد از القا، به کمک SDS-PAGE الکتروفورز شد، باندها از روی ژل به روی کاغذ PVDF منتقل و سپس به کمک آنتی‌بادی اختصاصی علیه IL-15 به‌عنوان آنتی‌بادی اولیه و سپس آنتی‌بادی ثانویه متصل به HRP، وسترن بلات انجام شد. همان‌طور که در شکل ۳ قابل مشاهده است، باند حدود ۱۵ کیلودالتون موید حضور IL-15 است.



شکل ۳) تایید نهایی پروتئین بیان‌شده به کمک وسترن بلات؛ باند حدود ۱۵ کیلودالتون مشاهده شده، موید بیان IL-15 است (ستون ۱: سایز مارکر؛ ستون ۲: نمونه قبل از القا؛ ستون ۳: نمونه بعد از القا).

## بحث و نتیجه‌گیری

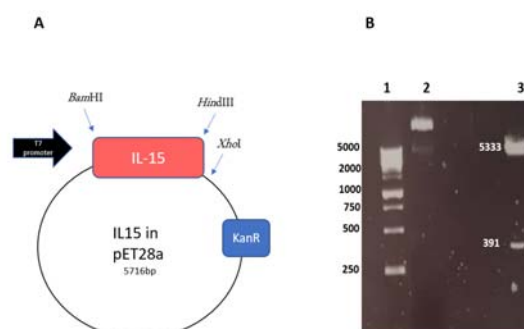
در مطالعه حاضر، ژن *IL-15* انسانی پس از سنتز، در وکتور بیانی باکتریال pET28a کلون و سپس با موفقیت در باکتری *E. coli* سویه Rosetta (DE3) بیان شد.

به دلیل بیان نسبتاً پایین و حلالیت اندک IL-15، تولید این پروتئین تا حدودی چالش‌برانگیز بوده است [14]. تحقیقاتی مختلفی حتی تا سال‌های اخیر سعی در بهینه‌سازی تولید این پروتئین در سیستم‌های بیانی متفاوت داشته‌اند. از جمله تلاش برای تولید IL-15 انسانی در سیستم بیانی پستاندار [16]، در مخمر [17] و البته باکتری [14, 15] صورت گرفته است که هر روش مزایا و معایب خاص خود را دارد. میزان بیان IL-15 در سیستم پستاندار عمدتاً پایین است (حدود ۱۲ میکروگرم در لیتر در رده سلولی کلیه انسانی یا سلول حشره). هر چند در مطالعات مربوط به سال‌های اخیر، این مقدار تا حدودی افزایش پیدا کرده است [16]. یکی از دلایل بیان اندک IL-15 در سلول پستاندار آن است که بیان این پروتئین در این نوع سلول در مراحل رونویسی، ترجمه و بعد از ترجمه به شدت کنترل می‌شود [16]. بیان IL-15 در مخمر پیکپا یا ستوریس نیز با موفقیت انجام شده است، به‌صورتی که راندمان تولید حدود ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر بوده که سه روز پس از القا با متانول به دست آمده و پروتئین حاصل به کمک ستون Ni/NTA و سپس کروماتوگرافی

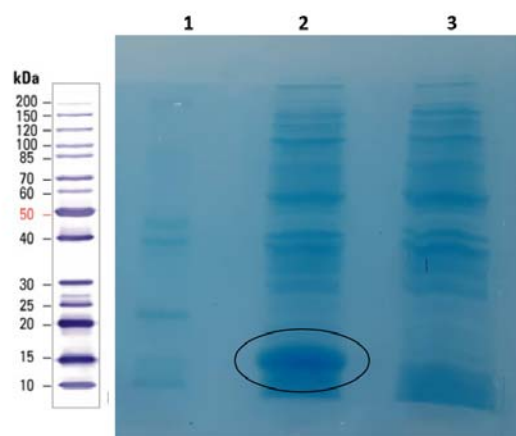
پس از سنتز ژن *IL-15* توسط شرکت بیوماتیک و کلون کردن آن درون وکتور بیانی باکتریال pET28a به کمک آنزیم‌های BamHI و HindIII، برای تایید کلونینگ، از کلنی PCR و سپس آنالیز هضم آنزیمی استفاده شد. آنالیز هضم به کمک آنزیم‌های BamHI و XhoI انجام و باند مورد انتظار با اندازه ۳۹۱ جفت باز، پس از الکتروفورز روی ژل ۱٪ آگارز مشاهده شد (شکل ۱).

پس از ترانسفورم کردن سازه نهایی درون باکتری کامپنت *E. coli* سویه Rosetta (DE3)، طبق شرایط توضیح داده شده، بیان پروتئین در جذب نوری ۶/۰٪ در OD<sub>600</sub> و در حضور امیلی‌مولار IPTG انجام شد. رسوب امیلی‌لیتر محیط حاوی باکتری در مراحل قبل و بعد از القا، به کمک SDS-PAGE بررسی شد و باند مشاهده شده حدود ۱۵ کیلودالتون، نشان‌دهنده بیان IL-15 درون باکتری بود (شکل ۲).

آنالیز دانسیتومتری باندهای پروتئینی بیان‌شده در نمونه بعد از القا به کمک نرم‌افزار Fiji، نشان داد که مقدار IL-15 بیان‌شده، حدود ۳۷٪ کل پروتئین بیان‌شده توسط باکتری است [22].



شکل ۱) A: پلاسمید کدکننده IL-15؛ B: آنالیز هضم آنزیمی به منظور تایید درستی سازه نو ترکیب؛ قطعه ۳۹۱ جفت بازی روی ژل آگارز مشاهده می‌شود (ستون ۱: سایز مارکر؛ ۲: پلاسمید قبل از هضم آنزیمی؛ ۳: پلاسمید هضم‌شده با آنزیم‌های BamHI و XhoI).



شکل ۲) بیان IL-15 در باکتری؛ باند حدود ۱۵ کیلودالتون که با بیضی مشخص شده، مربوط به IL-15 است (ستون ۱: سایز مارکر؛ ستون ۲: نمونه بعد از القا؛ ستون ۳: نمونه قبل از القا)



مرحله تخلیص بود که به سادگی بر روی ستون Ni/NTA (به روش کروماتوگرافی تمایلی) مقدور نشد. بنابراین به روش‌های کامل‌تر تخلیص همچون کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون یا کروماتوگرافی اندازه طردی پس از عبور از Ni/NTA نیاز است. همچنین به علت حلالیت پایین، نیاز به مراحل تاخوردگی مجدد ویژه دارد که پیشنهاد می‌شود در آینده بر روی این موارد بیشتر کار شود.

**تشکر و قدردانی:** مطالعه حاضر با حمایت مالی انستیتو پاستور ایران انجام شده است که بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

**تأییدیه اخلاقی:** موردی توسط نویسندگان ذکر نشد.

**تعارض منافع:** نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

**سهم نویسندگان:** مینا بحرالعلومی شاپورآبادی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۳۰٪)؛ آرش آرش‌کیا (نویسنده دوم)، تحلیلگر آماری (۱۰٪)؛ نصیر محجل (نویسنده سوم)، تحلیلگر آماری (۱۰٪)؛ فرزین روحوند (نویسنده چهارم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/نگارنده بحث (۲۰٪)؛ کیهان آزادمنش (نویسنده پنجم)، پژوهشگر اصلی (۳۰٪)

**منابع مالی:** هزینه‌های مربوط به مطالعه حاضر توسط انستیتو پاستور ایران تأمین شده است.

#### منابع

- 1- Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, Rauch C, Srinivasan S, Fung V, et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science*. 1994;264(5161):965-8.
- 2- Carson WE, Giri JG, Lindemann MJ, Linett ML, Ahdieh M, Paxton R, et al. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med*. 1994;180(4):1395-1403.
- 3- Dubois S, Mariner J, Waldmann TA, Tagaya Y. IL-15R $\alpha$  recycles and presents IL-15 in trans to neighboring cells. *Immunity*. 2002;17(5):537-47.
- 4- Giri JG, Ahdieh M, Eisenman J, Shanebeck K, Grabstein K, Kumaki S, et al. Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J*. 1994;13(12):2822-30.
- 5- Waldmann TA. The shared and contrasting roles of IL2 and IL15 in the life and death of normal and neoplastic lymphocytes: Implications for cancer therapy. *Cancer Immunol Res*. 2015;3(3):219-27.
- 6- Fehniger TA, Caligiuri MA. Interleukin 15: Biology and relevance to human disease. *Blood*. 2001;97(1):14-32.
- 7- Steel JC, Waldmann TA, Morris JC. Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer. *Trends Pharmacol Sci*. 2012;33(1):35-41.
- 8- Yu P, Steel JC, Zhang M, Morris JC, Waldmann TA. Simultaneous blockade of multiple immune system inhibitory checkpoints enhances antitumor activity mediated by interleukin-15 in a murine metastatic colon carcinoma model. *Clin Cancer Res*. 2010;16(24):6019-28.
- 9- Zhang M, Yao Z, Dubois S, Ju W, Müller JR, Waldmann TA. Interleukin-15 combined with an anti-CD40 antibody provides enhanced therapeutic efficacy for murine models of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci*.

تعویض یونی تا ۹۵٪ تخلیص شده است. هرچند به علت گلیکوزیلاسیون بیش از حد در سیستم مخمری، اندکی وزن پروتئین افزایش یافته است (بسته به میزان گلیکوزیلاسیون سه باند ۱۷، ۲۲ و ۵۵ کیلودالتون پس از بیان قابل مشاهده بودند) [17]. بیان IL-15 در سلول باکتری با تشکیل اینکلوزن بادی و نیاز به مراحل تاخوردگی مجدد (refolding) سخت همراه است [15]، ولی به دلیل آنکه گلیکوزیلاسیون IL-15 برای عملکرد آن ضروری نیست، هنوز سیستم باکتریایی برای تولید IL-15 گزینه‌ای است که می‌تواند مورد توجه باشد [14, 15, 23]. در مطالعاتی که IL-15 را در باکتری *E. coli* بیان کرده‌اند، اغلب از سویه BL21 (DE3) استفاده شده است [14, 23]. هرچند در یک مطالعه نیز از سویه اوریگامی استفاده شده است که امکان تاخوردگی (folding) بهتری را برای پروتئین بیان‌شده فراهم می‌کند [15]. در مطالعه حاضر، برای اولین بار اقدام به بیان IL-15 در سلول *E. coli* سویه Rosetta (DE3) شد که قادر است ضمن بهینه‌سازی تولید پروتئین مورد نظر، با فراهم کردن مولکول‌های tRNA مربوط به کدون‌های اسیدآمین‌های که در باکتری کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرند (کدون‌های نادر)، بیان ژن‌های یوکاریوتی را بهتر از سویه‌های دیگر انجام دهد [19].

آنالیز باندهای پروتئین‌های بیان‌شده در لایزیت سلولی باکتری به کمک نرم‌افزار Fiji، نیز مشخص کرد که ۳۷٪ پروتئین‌های بیان‌شده در باکتری مربوط به IL-15 بوده است که مقدار قابل توجهی است. این در حالی است که در مطالعات مشابه راندمان تولید حدود ۱ تا ۳٪ بوده است [14]. هرچند اخیراً مطالعات کامل‌تری نیز به منظور بهینه‌سازی تولید IL-15 منتشر شده است، به شکلی که در مطالعه‌ای دیگر تولید IL-15 انسانی را برای مصرف در کلینیک، در سیستم بیانی باکتری *E. coli* سویه‌های BL21 (DE3) و BL21-AI از طریق دستکاری ژنتیکی کدون پایان بهینه‌سازی کردند. پس از بیان در حضور القاکننده مناسب (به ترتیب IPTG و آرابینوز) و بعد از ۳ ساعت، دانسیتومتري با استفاده از نرم‌افزار آنالیزر Hewlett Packard ScanJet 5P و Gel Pro 4.0 انجام شد که تیتراژ بیان حدود ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر لیتر محیط کشت را به دست داد [23].

در مجموع، در مطالعه حاضر، بیان IL-15 انسانی در سلول میزبان باکتری *E. coli* سویه Rosetta (DE3) با موفقیت انجام شد و انتظار می‌رود در مراحل بعدی با خلص‌سازی مناسب و ارزیابی‌های عملکردی پروتئین تولیدشده، تولید انبوه این سایتوکاین که مصارف درمانی آن به‌ویژه در سرطان نشان داده شده است، امکان‌پذیر شود.

چالش عمده در تولید IL-15، بیان نسبتاً پایین و حلالیت اندک آن است که تخلیص پروتئین را تا حدود زیادی با سختی همراه می‌کند [14]. گروه‌های تحقیقاتی مختلفی حتی تا سال‌های اخیر سعی در بهینه‌سازی تولید و تخلیص این پروتئین در سیستم‌های بیانی متفاوت داشته‌اند. مرحله چالش‌برانگیز در این مطالعه،

- human interleukin-15 in *Pichia pastoris*. *J Immunol Methods*. 2016;428:50-7.
- 18- Tegel H, Tourle S, Ottosson J, Persson A. Increased levels of recombinant human proteins with the *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3). *Protein Expr Purif*. 2010;69(2):159-67.
- 19- Fu W, Lin J, Cen P. 5-Aminolevulinate production with recombinant *Escherichia coli* using a rare codon optimizer host strain. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007;75(4):777-82.
- 20- Hsu C, Hughes MS, Zheng Z, Bray RB, Rosenberg SA, Morgan RA. Primary human T lymphocytes engineered with a codon-optimized IL-15 gene resist cytokine withdrawal-induced apoptosis and persist long-term in the absence of exogenous cytokine. *J Immunol*. 2005;175(11):7226-34.
- 21- Sambrook J. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3<sup>rd</sup> Edition. Huntington: Cold Spring Harbor Laboratory; 2003.
- 22- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):676-82.
- 23- Vyas VV, Esposito D, Sumpter TL, Broadt TL, Hartley J, Knapp IV GC, et al. Clinical manufacturing of recombinant human interleukin 15. I. Production cell line development and protein expression in *E. coli* with stop codon optimization. *Biotechnol Prog*. 2012;28(2):497-507.
- 2009;106(18):7513-8.
- 10- Xu X, Sun Q, Yu X, Zhao L. Rescue of nonlytic Newcastle Disease Virus (NDV) expressing IL-15 for cancer immunotherapy. *Virus Res*. 2017;233:35-41.
- 11- Hu XD, Chen ST, Li JY, Yu DH, Cai H. An IL-15 adjuvant enhances the efficacy of a combined DNA vaccine against *Brucella* by increasing the CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cell response. *Vaccine*. 2010;28(12):2408-15.
- 12- Wu J. IL-15 agonists: The cancer cure cytokine. *J Mol Genet Med*. 2013;7:85.
- 13- Liu B, Kong L, Han K, Hong H, Marcus WD, Chen X, et al. A novel fusion of ALT-803 (interleukin (IL)-15 superagonist) with an antibody demonstrates antigen-specific antitumor responses. *J Biol Chem*. 2016;291(46):23869-81.
- 14- Ward A, Anderson M, Craggs RI, Maltby J, Grahames C, Davies RA, et al. *E. coli* expression and purification of human and cynomolgus IL-15. *Protein Expr Purif*. 2009;68(1):42-8.
- 15- Béhar G, Solé V, Defontaine A, Maillason M, Quémener A, Jacques Y, et al. Evolution of interleukin-15 for higher *E. coli* expression and solubility. *Protein Eng Des Sel*. 2011;24(3):283-90.
- 16- Huang H, Luo Y, Baradei H, Liu Sh, Haenssen KK, Sanglikar S, et al. A novel strategy to produce high level and high purity of bioactive IL15 fusion proteins from mammalian cells. *Protein Expr Purif*. 2018;148:30-9.
- 17- Sun W, Lai Y, Li H, Nie T, Kuang Y, Tang X, et al. High level expression and purification of active recombinant