

**ПОЛУЧЕНИЕ ИЛ-36РА ЧЕЛОВЕКА В *ESCHERICHIA COLI*  
ПРИ КОЭКСПРЕССИИ С МЕТИОНИНАМИНОПЕПТИДАЗОЙ *E. COLI*.  
I. СРАВНЕНИЕ ПРОДУКЦИИ ИЛ-36РА РАЗЛИЧНЫМИ ШТАММАМИ**

© А. А. Колобов,<sup>1,2,\*</sup> Е. В. Кондратьева,<sup>2</sup> Т. В. Кудлинг,<sup>2</sup>  
М. М. Карасев,<sup>2</sup> Р. С. Калинин,<sup>1,2</sup> А. А. Хижина,<sup>1,2</sup> П. П. Нимирицкий,<sup>3</sup>  
В. Е. Стефанов,<sup>1</sup> А. В. Петров<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Кафедра биохимии С.-Петербургского государственного университета,  
Санкт-Петербург, 199004,

<sup>2</sup>Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов  
ФМБА России, Санкт-Петербург, 197110, и

<sup>3</sup>Кафедра биохимии Московского государственного университета, Москва, 119192;  
\* электронный адрес: alexey.kolobov.spb@gmail.com

Генерализованный пустулезный псориаз (ГПП) — это редкая, в некоторых случаях смертельно опасная форма псориаза, которая ассоциирована с рядом мутаций в гене рецепторного антагониста интерлейкина-36 (ИЛ-36РА), сопровождающихся его сниженной экспрессией или активностью. Введение экзогенного ИЛ-36РА могло бы применяться для лечения ГПП и других форм псориаза. Поскольку для полной биологической активности ИЛ-36РА необходимо отщепление инициаторного остатка метионина, нами был разработан способ получения безметионинового ИЛ-36РА в *Escherichia coli*. Была создана серия плазмид, несущих ген метионинаминопептидазы (МАП) *E. coli* под контролем различных промоторов, для коэкспрессии ИЛ-36РА и МАП и протестировано их влияние на продукцию ИЛ-36РА. Наибольшая продукция ИЛ-36РА с содержанием менее 3 % примеси непротессированной формы с неотщепленным инициаторным остатком метионина была показана для штамма, в котором ген МАП контролировался индуцируемым арабинозой промотором.

Ключевые слова: интерлейкин, рецепторный антагонист ИЛ-36 (ИЛ-36РА), метионинаминопептидаза, рекомбинантный белок, коэкспрессия, метионин.

Принятые сокращения: ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография, ГПП — генерализованный пустулезный псориаз, ИЛ — интерлейкин, ИЛ-36РА — рецепторный антагонист ИЛ-36, ИПТГ — изопропил-β-D-1-тиогаляктопиранозид, МАП — метионинаминопептидаза, ОФ-ВЭЖХ — обращенно-фазовая ВЭЖХ.

Генерализованный пустулезный псориаз (ГПП) — это редкая, в некоторых случаях смертельно опасная форма псориаза, которая характеризуется периодическими обострениями с повышением температуры тела, обширными кожными высыпаниями в виде пустул, а примерно в 30 % случаев еще и поражениями кожи по типу вульгарного псориаза (Zelickson, 1991; Griffiths, 2007). Системные эффекты ГПП включают в себя гиперлейкоцитоз и повышение уровня С-реактивного белка в крови (Zelickson, 1991; Griffiths, 2007). Обострения ГПП могут вызываться бактериальными инфекциями, отменой ретиноидной терапии, менструацией или беременностью (Margakchi, 2011). Развитие ГПП в большинстве случаев связывают с генетическими факторами.

В ряде исследований было показано, что возникновение ГПП ассоциировано с рядом мутаций в гене рецепторного антагониста интерлейкина (ИЛ)-36 (ИЛ-36РА) (Farooq, 2013; Kanazawa, 2013; Korber, 2013; Sugiura, 2013; Hussain, 2015). ИЛ-36РА представляет собой белок семейства ИЛ-1, который регулирует воспаление в

кожных покровах, вызываемое молекулами подсемейства ИЛ-36 (ИЛ-36α, ИЛ-36β и ИЛ-36γ) (Smith, 2000; Debets, 2001; Sims, 2010). Установлено, что ИЛ-36 участвуют в патогенезе не только ГПП, но также других форм псориаза и подобных ему кожных заболеваний у человека и мыши (Blumberg, 2010). Тем не менее ни для одного из этих заболеваний в настоящее время не существует терапии, направленной на подавление воспаления, вызванного ИЛ-36. И пока не разработано никакой специфической терапии ГПП. Введение экзогенного ИЛ-36РА могло бы применяться для лечения ГПП и других форм псориаза.

Поскольку другие цитокины семейства ИЛ-1 структурно сходны с ИЛ-36РА (Dunn, 2001; Günther, 2014) и были ранее успешно получены в прокариотических продуцентах (Steinkasserer, 1992; Zanette, 1998; Nausch, 2013), нами было принято решение получить рекомбинантный ИЛ-36РА в *Escherichia coli*. Однако белок, получаемый в прокариотическом продуценте, неизбежно имеет ряд отличий от своей природной формы. Например, он

обычно либо не гликозилирован, либо гликозилирован иначе, чем у белков млекопитающего, а также потенциально иммуногенен (Brooks, 2004). Для ИЛ-36РА ранее было показано отсутствие потенциальных сайтов гликозилирования (Barton, 2000), поэтому отсутствие гликозилирования при наработке белка в *E. coli* не влияет на его биологическую активность.

Другой стандартной проблемой для рекомбинантных белков, получаемых в бактериальных продуцентах, является недостаточно эффективное отщепление инициаторного остатка формилметионина с N-конца цепи (Hoffman, 1990; Shen, 1993; Proudfoot, 1996; Newton, 1998). В ряде случаев такие белки обладали существенно сниженной биологической активностью (Proudfoot, 1996; Newton, 1998). В *E. coli* отщепление инициаторного N-концевого остатка формилметионина требует работы двух ферментов — деформилазы и метионинаминопептидазы (МАП). Первый фермент отщепляет формильную группу, второй отщепляет остаток метионина (Makrides, 1996; Solbiati, 1999). Процесс деформилирования тесно связан с процессом трансляции, так как деформилаза связана с рибосомой (Piatkov, 2015). В литературе нам не удалось найти данные о том, что недостаток активности деформилазы служит ограничением продукции экзогенных рекомбинантных белков в *E. coli*. В то же время представлено множество таких данных в отношении МАП.

МАП обладает выраженной субстратной специфичностью: было показано, что она может эффективно удалять N-концевой остаток метионина белковой молекулы только в том случае, когда следующий за метионином аминокислотный остаток имеет радиус вращения своей боковой цепи не более 0.143 нм (Ben-Bassat, 1987), например остаток глицина или аланина. Процессинг идет тем эффективнее, чем меньше боковой радикал второй аминокислоты в цепи, и может быть существенно замедлен в случае аминокислот с большими боковыми радикалами, таких как триптофан (Ben-Bassat, 1987; Hirel, 1989; Dalboge, 1990).

Для обработки подобных сложных объектов в 2004 г. группой Лиао и соавторов (Liao, 2004) была получена модифицированная МАП с несколькими заменами в аминокислотной последовательности, способная игнорировать эти стерические ограничения. Авторы утверждают, что примерно 85—90 % известных белков могли бы быть процессированы этой МАП. Однако авторы также отмечают, что модифицированная МАП может еще отщеплять и следующий за остатком метионина аминокислотный остаток, если третий остаток в цепи имеет боковую цепь небольшого радиуса (Liao, 2004), что также может отразиться на свойствах получаемого белка. Другим вариантом решения проблемы со специфичностью МАП по отношению к изучаемому объекту могло бы стать использование другой N-концевой аминопептидазы, способной отщеплять остаток метионина. Например, лейцин-аминопептидазы *E. coli* (белок PepA) (Bhosale, 2010). Однако нам не удалось найти в литературе примеры такого ее применения.

Очень неудачным объектом для МАП является, например, интерферон  $\alpha 2b$  человека, в молекуле которого есть замкнутая дисульфидная связь с остатком цистеина, следующим сразу за инициаторным остатком метионина (Wetzel, 1981). Тем не менее остаток цистеина в принципе имеет хиральный радиус бокового радикала, равный 0.122 нм (1.22 Å) (Levitt, 1976), т. е. процессинг молекулы с помощью МАП возможен, пока дисульфидная связь не

замкнута. Эта ситуация вполне возможна в случае, когда ИФН- $\alpha 2b$  производится в клетке в растворимом виде, а количество МАП в клетке достаточно для его своевременного процессинга. Эта ситуация также вполне возможна в случае рефолдинга и обработки ИФН- $\alpha 2b$  МАП *in vitro*, но этот вариант, как описано выше, технологически сложнее. В случае принципиальной невозможности применения МАП к некоторым объектам решением проблемы становятся введение сайта распознавания какой-либо протеазы с N-конца получаемого белка, часто вместе с гибридным белком, и последующая обработка продукта этой протеазой *in vitro* (Shirokov, 2011) или *in vivo* (Rabhi-Essafi, 2007). Метионин, таким образом, отщепляется вместе с несколькими аминокислотами, входящими в сайт распознавания протеазы.

Однако в случаях, когда МАП все же может быть применена, ее использование представляется наиболее простым и потому желательным подходом. При этом обработка продукта выделенной и очищенной МАП *in vitro* нежелательна, так как значительно усложняет технологический процесс. Поэтому оптимальным выбором является коэкспрессия рекомбинантного белка с МАП. В этом случае, однако, система коэкспрессии требует значительной оптимизации, так как продукция МАП сама по себе создает метаболическую нагрузку на клетку, что понижает выход продукта.

При наработке ИЛ-36РА в *E. coli* мы столкнулись с тем, что получаемый белок содержал в среднем 25.6 % примесной непроцессированной формы с неотщепленным N-концевым остатком метионина. Поскольку отщепление инициаторного остатка метионина необходимо для полной биологической активности ИЛ-36РА (Towne, 2011), возникла необходимость разработки технологии получения безметионинового ИЛ-36РА.

В настоящей работе нами была создана серия плазмид, несущих ген МАП *E. coli* под контролем различных промоторов, для коэкспрессии ИЛ-36РА и МАП и протестировано их влияние на продукцию ИЛ-36РА.

## Материал и методика

**Реактивы.** При создании плазмид использовали рестриктазы FastDigest (Thermo Scientific, США), лигазу фага T4 (Thermo Scientific, США) и полимеразу Encyclo (Евроген, Россия). В работе с культурами бактерий использовали среду LB (Sigma-Aldrich, США), ампициллин (Panreas, Испания), хлорамфеникол (Panreas, Испания), изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ; Thermo Scientific, США), хлорид натрия (Amresco, США), хлорид аммония (Нева-Реактив, Россия), фосфат калия однозамещенный (Нева-Реактив, Россия), рамнозу (Диа-М, Россия) и арабинозу (Диа-М, Россия). При хроматографической очистке ИЛ-36РА использовали Трис (Amresco, США), сульфат аммония (Amresco, США), фосфат натрия однозамещенный и фосфат натрия двузамещенный (Panreas, Испания), лимонную кислоту (Sigma-Aldrich, США), соляную кислоту (Вектон, Россия) и гидроксид натрия (Нева-Реактив, Россия). Для ВЭЖХ-анализа применяли ацетонитрил (Вектон, Россия) и трихлоруксусную кислоту (AppliChem, Германия).

Для создания штамма продуцента ИЛ-36РА при коэкспрессии с МАП были выбраны плазмиды pET22b+ и pACYC184 как относящиеся к различным группам совместимости. Была проведена кодонная опти-

мизация последовательности гена ИЛ-36РА человека с помощью программы JCat (Grote, 2005). Полученная последовательность была химически синтезирована и клонирована в плазмидный вектор pET22b+. Полученный плазмидный вектор получил название pIL36ra. Последовательность мРНК гена МАП *E. coli* была амплифицирована методом ОТ-ПЦР. В качестве матрицы использовали РНК штамма *E. coli* BL21 DE3. Полученную последовательность клонировали в модифицированный плазмидный вектор pACYC184. Получили три плазмидных вектора, несущих ген МАП под контролем трех различных промоторов — *T7/lac*, *rhaBAD* и *araBAD*. Полученные плазмиды получили названия pMAP-lac, pMAP-rha и pMAP-ara соответственно. Соответствие нуклеотидных последовательностей клонированных фрагментов и ожидаемых было проверено путем секвенирования. Далее бактерии штамма *E. coli* BL21 DE3 были трансформированы либо только плазмидой pIL36ra, либо комбинацией pIL36ra и одной из плазмид, несущих ген МАП, с помощью аппарата Bio-Rad MicroPulser (Bio-Rad, США) согласно инструкции фирмы-производителя. Полученные штаммы получили следующие названия: 36РА/MAP-lac, 36РА/MAP-rha и 36РА/MAP-ara. В экспериментах также использовали штамм-продуцент ИЛ-36РА под названием 36РА, трансформированный только плазмидой pIL36ra.

Культуры бактерий. Культивирование бактерий осуществляли в 1.5-кратной среде LB, дополненной 1-кратной средой M9. В качестве селективирующего агента применяли ампициллин в концентрации 100 мкг/л. При культивировании штаммов, несущих две плазмиды, также добавляли хлорамфеникол в концентрации 25 мкг/л. Культуру засеивали до оптической плотности 0.1 оптической единицы (далее ОЕ) при длине волны 600 нм в 10 мл культуры в конической колбе объемом 100 мл, растили 16 ч при 37 °С при скорости перемешивания 250 об/мин. Затем эту культуру инокулировали в 200 мл 1.5-кратной среды LB, дополненной средой M9, до плотности 0.3 ОЕ и растили в конической колбе объемом 2 л при 37 °С при скорости перемешивания 250 об/мин до плотности 3 ОЕ/мл. При этой оптической плотности во все колбы вносили ИПТГ в концентрации 0.1 мМ, а при культивировании штаммов, несущих плазмиды pMAP-rha или pMAP-ara, также вносили 0.02 % рамнозы или 0.2 % арабинозы соответственно. Длительность индукции составляла 3 ч. Биомассу бактерий собирали центрифугированием со скоростью 10 000 g при 4 °С в течение 30 мин и лизировали трехкратным последовательным замораживанием—размораживанием. После этого лизированную биомассу разводили в 50 мМ Трис-буфере, pH 7.0, дебрис удаляли центрифугированием. Полученный лизат фильтровали через фильтр с размером пор 0.45 мкм.

Хроматографическая очистка ИЛ-36РА. Очистку ИЛ-36РА проводили в два этапа с использованием хроматографа АКТА prime plus (GE, США) в ручном режиме. Сначала полученный лизат наносили на колонку диаметром 25 мм с 50 мл сорбента Q XL (GE, США) при комнатной температуре со скоростью 10 мл/мин. ИЛ-36РА слабо заряжен при этих условиях и не связывается с колонкой. Колонку отмывали 150 мл 50 мМ Трис-HCl-буфера, pH 7.0, затем регенерировали в 250 мл 50 мМ Трис-HCl-буфера, pH 7.0, содержащего 2 М NaCl, 250 мл 0.2 М NaOH, 250 мл апиrogenной воды и 250 мл 20%-ного этанола; хранили в 20%-ном этаноле. Проходя-

щую фракцию и фракцию отмывки собирали, добавляли сульфат аммония до 0.3 М, перемешивали и наносили при комнатной температуре со скоростью 10 мл/мин на колонку диаметром 25 мм с 20 мл сорбента Butyl-650S (Tosoh, Япония). Колонку промывали последовательно 100 мл раствора, содержащего 50 мМ фосфата натрия, pH 6.0, и 0.3 М сульфата аммония, затем 100 мл раствора, содержащего 50 мМ фосфата натрия, pH 6.0, и 0.1 М сульфата аммония. Элюировали ИЛ-36РА 150 мл 50 мМ фосфата натрия, pH 6.0, отсекая первые 60 и последние 40 мл. Колонку регенерировали 100 мл апиrogenной воды, 100 мл 0.2 М NaOH, 100 мл апиrogenной воды и 100 мл 20%-ного этанола, хранили в 20%-ном этаноле. Элюат концентрировали с помощью ультрафильтрационной ячейки Amicon (Millipore, США) и подвергали диализу против 50 мМ цитратного буфера, pH 6.0 (Sigma-Aldrich, США).

Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по поглощению раствором света при длине волны 280 нм с использованием аппарата Leki SS2109UV (Leki, Россия).

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) ИЛ-36РА. Количественный анализ примесной метиониновой формы ИЛ-36РА проводили при разделении пробы ИЛ-36РА методом ВЭЖХ в обратной фазе на колонке Jupiter C18 (Phenomenex, США). 10 мкг ИЛ-36РА в 20 мкл раствора наносили на колонку в 50 мМ фосфатном буфере, pH 6.0. Элюцию проводили в градиенте ацетонитрила (Вектон, Россия) от 39.6 до 40.8 % в 0.1%-ной трифторуксусной кислоте, pH 2.5, в течение 20 мин при скорости потока 1.5 мл/мин и 35 °С. Детектировали пики при длине волны 220 нм. Анализ чистоты препарата проводили при элюции ИЛ-36РА в градиенте ацетонитрила от 30 до 70 %, в остальном условия были теми же.

## Результаты и обсуждение

Были созданы три штамма-продуцента растворимого ИЛ-36РА на основе *E. coli* BL21 DE3, трансформированных одновременно плазмидой, несущей ген ИЛ-36РА человека под контролем промотора *T7/lac*, и одной из трех плазмид, несущих ген МАП *E. coli* под контролем промотора *T7/lac*, *rhaBAD* или *araBAD*. Полученные штаммы получили следующие названия — 36РА/MAP-lac, 36РА/MAP-rha и 36РА/MAP-ara соответственно. Все описанные штаммы-продуценты производили ИЛ-36РА в растворимой форме и накапливали его в цитоплазме клеток. Из лизата биомассы бактериальных клеток ИЛ-36РА очищали хроматографически в две стадии — сначала на анионообменном сорбенте Q-XL (GE), а затем на гидрофобном сорбенте Butyl-S (Tosoh) в среднем до 98 % чистоты. Чистоту препарата ИЛ-36РА определяли с помощью обращенно-фазовой (ОФ) ВЭЖХ. Были подобраны условия разделения процессированной и непродессированной (содержащей N-концевой остаток метионина) форм ИЛ-36РА в ОФ-ВЭЖХ. Пик, соответствующий метиониновой форме ИЛ-36РА, был впервые выявлен при сравнении необработанного образца ИЛ-36РА и образца, обработанного коммерческим препаратом МАП (RnD systems) in vitro. Образец ИЛ-36РА разделялся на два пика, один из которых исчезал после обработки МАП. Таким образом этот пик был идентифицирован как соответствующий непродессированной форме

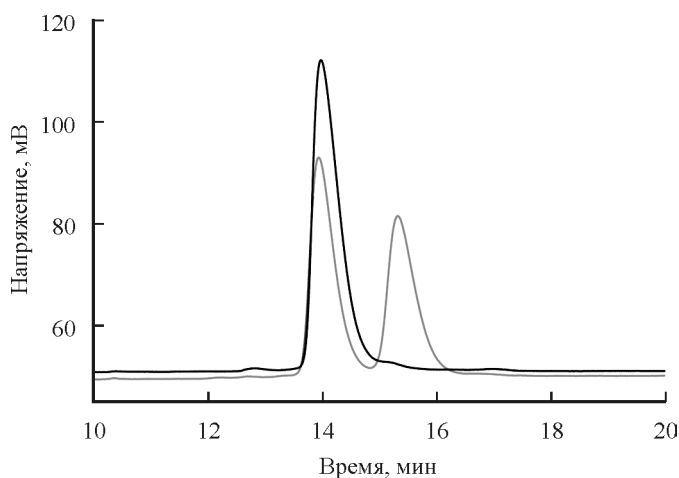


Рис. 1. Наложение типичных ОФ-ВЭЖХ-хроматограмм образцов ИЛ-36РА, полученных при коэкспрессии с МАП (черная кривая) и без коэкспрессии с МАП (серая кривая).

ИЛ-36РА, содержащей N-концевой остаток метионина. В дальнейшем соотношение процессированной и непроцессированной форм ИЛ-36РА количественно определяли по соотношению площадей их пиков после разделения методом ОФ-ВЭЖХ. Типичные хроматограммы образцов ИЛ-36РА, полученных при коэкспрессии с МАП и без нее, показаны на рис. 1.

Коэкспрессия с МАП приводила к уменьшению примеси непроцессированной формы ИЛ-36РА. Все три штамма-продуцента, коэкспрессирующих гены ИЛ-36РА и МАП, производили ИЛ-36РА, содержащий менее 3% непроцессированной формы (рис. 2). Материнский штамм-продуцент ИЛ-36РА, на основе которого были созданы все три описываемых штамма, не несущий дополнительной плазмиды с геном МАП, производил ИЛ-36РА, содержащий в среднем 25.6% непроцессированной формы (рис. 2).

Далее был выявлен наиболее производительный штамм-продуцент безметионинового ИЛ-36РА. Продуктивность штамма 36РА/МАР-ага составила 186 мг ИЛ-36РА на 1 л бактериальной культуры (18.6 мкг/ОЕ) и оказалась несколько выше, чем у штаммов 36РА/МАР-лас и 36РА/МАР-рха, однако различие не было статистически достоверным (рис. 3). Достоверно ниже продукция ИЛ-36РА только у штамма 36РА/МАР-рха по сравнению с 36РА (рис. 3). Причиной таких различий в продуктивности может служить то, что эффективность наработки МАП под контролем промотора агаBAD, вероятно, меньше, чем в случае других использованных промоторов. Однако сравнительного анализа количества МАП, вырабатываемого различными штаммами-продуцентами, мы не проводили. В любом случае получаемого количества экзогенной МАП достаточно для эффективного процессинга рекомбинантного ИЛ-36РА. При этом производительность штамма-продуцента 36РА, не несущего дополнительной кодирующей МАП плазмиды, была еще выше и составляла 216 мг ИЛ-36РА на 1 л бактериальной культуры (или 21.6 мкг/ОЕ), однако различие также не было статистически значимым (рис. 3). Очевидно, что дополнительная нагрузка на бактериальную клетку в виде необходимости поддерживать еще одну плазмиду и синтезировать МАП приводит к существенному снижению продукции ИЛ-36РА.

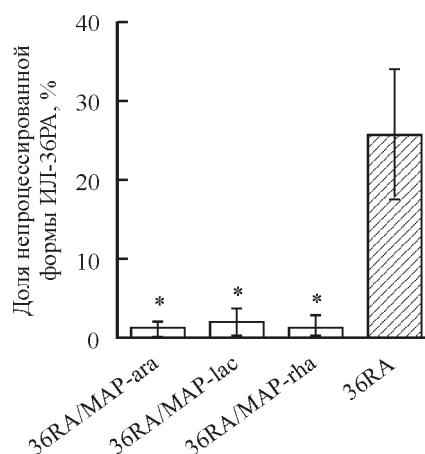


Рис. 2. Сравнение количества непроцессированной формы ИЛ-36РА в препаратах ИЛ-36РА, полученных от различных штаммов-продуцентов *Escherichia coli*.

36РА — штамм, трансформированный только плазмидой, несущей ген ИЛ-36РА; 36РА/МАР-ага, 36РА/МАР-лас и 36РА/МАР-рха — штаммы, трансформированные плазмидой, несущей ген ИЛ-36РА, и плазмидой, несущей ген МАП под контролем различных промоторов: ага (промотор *araBAD*), рха (промотор *rhaBAD*) и лас (промотор *lac/T7*). Звездочкой указана достоверность различий при  $P < 0.05$  (*t*-критерий Стьюдента).

Существенным преимуществом полученной системы экспрессии безметионинового ИЛ-36РА является отсутствие дополнительных технологических этапов, связанных с обработкой получаемого ИЛ-36РА МАП уже после очистки. Самым существенным усложнением процесса являлась бы необходимость постоянной параллельной наработки высокоочищенной МАП. К тому же МАП является достаточно термолабильным ферментом, не подлежащим хранению в течение более 1 года даже при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Поэтому не представляется возможным наработать его один раз для последующего использования в течение длительного времени. Далее, при масштабировании производства ИЛ-36РА потребовалось бы симметричное масштабирование производства МАП. Кроме того, для работы МАП требуются специфические условия (Ben-Bassat, 1987; D'souza, 1999), поэтому в случае разработанного нами процесса очистки ИЛ-36РА обработка МАП *in vitro* потребовала бы дополнительных ша-

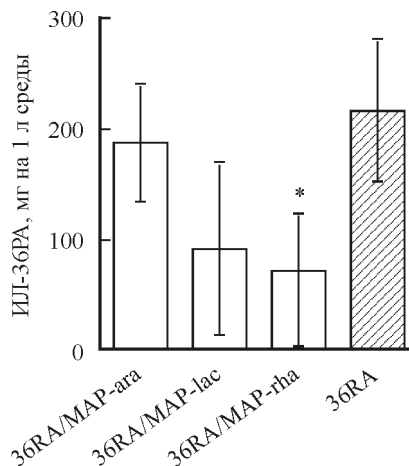


Рис. 3. Сравнение продукции ИЛ-36РА различными штаммами-продуцентами *Escherichia coli*.

Объяснения те же, что и в подписи к рис. 2.

гов со сменой буфера в образце. По этим причинам коэкспрессия генов ИЛ36РА и МАП — и, таким образом, обработка ИЛ-36РА МАП *in vivo* — представляется нам более простым способом получения безметионинового ИЛ-36РА. Разработанная система коэкспрессии ИЛ-36РА с МАП может быть применена для получения и других рекомбинантных белков.

Систему коэкспрессии гена целевого белка с МАП потенциально можно было бы реализовать не с помощью двух плазмид, относящихся к разным группам несовместимости, как в данном исследовании, а с помощью одного вектора, несущего последовательности как гена белка интереса, так и гена МАП. Преимуществом такой системы является меньшая метаболическая нагрузка на бактериальную клетку из-за отсутствия необходимости репликации еще одной плазмиды и наработки белка, определяющего устойчивость к соответствующему ей антибиотику. Вследствие сниженной метаболической нагрузки клетка должна быть способна производить больше целевого белка, а культуру бактерий, трансформированных этой плазмидой, должно быть возможным доращивать до больших плотностей, чем в случае с двухплазмидной системой. Такая система может стать логичным развитием полученной нами системы коэкспрессии ИЛ-36РА и МАП. Нами уже установлено, что оптимальным сочетанием генетических конструкций для экспрессии безметионинового ИЛ-36РА из протестированных нами является ИЛ-36РА под контролем промотора фага T7 и МАП под контролем промотора *araBAD*. Штамм-продуцент с единственным плазмидным вектором, несущим обе эти генетические конструкции, вероятно, превзошел бы по продуктивности имеющийся штамм-продуцент. Аналогичные системы уже были описаны в литературе (Liu, 2012).

С другой стороны, двухплазмидная система очень удобна тем, что ее можно быстро адаптировать к любому новому объекту, избегая дополнительных шагов с клонированием. Достаточно клонировать ген белка интереса в одну экспрессионную плазмиду и затем котрансформировать штамм-носитель ею и одной из плазмид, несущих ген МАП. Таким образом, полученную нами серию плазмид с геном МАП под контролем различных промоторов удобно было бы использовать для быстрого подбора оптимальных условий работы МАП на новых объектах. В нашем эксперименте при текущих уровнях продукции ИЛ-36РА того количества МАП, которое вырабатывается под контролем промотора *araBAD*, достаточно для эффективного процессинга объекта. Однако в случае иных объектов оптимальное соотношение МАП и целевого белка может быть иным, что определяет необходимость такой оптимизации.

Таким образом, полученная серия плазмид, несущих ген МАП под контролем различных промоторов, может служить основой для создания систем коэкспрессии с генами других белков, отличных от ИЛ-36РА, и использоваться для подбора оптимальных условий такой коэкспрессии. Из созданных штаммов-продуцентов рекомбинантного ИЛ-36РА человека на основе *E. coli* BL21 DE3 наиболее продуктивным оказался штамм, трансформированный плазмидой, несущей ген ИЛ-36РА человека, и плазмидой, несущей ген МАП *E. coli* под контролем промотора *araBAD*. Его продуктивность составляет 186 мг ИЛ-36РА на 1 л бактериальной культуры (18.6 мкг/ОЕ). Получаемый рекомбинантный ИЛ-36РА содержит меньше 3 % примеси непротессированной формы ИЛ-36РА с

неотщепленным N-концевым остатком метионина. Анализ биологической активности ИЛ-36РА, полученных от разных штаммов-продуцентов, будет описан в следующих сообщениях.

Коллектив авторов выражает свою глубочайшую благодарность Е. А. Протасову за помощь при проведении ВЭЖХ-анализа.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (ГК № 14.N08.11.0041).

### Список литературы

- Barton J. L., Herbst R., Bosisio D., Higgins L., Nicklin M. J. 2000. A tissue specific IL-1 receptor antagonist homolog from the IL-1 cluster lacks IL-1, IL-1ra, IL-18 and IL-18 antagonist activities. *Eur. J. Immunol.* 30 : 3299—3308.
- Ben-Bassat A., Bauer K., Chang S. Y., Myambo K., Boosman A., Chang S. 1987. Processing of the initiation methionine from proteins: properties of the *Escherichia coli* methionine aminopeptidase and its gene structure. *J. Bacteriol.* 169 : 751—757.
- Bhosale M., Pande S., Kumar A., Kairamkonda S., Nandi D. 2010. Characterization of two M17 family members in *Escherichia coli*, Peptidase A and Peptidase B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 395 : 76—81.
- Blumberg H., Dinh H., Dean C., Trueblood E. S., Bailey K., Shows D., Bhagavathula N., Aslam M. N., Varani J., Towne J. E., Sims J. E. 2010. IL-1RL2 and its ligands contribute to the cytokine network in psoriasis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 185 : 4354—4362.
- Brooks S. A. 2004. Appropriate glycosylation of recombinant proteins for human use: implications of choice of expression system. *Mol. Biotechnol.* 28 : 241—255.
- Dalbøge H., Bayne S., Pedersen J. 1990. *In vivo* processing of N-terminal methionine in *E. coli*. *FEBS Lett.* 266 : 1—3.
- Debets R., Timans J. C., Homey B., Zurawski S., Sana T. R., Lo S., Wagner J., Edwards G., Clifford T., Menon S., Bazan J. F., Kastelein R. A. 2001. Two novel IL-1 family members, IL-1 delta and IL-1 epsilon, function as an antagonist and agonist of NF-kappa B activation through the orphan IL-1 receptor-related protein 2. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 167 : 1440—1446.
- D'souza V. M., Holz R. C. 1999. The methionyl aminopeptidase from *Escherichia coli* can function as an iron(II) enzyme. *Biochemistry (Moscow).* 38 : 11 079—11 085.
- Dunn E., Sims J. E., Nicklin M. J., O'Neill L. A. 2001. Annotating genes with potential roles in the immune system: six new members of the IL-1 family. *Trends Immunol.* 22 : 533—536.
- Farooq M., Nakai H., Fujimoto A., Fujikawa H., Matsuyama A., Kariya N., Aizawa A., Fujiwara H., Ito M., Shimomura Y. 2013. Mutation analysis of the IL36RN gene in 14 Japanese patients with generalized pustular psoriasis. *Hum. Mutat.* 34 : 176—183.
- Griffiths C. E. M., Barker J. N. W. N. 2007. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet Lond. Engl.* 370 : 263—271.
- Grote A., Hiller K., Scheer M., Münch R., Nörtemann B., Hempel D. C., Jahn D. 2005. JCat: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host. *Nucleic Acids Res.* 33 : W526—W531.
- Günther S., Sundberg E. J. 2014. Molecular determinants of agonist and antagonist signaling through the IL-36 receptor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 193 : 921—930.
- Hirel P. H., Schmitter M. J., Dessen P., Fayat G., Blanquet S. 1989. Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 86 : 8247—8251.
- Hoffman S. J., Looker D. L., Roehrich J. M., Cozart P. E., Durfee S. L., Tedesco J. L., Stetler G. L. 1990. Expression of fully

functional tetrameric human hemoglobin in *Escherichia coli*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 87 : 8521—8525.

Hussain S., Berki D. M., Choon S.-E., Burden A. D., Allen M. H., Arostegui J. I., Chaves A., Duckworth M., Irvine A. D., Mockenhaupt M., Navarini A. A., Seyger M. M. B., Soler-Palacin P., Prins C., Valeyrie-Allanore L., Vicente M. A., Trembath R. C., Smith C. H., Barker J. N., Capon F. 2015. IL36RN mutations define a severe autoinflammatory phenotype of generalized pustular psoriasis. J. Allergy Clin. Immunol. 135 : 1067—1070.e9.

Kanazawa N., Nakamura T., Mikita N., Furukawa F. 2013. Novel IL36RN mutation in a Japanese case of early onset generalized pustular psoriasis. J. Dermatol. 40 : 749—751.

Körber A., Mössner R., Renner R., Sticht H., Wilsmann-Theis D., Schulz P., Sticherling M., Traupe H., Hüffmeier U. 2013. Mutations in IL36RN in patients with generalized pustular psoriasis. J. Invest. Dermatol. 133 : 2634—2637.

Levitt M. 1976. A simplified representation of protein conformations for rapid simulation of protein folding. J. Mol. Biol. 104 : 59—107.

Liao Y.-D., Jeng J.-C., Wang C.-F., Wang S.-C., Chang S.-T. 2004. Removal of N-terminal methionine from recombinant proteins by engineered *E. coli* methionine aminopeptidase. Protein Sci. Publ. Protein Soc. 13 : 1802—1810.

Liu M., Bandaru V., Holmes A., Averill A. M., Cannan W., Wallace S. S. 2012. Expression and purification of active mouse and human NEIL3 proteins. Protein Expr. Purif. 84 : 130—139.

Makrides S. C. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. Microbiol. Rev. 60 : 512—538.

Marrakchi S., Guigue P., Renshaw B. R., Puel A., Pei X.-Y., Freitag S., Zribi J., Bal E., Cluzeau C., Chrabieh M., Towne J. E., Douangpanya J., Pons C., Mansour S., Serre V., Makni H., Mahfoudh N., Fakhfakh F., Bodemer C., Feingold J., Hadj-Rabia S., Favre M., Genin E., Sahbatou M., Munnich A., Casanova J.-L., Sims J. E., Turki H., Bachelez H., Smahi A. 2011. Interleukin-36-receptor antagonist deficiency and generalized pustular psoriasis. N. Engl. J. Med. 365 : 620—628.

Nausch H., Huckauf J., Koslowski R., Meyer U., Broer I., Mikschofsky H. 2013. Recombinant production of human interleukin 6 in *Escherichia coli*. PLoS ONE. 8 : e54933.

Newton D. L., Boque L., Wlodawer A., Huang C. Y., Rybak S. M. 1998. Single amino acid substitutions at the N-terminus of a recombinant cytotoxic ribonuclease markedly influence biochemical and biological properties. Biochemistry (Moscow). 37 : 5173—5183.

Piatkov K. I., Vu T. T. M., Hwang C.-S., Varshavsky A. 2015. Formyl-methionine as a degradation signal at the N-termini of bacterial proteins. Microb. Cell. 2 : 376—393.

Proudfoot A. E., Power C. A., Hoogewerf A. J., Montjovent M. O., Borlat F., Offord R. E., Wells T. N. 1996. Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating me-

thionine produces a potent antagonist. J. Biol. Chem. 271 : 2599—2603.

Rabhi-Essafi I., Sadok A., Khalaf N., Fathallah D. M. 2007. A strategy for high-level expression of soluble and functional human interferon alpha as a GST-fusion protein in *E. coli*. Protein Eng. Des. Sel. PEDS. 20 : 201—209.

Shen T. J., Ho N. T., Simplaceanu V., Zou M., Green B. N., Tam M. F., Ho C. 1993. Production of unmodified human adult hemoglobin in *Escherichia coli*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 90 : 8108—8112.

Shirokov D. A., Riabichenko V. V., Akishina R. I., Ospel'nikova T. P., Glazunov A. V., Chestukhina G. G., Veiko V. P. 2011. Designing of hybrid human interferon alpha-2 strain-producers and the use of enteropeptidase for obtaining N-terminal methionine-free interferons. Mol. Biol. (Moscow). 45 : 510—516.

Sims J. E., Smith D. E. 2010. The IL-1 family: regulators of immunity. Nat. Rev. Immunol. 10 : 89—102.

Smith D. E., Renshaw B. R., Ketchem R. R., Kubin M., Garaka K. E., Sims J. E. 2000. Four new members expand the interleukin-1 superfamily. J. Biol. Chem. 275 : 1169—1175.

Solbiati J., Chapman-Smith A., Miller J. L., Miller C. G., Cronan J. E. 1999. Processing of the N termini of nascent polypeptide chains requires deacetylation prior to methionine removal. J. Mol. Biol. 290 : 607—614.

Steinkasserer A., Solari R., Mott H. R., Aplin R. T., Robinson C. C., Willis A. C., Sim R. B. 1992. Human interleukin-1 receptor antagonist. High yield expression in *E. coli* and examination of cysteine residues. FEBS Lett. 310 : 63—65.

Sugiura K., Takemoto A., Yamaguchi M., Takahashi H., Shoda Y., Mitsuma T., Tsuda K., Nishida E., Togawa Y., Nakajima K., Sakakibara A., Kawachi S., Shimizu M., Ito Y., Takeichi T., Kono M., Ogawa Y., Muro Y., Ishida-Yamamoto A., Sano S., Matsue H., Morita A., Mizutani H., Izuka H., Muto M., Akiyama M. 2013. The Majority of generalized pustular psoriasis without psoriasis vulgaris is caused by deficiency of interleukin-36 receptor antagonist. J. Invest. Dermatol. 133 : 2514—2521.

Towne J. E., Renshaw B. R., Douangpanya J., Lipsky B. P., Shen M., Gabel C. A., Sims J. E. 2011. Interleukin-36 (IL-36) ligands require processing for full agonist (IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$ , and IL-36 $\gamma$ ) or antagonist (IL-36Ra) activity. J. Biol. Chem. 286 : 42 594—42 602.

Wetzel R. 1981. Assignment of the disulphide bonds of leukocyte interferon. Nature. 289 : 606—607.

Zanette D., Dundon W., Soffientini A., Sottani C., Marinelli F., Akeson A., Sarubbi E. 1998. Human IL-1 receptor antagonist from *Escherichia coli*: large-scale microbial growth and protein purification. J. Biotechnol. 64 : 187—196.

Zelickson B. D., Muller S. A. 1991. Generalized pustular psoriasis. A review of 63 cases. Arch. Dermatol. 127 : 1339—1345.

Поступила 21 III 2017

## HUMAN IL-36RA PRODUCTION IN *ESCHERICHIA COLI* WITH COEXPRESSION WITH *E. COLI* METHIONINE AMINOPEPTIDASE.

### I. COMPARISON OF IL-36RA PRODUCTION BY DIFFERENT STRAINS

A. A. Kolobov,<sup>1,2,\*</sup> E. V. Kondratyeva,<sup>2</sup> T. V. Kudling,<sup>2</sup> M. M. Karasev,<sup>2</sup> R. S. Kalinin,<sup>1,2</sup>  
A. A. Khizhina,<sup>1,2</sup> P. P. Nimiritsky,<sup>3</sup> V. E. Stefanov,<sup>1</sup> A. V. Petrov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biochemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199004,

<sup>2</sup> State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, 197110, and

<sup>3</sup> Department of Biochemistry, Moscow State University, Moscow, 119192;

\* e-mail: alexey.kolobov.spb@gmail.com

Generalized pustular psoriasis (GPP) is a rare sometimes lethal form of psoriasis, caused by series of mutations in the interleukin-36 receptor antagonist (IL-36RA) gene associated with its reduced expression or activity. Administration of exogenous IL-36RA can be a potent therapeutic approach to treatment of GPP and other

forms of psoriasis. Since cleavage of the starting N-formylmethionine residue from N-terminal end is needed for full biological activity of IL-36RA we have developed technology for producing IL-36RA lacking N-formylmethionine residue in *Escherichia coli*. We have created a series of plasmids carrying the *E. coli* methionine aminopeptidase (MAP) gene under the control of different promoters for co-expression of IL-36RA and MAP and tested their effect on IL-36RA production. The highest production of IL-36RA with <3 % of unprocessed molecules with uncleaved N-terminal formylmethionine residue has been shown for *E. coli* strain carrying the MAP gene under the control of arabinose-inducible promoter.

**Key words:** interleukin, interleukin-36 receptor antagonist (IL-36RA), methionine aminopeptidase (MAP), recombinant protein, coexpression, methionine.

---