

**ПОЛУЧЕНИЕ ИЛ-36РА ЧЕЛОВЕКА В *ESCHERICHIA COLI* ПРИ КОЭКСПРЕССИИ  
С МЕТИОНИНАМИНОПЕПТИДАЗОЙ *E. COLI*.  
II. СРАВНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИЛ-36РА  
ОТ РАЗЛИЧНЫХ ШТАММОВ**

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

<sup>1</sup> Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов ФМБА России,  
Санкт-Петербург, 197110,

<sup>2</sup> Кафедра биохимии С.-Петербургского государственного университета,  
Санкт-Петербург, 199004, и

<sup>3</sup> Кафедра биохимии Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова,  
Москва, 119192;

\* электронный адрес: alexey.kolobov.spb@gmail.com

Провоспалительные цитокины семейства интерлейкина-36 (ИЛ-36) участвуют в патогенезе различных кожных заболеваний человека и мыши. Введение экзогенного рецепторного антагониста интерлейкина-36 (ИЛ-36РА) могло бы применяться для лечения различных дерматитов. Для полной биологической активности ИЛ-36РА необходимо отщепление N-концевого остатка метионина. Нами были созданы три штамма, продуцирующих безметиониновый ИЛ-36РА человека при коэкспрессии с метионинаминопептидазой *Escherichia coli* под контролем различных промоторов. Для тестирования биологической активности ИЛ-36РА клеточную линию A549 трансфицировали плазмидой, несущей ген рецептора ИЛ-36 человека (ген *IL1RL2*). Клетки этой линии отвечают на обработку ИЛ-36г выработкой ИЛ-8, измеряемой с помощью ИФА. Обработка ИЛ-36РА блокирует активацию рецептора ИЛ-36 и соответственно выработку ИЛ-8 на фоне ИЛ-36г. С помощью этой системы установили, что ИЛ-36РА от 3 описанных штаммов-продуцентов обладает полной биологической активностью.

Ключевые слова: интерлейкин, рецепторный антагонист ИЛ-36 (ИЛ-36РА), метионинаминопептидаза, рекомбинантный белок, коэкспрессия, метионин, A549.

Принятые сокращения: ГПП — генерализованный пустулезный псориаз, ИЛ — интерлейкин, ИЛ-36РА — рецепторный антагонист ИЛ-36, МАП — метионинаминопептидаза, ПФЧ — первичные фибробласты человека, ЛПС — липополисахарид, FCS — фетальная сыворотка телят, NF-κB — ядерный фактор κB.

Цитокины семейства интерлейкина-36 (ИЛ-36) являются одними из ключевых регуляторов воспаления в кожных покровах (Gresnigt, van de Veerdonk, 2013). Семейство ИЛ-36 включает в себя три провоспалительных цитокина — ИЛ-36 a, b и g и один противовоспалительный — рецепторный антагонист интерлейкина-36 (ИЛ-36РА) (Smith et al., 2000; Debets et al., 2001; Sims, Smith, 2010).

ИЛ-36 участвуют в патогенезе различных кожных заболеваний человека и мыши (Blumberg et al., 2010). Было показано, что ряд мутаций в гене ИЛ-36РА ассоциирован с возникновением генерализованного пустулезного псориаза (ГПП) (Farooq et al., 2013; Kanazawa et al., 2013; Körber et al., 2013; Sugiura et al., 2013; Hussain et al., 2015). ГПП — это редкая тяжелая форма псориаза с периодическими обострениями, повышением температуры тела, обширными кожными высыпаниями в виде пустул и частыми поражениями кожи по типу вульгарного псориаза (Zelickson, Muller, 1991; Griffiths, Barker, 2007). Введение

экзогенного ИЛ-36РА могло бы применяться для лечения ГПП и других форм псориаза.

Биологическая активность ИЛ-36РА напрямую зависит от эффективности отщепления N-концевого остатка метионина (Towne et al., 2011). При наработке ИЛ-36РА в *Escherichia coli* (штамм 36РА) мы столкнулись с тем, что получаемый белок содержал в среднем 25.6 % примесной непротесированной формы с неотщепленным N-концевым остатком метионина. Поэтому возникла необходимость разработки технологии получения безметионинового ИЛ-36РА.

Нами была получена серия штаммов-продуцентов ИЛ-36РА на основе *E. coli*, трансформированных также плазмидами, несущими ген метионинаминопептидазы (МАП) *E. coli* под контролем различных промоторов — T7/lac, rhaBAD или araBAD. Полученные штаммы получили названия соответственно 36РА/МАП-lac, 36РА/МАП-rha и 36РА/МАП-ara.

Коэкспрессия с МАП приводила к уменьшению прироста непротрансформированной формы ИЛ-36РА. Все три штамма-продуцента, коэкспрессирующие гены ИЛ-36РА и МАП, производили ИЛ-36РА, содержащий меньше 3 % непротрансформированной формы. Штамм, не несущий дополнительной плазмиды с геном МАП, производил ИЛ-36РА, содержащий в среднем 25.6 % непротрансформированной формы. Сравнение продукции ИЛ-36РА различными штаммами *E. coli* было подробно описано нами ранее (Колобов и др., 2017).

Целью настоящей работы стала оценка биологической активности получаемых ИЛ-36РА. Для этого нами была создана клеточная линия А549 + 36R для тестирования биологической активности ИЛ-36 и ИЛ-36РА и измерена биологическая активность ИЛ-36РА от различных штаммов-продуцентов.

### Материал и методика

Создание штамма-продуцента ИЛ-36РА, культивирование этого штамма и хроматографическая очистка ИЛ-36РА подробно описаны ранее (Колобов и др., 2017).

Получение экспрессионного вектора pIRESpu3/IL1RL2. Тотальную РНК выделяли из первичной культуры фибробластов кожи человека (из коллекции клеточных культур Государственного научно-исследовательского института особо чистых препаратов) с помощью набора GeneJET RNA Purification Kit согласно протоколу фирмы-производителя. Качество и количество РНК оценивали спектрофотометрически и электрофоретически. кДНК получали на матрице РНК с помощью Maxima Reverse Transcriptase с использованием Oligo(dT)-праймеров.

Аmplification последовательности гена рецептора ИЛ-36 (ген *IL1RL2*) проводили путем ПЦР со вложенной парой праймеров (nested PCR) в два этапа с помощью Long PCR Enzyme mix. Первой парой праймеров были F1 (ttgggatgtgtgccttg) и R1 (tccagcaagtcttagcca). Вторую пару праймеров F2 (gtagctagcgcaccatgtgtctctgtgctc) и R2 (gctgcggatccttagccagctcgtgagagtacac) (Бигль, Россия) подбирали таким образом, чтобы полученная последовательность содержала по краям сайты рестрикции NheI и BamHI. Кроме того, полученная последовательность также содержала последовательность Козака перед старт-кодоном. Продукт второго этапа ПЦР и экспрессионный вектор pIRESpu3 (Clontech, США) обрабатывали рестриктазами NheI и BamHI (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу фирмы-производителя. Продукты рестрикции разделяли электрофоретически и полосы нужной длины (1748 и 5099 п.о.) очищали с помощью набора для очистки ДНК. Полученные продукты рестрикции лигировали с помощью T4 ДНК-лигазы. Лигазную смесь использовали для трансформации 40 мкл электрокомпетентных клеток *E. coli* DH10 В/т. Выросшие колонии анализировали методом ПЦР на колониях с помощью праймеров CMV\_F (cgcaaatggcgcgtaggcgtg), EMCV\_IR (ccattattccaagcgcttcg), F2 и R2. Из колоний, содержащих плазмиду, выделяли плазмидную ДНК и секвенировали ее. Полученный экспрессионный вектор назвали pIRESpu3/IL1RL2. Плазмидную ДНК выделяли с помощью набора PureLink HiPure Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, Германия) и использовали для трансфекции.

Трансфекция и ведение культуры А549 + 36R. Клеточная линия А549 (эпителиоподобная карцинома легкого человека) была получена из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН. Клетки культивировали в среде DMEM/F12 с L-глутамином (Биолот, Россия) в пластиковых флаконах 25 см<sup>2</sup> (Costar, США). В среду добавляли 10 % фетальной телячьей сыворотки (FCS) (HyClone, США). Культивирование проводили в инкубаторе при 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> в условиях абсолютной влажности. Процедуру посева проводили 1 раз в 3—4 сут. Для снятия клеток с поверхности сосуда использовали смесь 0.25%-ного раствора трипсина с раствором Версена (1 : 1). Концентрацию клеток подсчитывали в камере Горяева, жизнеспособность определяли по исключению трипанового синего. Для трансфекции использовали клетки на 3—8-м пассажах. Липосомальную трансфекцию клеток плазмидой pIRESpu3/IL1RL2 проводили с помощью реагента TurboFect Transfection Reagent в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Для получения стабильно трансфицированных клеток через 2 сут после трансфекции в среду добавляли 0.5 мкг/мл пуромицина в качестве селективирующего агента и культивировали со сменой среды 1 раз в 5 сут до получения устойчивого роста. Клетки единственного полученного таким образом клона А549 + 36R нарастили и криоконсервировали в FCS с 10 % диметилсульфоксида (Sigma, США) в жидком азоте, считая созданный банк клеток культурой нулевого пассажа. Для последующих экспериментов клетки А549 + 36R размораживали и культивировали в тех же условиях, что и клетки линии А549, но с добавлением 0.5 мкг/мл пуромицина. Для тестирования биологической активности ИЛ-36РА клетки А549 + 36R использовали на 4—10-м пассажах.

Тестирование биологической активности ИЛ-36РА. Сравнение активности ИЛ-36РА, полученного из различных штаммов-продуцентов, основано на оценке их способности блокировать действие ИЛ-36 на рецептор ИЛ-36 на поверхности клеток А549 + 36. Клетки А549 + 36R рассевали в 96-луночную плату по 40 000 клеток на лунку в 100 мкл DMEM/F12 с 10 % FCS. Через 24 ч среду заменяли на свежую (100 мкл) и в 50 мкл свежей среды с 1 % FCS вносили различные полученные нами рекомбинантные ИЛ-36РА человека или коммерческий ИЛ-36РА человека в качестве стандартного образца в последовательных 3-кратных разведениях в диапазоне конечных концентраций от 3000 до 4.1 нг/мл. Каждое разведение было выполнено в трех повторениях. Затем добавляли 50 мкл свежей среды с 1 % FCS ИЛ-36 до конечной концентрации ИЛ-36 в среде 10 нг/мл. Через 24 ч отбирали супернатант, в котором методом ИФА определяли концентрацию ИЛ-8.

Иммуноферментный анализ для определения количества интерлейкина-8 проводили с помощью иммуноферментной тест-системы для количественного определения интерлейкина-8 человека (Цитокин, Россия) по инструкции фирмы-изготовителя. Супернатанты предварительно разводили в 5—50 раз, для того чтобы полученные оптические плотности попадали в линейный участок калибровочной кривой. Значения, полученные для супернатантов от образцов в параллелях, усредняли. Измерение оптической плотности проводили на планшетном фотометре Victor2 (Wallac, США) при длине волны 450 нм.

Расчет активности образцов ИЛ-36РА. Для каждого образца экспериментальные точки ( $d_i$  и  $c_i$ ),

где  $c_i$  — усредненное значение концентраций ИЛ-8, измеренных при заданной концентрации  $d_i$  ИЛ-36РА, аппроксимировались экспоненциальной функцией вида  $c(d) = A_0 + A_1 \cdot \exp(a_1 \cdot d)$ , такой, что сумма квадратов отклонений всех экспериментальных значений  $c_i$  от значений аппроксимирующей функции  $c(d_i)$  минимальна. Аппроксимацию признавали удовлетворительной, если коэффициент ее детерминированности ( $r^2$ ) был больше 0.95. Коэффициент  $A_0$  функции  $c(d)$  соответствует фоновой концентрации ИЛ-8. Экспонента  $\exp(a_1(d))$  описывает снижение концентрации ИЛ-8 на фоне 10 нг/мл ИЛ-36g в связи с увеличением концентрации ИЛ-36РА. Активность исследуемых образцов ИЛ-36РА определяли как отношение площади под кривой концентраций ИЛ-8  $c(d)$  (интеграла  $\exp(a_1 \cdot d)$  на интервале  $0 \leq d < \infty$ , равном  $A_1/a_1$ ) исследуемого и стандартного образцов.

Реактивы. GeneJET RNA Purification Kit, Maxima Reverse Transcriptase, Long PCR Enzyme mix, рестриктазы NheI и BamHI, T4 ДНК-лигаза, пурамицин и TurboFect Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, США); олигонуклеотидные праймеры для ПЦР (Бигль, Россия); плазмида pIRESpuo3 (Clontech, США); набор для очистки ДНК и иммуоферментная тест-система для количественного определения интерлейкина-8 человека (Цитокин, Россия); PureLink HiPure Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, Германия); DMEM/F12 и смесь 0.25%-ного раствора трипсина с раствором Версена (1 : 1) (Биолот, Россия); фетальная телячья сыворотка (HyClone, США); трипановый синий (Диа-М, Россия); ИЛ-36g (6835-IL-010, R&DSYSTEMS, США); рекомбинантный ИЛ-36РА человека (1275-IL-025, R&DSYSTEMS, США).

## Результаты

Для создания клеточной линии, которая может быть использована для измерения биологической активности ИЛ-36РА, нами была получена плазмида pIRESpuo3/IL1RL2, несущая ген рецептора ИЛ-36, клонированный из кДНК первичных фибробластов человека. С помощью постоянной трансфекции этой плазмидой клеток линии A549 удалось получить единственный клон клеток, стабильно растущий в селективных условиях и названный A549 + 36R.

Клетки A549 + 36R дозозависимо секретировали ИЛ-8 при стимуляции ИЛ-36g в диапазоне доз от 4 до

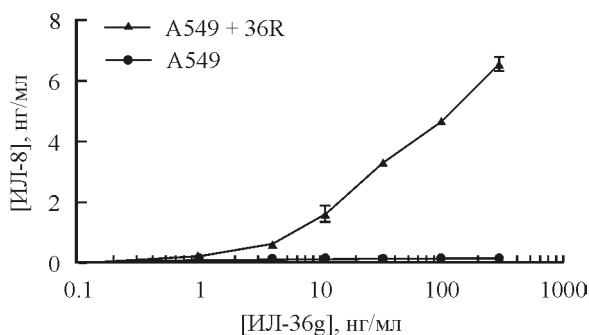


Рис. 1. Продукция ИЛ-8 клетками линии A549 и линии A549 + 36R, трансфицированной плазмидой pIRESpuo3/IL1RL2, несущей ген рецептора ИЛ-36, в присутствии ИЛ-36g в различных концентрациях.

Вертикальными отрезками отмечены стандартные отклонения (SD).

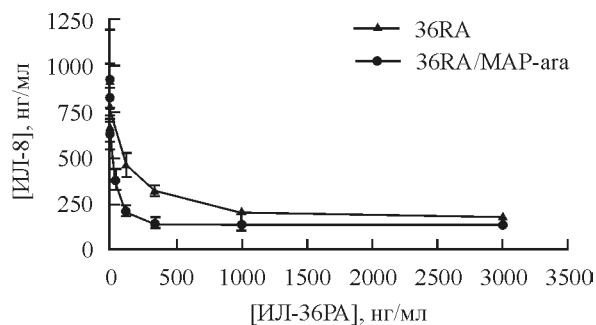


Рис. 2. Продукция ИЛ-8 клетками линии A549 + 36R на фоне 10 нг/мл ИЛ-36g и различных концентраций рекомбинантных ИЛ-36РА человека от различных штаммов-продуцентов.

Использовали следующие рабочие концентрации ИЛ-36РА (округлено до целых чисел): 3000, 1000, 333, 111, 37, 12, 4 и 0. 36RA — штамм, трансформированный только плазмидой, несущей ген ИЛ-36РА; 36RA/MAP-ara — штамм, трансформированный плазмидой, несущей ген ИЛ-36РА, и плазмидой, несущей ген МАП под контролем промотора *araBAD*. Вертикальными отрезками отмечены стандартные отклонения (SD).

300 нг/мл, тогда как исходная линия не отвечала на такую стимуляцию (рис. 1). Для определения активности ИЛ-36РА было решено использовать тест, основанный на блокаде действия ИЛ-36g на клетки A549 + 36R. Так, при добавлении ИЛ-36РА на фоне 10 нг/мл ИЛ-36g продукция ИЛ-8 клетками снижалась до фоновых значений (рис. 2). 50%-ное ингибирование продукции ИЛ-8, вызванное добавлением 10 нг/мл ИЛ-36g, наблюдали на фоне 10—20 нг/мл ИЛ-36РА.

С помощью созданной таким образом системы мы сравнили биологическую активность ИЛ-36РА от штаммов-продуцентов 36RA/MAP-lac, 36RA/MAP-rha, 36RA/MAP-ara и 36RA. Для всех штаммов, кроме 36RA, сравнивали активность ИЛ-36РА от последовательных культиви-

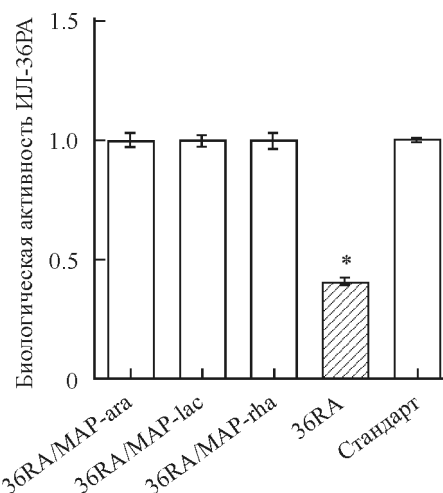


Рис. 3. Биологическая активность ИЛ-36РА от различных штаммов-продуцентов *Escherichia coli*.

36RA — штамм, трансформированный только плазмидой, несущей ген ИЛ-36РА; 36RA/MAP-ara, 36RA/MAP-lac и 36RA/MAP-rha — штаммы, трансформированные плазмидой, несущей ген ИЛ-36РА, и плазмидой, несущей ген МАП, под контролем различных промоторов: ara (промотор *araBAD*), rha (промотор *rhaBAD*) и lac (промотор *lacT7*); стандарт — коммерческий ИЛ-36РА (1275-IL-025, R&DSYSTEMS, США). Биологическую активность всех образцов сравнивали со стандартом; звездочка — достоверные отличия от стандарта,  $p < 0.05$  ( $t$ -критерий Стьюдента), вертикальными отрезками отмечены стандартные отклонения (SD).

рований. В случае же 36РА примесь непротрансформированной формы ИЛ-36РА оказывалась разной в результате разных культивирований, поэтому для эксперимента взяли один образец ИЛ-36РА с 58 % непротрансформированной формы.

Биологическая активность ИЛ-36РА, полученного от штаммов 36РА/MAP-lac, 36РА/MAP-rha и 36РА/MAP-ara и содержащего менее 3 % метиониновой формы, не отличается от активности стандартного образца (рис. 3). Активность ИЛ-36РА от штамма 36РА, не имеющего плазмиды с геном метионинаминопептидазы *E. coli*, составляет 44 % от активности стандартного образца (рис. 2, 3).

### Обсуждение

Для определения биологической активности ИЛ-36РА могут использоваться также первичные культуры фибробластов и кератиноцитов (MacLeod et al., 2016). Однако клетки первичных культур неудобны для рутинного использования в качестве тест-культуры из-за невозможности длительного пассирования и различий, наблюдаемых при работе с клетками от различных доноров.

Кроме того, первичные фибробласты человека (ПФЧ) очень чувствительны к липополисахариду (ЛПС), который является типичной примесью рекомбинантных белков, полученных в *E. coli*. При действии ЛПС на ПФЧ наблюдается активация транскрипционного фактора NF-κB, который также активируется при действии ИЛ-36g на клетки-мишени (Towne et al., 2004). В итоге дифференцировать эти два сигнала оказывается практически невозможно. Из-за высокой гидрофобности ИЛ-36РА очистка его от ЛПС на ранних этапах работы была, поэтому важно было найти систему, малочувствительную к ЛПС.

Мы решили создать такую линию самостоятельно на основе клеток аденокарциномы легочного эпителия линии A549. Клетки A549 примерно в 2400 раз менее чувствительны к ЛПС, чем ПФЧ. Так, клетки A549 отвечали на обработку 100 мкг/мл ЛПС выработкой 5 нг ИЛ-8 на 1 млн клеток (Palmborg et al., 1998), а культура ПФЧ отвечала на обработку 200 нг/мл ЛПС выработкой 24 нг ИЛ-8 на 1 млн клеток (Eleftheriadis et al., 2011).

Но что еще более важно, эта линия чувствительна к ИЛ-1α и β (Standiford et al., 1990), при этом пути передачи сигнала от рецептора ИЛ-1 и рецептора ИЛ-36 идентичны (Towne et al., 2004). Таким образом, эта линия продуцирует все белки, необходимые для передачи сигнала от рецептора ИЛ-36, за исключением собственно рецептора ИЛ-36.

Сходный подход ранее использовали другие авторы (Towne et al., 2011). В их работе клеточная линия Т-клеток человека Jurkat была трансфицирована двумя плазмидами. Одна несла ген рецептора ИЛ-36 (ген *IL1RL2*) под контролем индуцируемого тетрациклином промотора, а другая — ген люциферазы светлячка (*luc2*) под контролем промотора гена ИЛ-8, содержащего сайты связывания транскрипционного фактора NF-κB (Roebuck, 1999). После индукции экспрессии гена рецептора ИЛ-36 клетки начинали отвечать выработкой люциферазы на внесение ИЛ-36 а, б и г.

В нашем случае в качестве способа измерения активации NF-κB было использовано иммуноферментное определение концентрации ИЛ-8 в супернатанте культуры клеток-мишеней. Следует признать, что использование люциферазы в качестве репортерного белка является

более быстрым и удобным, поскольку позволяет проводить прямое измерение активации транскрипционного фактора в лизатах клеток-мишеней. Впрочем, выбор конкретного репортерного гена и метода измерения его активности не имеет принципиального значения и определяется, скорее, практическими соображениями.

С использованием клеток A549 + 36R мы сравнили биологическую активность препаратов ИЛ-36РА, полученных от разных штаммов-продуцентов и различающихся содержанием непротрансформированной формы белка с N-концевым метионином. Было показано, что активность образцов ИЛ-36РА, полученных от всех штаммов с коэкспрессией MAP, составляет 100 %, тогда как образец ИЛ-36РА от штамма 36РА, не имеющего плазмиды с геном метионинаминопептидазы *E. coli*, составляет 44 % от активности стандартного образца (рис. 2, 3). Эти данные соответствуют опубликованной информации о том, что непротрансформированная форма ИЛ-36РА, имеющая неотщепленный N-концевой остаток метионина, не обладает биологической активностью (Towne et al., 2011).

Таким образом, полученная клеточная линия A549 + 36R пригодна для тестирования биологической активности ИЛ-36. ИЛ-36РА, получаемый от всех трех штаммов-продуцентов ИЛ-36РА, трансформированных плазмидами, несущей ген ИЛ-36РА человека, и плазмидой, несущей ген MAP *E. coli*, обладает полной биологической активностью, которая определяется в первую очередь отщеплением N-концевого остатка метионина.

Авторы выражают свою благодарность А. В. Вахрушеву за помощь в разработке методики обсева данных теста биологической активности ИЛ-36РА.

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

### Список литературы

- Колобов А. А., Кондратьева Е. В., Кудлинг Т. В., Карасев М. М., Калинин Р. С., Хижина А. А., Нимирицкий П. П., Стефанов В. Е., Петров А. В. 2017. Получение ИЛ-36РА человека в *Escherichia coli* при коэкспрессии с метионинаминопептидазой *E. coli*. I. Сравнение продукции ИЛ-36РА различными штаммами. Цитология. 59 (7) : 482—488. (Kolobov A. A., Kondratyeva E. V., Kudling T. V., Karasev M. M., Kalinin R. S., Khizhina A. A., Nimiritsky P. P., Stefanov V. E., Petrov A. V. 2017. Human IL-36Ra production in *Escherichia coli* with coexpression with *E. coli* methionine aminopeptidase. I. Comparison of IL-36Ra production by different strains. Tsitologiya. 59 (7) : 482—488.)
- 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.
- 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-κB activation through the orphan IL-1 receptor-related protein 2. J. Immunol. Baltim. Md 1950. 167 : 1440—1446.
- Eleftheriadis T., Liakopoulos V., Lawson B., Antoniadis G., Stefanidis I., Galaktidou G. 2011. Lipopolysaccharide and hypoxia significantly alters interleukin-8 and macrophage chemoattractant protein-1 production by human fibroblasts but not fibrosis related factors. Hippokratia. 15 : 238—243.

- Farooq M., Nakai H., Fujimoto A., Fujikawa H., Matsuyama A., Kariya N., Aizawa A., Fujiwara H., Ito M., Shimotsuma Y. 2013. Mutation analysis of the IL36RN gene in 14 Japanese patients with generalized pustular psoriasis. *Hum. Mutat.* 34 : 176—183.
- Gresnigt M. S., van de Veerdonk F. L. 2013. Biology of IL-36 cytokines and their role in disease. *Semin. Immunol.* 25 : 458—465.
- Griffiths C. E. M., Barker J. N. W. N. 2007. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet Lond. Engl.* 370 : 263—271.
- 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., Mossner R., Renner R., Sticht H., Wilschmann-Theis D., Schulz P., Sticherling M., Traupe H., Huffmeier U. 2013. Mutations in IL36RN in patients with generalized pustular psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 133 : 2634—2637.
- Macleod T., Doble R., McGonagle D., Wasson C. W., Alase A., Stacey M., Wittmann M. 2016. Neutrophil elastase-mediated proteolysis activates the anti-inflammatory cytokine IL-36 receptor antagonist. *Sci. Rep.* 6 : 24880.
- Palmberg L., Larsson B. M., Malmberg P., Larsson K. 1998. Induction of IL-8 production in human alveolar macrophages and human bronchial epithelial cells *in vitro* by swine dust. *Thorax.* 53 : 260—264.
- Roebuck K. A. 1999. Regulation of interleukin-8 gene expression. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* 19 : 429—438.
- 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., Ketchum R. R., Kubin M., Garka K. E., Sims J. E. 2000. Four new members expand the interleukin-1 superfamily. *J. Biol. Chem.* 275 : 1169—1175.
- Standiford T. J., Kunkel S. L., Basha M. A., Chensue S. W., Lynch J. P., Toews G. B., Westwick J., Strieter R. M. 1990. Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line. A model for cytokine networks in the lung. *J. Clin. Invest.* 86 : 1945—1953.
- Sugiura K., Takemoto A., Yamaguchi M., Takahashi H., Shoda Y., Mitsuuma 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., Iizuka 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., Garka K. E., Renshaw B. R., Virca G. D., Sims J. E. 2004. Interleukin (IL)-1F6, IL-1F8, and IL-1F9 signal through IL-1Rrp2 and IL-1RACp to activate the pathway leading to NF-kappaB and MAPKs. *J. Biol. Chem.* 279 : 13 677—13 688.
- 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.
- Zelickson B. D., Muller S. A. 1991. Generalized pustular psoriasis. A review of 63 cases. *Arch. Dermatol.* 127 : 1339—1345.

Поступила 22 V 2017

HUMAN IL-36RA PRODUCTION IN *ESCHERICHIA COLI* WITH COEXPRESSION WITH *E. COLI* METHIONINE AMINOPEPTIDASE.  
II. COMPARISON OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF IL-36RA FROM DIFFERENT STRAINS

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

<sup>1</sup> State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, 197110,

<sup>2</sup> Department of Biochemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199004, and

<sup>3</sup> Department of Biochemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119192;

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

Proinflammatory cytokines of the interleukin-36 (IL-36) family are involved in pathogenesis of different skin diseases in human and mice. Administration of exogenous IL-36 receptor antagonist (IL-36Ra) could be an approach to therapy of different dermatitises. For its full biological activity IL-36Ra require the cleavage of N-terminal methionine residue. We created 3 *Escherichia coli* strains producing IL-36Ra coexpressed with *E. coli* methionine aminopeptidase under control of different promoters. To test biological activity of IL-36Ra from different strains we transfected the A549 cell line with plasmid carrying IL-36 receptor gene (*IL1RL2*). These cells respond to IL-36g treatment with production of IL-8 which can be quantified with ELISA. IL-36Ra treatment disrupts IL-36 receptor activation by IL-36g and production of IL-8. Using this system we proved that IL-36Ra from all 3 production strains is fully biologically active.

Key words: interleukin, interleukin-36 receptor antagonist (IL-36RA), methionine aminopeptidase (MAP), recombinant protein, coexpression, methionine, A549.