

УСЕНКО М. О.^{1✉}, ОКУНСВ О. В.², БЕНЦІОНОВА К. І.³, ГОРБАТЮК О. Б.¹, ПРОДОВ Д. М.¹, КОРДЮМ В. А.¹

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150, e-mail: usenko.m.alex@gmail.com

² Державна установа «Інститут генетичної та регенеративної медицини АМН України»,

Україна, 04114, м. Київ, вул. Вишгородська, 67, e-mail: amn_igrm@ukr.net

³ Державна установа «Інститут охорони ґрунтів України»,

Україна, 03190, м. Київ, пров. Бабушкіна, 3

✉ usenko.m.alex@gmail.com, (050) 462-37-85

ОТРИМАННЯ РЕКОМБІНАНТНОГО ЗЛИТОГО БІЛКА rhIL7-VAPmut ТА ЙОГО ФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА

Мета. Метою роботи було отримання у функціонально активній формі рекомбінантного злитого білка на основі інтерлейкіну-7 людини (rhIL7) і бактерійної лужної фосфатази (VAPmut). **Методи.** ДНК послідовності, що кодують rhIL-7 і VAPmut, було субклоновано у плазмідний вектор pET24a(+), який містив послідовність 6His-tag для подальшого хроматографічного очищення цільового білка. Плазмідним вектором pET24-rhIL7-VAPmut трансформували клітин *Escherichia coli* штаму BL21(DE3). Синтез білка індукували внесенням IPTG і за протоколом аутоіндукції. Біфункціональну активність rhIL7-VAPmut після ренатурації плавним розведенням підтверджено імунохімічними методами шляхом зв'язування зі специфічними антитілами. **Результати.** Сконструйовано злитий білок rhIL7-VAPmut. Встановлено, що застосування протоколу аутоіндукції забезпечує значно вищий рівень синтезу білка в *E. coli* у порівнянні з індукцією IPTG. Відпрацьовано метод очищення і ренатурації rhIL7-VAPmut із бактерійних тілець включення *in vitro*. З'ясовано, що rhIL7-VAPmut після ренатурації має специфічну біологічну активність. **Висновки.** Отриманий білок rhIL7-VAPmut надалі може бути використаний для проведення скринінгу імунних комбінаторних бібліотек кДНК варіабельних генів імуноглобулінів, що є джерелом специфічних одноланцюгових антитіл, а також для якісного і кількісного аналізу рецепторів до IL-7.

Ключові слова: IL-7, VAPmut, бактерійні тільця включення, ренатурація.

Інтерлейкін 7 (IL-7) – це імунний цитокін, що відіграє центральну роль у дозріванні та го-

меостазі Т- і В-лімфоцитів [1, 2]. Він являє собою одноланцюговий глікопротеїн масою близько 20 кДа, що складається з чотирьох α -спіралей, стабілізованих за допомогою дисульфідних зв'язків, які забезпечуються наявністю шістьох залишків Cys (Cys34-Cys129, Cys47-Cys141 і Cys2-Cys92). Рецептором IL-7 (IL-7R) є гетеродимерний білок, що складається з ланцюгів IL-7R α (CD127) та IL-2R γ (CD132). Основні сигнальні каскади, що активуються приєднанням IL-7 до IL-7R, включають Jak-Stat і PI3K-Акт шляхи [3, 4].

Дослідження IL-7 і IL-7R показали, що їх рівні варіюють у різних захворюваннях, зокрема таких, як вірусні інфекції (ВІЛ, цитомегаловірусна інфекція, вірусний гепатит С), розсіяний склероз (РС), ревматоїдний артрит, діабет 1 типу, синдром важкого комбінованого імунодефіциту та інших [5]. Слід зазначити, що ланцюг IL-7R α може існувати в мембранозв'язаній та розчинній ізоформах. У роботі [6] зроблено припущення, що певні концентрації розчинної ізоформи IL-7R α можуть сприяти прискоренню відновлення CD4+ Т-хелперів у хворих на ВІЛ після початку комбінованої антиретровірусної терапії, до складу якої входить IL-7. Докладний механізм, за допомогою якого це відбувається, залишається невідомим. IL-7R впливає на розвиток $\gamma\delta$ Т-клітин, що першими з'являються в зонах запального ураження за РС [7]. Дослідження [8] показали, що декілька мутацій в 6 екзоні CD127 можуть призводити до альтернативного сплайсингу, причому зміна співвідношення розчинної і мембрано-зв'язаної форм IL-7R α пов'язується із підвищеним ризиком розвитку РС. Проводяться також дослідження кореляції рівнів інтерферону- β (IFN β), що засто-

© УСЕНКО М. О., ОКУНСВ О. В.², БЕНЦІОНОВА К. І., ГОРБАТЮК О. Б., ПРОДОВ Д. М., КОРДЮМ В. А.

совується як первинна ланка лікування РС, та рівнів IL-7, IL-7Ra, нейтралізуючих антитіл [9].

Отже, моніторинг концентрації IL-7R має прогностичне значення і потрібен для детального вивчення механізмів впливу змін його концентрації на перебіг терапії вірусних та аутоімунних захворювань. Тому метою нашої роботи було отримання функціонально активного рекомбінантного інтерлейкіну 7 людини (rhIL-7), кон'югованого з бактерійною лужною фосфатазою (BAPmut). BAPmut, застосована для проведення дослідження, має підвищену ферментативну активність порівняно з бактерійною лужною фосфатазою *E. coli* [10]. У роботі авторів Muller В. Н. та ін. [11] було з'ясовано, що за рахунок двох амінокислотних замінів D153G і D330N (заміна аспарагінової кислоти на аспарагін і гліцин у 153 та 330 положеннях відповідно) досягається збільшення каталітичної активності у 17–40 разів без втрати термостабільності ферменту.

Злитий білок rhIL-7-BAPmut може бути перспективним компонентом тест-систем для детекції IL-7R. rhIL-7-BAPmut може також використовуватися для скринінгу імунних комбінаторних бібліотек кДНК варіабельних генів імунноглобулінів для забезпечення селективного виділення scFv, специфічних до IL7, та скорочення тривалості проведення самого скринінгу.

Матеріали і методи

Конструювання і синтез rhIL7-BAPmut.

Для отримання ДНК-последовності, що кодує rhIL7 з 10^7 клітин кісткового мозку людини, за допомогою реакції зворотної транскрипції отримували тотальну кДНК, із якої в результаті реакції ПЛР із застосуванням специфічних праймерів – sn 5'CCCGCAGACCATGTTCCATG3' та asn 5'GCTTGAATCGACGTTAGGAG3' ампліфікували ДНК-последовність hIL-7 розміром 591 п. н., яку клонували у раніше отриманий співробітниками відділу плазмідний вектор pET24-BAPmut по сайтах рестрикції *NdeI* та *NotI* [10]. Генно-інженерні маніпуляції з ДНК виконували згідно зі стандартними методами та рекомендаціями виробників відповідних ферментів [12].

Для забезпечення синтезу rhIL7-BAPmut одержаною плазмідною pET24-IL7-BAPmut трансформували клітини *E. coli* BL21(DE3). Синтез білка індукували внесенням IPTG і за протоколом аутоіндукції [13]. Виділення та очищення

бактерійних тілець включення проводили згідно з оптимізованою нами раніше методикою [14]. Для визначення локалізації і кількісного вмісту цільового білка в сумарному лізаті клітин-продуцентів проводили електрофоретичне розділення розчинної і нерозчинної фракції білків цитоплазми клітини.

Очищення і ренатурація rhIL7-BAPmut. Очищення білка проводили методом металоафінної хроматографії. Колонку HiTrap об'ємом 1 мл урівноважували іонами Ni^{2+} та приєднували до автоматизованої хроматографічної системи FPLS («Pharmacia», Швеція). Сорбент урівноважували денатуруючим буфером, який містив 6 М гуанідин гідрохлориду, 100 мМ трис-НСІ (рН 8,0), 200 мМ NaCl, 10 мМ імідазолу за швидкості потоку буфера 0,5 мл/хв. Фракцію бактерійних тілець включення солюбілізували протягом 1 години за кімнатної температури в денатуруючому буфері, який містив 10 мМ 2-меркаптоетанолу, центрифугували, фільтрували через 0,45 мкм мембранний фільтр PVDF («Millipore», США). 1 мл солюбілізованих тілець включення (2 мг/мл) наносили на колонку зі швидкістю 0,2 мл/хв. Сорбент відмивали від неспецифічно зв'язаних білків денатуруючим буфером. IL7-BAPmut елюювали денатуруючим буфером, який містив 500 мМ імідазолу. Далі проводили заміну буфера для елюції на такий, що не містив імідазолу, методом гель-фільтрації на сорбенті сефадекс G-25. Очищений білок ренатурували плавним розведенням у результаті додавання ренатуруючого буфера (100 мМ трис-НСІ (рН 8,0), 140 мМ NaCl, 4 мМ глутатіон відновлений; 0,4 мМ глутатіон окиснений; 0,5 М L-аргінін та 0,1 % Tween 20) протягом 12 годин за +4°C та постійного перемішування. Гомогенність очищеного білка аналізували у 12 %-му ДСН-ПААГ, концентрацію IL7-BAPmut визначали за відомою величиною адсорбції A_{280} , яку розраховували для цієї последовності із застосуванням програми Vector NTI.

Дот-блот аналіз. На нітроцелюлозну мембрану («Millipore», США) наносили специфічні до IL7 моноклональні антитіла ma124794 («Thermo Scientific», США) миші та поліклональні антитіла кроля у кількості 10 нг. Після блокування сайтів неспецифічного зв'язування буфером PBS, що містив 3 % молоко (PBSM), мембрану з іммобілізованими білками інкубували протягом 1 год з ренатурованим rhIL7-BAPmut у концентрації 1 мкг/мл. Як негативний контроль на мембрану наносили рекомбінант-

ний інтерферон $\alpha 2b$ людини (rhIFN $\alpha 2b$). Мембрану проявляли з використанням нерозчинного колориметричного субстрату для фосфатази BCIP-T/NBT («Sigma», США).

Результати та обговорення

Для високоефективної експресії плазмідним вектором *pET-rhIL7-ВАРmut*, який містить промотор одного з ранніх генів бактеріофага Т7, трансформували штам-реципієнт *E. coli* BL21(DE3). Індукування синтезу злитого білка проводили за протоколом аутоіндукції та додаванням ППТГ за +30°C та +37°C. Електрофоретичний аналіз лізатів бактеріальних клітин показав наявність у них продукту очікуваної молекулярної маси (66,2 кДа), максимальний рівень накопичення цільового білка (30 % від вмісту сумарних білків клітин *E. coli*) спостерігався у випадку аутоіндукції за +37°C. Вихід цільового білка досягав 0,4 мг/мл вихідної культури *E. coli*. У результаті електрофоретичного розділення розчинної і нерозчинної фракцій білків *E. coli* встановлено, що цільовий білок накопичувався у вигляді бактерійних тілець включення (рис. 1).

Щоб отримати очищену фракцію rhIL7-ВАРmut, було проведено виділення тілець

включення. Денситометрія електрофореграм після розділення білків лізатів *E. coli* за допомогою програми TotalLab 2.0 показала, що вміст цільового білка в тілцях включення досягав 30–35 % від вмісту сумарних білків клітин *E. coli*. Отримані тілця включення містили в середньому 0,32 мг/мл rhIL7-ВАРmut у перерахунку на вихідну культуру *E. coli* (рис. 1).

Оскільки цільовий білок накопичувався у формі нерозчинних агрегатів – тілець включення, подальша робота була сконцентрована на очищенні та ренатурації rhIL7-ВАРmut *in vitro*. Солюбілізацію тілець включення проводили в буферному розчині, що містив 6 М ГГХ та 10 мМ 2-меркаптоетанолу, центрифугували та відбирали супернатант для подальшої очистки та ренатурації. rhIL7-ВАРmut містить С-кінцевий залишок олігогістидину, тому його очищення проводили методом металоафінної хроматографії. Оскільки імідазол, який було застосовано для елюції білка з металоафінного сорбенту, може впливати на активність лужної фосфатази, проводили заміну буфера для елюції на буфер, що не містить імідазол, методом гел'фільтрації на сорбенті сефадекс G-25 («GE Healthcare», США).

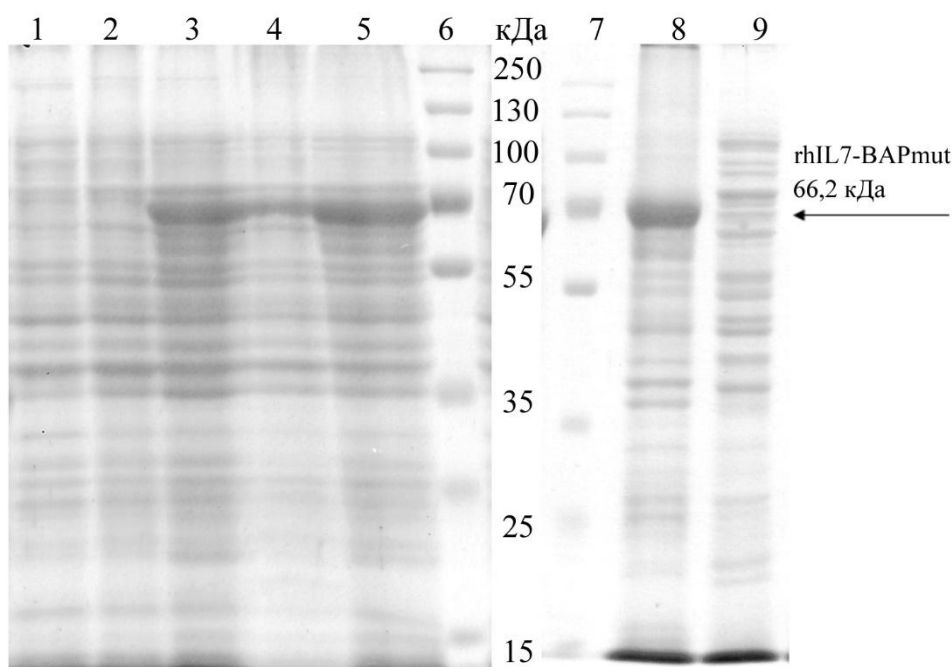


Рис. 1. Електрофореграма фракції білків *E. coli*, отриманих у результаті індукування синтезу rhIL7-ВАРmut: 1 – клітини без індукції; 2, 4 – індукція ППТГ за 30°C і 37°C відповідно; 3, 5 – аутоіндукція за 30°C і 37°C відповідно; 6, 7 – білки-маркери молекулярної маси («Thermo Scientific», США), 8 – нерозчинна фракція білків клітин, 9 – розчинна фракція білків клітин.

Очищений білок ренатурували плавним розведенням у буфері для ренатурації, що містив 4 мМ глутатіону відновленого та 0,4 мМ глутатіону окисненого для забезпечення коректного замикання трьох дисульфідних зв'язків ІL-7; 0,5 М L-аргініну та 0,1 % Tween – для просторового розділення білкових молекул та запобігання агрегації під час ренатурації. Ренатурацію проводили протягом 12 годин за +4°C за умов постійного перемішування. Вихід цільового білка після очистки та ренатурації становив 80 %. Чистота препарату складала приблизно 90 % (рис. 2).

Узагальнені дані результатів синтезу, очищення та ренатурації рекомбінантного злитого білка ІL7-ВАРmut за різних умов індукції синтезу наведено в таблиці.

Перевірку біологічної активності rhІL-7 у складі злитого білка проводили шляхом зв'язування зі специфічними до rhІL-7 полі- та моноклональними антитілами. Для візуалізації імунних комплексів застосовували нерозчинний субстрат для лужної фосфатази NBT/BCIP-T (Sigma, США). rhІL-7-ВАРmut давав чіткий сигнал у випадку обох антитіл, що є свідченням специфічності реакції та підтвердженням його біфункціональної активності (рис. 3).

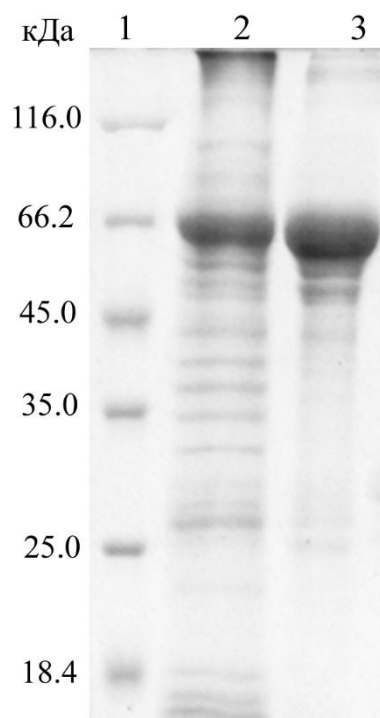


Рис. 2. Електрофореграма фракції білків бактерійних тілець включення: 1 – білки-маркери молекулярної маси; 2 – виділені та очищені тільки включення rhІL7-ВАРmut; 3 – очищений rhІL7-ВАРmut на металоафінному сорбенті та гель-фільтраційній колонці.

Таблиця. Порівняння результатів синтезу, очищення та ренатурації рекомбінантного злитого білка ІL7-ВАРmut за умов індукції синтезу додаванням ІПТГ і за протоколом аутоіндукції за температури + 37°C

| | Аутоіндукція | Індукція ІПТГ |
|---|--------------|---------------|
| Вихід цільового білка, після індукції його синтезу (мг/л <i>E. coli</i>) | 390 | 100 |
| Рівень накопичення цільового білка від сумарних білків <i>E. coli</i> , % | 30 | 23 |
| Значення OD600 бактерійної культури після індукції синтезу | 15.3 | 9.1 |
| Вихід* ІL7-ВАРmut після виділення та очищення тілець включення, % | 80 | не визначали |
| Чистота ІL7-ВАРmut після очищення та ренатурації, % | 90 | не визначали |
| Вихід** ІL7-ВАРmut після очищення та ренатурації (мг/л <i>E. coli</i>) | 70 | не визначали |

Примітка. *Вихід rhІL7-ВАРmut розраховували як відсоток отриманого білка від його загальної кількості після індукції синтезу.



Рис. 3. Дот-блот аналіз зв'язування rhІL7-ВАРmut з антитілами, специфічними до ІL7: 1 – поліклональні антитіла кроля, специфічні до ІL7; 2 – моноклональні антитіла миші, специфічні до ІL7; 3 – негативний контроль.

Висновки

Сконструйовано ген біфункціонального злитого білка rhIL7-ВАРmut, плазмідний вектор на його основі та штам-продуцент *E. coli*. Визначено умови індукції синтезу rhIL7-ВАРmut в *E. coli*, які забезпечили вихід цільового білка приблизно 0,4 мг/мл вихідної культури *E. coli*. rhIL7-ВАРmut виділено шляхом хроматографічного очищення на Ni-NTA сефарозі. Чистота препарату складала майже 90%. Відпрацьовано метод ренатурації цільового білка із бактерійних тілець включення шляхом плавного

розведення. З'ясовано, що rhIL7-ВАРmut після ренатурації має антиген-зв'язувальну активність (IL7-компонент) та ферментативну активність (ВАРmut-компонент) і може бути застосований у подальших дослідженнях для скринінгу імунних комбінаторних бібліотек кДНК варіабельних генів імуноглобулінів. Перспективним також є використання злитого білка rhIL7-ВАРmut для якісного та кількісного аналізу рецепторів до IL-7, що дозволить проводити моніторинг функціонального стану клітин імунної системи організму.

References

1. Takada K., Jameson S.C. Naive T cell homeostasis: from awareness of space to a sense of place. *Nat. Rev. Immun.* 2009. Vol. 9. P. 823–832. doi: 10.1038/nri2657.
2. Corfe S.A., Paige C.J. The many roles of IL-7 in B cell development; Mediator of survival, proliferation and differentiation. *Seminars in Immunology*. 2012. Vol. 24. P. 198–208. doi: 10.1016/j.smim.2012.02.001.
3. Slyvka A.V., Okunev O.V. Molecular mechanisms of versatile biological activity of interleukin-7. *Biopolym. Cell*. 2014. Vol. 30. P. 349–357. doi: 10.7124/bc.0008B1.
4. Palmer M.J., Mahajan V.S., Trajman L.C., Irvine D.J., Lauffenburger D.A., Chen J. Interleukin-7 Receptor Signaling Network: An Integrated Systems Perspective. *Cellular & Molecular Immunology*. 2008. Vol. 5. P. 79–89. doi: 10.1038/cmi.2008.10.
5. Lundström W., Fewke N.M., Mackall C.L. IL-7 in human health and disease. *Seminars in immunology*. 2012. Vol. 24. P. 218–224. doi: 10.1016/j.smim.2012.02.005.
6. Hartling H.J., Ryder L.P., Ullum H., Ødum N., Nielsen S.D. Gene variation in IL-7 receptor (IL-7R) α affects IL-7R response in CD4+ T cells in HIV-infected individuals. *Sci. reports*. 2017. Vol. 7. P. 42036 (1–8). doi: 10.1038/srep42036.
7. Haas J., Korporal M., Schwarz A., Balint B., Wildemann B. The interleukin-7 receptor α chain contributes to altered homeostasis of regulatory T cells in multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol.* 2011. Vol. 41. P. 845–853. doi: 10.1002/eji.201041139.
8. Taheri M., Sayad A. Investigating the exon 6 sequence changes of interleukin 7 receptor A (IL7RA) gene in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Hum. Antibodies*. 2018. Vol. 26. P. 43–48. doi: 10.3233/HAB-170320.
9. Lundström W., Hermanrud C., Sjöstrand M., Brauner S., WahrenHerlenius M., Olsson T., Karrenbauer V., Hillert J., Fogdell-Hahn A. Interferon beta treatment of multiple sclerosis increases serum interleukin-7. *Multiple Sclerosis Journal*. 2014. Vol. 20. P. 1727–1736. doi: 10.1177/1352458514532700.
10. Gorbatiuk O.B., Okunev O.V., Nikolaev Yu.S., Svyatenko O.V., Kordium V.A. Construction, expression, functional characterization and practical application of fusion protein SPA-ВАРmut. *Biopolym. Cell*. 2013. Vol. 29. P. 49–54. doi: 10.7124/bc.000805.
11. Muller B.H., Lamoure C., Le Du M.H., Cattolico L., Lajeunesse E., Lemaitre F., Pearson A., Ducancel F., Menez A., Boulain J.C. Improving *Escherichia coli* alkaline phosphatase efficacy by additional mutations inside and outside the catalytic pocket. *Chembiochem*. 2001. Vol. 2. P. 517–523. doi: 10.1002/1439-7633(20010803)2:7/8<517::aid-cbic517>3.0.co;2-h.
12. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory Manual. Second edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659 p.
13. Studier F.W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* 2005. Vol. 41. P. 207–234. doi: 10.1016/j.pep.2005.01.016.
14. Gorbatiuk O.B., Nikolayev U.S., Irodov D.M., Dubey I.Ya., Gilchuk P.V. Refolding of ScFv-CBD fusion protein from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Biopolym. Cell*. 2008. Vol. 24, № 1. P. 51–59. [in Ukrainian] / Горбатюк О.Б., Ніколаєв Ю.С., Іродов Д.М., Дубей І.Я., Гільчук П.В. Ренатурація химерного білка ScFv-CBD з тілець включення *Escherichia coli*. *Біополім. і клім.* 2008. Т. 24, № 1. С. 51–59. doi: 10.7124/bc.000790.

USENKO M. O.¹, OKUNEV O. V.², BENTSIONOVA K. I.³, GORBATIUK O. B.¹, IRODOV D. M.¹, KORDIUM V. A.¹

¹ *Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Zabolotnogo str., 150, e-mail: usenko.m.alex@gmail.com*

² *State Institute of Genetic and Regenerative Medicine NAMS of Ukraine, Ukraine, 04114, Kyiv, Vyshgorodska str., 67, e-mail: amn_igrm@ukr.net*

³ *State Institution "Soils Protection Institute of Ukraine", Ukraine, 03190, Kyiv, Babushkina str., 3*

OBTAINING OF THE RECOMBINANT rhIL7-BAPmut FUSION PROTEIN AND ITS FUNCTIONAL CHARACTERIZATION

Aim. The purpose was to obtain a functionally active form of the recombinant fusion protein based on the human interleukin-7 (rhIL7) and bacterial alkaline phosphatase (BAPmut). **Methods.** The DNA sequences encoding rhIL-7 and BAPmut were subcloned into the pET24a(+) plasmid vector containing the 6His-tag sequence for further chromatographic purification of the target protein. The cells of *E. coli* strain BL21(DE3) were transformed with pET24-rhIL7-BAPmut plasmid vector. Protein synthesis was induced by IPTG and by autoinduction. Bifunctional activity of rhIL7-BAPmut after refolding via dilution is confirmed immunochemically by binding to specific antibodies. **Results.** RhIL7-BAPmut protein has been designed. It was shown that autoinduction protocol provides a significantly higher level of protein synthesis in *E. coli* compared with IPTG induction. *In vitro* method of purification and renaturation of rhIL7-BAPmut from inclusion bodies has been worked out. It has been shown that rhIL7-BAPmut has a specific biological activity after renaturation. **Conclusions.** The obtained rhIL7-BAPmut protein can be used for screening of immune combinatorial cDNA libraries of immunoglobulins variable genes, that are the sources of specific single chain antibodies. The protein also can be used for qualitative and quantitative analysis of IL-7 receptors.

Keywords: IL-7, BAPmut, inclusion bodies, renaturation.