

УСЕНКО М. О.<sup>1✉</sup>, ГОРБАТЮК О.Б.<sup>1</sup>, ОКУНСВ О. В.<sup>2</sup>, ПРОДОВ Д. М.<sup>1</sup>, КОВАЛЬЧУК М. В.<sup>1</sup>, КОРДЮМ В. А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

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

<sup>2</sup> Державна установа «Інститут генетичної та регенеративної медицини АМН України»,

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

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

## ОТРИМАННЯ РЕКОМБІНАНТНОГО ЗЛИТОГО БІЛКА rhIL7-CBD

**Мета.** Метою роботи було отримання рекомбінантного злитого білка на основі інтерлейкіну-7 людини (rhIL7) і целюлозо-зв'язуючого домену (CBD). **Методи.** У плазмідний вектор pET24a(+) субклоновано ДНК послідовності, які кодують rhIL-7 і CBD. Вектор містив послідовність 6His-tag, що дозволяє проводити хроматографічне очищення цільового білка. Плазмідним вектором pET24-rhIL7-CBD трансформували клітини *E. coli* штаму BL21(DE3). Синтез білка в отриманих клонах-продуцентах індукували внесенням ППТГ і за протоколом аутоіндукції. **Результати.** Сконструйовано експресійну касету pET24-rhIL7-CBD. Отримано клони-продуценти, що дозволяють проводити синтез злитого білка rhIL7-CBD. Встановлено, що, на відміну від індукції ППТГ, застосування протоколу аутоіндукції забезпечує синтез білка в *E. coli*. Білок накопичувався у цитоплазматичній фракції білків у формі тілець включення. Відпрацьовано метод хроматографічного очищення rhIL7-CBD із бактерійних тілець включення *in vitro*. **Висновки.** Отриманий білок rhIL7-CBD надалі може бути іммобілізований на полісахаридній матриці та застосований для виділення та очищення специфічних до rhIL-7 поліклональних антитіл, а також для якісного і кількісного аналізу рецепторів до IL-7.

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

Інтерлейкін 7 людини (hIL-7) є терапевтично важливим цитокином. Він залучений у процеси розвитку та дозрівання лімфоцитів, запезпечує їх гомеостаз. [1]. Дослідження IL-7 і його рецептора (IL-7R) показали, що їх рівень варіює у низці захворювань, зокрема таких, як вірусні інфекції (ВІЛ, цитомегаловірусна інфекція, вірусний гепатит С), розсіяний склероз, ревматоїдний артрит, діабет 1 типу, синдром важкого

комбінованого імунодефіциту, гострий лімфобластний лейкоз та інших [2, 3, 4]. Наявність трьох дисульфідних зв'язків у структурі цитокина, а також трьох сайтів глікозилювання ускладнює отримання терапевтичного білка в системі синтезу *E. coli* [5, 6], проте така система дозволяє отримати кон'югати із цитокином для діагностичного застосування у великих кількостях [7].

Сьогодні наукові дослідження важко уявити без застосування імунологічних підходів, головним інструментом для проведення яких є специфічні антитіла. Для очищення моноклональних антитіл найбільш вживаним є застосування афінних сорбентів на основі білка *A. Staphylococcus aureus* та/або білка *G. Streptococcus*. Однак, у випадку поліклональних сироваток, які містять близько 10 % цільових антитіл, зазначеними методами не можливо виділити високоспецифічні антитіла. Це в подальшому критично впливає на проведення імунологічних аналізів. Застосування інших хроматографічних підходів, що ґрунтуються на фізико-хімічних властивостях антитіл, також не забезпечує необхідного ступеня чистоти, що зумовлює необхідність розробки ефективних методів виділення специфічних антитіл на іммобілізованому антигені. Тому метою нашої роботи було отримання функціонально активного рекомбінантного інтерлейкіну 7 людини (rhIL-7), кон'югованого з целюлозо-зв'язуючим доменом (CBD – cellulose binding domain). Для створення афінного імунного сорбенту важливим є спосіб закріплення білка на його поверхні. Авторами [8, 9] було з'ясовано, що CBD із целюлозолітичного комплексу *Clostridium thermocellum* здатний до селективного зв'язування з целюлозою в умовах, коли інші білки денатуровані і функціонально неактивні (наприклад, у 6 М розчинах сечовини). Домен дозволяє іммобілізу-

---

© УСЕНКО М. О., ГОРБАТЮК О.Б., ОКУНСВ О. В., ПРОДОВ Д. М., КОВАЛЬЧУК М. В., КОРДЮМ В. А.

вати білок на поверхні цільового целюлозного матриксу, при цьому активні сайти білка-партнера (rhIL7) залишаються у вільному доступі, і їх позиція є оптимальною для взаємодії із імуноглобулінами. Так можна уникнути ускладнень, що виникають за використання хімічно активованих сорбентів. Злитий білок rhIL7-CBD є перспективним компонентом для створення імуносорбенту для виділення та очищення характерних для rhIL-7 поліклональних антитіл, а також може бути використаний для детекції IL-7R.

### Матеріали і методи

**Конструювання і синтез rhIL7-CBD.** Для отримання ДНК-послідовності, що кодує rhIL7 з  $10^7$  клітин кісткового мозку людини, за допомогою реакції зворотної транскрипції отримували тотальну кДНК, з якої в результаті реакції ПЛР із застосуванням специфічних праймерів – 5'CCCCGACACCATGTTCCATG3' та 5'GCTTGAATCGACGTAGGAG3' – ампліфікували ДНК-послідовність hIL-7 розміром 591 п. н., яку клонували у раніше отриманий співробітниками відділу плазмідний вектор pET24-CBD [10] за сайтами рестрикції *Nde I* та *Not I*. Генно-інженерні маніпуляції з ДНК виконували згідно зі стандартними методами та рекомендаціями виробників відповідних ферментів [11]. Для забезпечення синтезу цільового білка одержаною плазмідною pET24-IL7-CBD трансформували клітини *E. coli* BL21(DE3). Синтез білка індукували внесенням IPTG і за протоколом аутоіндукції [12]. Виділення та очищення бактерійних тілець включення проводили згідно з оптимізованою нами раніше методикою [13]. Для визначення локалізації і кількісного вмісту цільового білка в сумарному лізаті клітин-продуцентів проводили електрофоретичне розділення розчинної і нерозчинної фракції білків цитоплазми клітини.

**Оптимізація очищення rhIL7-CBD.** 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). Денатуруючим буфером, який містив 7 М гуанідин гідрохлорид, у 100 мМ трис-HCl (pH 8,0), 200 мМ NaCl, 10 мМ імідазолу за швидкості потоку буфера 0,5 мл/хв урівноважували систему. Фракцію бактерійних тілець включення солубілізували протя-

гом 1,5 годин 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 солубілізованих тілець включення (2 мг/мл) наносили на колонку зі швидкістю 0,2 мл/хв. Сорбент відмивали від неспецифічно зв'язаних білків денатуруючим буфером із 20 мМ імідазолом. rhIL7-CBD елюювали денатуруючим буфером, який містив 500 мМ імідазолу. Гомогенність очищеного білка аналізували у 12 %-му ДСН-ПААГ, концентрацію rhIL7-CBD визначали за відомою величиною адсорбції  $A_{280}$ , яку розраховували для цієї послідовності із застосуванням програми Vector NTI.

### Результати та обговорення

Для отримання цільового злитого білка штам-реципієнт *E. coli* BL21(DE3) трансформували плазмідним вектором pET-rhIL7-CBD. У цьому векторі синтез білка відбувався за контролю промотору одного з ранніх генів бактеріофагу T7 (рис. 1). Індукування синтезу злитого білка проводили за протоколом аутоіндукції, а також додаванням IPTG за температури +30°C та +37°C. Електрофоретичний аналіз лізатів бактеріальних клітин показав наявність у них продукту очікуваної молекулярної маси (38,2 кДа) за використання протоколу аутоіндукції. Водночас у результаті додавання IPTG синтез цільового білка не спостерігався. Максимальний рівень накопичення цільового білка (30 % від вмісту сумарних білків клітин *E. coli*) спостерігався у випадку аутоіндукції за +37°C. Вихід цільового білка досягав 0,2 мг/мл вихідної культури *E. coli*. В результаті електрофоретичного розділення розчинної і нерозчинної фракції білків *E. coli* встановлено, що цільовий білок накопичувався у вигляді бактерійних тілець включення (рис. 2).

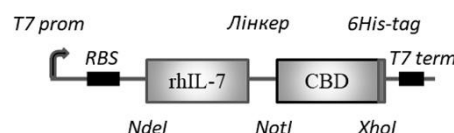


Рис. 1. Схематичне розміщення елементів експресійної касети у векторі pET24 для синтезу рекомбінантного злитого білка rhIL7-CBD.

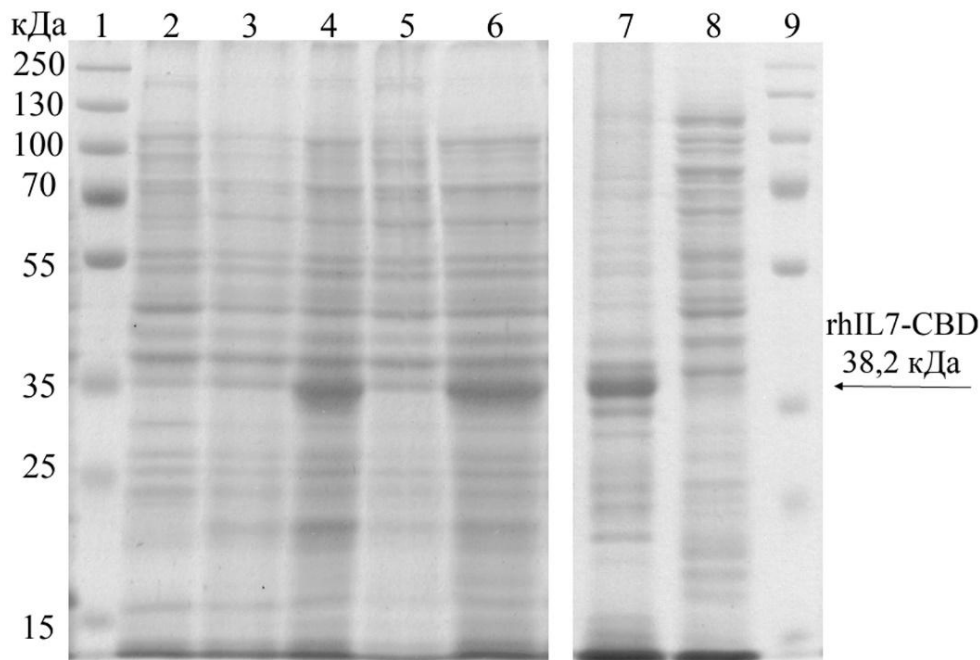


Рис. 2. Електрофореграма білків *E. coli*, отриманих у результаті індукування синтезу rhIL7-CBD: 1, 9 – білки-маркери молекулярної маси («Thermo Scientific», США); 2 – клітини без індукції; 3, 5 – індукція ППТГ за 30°C і 37°C відповідно; 4, 6 – аутоіндукція за 30°C і 37°C відповідно; 7 – фракція нерозчинних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

Щоб отримати очищену фракцію rhIL7-CBD, 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 % від вмісту сумарних білків клітин *E. coli* (рис. 2). Оскільки цільовий білок накопичувався у формі нерозчинних агрегатів (тілець включення), то необхідною умовою для його отримання у розчинній функціонально активній формі стає етап його подальшої ренатурації *in vitro*. Суттєвий вплив на ефективність процесу ренатурації мають нецільові білкові домішки, що спричиняють агрегацію білка. Тому подальша робота була сконцентрована на оптимізації очищення кон'югату. Солюбілізацію rhIL7-CBD із тілець включення проводили в буферному розчині, що містив 7 М ГГХ та 10 мМ 2-меркаптоетанолу, центрифугували та відбирали супернатант для подальшої очистки та ренатурації. RhIL7-CBD містить С-кінцевий залишок олігогістидину, тому його очищення проводили методом мета-

лоафінної хроматографії. Під час відпрацювання умов очистки було з'ясовано, що після нанесення білка промивання колонки денатуруючим буфером із 20 мМ імідазолом дозволяє суттєво підвищити чистоту елюйованого білка. Чистота препарату складала майже 90 % (рис. 3).

### Висновки

Отже, в результаті виконання роботи було сконструйовано злитий білок на основі інтерлейкіну 7 людини та целюлозозв'язуючого домену *Clostridium thermocellum* (rhIL7-CBD) і забезпечено його синтез у цитоплазматичну фракцію клітин *E. coli* у формі тілець включення. Встановлено, що для функціональної активності білок потребує відновлення нативної конформації за рахунок додаткового етапу ренатурації. Злитий білок rhIL7-CBD може бути використаний для створення імуноафінного сорбенту, а також у подальших дослідженнях для якісного та кількісного аналізу рецепторів до ІЛ-7. Це дозволить проводити моніторинг функціонального стану клітин імунної системи організму.

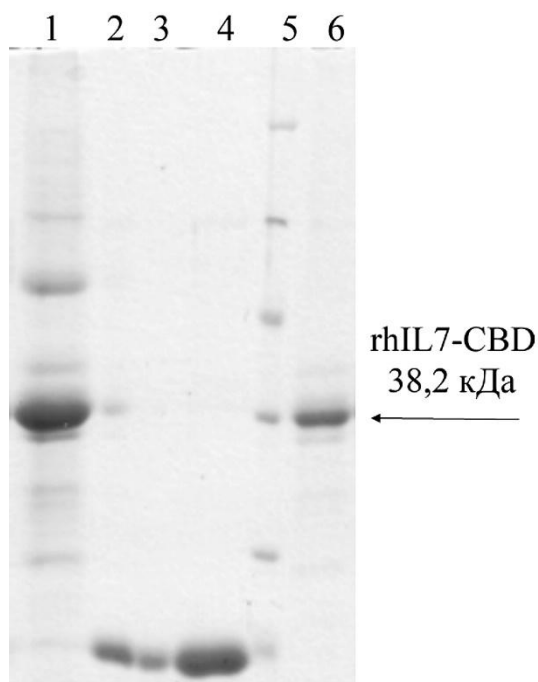


Рис. 3. Електрофореграма фракції білків, отриманих у результаті очищення rhIL7-CBD із бактерійних тілець включення: 1 – rhIL7-CBD до оптимізації умов очищення; 2–4 – білки-маркери концентрації; 5 – білки маркери молекулярної маси; 6 – rhIL7-CBD після оптимізації умов очищення.

## References

- 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.
- Gao J., Zhao L., Wan Y.Y., Zhu B. Mechanism of action of IL-7 and its potential applications and limitations in cancer immunotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2015. Vol. 16. P. 10267–10280. doi: 10.3390/ijms160510267.
- Lin J., Zhu Z., Xiao H., Wakefield M.R., Ding V.A., Bai Q., Fang Y. The role of IL-7 in Immunity and Cancer. *Anticancer Research*. 2017. Vol. 37. P. 963–967. doi: 10.21873/anticancerres.11405.
- Savino A.M., Izraeli S. Interleukin-7 signaling as a therapeutic target in acute lymphoblastic leukemia. *Exp. Rev. of Hemat.* 2017. Vol. 10. P. 183–185. doi: 10.1080/17474086.2017.1292121.
- Mackall C.L., Fry T.J., Gress R.E. Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. *Nat. Rev. Immunol.* 2011. Vol. 11. P. 330–342. doi: 10.1038/nri2970.
- 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.
- Usenko M.O., Okunev O.V., Bentsionova K.I., Gorbatiuk O.B., Irodov D.M., Kordium V.A. Obtaining of the recombinant rhIL7-BAPmut fusion protein and its functional characterization. *Factors in Experimental Evolution of Organisms*. 2019. Vol. 25. P. 321–326. [in Ukrainian] / Усенко М.О., Окунев О.В., Бенціонова К.І., Горбатиук О.Б., Іродов Д.М., Кордюм В.А. Отримання рекомбінантного злитого білка rhIL7-BAPmut та його функціональна характеристика. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2019. Т. 25. С. 321–326. doi: 10.7124/FEEO.v25.1185.
- Morag E., Lapidot A., Govorko D., Lamed R., Wilchek M., Bayer E.A., Shoham Y. Expression, purification, and characterization of the cellulose-binding domain of the scaffoldin subunit from the cellulosome of *Clostridium thermocellum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. Vol. 61, № 5. P. 1980–1986.
- Gilchuk P.V., Volkov G.L. Immobilization of mouse singlechain antibodies for affinity chromatography using the cellulose-binding protein. *Ukr. Biokhim. Zhur.* 2006. Vol. 78, No. 4. P. 160–163.
- Gilchuk P.V., Okunev O.V., Pavlova M.V., Irodov D.M., Gorbatiuk O.B. Obtaining of ScFv-CBD fusion protein and its application for affinity purification of recombinant human interferon a2b. *Ukr. Biochem. J.* 2006. Vol. 78, № 2. P. 52–61. [in Ukrainian] / Гільчук П.В., Окунев О.В., Павлова М.В., Іродов Д.М., Горбатиук О.Б. Одержання злитого білка ScFv-CBD і його застосування для афінного очищення рекомбінантного інтерферону a2b людини. *Укр. Біохім. Журн.* 2006. Т. 78, № 2. С. 52–61.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory Manual*. Second edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659 p.
- 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.
- 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] / Горбатиук О.Б., Николаєв Ю.С.,

Іродов Д.М., Дубей І.Я., Гільчук П.В. Ренатурація химерного білка ScFv-CBD з тілець включення *Escherichia coli*. *Біологія і клімат*. 2008. Т. 24, № 1. С. 51–59. doi: 10.7124/bs.000790.

**USENKO M.O.<sup>1</sup>, GORBATIUK O.B.<sup>1</sup>, OKUNEV O.V.<sup>2</sup>, IRODOV D.M.<sup>1</sup>, KOVAL'CHUK M.V.<sup>1,2</sup>, KORDIUM V.A.<sup>1</sup>**

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

<sup>2</sup> *State Institute of Genetic and Regenerative Medicine NAMS of Ukraine, Ukraine, 04114, Kyiv, Vyshgorodska str., 67, e-mail: amn\_igrm@ukr.net*

#### **OBTAINING OF THE RECOMBINANT rhIL7-CBD FUSION PROTEIN**

**Aim.** The purpose was to obtain the recombinant fusion protein based on the human interleukin-7 (rhIL7) and cellulose binding domain (CBD). **Methods.** The DNA sequences encoding rhIL-7 and CBD were subcloned into the pET24a(+). 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-CBD* plasmid vector. Protein synthesis was induced in clones by IPTG and by autoinduction. **Results.** An expression cassette of rhIL7-CBD protein has been designed. Producers of rhIL7-CBD protein were obtained. It was shown that the autoinduction protocol provides protein synthesis in *E. coli* (but IPTG induction doesn't). Protein was obtained in the cytoplasmic fraction in form of inclusion bodies. *In vitro* method of purification of rhIL7-CBD from inclusion bodies has been worked out. **Conclusions.** The obtained rhIL7-CBD protein can be used for the microcrystalline cellulose immunosorbent construction for the purification of the specific polyclonal IL-7 antibodies and also for qualitative and quantitative analysis of IL-7 receptors. **Keywords:** IL-7, CBD, inclusion bodies, renaturation.