

УДК 577.21

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-0-2-25-31

КЛОНИРОВАНИЕ, ЭКСПРЕССИЯ И ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗ *ESCHERICHIA COLI* РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА КЕРАТИНА 17, ТРАНСЛЯЦИОННО СЛИТОГО С ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗОЙ

© А.М. Хузиахметова, М.М. Юнусбаева, Э.К. Хуснутдинова

Согласно аутоиммунной гипотезе, развитие ошибочного иммунного ответа при псориазе вызвано феноменом «молекулярной мимикрии». Данный феномен заключается в структурном сходстве собственного белка организма с антигенами различных микроорганизмов. В случае псориаза рассматривается гомология аминокислотной последовательности белка кератина 17 с М белком стрептококка (*Streptococcus pyogenes*). Кератин 17 (К17) – представитель большого семейства белков промежуточных филаментов цитоскелета, высоко экспрессирующийся в пораженных псориазом участках кожи и полностью отсутствующий в здоровом эпидермисе. Экспрессия К17 резко возрастает при патологиях, характеризующихся воспалением в коже, включая механическое повреждение ткани (травмы) и псориаз. Было высказано предположение о вероятной роли К17 в качестве важного молекулярного игрока, вовлеченного в сложный многоуровневый процесс взаимодействия между клетками кожи и Т-лимфоцитами, а следовательно, о возможном вкладе этого белка в развитие патологий, характеризующихся спонтанной пролиферацией клеток, характерной для псориаза. Целью работы было клонирование, экспрессия и выделение в бактериальной системе (*Escherichia coli*) рекомбинантного белка К17 для последующего изучения его функциональной активности и обнаружения аутореактивных к кератину 17 иммунных клеток у больных псориазом. Амплифицированный фрагмент кДНК гена *KRT17* человека клонировали в вектор рGEX4T1 для экспрессии рекомбинантного белка кератина 17, трансляционно слитого с глутатион-S-трансферазой (GST). Биосинтез GST/К17 осуществляли в трансформированных клетках *E. coli* BL21. Рекомбинантный белок был очищен методами аффинной хроматографии на глутатион-сефарозе. Количество и чистота выделенного белка оказались достаточными для изучения его функциональной активности с последующим проведением исследований по обнаружению у больных псориазом аутореактивных к кератину 17 Т-лимфоцитов крови.

Ключевые слова: псориаз, кератин 17, клонирование гена, экспрессия, GST-слитый белок.

Кератин 17 (К17), белок массой 44 кДа – представитель большого семейства белков промежуточных филаментов, образующих цитоскелет клетки. В отличие от большинства белков огромного семейства кератинов, присутствующих во всех слоях кожного покрова и экспрессирующихся постоянно, в здоровом эпидермисе кератин 17 вырабатывается исключительно в волосяных фолликулах, ногтевых пластинках, сальных и потовых железах [1]. Экспрессия К17 резко увеличивается при различных патологических состояниях, характеризующихся воспалительным процессом, включая механическое повреждение кожи (ранения), различные карциномы, вирус-индуцированные

опухоли и псориаз [2–5]. Псориаз представляет собой аутоиммунное системное заболевание организма, характеризующееся гиперпролиферацией эпидермальных кератиноцитов, хроническим воспалением и инфильтрацией Т-лимфоцитов в коже. Характерной особенностью псориазических участков кожи является неполная терминальная дифференцировка кератиноцитов, которая является результатом нарушений в регуляции процесса пролиферации клеток, вызванная, в частности, изменениями в экспрессии белков кератинов. В норме супрабазальные кератиноциты здорового эпидермиса экспрессируют кератины дифференцировки – кератин 1 и 10 (К1, К10), основная функция

ХУЗИАХМЕТОВА Алина Маратовна, Башкирский государственный университет,

e-mail: aimurmuralina@yandex.ru

ЮНУСБАЕВА Миляуша Мусиевна – к.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,

e-mail: milyausha_ufa@mail.ru

ХУСНУТДИНОВА Эльза Камилевна – д.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,

e-mail: elzakh@mail.ru

которых заключается в придании механической прочности, ороговении и целостности эпидермиса [6]. При псориазе наблюдается редукция К1 и К10 и индукция кератинов, ассоциированных с гиперпролиферацией и миграцией клеток, в особенности кератина 17. Присутствие данного кератина в псориазных очагах способствует активации кератиноцитов, развитию и поддержанию воспалительного процесса с привлечением иммунных клеток [6]. Одним из возможных объяснений поддержания хронического воспаления в псориазном эпидермисе является аутоиммунная гипотеза развития псориаза. Согласно этой гипотезе, в основе развития аутоиммунной реакции при псориазе лежит феномен «молекулярной мимикрии» [7, 8]. Данный феномен заключается в идентичности антигенных детерминант некоторых микроорганизмов антигенным детерминантам хозяина. В случае псориаза рассматривается гомология аминокислотной последовательности белка кератина 17 с М белком *Streptococcus pyogenes* [8]. Эти данные позволили предположить, что псориаз характеризуется развитием ошибочного иммунного ответа, при котором Т-лимфоциты (ранее встречавшиеся с М белками (М-белок примированные) или аутореактивные) ошибочно распознают эпитопы кератинов как чужеродные, тем самым приводя к развитию клинических признаков заболевания. Для подтверждения данной гипотезы и обнаружения аутореактивных к кератину 17 Т-лимфоцитов у больных псориазом первоначально необходимо осуществить синтез предполагаемого аутоантигена – рекомбинантного белка кератина 17.

Целью работы является получение в бактериальной системе (*Escherichia coli*) рекомбинантного белка кератина 17 для последующего исследования его функциональной активности и использования в экспериментах по поиску циркулирующих в крови аутореактивных к кератину 17 Т-клеток у больных псориазом.

Материалы и методы. *Бактериальные штаммы и плазмиды.* Бактерии штамма *E. coli* XL1 Blue (F' proAB lacIq lacZΔM15 Tn10(Tcr)/recA1 endA1 gyrA96(Nalr) thi-1 hsdR17supE44 relA1 lac) из коллекции лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологии Института биохимии и генетики УФИЦ РАН использовали для клонирования рекомбинантных плазмид. В клетках *E. coli* BL21 (F', ompT, hsdS (r_B⁻, m_B⁻), gal) («GE Healthcare»), со-

державших ген РНК-полимеразы бактериофага Т7 под контролем P_{lac}-промотора, осуществляли индуцибельную экспрессию целевого гена в системе транскрипции бактериофага Т7. Плазмиду рGEM-T («Promega») использовали в качестве вектора для клонирования последовательности гена кератина 17. Плазмиду рGEX4Т1 применяли в качестве экспрессионного вектора («Amersham Biosciences»).

Генно-инженерные методы. Тотальную РНК выделяли с использованием реагента TRIzol (Invitrogen, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрацию РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 1000, нативность РНК оценивали посредством электрофореза в 1% агарозном геле. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в смеси стандартного состава с использованием AmpliTaq Gold ДНК полимеразы («Life Technologies») и специфических праймеров: 5'-ATGGATCCCTCTCCAGCCCTTCTCCT-3' и 5'-ATGAATTCTCAGGCAAGGAAGCATG-3', содержащих рестрикционные сайты *Vam*NI и *Eco*RI соответственно (подчеркнуты). Амплификацию производили в следующем режиме: денатурация при 95°C 7 мин, затем 30 циклов по 45 с при 94°C, 45 с при 60°C и 1 мин при 72°C, общая элонгация продолжалась 7 мин при 72°C. Конструирование, выделение, рестрикционный анализ рекомбинантных плазмид, проведение Ca²⁺-зависимой трансформации и электрофорез осуществляли в соответствии с общепринятыми экспериментальными протоколами [9]. Скрининг рекомбинантных клонов проводили методом ПЦР с использованием универсальных праймеров для секвенирования рGEX F GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG и рGEX R CCGGGAGCTGCATGTGTTCAGAGG. Секвенирование осуществляли по методу Сэнгера. Электрофоретический анализ бактериальных белков проводили в 12% ПААГ в денатурирующих условиях с 0.1% додецилсульфата натрия (SDS) по методу Laemmli [10]. Гель окрашивали в растворе Кумасси синего R-250. Количественное определение концентрации белка оценивали с помощью колориметрического метода (по Брэдфорду).

Иммуноблотинг. Фракции, полученные после элюции, разделяли посредством электрофореза в 12% полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия (SDS-PAGE). На каждую дорожку наносили не более 10 мкг суммарного белка. Перенос белков на поливи-

нилидендифторидную (PVDF) мембрану осуществляли в камере для полусухого переноса («Bio-Rad»). Перед переносом гель и мембрану инкубировали 10 мин в буфере, содержащем 25 мМ Трис, 192 мМ глицин, 20% этанола. Перенос белков из геля на мембрану проводили при постоянном напряжении 25 В в течение 1 ч. Мембрану инкубировали в 10% растворе обезжиренного молока в буфере TBS-T, содержащем 20 мМ трис HCl (pH 7.5), 150 мМ NaCl, 0.05% твин 20, в течение 1 ч при комнатной температуре. После отмывки мембрану инкубировали с моноклональными антителами к белку кератина 17 человека (MCA1872, Bio-Rad) в разведении 1:1500 в течение 1 ч, промывали 0.3% TBS-T три раза и далее инкубировали в течение 40 мин со вторичными антителами к иммуноглобулинам мыши, мечеными пероксидазой хрена (STAR13B, Bio-Rad), в разведении 1:20000 в 0.05% буфере TBS-T. После двукратной отмывки в буфере TBS-T мембрану проявляли с помощью набора Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Kit («GE Healthcare») согласно протоколу производителя.

Результаты и обсуждение. Клонирование кДНК гена *KRT17*. Для клонирования кДНК гена *KRT17* человека был выбран вектор рGEX4T1, позволяющий экспрессировать целевой ген под контролем индуцибельного тас-промотора после добавления изопропил-β-D-тиогалактозида (ИПТГ) («Sigma»). Учитывая узкоспецифичную экспрессию K17 в организме человека, нами был разработан метод выделения тотальной РНК из волосяных фолликул, полученных с пораженной псориазом волосистой части головы больных. Методика выделения заключалась в инкубации 3–5 луковиц волос в растворе, содержащем STE буфер (pH=8), 10% SDS, протеиназу К (конеч. конц. 2мг/мл) и ингибитор РНКаз (RiboLock RNase inhibitor, 20 ед/мл), в течение 1 ч при 37°C, после чего осуществлялось выделение пула РНК. Выделенную РНК использовали в качестве матрицы для синтеза кДНК гена *KRT17* методом обратной транскрипции с помощью ревертазы M-MuLV («Fermentas») и oligo(dT)₁₈ праймеров согласно инструкции к набору First Strand cDNA Synthesis Kit («Fermentas»). Последовательность, кодирующую белок кератина 17, амплифицировали, используя AmpliTaq Gold ДНК полимеразу («Life Technologies»). Длина ПЦР продукта составила 1485 п.н. После электрофо-

ретического разделения продуктов ПЦР искомый фрагмент ДНК кератина 17 был элюирован из геля с последующим клонированием в экспрессионный вектор рGEX4T1 по сайтам эндонуклеаз рестрикции *Bam*HI и *Eco*RI. Вектор рGEX4T1 в своем составе содержит последовательность гена глутатион-S-трансферазы (GST), наиболее популярного аффинного домена, широко используемого для иммобилизации и очистки гибридных белков. GST расположен перед сайтом узнавания рестриктазы *Bam*HI и позволяет экспрессировать слитый с глутатион-S-трансферазой целевой белок. Кроме того, вектор сконструирован с учетом возможности последующего отщепления вспомогательного полипептида GST посредством обработки протеазой тромбином, сайт которого введен между сливаемыми последовательностями GST и K17.

1 2 3 4 5

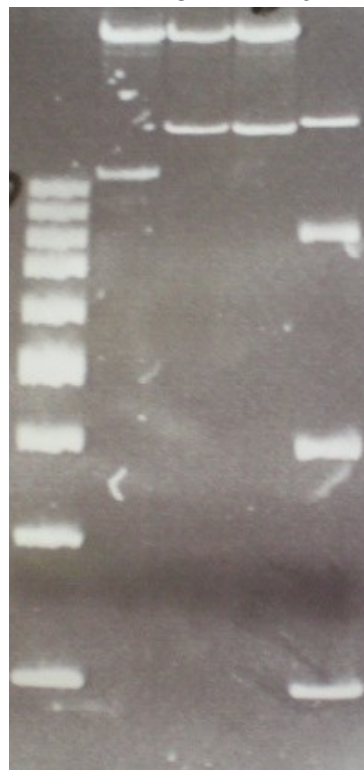


Рис. 1. Подтверждение вставки кДНК K17, клонированной в векторе рGEX4T1 по сайтам рестрикции *Bam*HI и *Eco*RI. Дорожка 1 – маркер GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas), дорожки 2–4 – клоны, предположительно содержащие вставку кДНК K17, расщепленные рестриктазами *Bam*HI и *Eco*RI. (дорожка 2 – клон, имеющий вставку меньшего размера, дорожки 3 и 4 – клоны, имеющие вставку K17 (1485 п.н.), соответствующую теоретически ожидаемой. Дорожка 5 – маркер FastRuler™ DNA Ladder (Fermentas)

Полученной лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* штамма XL1 Blue («Stratagene») по стандартной методике. Отбор трансформантов проводили на агаризованной среде LB, содержащей ампициллин в качестве селективного маркера. Наличие вставки в клонах, соответствующей по размеру кДНК *KRT17*, определяли гидролизом эндонуклеазами рестрикции *EcoRI* и *BamHI* (рис. 1). ДНК положительных клонов была подвергнута секвенированию, результаты которого показали, что последовательность клонированной кДНК полностью соответствует кодирующей последовательности гена *KRT17* человека, представленного в базе NCBI. Полученный нами вектор pGEX4T1-K17 способен экспрессировать рекомбинантный K17 в форме слитого белка с глутатион-S-трансферазным тагом, что позволяет очистить этот белок с помощью аффинной хроматографии на глутатион-сефарозе 4В.

Экспрессия и выделение рекомбинантного белка кератина 17.

Для экспрессии рекомбинантных белков был выбран бактериальный штамм BL21, характеризующийся низким уровнем экспрессии протеаз. Клетки *E. coli* штамма BL21 трансформировали плазмидой pGEX4T1/K17 и высевали на чашки Петри по стандартной методике. Одиночную колонию с чашки пересевали в 10 мл среды LB с ампициллином (100 мкг/мл), с последующей инкубацией в течение ночи с горизонтальным перемешиванием (250 об/мин) при 37°C. Ночную культуру разбавляли LB средой (1:100) и растили до достижения оптической плотности $A_{600} = 0.6-0.8$. Экспрессию GST/K17 индуцировали добавлением 0.1 мМ ИПТГ в течение 3 ч при 28°C и горизонтальном перемешивании (250 об/мин). В качестве контроля использовали лизат клеток штамма BL21, содержащего плазмиду pGEX4T1 без вставки. При соблюдении указанных выше условий в клеточных лизатах штамма BL21, содержащих плазмиду pGEX4T1/K17 после опосредованной ИПТГ-индукции, появляется дополнительная фракция белка GST/K17. На рис. 2 показано, что размер слитого белка GST/K17 имеет электрофоретическую подвижность около 73 кДа,

что хорошо согласуется с теоретически рассчитанной молекулярной массой. После центрифугирования лизата большая часть экспрессируемого белка содержалась в надосадочной жидкости, белок не образовывал телец включения в клетках бактерий и являлся растворимым (рис. 2).

Выделение рекомбинантного белка GST/K17 осуществляли на глутатион-сефарозе 4В («GE Healthcare»). Первоначально BL21 клетки осаждали центрифугированием (1000 g, 20 мин) и осадок ресуспендировали в 20 мл ледяного STE буфера (10 мМ трис HCl (pH 7.5), 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА Na), содержащего 1 мМ фенилметилсульфонилфторид (PMSF), 1 мМ дитиотреитол (DTT) и коктейль протеазных ингибиторов («Sigma»). Для уменьшения протеолитической деградации белков дальнейшие этапы выделения проводили при 4°C. Клетки разрушали ультразвуком, к полученной суспензии добавляли тритон X-100 до конечной концентрации 1% и центрифугировали в течение 20 мин при 14000 об/мин. Далее к супернатанту добавляли предварительно уравновешенную однократным PBS буфером 0.5–1 мл глутатион-сефарозу 4В («GE Healthcare»). Поскольку выход целевого белка после инкубации с глутатион-сефарозой 4В в течение 10 мин, согласно рекомендациям производителя, был низким (менее 1 мг/л), для оптимизации условий выделения в процедуру хроматографической очистки был внесен ряд модификаций. В частности, увеличено время связывания белка с носителем до 30 мин при интенсивном перемешивании при 4°C. Далее смесь загружали в колонку и промывали 1×PBS буфером для вытеснения примесей и несвязавшихся бактериальных белков. Элюция белка GST/K17 осуществлялась добавлением 3–5 мл буфера, содержащего 50 мМ трис HCl (pH 8.0), 10 мМ глутатиона. Кроме того, для уменьшения неспецифического связывания белка с носителем в элюирующий буфер добавляли тритон X-100 до конечной концентрации 1%. При перечисленных выше условиях общий выход белка составлял 5 мг на 1 л бактериальной культуры. Присутствие белка подтверждали с помощью вестерн-блоттинга с использованием моноклональных антител к кератину 17 (рис. 2, Б).

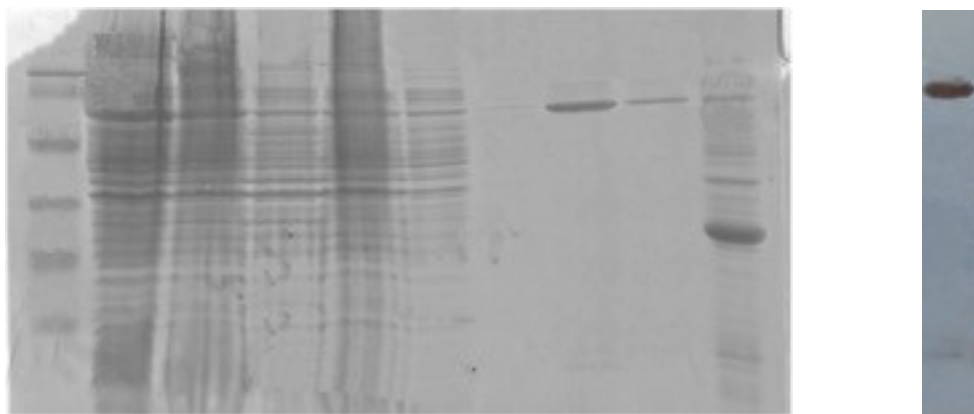


Рис. 2. Анализ экспрессии рGEX4T1/K17 в *E. coli* и его очистка с помощью аффинной хроматографии: А – электрофореграмма в 12% SDS-PAGE: 1 – маркер длин белка; 2–3 – лизат культуры через 3 ч после индукции ИПТГ в концентрациях 0.1 и 0.5 мМ соответственно; 4–5 – последовательные фракции, содержащие несвязавшиеся белки; 6–7 – последовательная промывка связавшегося белка на колонке; 8–9 – фракции, полученные в ходе последовательной хроматографической элюции белка GST/K17; 10 – глутатион-S-трансфераза, экспрессированная с плазмиды рGEX4T1 без вставки; Б – иммуноблотинг восьмой фракции белка GST/K17, полученный с использованием антител к кератину 17 (MCA1872, Bio-Rad). Положение GST/K17 указано звездочкой

Заключение. Таким образом, при использовании бактериальной системы клонирования и экспрессии на основе плазмидного вектора рGEX4T1 в клетках *E. coli* штамма BL21 нами был получен полноразмерный рекомбинантный белок кератина 17 человека. Были подобраны оптимальные условия культивирования продуцентов для биосинтеза растворимых фракций целевого продукта, предложен простой и эффективный метод очистки рекомбинантного белка. Преимущество данной бактериальной системы состоит в относительно высоком выходе белка и легкой очистке с помощью аффинной хроматографии на глутатион-сефарозе 4В. Следует отметить, что полученный нами полноразмерный белок кератина 17 человека получен впервые и может быть использован в экспериментах по поиску аутореактивных Т-лимфоцитов у больных псориазом. Ранее была показана пролиферативная активность и индукция высоких концентраций IFN γ Т-лимфоцитами больных псориазом после их инкубации с пептидами М белка стрептококка и небольшими короткими пептидами К17 [8]. Однако работ по культивированию клеток с полноразмерным белком К17 не проводилось. Возможно, что использование цельного рекомбинант-

ного белка К17 позволит выявить новые звенья патогенеза псориаза и идентифицировать молекулярные механизмы взаимодействия предполагаемого аутоантигена с клетками иммунной системы.

В заключение следует отметить необходимость дальнейшего исследования роли К17 в регуляции Т-клеточного ответа для лучшего понимания механизмов развития псориаза и онкопатологий, а также с целью поиска терапевтических мишеней и создания новых эффективных препаратов для лечения псориаза.

Данная работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (мол_а №14-04-31814).

Литература

1. Moll R., Divo M., Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol.* 2008. Vol. 129, № 6. P. 705–733. doi: 10.1007/s00418-008-0435-6
2. Chen R., Fu M., Zhang G., Zhou Y., Zhu S., Liu J., Wang D., Deng A., Wang Z. Rac1 regulates skin tumors by regulation of keratin 17 through recruitment and interaction with CD11b+Gr1+ cells. *Oncotarget.* 2014. Vol. 5, № 12. P. 4406–4417. doi: 10.18632/oncotarget.2030

3. DePianto D., Kerns M., Dlugosz A.A., Coulombe P.A. Keratin 17 promotes epithelial proliferation and tumor growth by polarizing the immune response in skin. *Nat Genet.* 2010. Vol. 42, № 10. P. 910–914. doi: 10.1038/ng.665

4. Hobbs R.P., DePianto D.J., Jacob J.T., Han M.C., Chung B.M., Batazzi A.S., Poll B.G., Guo Y., Han J., Ong S., Zheng W., Taube J.M., Čihakova D., Wan F., Coulombe P.A. Keratin-dependent regulation of Aire and gene expression in skin tumor keratinocytes. *Nat Genet.* 2015. Vol. 47, № 8. P. 933–938. doi:10.1038/ng.3355

5. Sankar S.S., Tanner J.M., Bell R.G., Chaturvedi A.A., Randall R.L., Beckerle M.C., Lessnick S.L. A novel role for keratin 17 in coordinating oncogenic transformation and cellular adhesion in Ewing sarcoma. *Mol. Cell Biol.* 2013. Vol. 33, № 22. P. 4448–4460. doi: 10.1128/MCB.00241-13

6. Fu M., Wang G. Keratin 17 as a therapeutic target for the treatment of psoriasis. *J Dermatol Sci.* 2012. Vol. 67, № 3. P. 161–165. doi: 10.1016/j.jdermsci.2012.06.008

7. Jin L., Wang G. Keratin 17: a critical player in the pathogenesis of psoriasis. *Med Res Rev.* 2014. Vol. 34, № 2. P. 438–454. doi: 10.1002/med.21291

8. Gudmundsdottir A.S., Sigmundsdottir H., Sigurgeirsson B., Good M.F., Valdimarsson H., Jonsdottir I. Is an epitope on keratin 17 a major target for autoreactive T lymphocytes in psoriasis? *Clin Exp Immunol.* 1999. Vol. 117. P. 580–586. PMC1905362

9. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. *Molecular cloning. A laboratory manual.* New York, 1982. 480 p. <https://trove.nla.gov.au/version/45221481>

10. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970. Vol. 227, № 5259. P. 680–685. doi: 10.1038/227680a0

References

1. Moll R., Divo M., Langbein L. The human keratins: Biology and pathology. *Histochem. Cell Biol.* 2008, vol. 129, no 6, pp. 705–733. doi: 10.1007/s00418-008-0435-6

2. Chen R., Fu M., Zhang G., Zhou Y., Zhu S., Liu J., Wang D., Deng A., Wang Z. Rac1 regulates skin tumors by regulation of keratin 17 through recruitment and interaction with CD11b+Gr1+ cells. *Oncotarget*, 2014, vol. 5, no. 12, pp. 4406-4417. doi: 10.18632/oncotarget.2030

3. DePianto D., Kerns M., Dlugosz A.A., Coulombe P.A. Keratin 17 promotes epithelial proliferation and tumor growth by polarizing the immune response in skin. *Nat. Genet.*, 2010, vol. 42, no. 10, pp. 910–914. doi: 10.1038/ng.665

4. Hobbs R.P., DePianto D.J., Jacob J.T., Han M.C., Chung B.M., Batazzi A.S., Poll B.G., Guo Y., Han J., Ong S., Zheng W., Taube J.M., Čihakova D., Wan F., Coulombe P.A. Keratin-dependent regulation of Aire and gene expression in skin tumor keratinocytes. *Nat. Genet.*, 2015, vol. 47, no. 8, pp. 933–938. doi:10.1038/ng.3355

5. Sankar S.S., Tanner J.M., Bell R.G., Chaturvedi A.A., Randall R.L., Beckerle M.C., Lessnick S.L. A novel role for keratin 17 in coordinating oncogenic transformation and cellular adhesion in Ewing sarcoma. *Mol. Cell Biol.*, 2013, vol. 33, no. 22, pp. 4448–4460. doi: 10.1128/MCB.00241-13

6. Fu M., Wang G. Keratin 17 as a therapeutic target for the treatment of psoriasis. *J. Dermatol. Sci.*, 2012, vol. 67, no. 3, pp. 161–165. doi: 10.1016/j.jdermsci.2012.06.008

7. Jin L., Wang G. Keratin 17: a critical player in the pathogenesis of psoriasis. *Med. Res. Rev.*, 2014, vol. 34, no. 2, pp. 438–454. doi: 10.1002/med.21291

8. Gudmundsdottir A.S., Sigmundsdottir H., Sigurgeirsson B., Good M.F., Valdimarsson H., Jonsdottir I. Is an epitope on keratin 17 a major target for autoreactive T lymphocytes in psoriasis? *Clin. Exp. Immunol.*, 1999, vol. 117, pp. 580–586. PMC1905362

9. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. *Molecular cloning. A laboratory manual.* New York, 1982. 480 p. Available at: <https://trove.nla.gov.au/version/45221481>

10. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685. doi: 10.1038/227680a0


**CLONING, EXPRESSION AND EXTRACTION FROM *ESCHERISCHIA COLI*
OF A HUMAN PROTEIN KERATIN 17 TRANSLATIONALLY FUSED TO
GLUTATHIONE S-TRANSFERASE**

© **A.M. Khuziakmetova¹, M.M. Yunusbaeva², E.K. Khusnutdinova²**

¹ Bashkir State University,
32, ulitsa Zaki Validi, 450076, Ufa, Russian Federation

² Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre, RAS,
71, prospekt Oktyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

According to the autoimmune hypothesis, the development of an erroneous immune response in psoriasis is caused by the phenomenon of "molecular mimicry." This phenomenon is the structural similarity of the own protein with the antigens of pathogenic microorganisms. In the case of psoriasis, consideration is given to homology of the amino acid sequence of keratin 17 with streptococcus M6 protein (*Streptococcus pyogenes*). Keratin 17 (K17), an intermediate filament protein, is highly expressed in psoriatic lesions, while not normally expressed in healthy epidermis. The expression of K17 sharply increases in various pathologies characterized by skin inflammation, including mechanical damage to tissue (injuries), psoriasis, various carcinomas and virus-induced tumors. It has been suggested that K17 may act as an important molecular player involved in a complex multi-level process of interaction between keratinocytes and T lymphocytes and thus possibly contribute to the development of pathologies characterized by spontaneous cell proliferation (psoriasis, oncology). The purpose of this work is cloning, expression in the bacterial system (*Escherichia coli*) and isolation of the recombinant K17 protein for subsequent study of its functional activity and detection of autoreactive K17 T cells in psoriatic patients. We amplified and cloned cDNA of the human *KRT17* gene into the pGEX4T1 vector for the expression in the bacterial system of the K17 protein translationally fused to glutathione-S-transferase. GST/K17 biosynthesis was performed in transformed *E. coli* BL21 (DE3) cells. The amount and purity of the isolated protein were sufficient to study its functional activity, followed by research on the detection of autoreactive T-lymphocytes to keratin 17 in psoriatic patients.

Key words: psoriasis, keratin 17, gene cloning, expression, GST fusion protein.