مقاله پژوهشی

آنتاگونیست رسپتور اینترلوکین-۱ انسانی: کلونینگ، بیان و بهینه سازی در میزبان E.coli

قاسم براتی *، دکتر حسن میرزاحسینی، دکتر جمشید کریمی*** ، فاطمه ابراهیم زاده*، نوشین شباب******
دکتر مسعود سعیدی جم*****

دریافت : ۹۲/۱۱/۹ ، پذیرش : ۹۳/۲/۳۰

چکیده:

مقدمه و هدف: آنتاگونیست رسپتور IL-1 (IL-1Ra) یک سایتوکاین ضد التهابی قوی است که باعث محدود کردن اثـرات التهـابی مربوط به اینترلوکین-۱ (IL-1) می شود. بعلت تشابه ساختمانی با IL-1، IL-1Ra به طور رقابتی به رسپتور IL-1 متصل مـی شـود ولی هیچ سیگنالی را القا نمی کند. بنابراین در درمان افراد مبتلا به بیماری های التهابی نظیـر آرتریـت روماتوئیـد بکـار مـی رود. هدف از مطالعه حاضر کلون کردن، بیان و بهینه سازی بیان این پروتئین در E. coli می باشد.

روش کـار: درایـن مطالعـه تجربـی قطعـه ی ژنـی سـنتزی مربـوط بـه IL-1Ra بـه وسـیله PCR تکثیـر داده شـد. پـس از بـرش دو آنزیمـی، ایـن قطعـه در وکتـور بیـانی pET28a کلـون گردیـد. بیـان ژن مـورد نظـر ابتـدا در سـطح mRNA بـه روش RT-PCR و سـپس در سـطح پـروتئین بـه روش SDS-PAGE مـورد بررسـی قـرار گرفـت و بـرای تاییـد پـروتئین بیـان شـده از وسـترن بـلات اسـتفاده گردیـد. بهینـه سـازی بیـان نیـز در غلظـت هـای مختلـف IPTG و مـدت زمـان هـای مختلـف بعد از القاء صورت گرفت.

نتایج: به کمک روش کلنی- PCR و هضم دو آنزیمی، کلون شدن قطعه ی ژنی مورد نظر در وکتور بیانی pET28a مشخص شـد. رونویسی از ژن کلون شده و بیان بالای پروتئین نوترکیب به ترتیب بـه روش RT-PCR و SDS-PAGE مـشاهده شـد. نتیجـه ی حاصل از الکتروفورز پروتئین نیز با روش وسترن بلات تایید گردید. میزان بیان در غلظت های مختلف القاءکننده و مـدت زمـان پس از القاء بهینه سازی گردید.

نتیجه نهایی: نتایج حاصل از مطالعه نشان دهنده ی بیان بالای این پروتئین در میزبان E.coli به وسیله وکتور بیـانی pET28a بـود. این مطالعه هم چنین نشان داد رابطه مستقیمی با افزایش بیان و مدت زمان برداشت سلول ها پس از القاء وجود دارد، لذا القاء با غلظت ۱ میلی مولار IPTG به مدت یک شب برای بیان بالای پروتئین پیشنهاد می گردد.

کلید واژه ها: التهاب روماتیسمی مفصل/ پروتئین نوترکیب/ سیتوکاین ها / گیرنده های اینترلوکین-۱

مقدمه :

التهاب مکانیسمی است که باعث محدود کردن اثرات مربوط به عوامل ضد عفونی می گردد. از طرف دیگر خـود التهاب نیـز مـی توانـد باعـث ایجـاد آسـیب و ضـایعه بـر سلولهای خودی گردد و لذا این مکانیسم بایـد در میزبـان به شدت تحت کنترل باشد (۱).

یکی از مهمترین سایتوکاین هائی که در ایجاد التهـاب نقـش دارد، IL-1 مـی باشـد (۲). سـایتوکاینی کـه باعـث

* کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی همدان
** استادیار بیوتکنولوژی عضو مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتوپاستور ایران
*** استادیار گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
**** کارشناس آزمایشگاه پزشکی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی همدان
***** دانشیار بیوتکنولوژی عضو مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی همدان(sjam110@yahoo.com)

محدود کردن اثرات ضد التهابی مربوط به IL-1 می شود، آنتاگونیست رسپتور IL-1 (IL-1Ra) می باشد که توسط اکثر سلول های بدن به خصوص مونوسیت ها، ماکروفاژها، فیبروبلاست ها و هم چنین هپاتوسیت های کبدی (به عنوان یک پروتئین فاز حاد) سنتز می گردد (۳،۴).

در افراد مبتلا به بیماری های التهابی نظیرآرتریت روماتوئید که یک بیماری التهابی مزمن و پیشرونده است، سطح IL-1 و IL-1Ra هر دو بالاست ولی سطح IL-1Ra آنقدر نیست که بتواند اثرات التهابی IL-1 را بلوکه کند. نشان داده شده است که تزریق نوع نوترکیب این پروتئین می تواند باعث کاهش اثرات بیماری و اثرات ضد التهابی آن در افراد مبتلا به این بیماری ها گردد (۵). هم چنین تحقیقات مختلف ایمن بودن و کارائی این پروتئین را به اثبات رسانده است (۱۰-۶) که در نهایت باعث شد این پروتئین در سال ۲۰۰۱ تا ئیدیه خود را ازFDA جهت درمان بیماری التهابی آرتریت روماتوئید دریافت نماید. این دارو هم اکنون با نام آناکینرا (Anakinra) شناخته شده و با نام تجاری کینرت (Kineret) در بازار عرضه می گردد (۱۱). هم چنین در تحقیقات مختلف نشان داده شده است که این دارو می تواند در بسیاری از اختلالات نظیر بیماریهای عفونی(۱۲)، رد پیوند GVHD (۱۳)و برخی سرطان ها به خصوص لوسمی ها نیز نقش داشته باشد (۱۴،۱۵).

این آنتاگونیست از اعضای خانواده ی IL-1 می باشد و به ۲ شکل ترشحی و داخل سلولی وجود دارد که هر دو شکل آن حاصل رونویسی از یک ژن می باشند (۱۶). عملکرد شکل داخل سلولی آن به خوبی شناخته نشده است ولی فرم ترشحی آن که دارای ۱۵۲ اسید آمینه است و گلیکوزیله می باشد، بعلت داشتن تشابه با IL-1 به صورت رقابتی به رسپتورIL-1 متصل می شود ولی برخلاف IL-1 هیچ سیگنال داخل سلولی را فعال نمی کند (۱۷). فرم نوترکیب آن غیر گلیکوزیله است ولی اثرات بیولوژیک مشابهی با نوع طبیعی و گلیکوزیله آن دارد (۱۸).

با توجه به اهمیت کاربردی که نوع نوترکیب این پروتئین می تواند داشته باشد، این مطالعه طرح ریزی گردید و هدف اصلی از انجام آن ضمن کلون کردن، بیان و بهینه سازی این پروتئین در E. coli تولید این دارو در شرایط آزمایشگاهی است تا بتوان آن را در آینده ای نزدیک به صورت وسیع و تجاری توسط شرکت های داروسازی داخل کشور تولید نمود.

روش کار:

تکثیر ژن مورد نظر: در این مطالعه تجربی ابتدا قطعه ژنی مورد نظر به صورت سنتتیک تهیه شد. سپس تکثیر آن به کمک دو پرایمر، یکی Forward با توالی 5'-GAT ATA CATATG GAC GAC GAC GAC AAG-3' دارای جایگاه برش آنزیمی برای آنزیم محدود الاثر NdeI و دیگری Reverse با توالی 5'-GAT ATA CTCGAG CTA CTC GTC CTC CTG GAA-3' دارای جایگاه برش آنزیمی برای آنزیم محدود الاثر XhoI طی فرایند PCR صورت گرفت.

فرایند PCR تحت شرایط زیر انجام شد:

مرحله ی واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه، سپس ۲۵ سیکل متوالی از مراحل واسرشت در دمای ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه ودر نهایت مرحله گسترش انتهائی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه.

سپس محصول PCR به منظور بررسی تکثیر بر روی ژل آگارز آشکار گردید.

هضم آنزیمی: محصول PCR توسط دو آنزیم محدود الاثر NdeI و XhoI تحت برش دو آنزیمی قرار گرفت. همزمان وکتور بیانی pET28a نیز تحت برش آنزیمی با دو آنزیم مذکور قرار گرفت.

واکنش اتصال: پس از برش آنزیمی و ایجاد انتها های چسبناک در محصول PCR و وکتور بیانی، مقدار مناسبی از آنها را با یکدیگر مخلوط کرده تا با اضافه کردن آنزیم T_4 DNA Ligase واکنش اتصال صورت گیرد و وکتور نوترکیب تشکیل گردد. سپس محصول واکنش اتصال به درون سلول E.coli سویه Top 10 F′ ترانسفورم شد. غربالگری کلنی های بدست آمده به وسیله ی واکنش PCR بر روی کلنی های بدست آمده صورت گرفت. بدین ترتیب کلنی های حاوی پلاسمید مورد نظر انتخاب گردید و در محیط LB Broth حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین به مدت ۱۶ ساعت و در دمای۳۷ درجه به منظور استخراج پلاسمید کشت داده شد. پس از استخراج ، به منظور تائید حضور قطعه ی ژنی، پلاسمید تحت برش دو آنزیمی قرار گرفت.

بیان پروتئین مورد نظر: پلاسمید نوترکیب پس از استخراج

به درون سلول E.coli سویه ی BL21(DE3) بـه منظـور تولید پروتئین مورد نظر ترانسفورم گردید. سپس باکتر هـا در محیط LB Broth حاوی آنتی بیوتیک کانامایـسین و در حرارت ۳۷ درجه با دور ۲۲۰ rpm کشت داده شـد تـا OD_{600} آن به ۰/۵ برسد. در این مرحله به آن IPTG اضافه گردید. سـپس انکوباسـیون بـاکتری هـا بـه منظـور بیـان پروتئین نوترکیب در شرایط مذکور ادامه یافت.

بررسی بیان ژن: ابتدا بررسی بیان ژن در سـطح RNA بـه وسیله ی واکنش RT-PCR صورت گرفت. بـرای ایـن کـار mRNA توتـال از بـاکتری در قبـل و بعـد از زمـان القـا استخراج گردید. سپس cDNA از روی آن سنتز گردیـد و در نهایـت بـا انجـام آزمـایش PCR بـر روی ایـن cDNA حضور mRNA در باکتری ها مورد بررسی قرار گرفت.

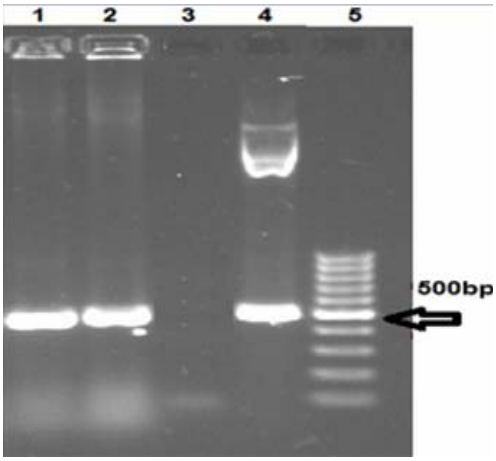
در مرحله ی بعد، بررسی بیان ژن در سطح پـروتئین صورت گرفت. بدین منظور از تکنیک SDS-PAGE بـرای آشکار شدن تمام پروتئین های باکتریائی بر روی ژل پلـی آکریل آمید استفاده شد. در این حالت رسـوب مربـوط بـه ۱ میلی لیتر از محیط کـشت در دو حالـت قبـل و بعـد از القاء در آب ۱۰۰ درجه به مدت ۵ دقیقه جوشانده شـد تـا سلول ها لیز گردند. سپس نمونه ها بر روی ژل پلی آکریل آمید لود گردیـد. پـس از اتمـام الکتروفـورز، ژل بـا رنـگ کوماسی بلو رنگ شد و پس از مرحله ی رنگبری بانـدهای مربوط به پروتئین های باکتری بر روی ژل ظاهر گردید.

برای تائید نتیجه ی مربوط بـه SDS-PAGE از روش وسـترن بـلات اسـتفاده شـد کـه طـی آن بعـد از انتقـال پروتئینها از ژل به کاغذ نیتروسـلولز و اتـصال آنتـی بـادی اولیه علیه برچسب هیستیدینی و به دنبـال آن اسـتفاده از آنتی بـادی ثانویـه کونژگـه بـا آنـزیم پراکـسیداز، حـضور پروتئین مورد نظر مورد آنالیز قرار گرفت.

بهینه سازی بیان: بدین منظور بیان پروتئین تحـت شـرایط مختلف غلظتIPTGو مدت زمانهای مختلف برداشت سلول بعد از القاء مورد بررسی قرار گرفت. میزان بیان پروتئین با استفاده از تراکم سنجی(Densitometry) به کمک نرم افزار TotalLab TL120 بر روی ژل پلی آکریل آمید صورت گرفت تا بهترین حالت برای بیان ژن مذکور مشخص گردد.

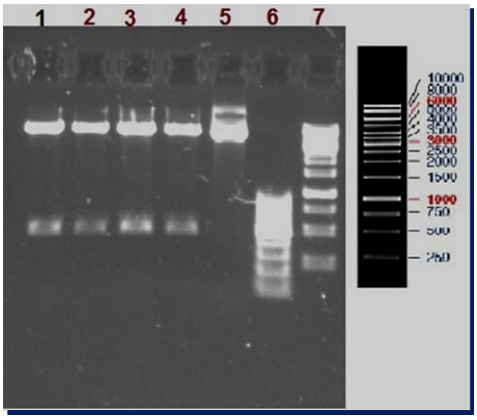
نتایج:

کلونینگ ژن مورد نظر: قطعه ی ژنی مورد نظـر توسـط برش آنزیمی جدا گردید و در وکتور pET28a کلون شـد. ابتدا غربالگری کلنی های بدست آمده توسط واکنش PCR کلنی صورت گرفت(شکل۱) و سپس واکنش هضم آنزیمی به وسیله ی دو آنزیم به صورت همزمان برای تائید نتیجـه بر روی پلاسمیدهای استخراج شده انجام گرفت (شکل۲). همانطور که در شکل پیداست، پس از برش پلاسمید با دو آنزیم Nde I و Xho I ، قطعه ژنی با طول ۴۸۱ جفت باز از پلاسمید خارج شده است که نشان دهنده ی کلون شـدن ژن در پلاسمید بیانی مذکور می باشد.



شکل ۱: غربالگری کلنی ها با انجام کلنی PCR

همانگونه که که درشکل مشخص است هر ۲ کلنی انتخاب شده مثبت بوده اند(ستونهای ۲-۱). ستون ۳، کنترل منفی که در آن از آب مقطر به عنوان الگو استفاده شده است. ستون ۴، کنترل مثبت که الگوی آن ژن سنتزی است و ستون ۵ نیز مارکر DNA را نشان می دهد

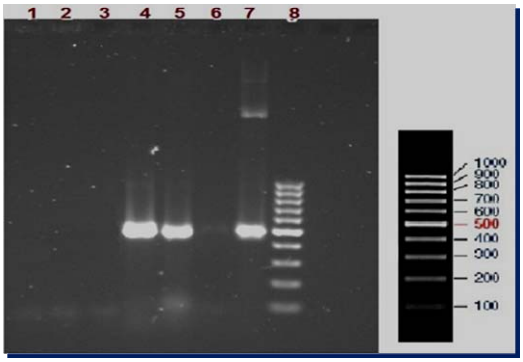


شکل۲: کلنی های انتخاب شده پس از کشت و تخلیص پلاسمید، تحت هضم دو آنزیمی با Nde I و Xho I قرار گرفته اند

در این حالت، قطعه ژنی پس از برش از وکتور خارج شده است (ستون های ۴-۱). ستون ۵، پلاسمید هضم نشده و ستون های ۶ و ۷ مارکر DNA می باشند

بیان پروتئین در میزبان: پس از کلون شـدن قطعـه ی ژنـی مورد نظر در پلاسمید بیانی pET28a، القـاء بـا IPTG بـه منظور بیان ژن صورت گرفت.

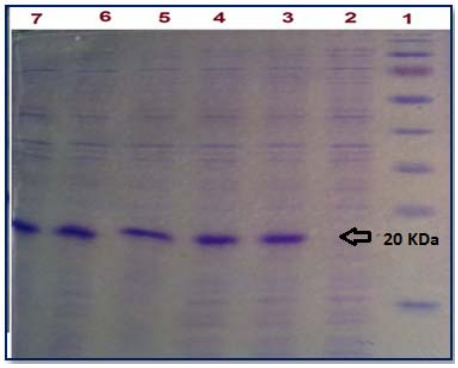
در ابتدا بیان ژن در سطح RNA با روش RT-PCR مشخص شد. نتیجه ی حاصل این روش بر روی ژل آگارز، نشان دهنده ی وجود mRNA مربوط به ژن مورد نظر در سلول باکتریایی بود که به صورت باند مشخصی با طول تقریبی ۴۸۰ جفت بازقابل مشاهده می باشد (شکل ۳).



شکل ۳: واکنش RT-PCR

ستون ۱: باکتری حاوی وکتور بدون ژن ، ستون ۲: باکتری حاوی وکتور pET28a-IL-1Ra بدون القا، ستون ۳: کنترل منفی واکنش RT-PCR، ستون ۴ و ۵: نمونه ها. ستون ۶ و ۷: به ترتیب کنترل مثبت و منفی واکنش PCR. ستون ۸: مارکر DNA

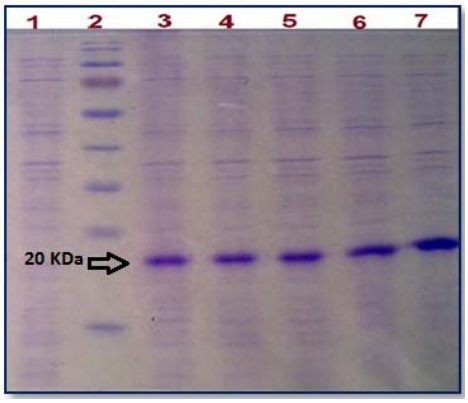
سپس بیان در سطح پروتئین توسط SDS-PAGE مشخص شد. با توجه به اینکه بیان پروتئین نوترکیب به صورت اجسام انکلوزیونی نا محلول صورت گرفته، نتیجه به صورت باند پر رنگی در محدوده ی ۲۰ کیلو دالتونی که نشان دهنده ی قسمت اعظم پروتئین های کل باکتریایی است، بر روی ژل پلی آکریل آمید قابل مشاهده بود. در طی بهینه سازی بیان به نظر رسید که غلظت های مختلف القاء کننده تاثیر چندانی درمیزان بیان پروتئین نوترکیب نداشته است(شکل ۴).



شکل۴ : بهینه سازی بیان در غلظت های مختلف IPTG

به ترتیب از راست به چپ، ستون ۱: مارکر پروتئینی، ستون ۲: نمونه غیر القا، ستون ۷-۳: به ترتیب بیان در غلظت های ۰,۱، ۰,۲۵، ۰,۵، ۰,۷۵و ۱ میلی مولار. وزن ملکولی پروتئین نوترکیب در حدود ۲۰ کیلو دالتون می باشد

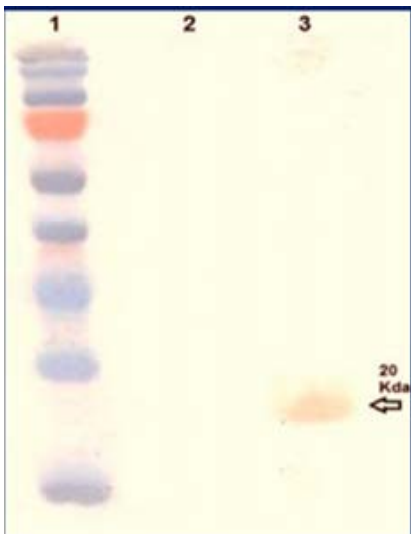
بهینه سازی بیان ژن در زمان های مختلف برداشت سلول ها پس از القاء، نشان دهنده ی تفاوت بیان در زمانهای مختلف می باشد (شکل ۵).



شکل۵ : بهینه سازی بیان در زمان های متفاوت برداشت سلولها پس از القا.

به ترتیب از چپ به راست، ستون۱: نمونه غیر القا، ستون ۲: مارکر پروتئینی، ستون های ۷-۳ به ترتیب زمان های برداشت سلول در ۲، ۴، ۵، ۷ و ۱۶ ساعت پس از القا را نشان می دهد. وزن ملکولی پروتئین نوترکیب در حدود ۲۰ کیلو دالتون می باشد.

آنالیز ژل با استفاده از نرم افزار TotalLabTL120 نشان دهنده این موضوع بود که هر چه مدت زمان افزایش یافته است، میزان بیان نیز بیشتر شده است. لذا بیشترین بیان پروتئین در ۱۶ ساعت پس از القاء مشاهده شد. نتیجه ی بدست آمده از روش SDS-PAGE به کمک روش ایمونوبلاتینگ تائید گردید (شکل ۶).



شکل ۶: نتیجه ی وسترن بلاتینگ با آنتی بادی علیه توالی برچسب هیتیدینی

ستون ۱: مارکر پروتئینی، ستون ۲: بلاتینگ بر روی عصاره باکتری بدون پلاسمید نوترکیب، ستون ۳: نتیجه ی بلاتینگ بر روی عصاره باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب بعد از القاء

بحث:

آرتریت روماتوئید یک بیماری التهابی مزمن و پیش رونده می باشد. در این بیماری، درمان معمول، استفاده از داروهای تعدیل کننده ی ضد روماتوئید (DMARDs) نظیر متوترکسات می باشد اما این داروها در بیماران با علائم متوسط تا شدید بیماری و مبتلایان به فرم مزمن آن اثر گذاری پائینی دارند. از طرف دیگر درمان با این داروها نیاز به استفاده طولانی مدت دارد که این به نوبه ی خود به تدریج کاهش اثر گذاری دارو را به همراه خواهد داشت و همچنین این استفاده طولانی مدت می تواند اثرات سمی بر روی بدن بیماران مبتلا داشته باشد (۱۹).

امروزه با استفاده از فناوری DNA نوترکیب، محصولات پروتئینی با کاربردهای درمانی فراوانی تولید شده اند. یکی از این داروهای نوترکیب آناکینرا نام دارد که همان IL-1Ra انسانی است که عمدتا در میزبان E.coli بیان می شود. این دارو نهایتا در سال ۲۰۰۱ موفق به دریافت تائیدیه FDA برای درمان بیماری آرتریت روماتوئید گردید. این داروی نوترکیب هم اکنون با نام تجاری کینرت در بازار به عرضه می رسد (۱۱). با توجه به اهمیت این پروتئین و کاربرد درمانی آن، هدف از مطالعه ی حاضر کلونینگ وبیان ژن مربوط به این پروتئین در شرایط آزمایشگاهی بود تا اولین قدم جهت تولید وسیع این داروی نوترکیب در ایران برداشته شود.

به منظور انجام این کار، ابتدا در ژن مربوط به این پروتئین، از توالی برچسب هیستسدینی به منظور تسهیل در شناسائی و تخلیص آن تعبیه شد. هم چنین توالی مربوط به انتروکیناز نیز بعد از آن قرار گرفت تا بتوان در ادامه ی این مطالعه، پس از تخلیص این پروتئین و برش قطعه ی اضافی محصول خالص پروتئینی را بدست آورد.

در این مطالعه از سیستم بیانی وکتورهای گروه pET که دارای پروموتور قوی T_7 می باشند استفاده شد. وکتور مورد استفاده در این گروه pET28a بود که استفاده ی وسیعی در تولید دارو های نوترکیب به خصوص در ایران دارد و لذا به راحتی در اکثر مراکز تحقیقاتی کشور در دسترس است. نتایج این مطالعه با یافته های حاصل از پژوهش هایدونگ تن و همکارانش در استفاده از این سیستم بیانی مطابقت دارد. در این تحقیق، آنها از وکتور pET30a جهت بیان این پروتئین استفاده نمودند (۲۰).

در این مطالعه ازسلول بیانی E.coli به منظور بیان این پروتئین استفاده شد. استفاده ازسیستم بیانی E.coli مزایای زیادی را به همراه دارد. از آن جمله می توان به میزان بالای تولید محصول نوترکیب در این سیستم و ارزان بودن استفاده از آن در تولید این گونه محصولات پروتئینی اشاره کرد. هر چند این سیستم دارای محدودیت هائی نیز می باشد، که مهمترین آنها عدم تشکیل پیوند دی سولفیدی و عدم وجود پردازش پس از ترجمه می باشد (۲۱). پروتئین مورد نظر در این مطالعه نیز دارای پیوند دی سولفیدی و هم چنین گلیکوزیلاسیون می باشد. مشخص شده است که فرم غیر گلیکوزیله ی آن نیز همانند فرم اصلی و گلیکوزیله ی آن دارای عملکرد یکسانی است (۱۸). ازطرف دیگر نشان داده شده که وجود یا عدم وجود پیوند دی سولفیدی نیز در عملکرد این پروتئین تاثیری ندارد و لذا فرم احیا و اکسید آن دارای عملکرد یکسانی می باشند(۲۰). به این ترتیب می توان به راحتی از سیستم بیانی E.coli برای بیان این پروتئین بهره جست، همچنان که در سایر مطالعات از این سیستم برای بیان این پروتئین استفاده شده است (۲۴-۲۲، ۲۰).

بیشترین میزان بیان پروتئین بعد از ۱۶ ساعت از زمان القاء مشاهده شد. آنالیز ژل SDS-PAGE طی بهینه سازی بیان، نشان داد که هر چه مدت زمان القاء افزایش یابد، میزان بیان پروتئین نیز افزایش پیدا می کند. با توجه به اینکه پروتئین به صورت اجسام نامحلول انکلوزیونی در سلول بیان می شود. بنابراین، پروتئین ها به دلیل اینکه فاقد عملکرد هستند، بر روی حیات سلول میزبان هیچ تأثیری نخواهند داشت. در نتیجه با افزایش مدت زمان القاء، پروتئین ها به تدریج در سیتوپلاسم تجمع می یابند و به مرور زمان درصد بیشتری از پروتئین های یک سلول را شامل می شوند تا جایی که پس از ۱۶ ساعت از زمان القاء بیش از ۸۰ درصد از پروتئین های میزبان را پروتئین های نوترکیب تشکیل می دهند.

نتیجه نهایی :

نتایج حاصل از مطالعه نشان دهنده ی بیان بالای این پروتئین در میزبان E.coli به وسیله وکتور بیانی pET28a بود. این مطالعه هم چنین نشان داد رابطه مستقیمی با افزایش بیان و مدت زمان برداشت سلول ها پس از القاء وجود دارد، لذا القاء با غلظت ۱ میلی مولار IPTG به مدت یک شب برای بیان بالای پروتئین پیشنهاد می گردد.

سپاسگزاری :

این مقاله برگرفته از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی می باشد، بدینوسیله از پشتیبانی مالی حوزه معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان قدردانی می گردد.

منابع :

1. Vane J, Botting R. Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. FASEB J 1987;1(2):89-96.
2. O'Neill LA, Dinarello CA. The IL-1 receptor/ toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. Immunol Today 2000;21(5):206-9.
3. Danis V, Millington M, Hyland V, Grennan D. Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. Clin Exp Immunol 1995; 99(2): 303-10.
4. Gabay C, Smith M, Eidlen D, Arend WP. Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) is an acute-phase protein. J Clin Invest 1997; 99(12): 2930.
5. Perricone C, Ceccarelli F, Valesini G. An overview on the genetic of rheumatoid arthritis: a never-ending story. Autoimmun Rev 2011; 10(10): 599-608.
6. Zuurmond AM, Koudijs A, van El B, Doornbos RP, van Manen-Vernooij BC, Bastiaans JH, et al. Integration of efficacy, pharmacokinetic and safety assessment of interleukin-1 receptor antagonist in a preclinical model of arthritis. Regul Toxicol Pharmacol 2011;59(3):461-70.
7. Fleischmann R. Addressing the safety of anakinra in patients with rheumatoid arthritis. Rheumatology 2003;42(suppl 2):ii29-ii35.
8. Fleischmann RM, Schechtman J, Bennett R, Handel ML, Burmester GR, Tesser J, et al. Anakinra, a recombinant human interleukin- 1 receptor antagonist (r-metHuIL-1ra), in patients with rheumatoid arthritis: A large, international, multicenter, placebo-controlled trial. Arthritis Rheum 2003;48(4):927-34.
9. Fleischmann R. Safety of anakinra, a recombinant interleukin-1 receptor antagonist (r-metHuIL-1ra) in patients with rheumatoid arthritis and comparison to anti-TNF alpha agents. Clin Exp Rheumatol 2002;20(5; SUPP/27):35-41.
10. Cohen S, Rubbert A. Bringing the clinical experience with anakinra to the patient. Rheuma-tology 2003;42(suppl 2):ii36-ii40.
11. Fleischmann R, Stern R, Iqbal I. Anakinra: an inhibitor of IL-1 for the treatment of rheumatoid arthritis. Expert Opin Biol Ther 2004;4(8):1333-44.
12. Ohlsson K, Björk P, Bergenfeldt M, Hageman R, Thompson RC. Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin shock. Nature 1990; 348(6301):550-2
13. McCarthy PJ, Abhyankar S, Neben S, Newman G, Sieff C, Thompson R, et al. Inhibition of interleukin-1 by an interleukin-1 receptor antagonist prevents graft-versus-host disease. Blood 1991;78(8):1915-8.
14. Tao M, Li B, Nayini J, Andrews CB, Huang R-W, Devemy E, et al. SCF, IL-1β, IL-1ra and GM-CSF in the bone marrow and serum of normal individuals and of AML and CML patients. Cytokine 2000;12(6):699-707.
15. Estrov Z, Kurzrock R, Wetzler M, Kantarjian H, Blake M, Harris D, et al. Suppression of chronic myelogenous leukemia colony growth by interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist and soluble IL-1 receptors: a novel application for inhibitors of IL-1 activity. Blood 1991; 78(6): 1476-84.
16. Butcher C, Steinkasserer A, Tejura S, Lennard AC. Comparison of two promoters controlling expression of secreted or intracellular IL-1 receptor antagonist. J Immunol 1994;153(2):701-11.
17. Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. Ann Rev Immunol 1998;16(1):27-55.
18. Moltó A, Olivé A. Anti-IL-1 molecules: new comers and new indications. Joint Bone Spine 2010;77(2):102-7.
19. Jacques C, Gosset M, Berenbaum F, Gabay C. The role of IL-1 and IL-1Ra in joint inflammation and cartilage degradation. Vitam Horm 2006;74:371-403.
20. Tan H, Dan G, Gong H, Cao L. On-column refolding and purification of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist (rHuIL-1ra) expressed as inclusion body in Escherichia coli. Biotechnol Lett 2005; 27(16):1177-82
21. Bell PA. E. coli Expression Systems. Problem Solver. New York: John-Wiley & Sons, 2001: 461.
22. Birikh KR, Lebedenko EN, Boni IV, Berlin YA. A high-level prokaryotic expression system: synthesis of human interleukin 1α and its receptor antagonist. Gene 1995 ; 164(2):341-5.
23. Schreuder HA, Rondeau JM, Tardif C, Soffientini A, Sarubbi E, Akeson A, et al. Refined crystal structure of the interleukin-1 receptor antagonist. Eur J Biochem 1995;227(3):838-47.
24. Steinkasserer A, Solari R, Mott HR, Aplin RT, Robinson CC, Willis AC, et al. Human Interleukin-1 receptor antagonist high yield expression in E. coli and examination of cysteine residues. FEBS Lett 1992;310(1):63-5.

Original Article

Human Interleukine-1 receptor antagonist: Cloning, Expression and Optimization in E.coli Host

Gh. Barati, M.Sc.[*]; H. Mirza Hossein, Ph.D.[**]; J. Karimi, Ph.D.[***]; F. Ebrahimzadeh, M.Sc.[*]
N. Shabab, B.Sc.[****]; M. Saidijam, Ph.D.[***]

Received: 29.1.2014 Accepted: 20.5.2014

Abstract

Introduction & Objective: Interleukine-1 receptor antagonist (IL-1RA) is a powerful anti-inflammatory cytokine which limits the biological effects of IL-1. Due to structural similarity between IL-1 and its antagonist, IL-1RA competitively binds to IL-1 receptor which leads to no signal transduction. Therefore , it is applied in the treatment of patients with inflammatory diseases such as Rheumatoid Arthritis. The aim of this study is cloning, expression and optimization of IL-1RA in *E. coli*.

Materials & Methods: In this experimental study synthetically prepared cDNA was amplified by PCR. After double digestion with NdeI and XhoI restriction enzymes, this gene was cloned in pET28a expression vector. Expression of desired gene was analyzed at RNA level by RT-PCR and at protein level by SDS-PAGE and followed by western blot to confirm SDS-PAGE results. Optimization of recombinant protein expression was performed in different IPTG concentrations and harvesting times after induction.

Results: The presence of gene in pET28a was determined by colony-PCR and confirmed by restriction digestion. Transcription of cloned gene and expression of high yield recombinant protein were shown by RT-PCR and SDS-PAGE, respectively. The result of SDS-PAGE was confirmed by western blot. Expression was optimized in different induction time and IPTG concentrations

Conclusion: The result of this study demonstrated expression of this recombinant protein at high level in *E.coli* system by pET28a expression vector. This study also showed a direct association between the increased level of expression and time of induction . Therefore, an overnight induction time with 0.1 mM IPTG concentration is recommended for a high level expression.

(Sci J Hamadan Univ Med Sci 2014; 21 (2):145-151)

Keywords: Arthritis, Rheumatoid / Cytokines / Protein, Recombinant/ Receptors, Interleukin-1

---

* M.Sc. in Biotechnology, Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.
** Assistant Professor of Biotechnology, Biotechnology Research Center
Pasture Institute, Tehran, Iran.
*** Assistant Professor, Department of Biochemistry, School of Medicine
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.
**** B. Sc. in Biology, Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.
***** Associate Professor of Biotechnology, Molecular Medicine Research Center
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran. (sjam110@yahoo.com)