Thesis Title Cloning, Expression and Purification of Recombinant Human Interleukin-1 Beta

Author Mr. Tawan Chokepaichitkool

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Dr. Waraporn Kasekarn — Advisor

Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert — Co-advisor

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a degenerative joint disease resulting in an irreversible damage of the articular cartilage caused by matrix degrading enzymes. Interleukin-1 beta (IL-1β) is an important inflammatory cytokine affecting on the cartilage degradation process of extracellular matrix components. To establish the *in vitro* model of the inflammation and degradation of cartilage, IL-1β is a crucial cytokine needed for stimulating the catabolic events in joint destruction. The purpose of this study is production of the recombinant human IL-1β (rhIL-1β) with functionally active using *Escherichia coli* expression system. Human peripheral blood mononuclear cells were separated by ficoll-hypaque centrifugation and activated with lipopolysaccharides. The total RNA was extracted and prepared the complementary DNA by using reverse transcriptase and oligo dT_{18} primer. The gene encoding mature human IL-1β was amplified by polymerase chain reaction and used as the template

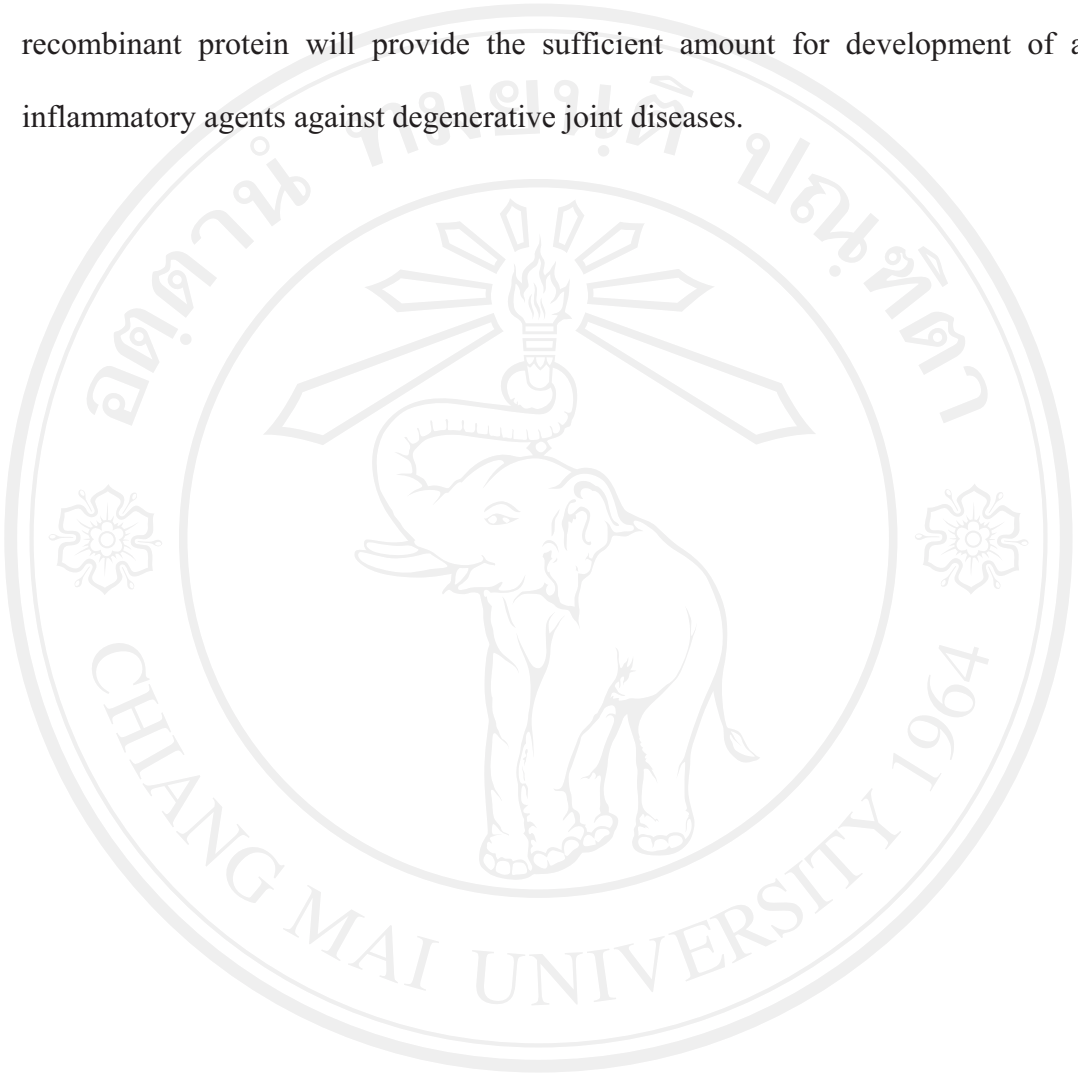
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

for incorporating the nucleotide sequences coding for the restriction sites, factor Xa and 6xHistidine tag at its 3′ end. The amplified product was directly inserted into the pJET1.2/blunt plasmid vector and *E. coli* BL21(DE3) was utilized as a host for protein expression. Analysis of insert nucleotide sequences by using automated DNA sequencing showed the perfect similarity (100%) with human IL-1β gene. The recombinant human IL-1β was expressed as a fusion protein with histidine tag at its C-terminus under the control of T7 promotor yielded an active protein in the soluble extract and the expressed product was verified by western blot analysis using monoclonal antibody specific to human IL-1β (hIL-1β). The rhIL-1β was successively purified by two steps purification through Ni-NTA affinity chromatography and factor Xa protease cleavage. The biological activities of purified product were observed in primary human articular chondrocyte (HAC) and porcine cartilage explant.

Effects of purified protein on HAC cells were determined by measuring the hyaluronan (HA) releasing in the culture media and MMPs mRNA expression using ELISA and reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) respectively in comparison with a commercial rhIL-1β. It was found that the hIL-1β stimulated HA released in dose-dependent manner, and increased mRNA expression level for MMP-1, MMP-3 and MMP-13. Biological effects on porcine cartilage explant were examined using the cartilage degenerative markers such as releasing of sulfated-glycosaminoglycan (sulfated-GAG), HA, remaining of uronic acid, and gelatin zymography. The results showed the similar biological action of rhIL-1β compared to the commercial product, indicating that the purified rhIL-1β had the biological function for stimulation the cartilage degradation.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

In conclusion, the rhIL-1β with biologically active was successfully produced using recombinant DNA technology based on *E.coli* expression system. This recombinant protein will provide the sufficient amount for development of anti-inflammatory agents against degenerative joint diseases.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การโคลนนิ่ง การแสดงออก และแยกบริสุทธิ์สำหรับรีคอมบิแนนท์อินเตอร์ลูคิน-1 ชนิดบีทาของมนุษย์

ผู้เขียน นายตะวัน โชคไพจิตรกุล

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ดร. วราภรณ์ เกษกาญจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

รศ.ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

โรคข้อเสื่อมเป็นโรคที่เกิดการเสื่อมสลายของของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนแบบไม่ย้อนกลับ อันมีสาเหตุจากเอนไซม์ทำลายเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนผิวข้อ กระบวนการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนนั้นมีสาเหตุหลักคือ สารไซโตไคน์ที่มีชื่อว่า อินเตอร์ลูคิน-1 ชนิดบีทา การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการอักเสบและการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนในห้องปฏิบัติการนั้นมีความจำเป็นต้องใช้อินเตอร์ลูคิน-1 ชนิดบีทาเป็นสารกระตุ้นเพื่อจำลองภาวะการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อน วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือ เพื่อสร้างรีคอมบิแนนท์อินเตอร์ลูคิน-1 ชนิดบีทาของมนุษย์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพโดยใช้ระบบการแสดงออกของโปรตีนในแบคทีเรียชนิด *Escherichia coli* ขั้นตอนการวิจัยเริ่มจากนำเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดียวจากเลือด ซึ่งถูกแยกโดยใช้การปั่นในสารละลาย ficoll-hypaque และกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ จากนั้นทำการสกัดแยกอาร์เอ็นเอรวมและสร้างสาย complementary DNA โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase และ oligo dT_{18} primer สายดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นจะถูกใช้เป็นต้นแบบเพื่อเพิ่มจำนวนยีนที่จำเพาะต่ออินเตอร์ลูคิน-1 ชนิดบีทาของมนุษย์ โดยเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ท่อนดีเอ็นเอที่ได้ถูกใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะบริเวณจดจำสำหรับ Factor Xa และกรดอะมิโนฮีสติดีนจำนวน 6 ตัว ทางด้านปลาย 3′ จากนั้นทำการเชื่อมต่อยีนที่ได้เข้ากับพลาสมิดเวคเตอร์ชนิด pJET1.2/blunt ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่องหาลำดับเบส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แบบอัติโนมัติพิสูจน์ได้ว่า ยีนที่ได้คืออินเตอร์ลูคิน-1 ชนิดบีทาของมนุษย์ และการแสดงออกของอินเตอร์ลูคิน-1 ชนิดบีทานี้อาศัยเซลล์เจ้าบ้านชนิดแบคทีเรียสายพันธุ์ *E. coli* BL21(DE3) การแสดงออกของโปรตีนที่สร้างขึ้นอยู่ในรูปของรีคอมพ์บิแนนท์โปรตีนที่ถูกเชื่อมต่อกับกรดอะมิโนฮีสติดีน 6 ตัว ทางด้านปลาย C ภายใต้การควบคุมของ T7 promotor และแสดงออกในรูปของโปรตีนที่ทำงานได้อยู่ในส่วนของ soluble extract ซึ่งสามารถยืนยันได้โดยใช้โมโนโคนอลแอนติบอดี้จำเพาะต่ออินเทอร์ลูคิน-1ชนิดบีทาของมนุษย์ การแยกบริสุทธิ์สามารถทำได้โดยผ่านสองขั้นตอนคือ การอาศัยการจับกันอย่างจำเพาะกับ Ni-NTA และการตัดบริเวณกรดอะมิโนจำเพาะสำหรับเอนไซม์ Factor Xa protease การศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของโปรตีนถูกทดสอบในเซลล์ primary human articular chondrocyte (HAC) และเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อของสุกร

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนที่ผลิตได้ต่อเซลล์ HAC ถูกวิเคราะห์โดยการวัดระดับการหลั่งของไฮยาลูโรแนน (HA) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ และวัดการแสดงออกของ mRNA ของ MMPs โดยใช้วิธี ELISA และ reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) ตามลำดับและเปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด จากผลการทดลองพบว่า รีคอมบิแนนท์อินเตอร์ลูคิน-1 ชนิดบีทาที่ได้มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งของไฮยาลูโรแนนสัมพันธ์กับความเข้มข้นที่ใช้ และเพิ่มระดับการแสดงออกของ mRNA ของ MMP-1, MMP-3 และ MMP-13 นอกจากนั้นผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของกระดูกอ่อนผิวข้อของสุกรโดยการวัดระดับของตัวบ่งชี้การเสื่อมสลายของกระดูกอ่อน เช่น การหลั่งของ sulfated-glycosamino-glycan (sulfated-GAG), HA, ปริมาณกรดยูโรนิกที่เหลืออยู่ในกระดูกอ่อนผิวข้อและ gelatin zymography ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตขึ้นมีฤทธิ์ทางชีวภาพเช่นเดียวกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มีการจำหน่ายซึ่งใช้เป็นมาตรฐาน จึงกล่าวได้ว่า รีคอมบิแนนท์อินเตอร์ลูคิน-1 ชนิดบีทาของมนุษย์ที่แยกบริสุทธิ์ได้ มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการกระตุ้นให้เกิดการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อน

ผลการศึกษาสรุปได้ว่า ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการสร้างรีคอมบิแนนท์อินเตอร์ลูคิน-1 ชนิดบีทาของมนุษย์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยใช้เทคโนโลยีการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนซึ่งอาศัยเซลล์เจ้าบ้านชนิดแบคทีเรีย โดยประโยชน์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้นี้ สามารถนำไปใช้ต่อยอดการศึกษาวิจัยและพัฒนาสารต่อต้านการอักเสบในโรคข้อเสื่อมต่อไปในอนาคต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved