

Κλινική μελέτη

Αναδίπλωση των πρωτεϊνών Sky D1-D3 και GAS6 με τη μέθοδο FSAP

Θ. Βαβίλης, B.Sc.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Οι πρωτεΐνες Sky D1-D3 και GAS6 απαντώνται εκτός των άλλων και στο γεννητικό σύστημα και των δύο φύλων. Σκοπός της εργασίας ήταν η επίτευξη αναδίπλωσης των πρωτεϊνών αυτών, προκειμένου να μελετηθούν μέσω κρυσταλλοποίησης.

Υλικό και μέθοδοι: Το υλικό αποτέλεσαν τα έγγλειστα σωματίδια των πρωτεϊνών Sky D1-D3 και GAS6 που είχαν υποστεί διάλυση σε ειδικό buffer. Στη συνέχεια οι διαλύσεις των πρωτεϊνών αυτών αραιώθηκαν με κάθε ένα ξεχωριστά από τα 24 διαλύματα αναδίπλωσης, τα οποία είχαν ήδη προπαρασκευαστεί. Μετά από ειδική επεξεργασία έγινε ηλεκτροφόρηση των διαλυμάτων.

Αποτελέσματα: Δεν επετεύχθη αναδίπλωση των δύο πρωτεϊνών.

Συμπέρασμα: Η αδυναμία επίτευξης αναδίπλωσης των πρωτεϊνών Sky D1-D3 και GAS6 με τη μέθοδο FSAP θα μπορούσε να αποδοθεί, εκτός του ανθρώπινου παράγοντα, σε μη κατάλληλες συστάσεις για τις προκειμένες περιπτώσεις των 24 διαλυμάτων αναδίπλωσης. Πειραματισμός με διάφορες συστάσεις διαλυμάτων θα μπορούσε να δοκιμασθεί.

Όροι ευρητηρίου: πρωτεΐνη Sky, πρωτεΐνη GAS6, FSAP, γεννητικό σύστημα.

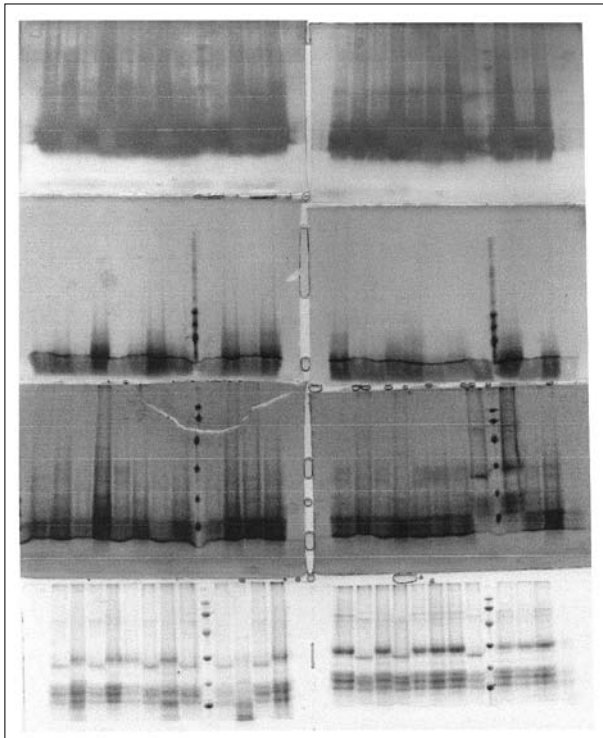
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Growth Arrest Specific 6 πρωτεΐνη (GAS6) είναι μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών που εξαρτώνται από τη βιταμίνη K. Η GAS6 μοιάζει κατά 46% με την πρωτεΐνη S, η οποία ως γνωστό ρυθμίζει αρνητικά την πήξη του αίματος¹. Αυτή η πρωτεΐνη έχει ταυτοποιηθεί ως συνδέτης (ligand) για την οικογένεια Axl/Sky των υποδοχέων κινασών της τυροσίνης, που περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες Axl (που επίσης καλείται Ufo, Ark και Tyro 7), Sky (Rse, Brt, Tif, Drk, Etk-2 και Tyro 3) και Mer (c-Egk, Nyk και Tyro 12)^{2,3,4}. Οι υποδοχείς αυτοί χαρακτηρίζονται από το εξωκυτταρικό τμήμα τους, που αποτελείται από δύο συνθέσεις που μοιάζουν με ανοσοσφαιρίνες και δύο συνθέσεις που μοιάζουν με φιμπρονεκτίνες τύπου 3.

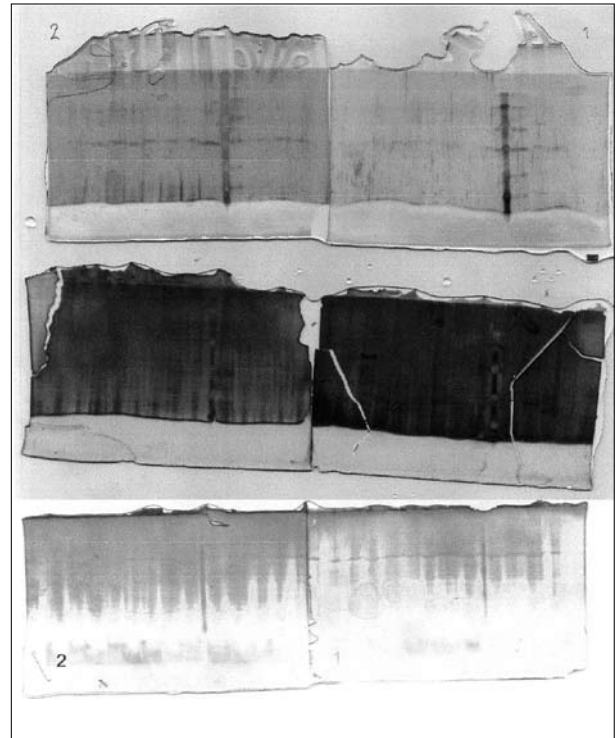
Μελέτες ήδη από την προηγούμενη δεκαετία δείχνουν ότι οι υποδοχείς αυτοί έχουν κάποιο ρόλο σε διεργασίες ανάπτυξης, λειτουργίας του αιμοποιητικού και νευρικού συστήματος και στην ογκογένεση⁵. Ειδικά για τον υποδοχέα Sky, αυτός εκφράζεται κατά κύριο λόγο στο ΚΝΣ και σε μικρότερο βαθμό στους νεφρούς, στα αιμοποιητικά κύτταρα, στους όρχεις και

School of Biological Sciences, Sussex
University, UK

Αλληλογραφία:
Θεοφάνης Βαβίλης
Πλουτάρχουν 6
55236 Πανόραμα, Θεσ/νίκη
Τηλ.: 2310345175
Κατατέθηκε: 27/11/07
Εγκρίθηκε: 19/12/07



Εικόνα 1. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης της Sky D1-D3. Από πάνω προς τα κάτω: subtilisin gel, proteinase K gel, thermolysin gel, control gel. Από αριστερά προς τα δεξιά: Πρώτο gel δείγματα 1-12, δεύτερο gel δείγματα 13-24. Ο δείκτης τοποθετήθηκε μεταξύ των θέσεων 8 και 9 και 20 και 21 αντίστοιχα.



Εικόνα 2. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης της Gas6. Από πάνω προς τα κάτω: control gel, thermolysin gel, subtilisin gel. Από αριστερά προς τα δεξιά: Πρώτο gel δείγματα 13-24, δεύτερο gel δείγματα 1-12. Ο δείκτης τοποθετήθηκε μεταξύ των θέσεων 20 και 21 και 8 και 9 αντίστοιχα.

στις ωοθήκες^{6,7,8}. Η GAS6 έχει βρεθεί να εκφράζεται μεταξύ των άλλων και στα σωματικά κύτταρα των όρχων, στο ενδομήτριο, στον καρκίνο του ενδομητρίου και στα λειομυώματα^{9,10,11,12}. Ειδικά στα τελευταία έχει βρεθεί ότι η μεταβίβαση του σήματος της GAS6 μπορεί να εμπλέκεται στην ανάπτυξη των λειομυωμάτων της μήτρας¹².

Προκειμένου να επιτευχθεί η κρυσταλλοποίηση μιας πρωτεΐνης, για να καταστεί έτσι δυνατή η μελέτη της, πρέπει αυτή να μπορεί να διατεθεί σε επαρκείς ποσότητες στην φυσική στερεοτακτική μορφή της (native state). Η παραγωγή μιας πρωτεΐνης από την *Escherichia coli*, μια ευρέως διαδεδομένη μέθοδος στον ερευνητικό και βιομηχανικό τομέα, έχει το μειονέκτημα ότι η πρωτεΐνη λαμβάνεται με τη μορφή εγκλειστών σωματίων. Επομένως, απαιτείται η εφαρμογή κάποιων μεθόδων για την μετατροπή της στην native state. Η μέθοδος FSAP (Folding Screen Assayed by Proteolysis) είναι μια μέθοδος γρήγορη, εύκολη και χαμηλού κόστους. Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν να αναδιπλώσουμε τις πρωτεΐνες GAS6 και Sky με τη μέθοδο αυτή.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Sky D1-D3 πρωτεΐνη

Τα έγκλειστα σωματίδια της Sky D1-D3 πρωτεΐνης είχαν προετοιμαστεί και διαλυτοποιηθεί σε buffer (20mM Tris-HCL, pH 8.0 6M guanidine-HCL). Η συγκέντρωση των εγκλειστών σωματίων ήταν 1mg/ml. Ήδη είχαν προετοιμαστεί τα 24 διαλύματα για την αναδίπλωση. Στον πίνακα 1 φαίνεται η σύνθεση των 24 αυτών διαλυμάτων. Δέκα μl του διαλύματος των εγκλειστών σωματίων προστέθηκαν σε 10ml από κάθε ένα από τα 24 παραπάνω διαλύματα και αραιώθηκαν ταχύτατα. Τα δείγματα που προέκυψαν επωάστηκαν για μια νύχτα στους 4°C. Την επόμενη μέρα προετοιμάστηκε το buffer διάλυσης (Tris pH 8.0). Η συσκευή διάλυσης που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από μια πλάκα 12 κυψελών, η οποία καλυπτόταν από μια ημιδιαπερατή μεμβράνη στην κάθε πλευρά της. Μετά από έλεγχο της στεγανότητας της συσκευής προστέθηκαν τα διαλύματα και υποβλήθηκαν στη διαδικασία της διάλυσης για μια νύχτα στους 4°C. Κατά τη διάρκεια της νύχτας το buffer αντικαταστάθηκε δύο φορές. Τα επεξεργασμέ-

Πίνακας 1. Τα 24 διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο FSAP. Mes και Tris Buffers: 55mM το καθένα. Υψηλή συγκέντρωση αλάτων: 264mM NaCl, 11mM KCl. Χαμηλή συγκέντρωση αλάτων: 10,56mM NaCl, 0,44mM KCl. EDTA: 1,1mM. MgCl₂, CaCl₂ 2,2mM το καθένα. CuCl₂ 7mM χαμηλή συγκέντρωση, 20mM υψηλή. PEG 4000: 0,055%. Lauryl Maltoside 0,3mM. CHAPS 0,3mM. Guanidine HCL: 550mM. Sucrose 440mM εκτός από το τελευταίο διάλυμα όπου ήταν 400mM. L-arginine 550mM εκτός από το διάλυμα 23 όπου ήταν 500μM. DTT 1mM. GSH 1mM. GSSG 0,1mM. Cysteine χαμηλής συγκέντρωσης: 1mM. Cysteine υψηλής συγκέντρωσης: 10mM. Το σημείο + δηλώνει την παρουσία της ένωσης, όπου αυτό είναι δόκιμο, ενώ το σημείο - δηλώνει την απουσία της.

Buffer and	Salt conse	Cation	PEG 4000	Detergent	Chaotrope	Polar/ non polar additive	Redox Potential
Tris 8.2	High	EDTA	+	-	-	-	DTT
MES 6.5	Low	MgCl ₂ /CaCl ₂	-	LM	+	-	GSSG/GSH 0.1
MES 6.5	Low	EDTA	+	-	+	Sucrose/ arginine	GSSG/GSH 0.1
Tris 8.2	High	MgCl ₂ /CaCl ₂	-	LM	-	Sucrose/ arginine	DTT
MES 6.5	High	MgCl ₂ /CaCl ₂	-	-	-	Sucrose	GSSG/GSH 0.1
Tris 8.2	Low	EDTA	+	LM	+	Sucrose	DTT
Tris 8.2	Low	MgCl ₂ /CaCl ₂	-	-	+	Arginine	DTT
MES 6.5	High	EDTA	+	LM	-	Arginine	GSSG/GSH 0.1
MES 6.5	High	MgCl ₂ /CaCl ₂	+	-	+	Sucrose	DTT
Tris 8.2	Low	EDTA	-	LM	-	Sucrose	GSSG/GSH 0.1
Tris 8.2	Low	MgCl ₂ /CaCl ₂	+	-	-	Arginine	GSSG/GSH 0.1
MES 6.5	High	EDTA	-	LM	+	Arginine	DTT
Tris 8.2	High	EDTA	-	-	+	-	GSSG/GSH 0.1
MES 6.5	Low	MgCl ₂ /CaCl ₂	+	LM	-	-	DTT
MES 6.5	Low	EDTA	-	-	-	Sucrose/ arginine	DTT
Tris 8.2	High	MgCl ₂ /CaCl ₂	+	LM	+	Sucrose/ arginine	GSSG/GSH 0.1
Tris 8.2	Low	-	-	-	-	-	Cystein Low
Tris 8.2	Low	-	-	-	-	-	Cystein High
Tris 8.2	Low	CuCl ₂ Low	-	-	-	-	-
Tris 8.2	Low	-	-	CHAPS	-	-	DTT
MES 6.5	Low	-	-	CHAPS	-	Arginine	Cystein High
Tris 8.2	Low	CuCl ₂ High	-	-	-	Sucrose	-

να διαλύματα φυγοκεντρήθηκαν για 20min στα 4.000g με σκοπό να αφαιρεθούν τα πιθανά καθιζήματα. Στη συνέχεια τα δείγματα που προέκυψαν συμπυκνώθηκαν με φυγοκέντρωση σε συσκευή Millipore filter (cutt-off μοριακού βάρους 3,5KDa) προς ένα τελικό όγκο 400μl. Δεδομένου ότι μόνο το υπερκείμενο στρώμα χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη φάση, τα φίλτρα προστατεύτηκαν από τυχόν εμφράξεις. Στην συνέχεια τα δείγματα διαμοιράστηκαν σε ειδικά σωληνάκια των 4X100μl για κάθε ένα από τα 24 διαλύματα. Οι πρωτεάσες που προστέθηκαν ήταν η subtilisin, thermolysin και proteinase

K. Ένα μl κάθε πρωτεάσης προστέθηκε αντίστοιχα στα τρία probes αφήνοντας το τέταρτο ως control. Μετά από δύο ώρες σταματήσαμε την αντίδραση της πρωτεάσης. Η δράση της thermolysin ανεστάλη με προσθήκη 10μl από 500mM EDTA. Η subtilisin και η proteinase K ανεστάλησαν με προσθήκη 10μl από 10mg/ml Pefa block και 10μl από PMSF αντίστοιχα. Τα δείγματα στέγνωσαν υπό κενό, επανασυστάθηκαν σε 15μl τυποποιημένου loading buffer και μετά υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Στα gel που περιείχαν το control, την thermolysin και την proteinase K χρησιμο-

πούηθηκε η χρωστική Coomassie Blue και στη συνέχεια έγινε μονιμοποίηση και αποχρωματισμός. Όσον αφορά στη subtilisin προτιμήθηκε χρώση με άργυρο.

GAS6 πρωτεΐνη

Για την πρωτεΐνη GAS6 χρησιμοποιήθηκε η ίδια μέθοδος με δύο τροποποιήσεις. Η πρώτη αφορά στη μη προσθήκη proteinase K -άρα προέκυψαν 3 probes- και η δεύτερη συνίστατο στην αρχική χρώση των gel με Coomassie Blue και στη συνέχεια, λόγω μη ικανοποιητικής χρώσης, αποχρωματισμός και εκ νέου χρώση με άργυρο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Sky D1-D3

Στην εικόνα 1 φαίνεται η ηλεκτροφόρηση των gel subtilisin, proteinase K, thermolysin και του control με τη πρωτεΐνη Sky D1-D3. Στο πρώτο αρχικά χρησιμοποιήθηκε η χρώση Coomassie Blue, αλλά λόγω μη ικανοποιητικού αποτελέσματος αποχρωματίστηκε και έγινε εκ νέου χρώση με χρωστική Silver. Στις υπόλοιπες τρεις χρησιμοποιήθηκε η χρώση Coomassie Blue. Η πρώτη μπάνα που φαίνεται στο control είναι τα έγκλειστα σωματίδια. Οι χαμηλότερες συστάδες που φαίνονται κάτωθεν της πρώτης μπάνας είναι ενδεικτικές παρουσίας πολλαπλών πρωτεϊνικών θραυσμάτων. Εάν προσέξει κανείς καλύτερα φαίνεται ότι όλα τα δείγματα δεν έτρεξαν στο ίδιο ύψος. Τα δείγματα 1, 3, 6, 8, 9, 14, 16 και 20 παρουσιάζουν μια μετατόπιση προς τα κάτω όσον αφορά και στα έγκλειστα σωματίδια και στις κατώτερες μπάνες. Τα thermolysin gel παρουσιάζουν μερική πρωτεόλυση, όπου ολιγοπεπτιδικές αλυσίδες είναι ορατές στις περισσότερες κυψέλες. Τα δείγματα 20 και 21 αυτού του σετ δεν παρουσιάζουν σημεία πρωτεόλυσης. Τα gel της proteinase K παρουσιάζουν πλήρη πρωτεόλυση. Η πρωτεόλυση αυτή είναι πολύ πιο έντονη από αυτή που παρατηρήθηκε με την thermolysin. Ένα επιπλέον προφανές σημείο είναι ότι ο δείκτης πρωτεϊνικού μεγέθους που βρίσκεται μεταξύ των κυψελών 8-9 και 20-21 παρουσίασε ανώμαλη συμπεριφορά, τρέχοντας πολύ πιο κάτω σε σύγκριση με το control και το thermolysin gel. Τέλος, η πρωτεόλυση με subtilisin είναι ακόμα πιο έντονη σε σύγκριση με τις προηγούμενες δύο. Κανένα δείγμα δεν παρουσιάζει διακριτές μπάνες, γεγονός ενδεικτικό πλήρους πρωτεόλυσης της Sky D1-D3.

GAS6 πρωτεΐνη

Στην εικόνα 2 φαίνεται η ηλεκτροφόρηση της πρωτεΐνης GAS6. Η χρώση σε όλα έγινε με χρωστική άργυρου. Και εδώ τα έγκλειστα σωματίδια είναι εμφανή στο control gel. Τα σετ των gel της thermolysin παρουσιάζουν εκτεταμένη πρωτεόλυση. Δεν παρατηρήθηκαν

διακριτές μπάνες. Τα gel subtilisin παρουσιάζουν την ίδια τάση όπως και τα αντίστοιχα της πρωτεΐνης Sky D1-D3 δεικνύοντας μια έντονη πρωτεόλυση. Η πρωτεόλυση είναι πλήρης και δεν παρουσιάστηκαν μπάνες ενδεικτικές σωστής αναδίπλωσης της πρωτεΐνης.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η πειραματική διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε δεν κατόρθωσε τελικά να επιτύχει σωστή αναδίπλωση των δύο πρωτεϊνών που μελετήθηκαν. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να δηλωθεί ότι στο εργαστήριό μας, σε προηγούμενο πείραμα, είχε επιτευχθεί με την ίδια μέθοδο αναδίπλωση άλλων τμημάτων της πρωτεΐνης Sky και συγκεκριμένα των τμημάτων D1-D2. Τόσο στην πρωτεΐνη Sky D1-D3, όσο και στην GAS6 παρατηρήθηκε μερική ως ολική πρωτεόλυση, ενδεικτικό εύρημα μη σωστής αναδίπλωμένης πρωτεΐνης. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί κατά τη γνώμη μας σε ποιοτικό υποβιβασμό των πρωτεϊνών κατά την παραγωγή και κατάψυξή τους ή σε εξωγενή επιμόλυνση των αρχικών δειγμάτων των πρωτεϊνών, που φυσικά μπορεί να χαρακτηριστεί ως ανθρώπινο λάθος, αλλά και σε μη κατάλληλη σύνθεση των 24 διαλυμάτων.

Ως προς το πρώτο, το δείγμα είχε παρασκευαστεί και καταψυχθεί στο εργαστήριό μας και δεν είχε παραγγελθεί από το ελεύθερο εμπόριο. Πιθανόν μη σωστός χειρισμός της διαδικασίας κατάψυξης-απόψυξης να υποβίβασαν την ποιότητα των πρωτεϊνών και να συνέβαλαν έτσι στην μη επίτευξη αναδίπλωσης. Το πρώτο σκέλος, δηλαδή της κατάψυξης, είχε γίνει σε προηγούμενο χρόνο και δεν μπορεί να θεωρηθεί μέρος του παρόντος πειράματος. Φυσικά, σωστό θα ήταν και η παρασκευή των πρωτεϊνών να είχε γίνει από εμάς. Ως προς το δεύτερο, δηλαδή τη σύνθεση των διαλυμάτων, επισημαίνουμε το εξής: τα διαλύματα για λόγους οικονομίας παρασκευάστηκαν από εμάς και δεν παραγγέλθηκαν από το ελεύθερο εμπόριο. Επίσης, η σύνθεση των διαλυμάτων αυτών έγινε κατά την κρίση μας και βασίστηκε, ως προς ορισμένες τροποποιήσεις, στο προηγούμενο πείραμα που αναφέραμε στην αρχή της συζήτησης, στο οποίο είχε επιτευχθεί αναδίπλωση του τμήματος D1-D2 της πρωτεΐνης Sky.

Δεδομένου ότι η μέθοδος FSAP είναι μέθοδος απλή, γρήγορη και φθηνή, πιστεύουμε ότι περαιτέρω προσπάθεια με αποφυγή πιθανών λαθών, αλλά κυρίως με τροποποίηση της σύνθεσης των διαλυμάτων, αξίζει τον κόπο να γίνει.

Summary

Vavilis Th

Protein folding attempt of Sky D1-D3 and GAS6 protein using FSAP method

Helen Obstet Gynecol 20(1):65-69, 2008

Objective: Sky D1-D3 and GAS6 proteins are in-

involved in reproductive system. The aim of this study was the folding of these proteins by FSAP method in order to be studied by means of crystallization.

Materials and methods: The inclusion bodies of Sky D1-D3 and GAS6 proteins were solubilised in denaturing buffer. An amount of these solutions was transferred in each of the 24 refolding solutions which were made previously. Upon further process the solutions were subjected to electrophoresis.

Results: No refolding conditions could be found for the two proteins in question.

Conclusion: The refolding inability of the studied proteins could possibly be attributed to non suitable conditions of the 24 refolding solutions. Further experimentation with different solution constituents and concentrations could be employed.

Key words: *sky protein, GAS6 protein, FSAP method, reproductive system.*

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Manfioletti G, Brancolini C, Avanzi G, Schneider C. The protein encoded by a growth arrest-specific gene (GAS6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Mol Cell Biol* 1993; 13:4976-4985.
2. Godowski PJ, Mark MR, Chen J, Sadick MD, Raab H, Hammonds RG. Reevaluation of the roles of proteins S and GAS6 as ligands for the receptor tyrosine kinase Rse/Tyro3. *Cell* 1995; 82: 355-358.
3. Varnum BC, Young C, Elliott G, Garcia A, Bartley TD, Fridell YW, Hunt RW, et al. Axl receptor tyrosine kinase stimulated by the vitamin K-dependent protein encoded by growth arrest-specific gene 6. *Nature* 1995; 373:623-626.
4. Chen J, Carey K, Godowski PJ. Identification of GAS6 as a ligand for Mer, a neural cell adhesion molecule related receptor tyrosine kinase implicated in cellular transformation. *Oncogene* 1997; 14:2033-2039.
5. Crosier KF, Crosier PS. New insights into the control of cell growth, the role of the Axl family. *Pathology* 1997; 29:131-135.
6. Neubauer A, Fiebeler A, Grahak DK, O'Bryan JP, Schmidt CA, et al. Expression of Axl, a transforming receptor tyrosine kinase, in normal and malignant hematopoiesis. *Blood* 1994; 84:1931-1941.
7. Prieto AL, Weber JL, Tracy S, Heeb MJ, Lai C. GAS6, a ligand for the receptor protein-tyrosine kinase Tyro3, is widely expressed in the central nervous system. *Brain Res* 1999; 816:646-661.
8. Matsubara N, Takahashi Y, Nishina Y, Mukouyama Y, Yanagisawa M, Watanabe T, et al. A receptor tyrosine kinase, Sky and its ligand GAS6 are expressed in gonads and support primordial germ cell growth or survival in culture. *Dev Biol* 1996; 180(2):499-510.
9. Chan MCW, Mather JP, Mccray G and Lee WM. Identification and regulation of receptor tyrosine kinases Rse and Mer and their ligand GAS6 in testicular somatic cells. *J Androl* 2000; 21:291-302.
10. Sun WS, Misao R, Iwagaki S, Fujimoto J and Tamaya T. Coexpression of growth arrest-specific gene 6 and receptor tyrosine kinases Axl and Sky in human uterine endometrium and ovarian endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2002; 8:552-558.
11. Sun WS, Fujimoto J, Tamaya T. Coexpression of growth arrest-specific gene 6 and receptor tyrosine kinases Axl and Sky in human uterine endometrial cancers. *Ann Oncol* 2003; 14:898-906.
12. Sun WS, Fujimoto J, Tamaya T. Clinical implications of coexpression of growth arrest-specific gene 6 and receptor tyrosine kinases Axl and Sky in human uterine leiomyoma. *Mol Hum Reprod* 2003; 9(11):701-707.