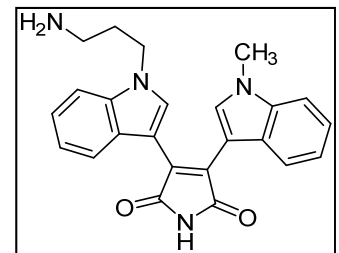


Isolation of drug target protein (2) Protein kinase inhibitors [Bisindolylmaleimide]

Summary

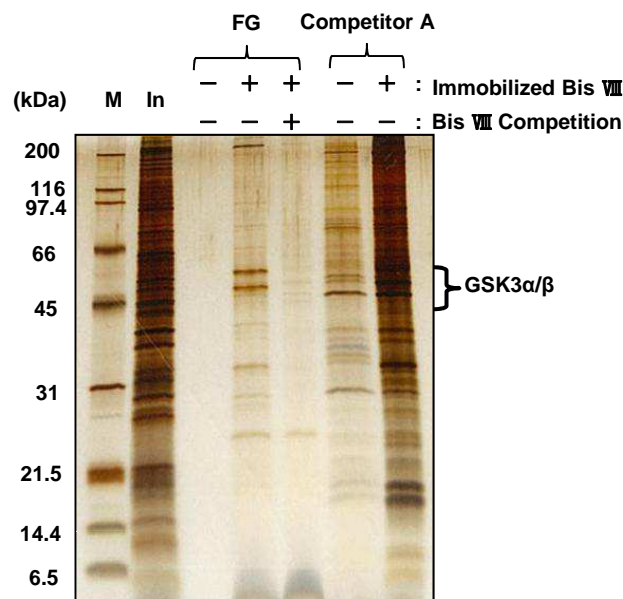
プロテインキナーゼはリン酸基を他分子に付加する(リン酸化する)酵素です。
今回、ある条件下におけるビスインドリルマレイミドⅧ (Bis Ⅷ) のターゲットタンパク質を分離する実験を行ったので紹介します。
ビスインドリルマレイミドは、プロテインキナーゼC (PKC) の強力な阻害剤として報告されましたが、その後 GSK3 α/β ¹⁾、CDK2²⁾、Rsk³⁾ などの他キナーゼに対しても阻害活性があることが報告されています。
本実験ではFGビーズへBis Ⅷを固定化し、TPA等の処理をしていないHeLa細胞抽出液から結合タンパク質をアフィニティ精製しました。
その結果、いくつかの結合タンパク質が精製され、その中でBis Ⅷの主要結合タンパク質としてGSK3 α/β がウェスタンブロットングおよびMS解析により同定されました。
精製される主要タンパク質の種類はFG beadsに固定化する化合物量によって変化します。



Bisindolylmaleimide Ⅷ

Result

- FGビーズと他社磁性ビーズAを使用していくつかの結合タンパク質が回収されました。
ビーズとの反応前に前にHeLa細胞抽出液へフリーのBisⅧを添加すると、いくつかのタンパク質の回収量が減少しました。これはそれらのタンパク質が特異的にBisⅧと結合することを示しています。
バンドの濃さから、回収量が一番多い結合タンパク質を選択し、その分子量から文献2を参考にGSK3 α/β と予測し、ウェスタンブロットングにより確認しました。
更に質量分析により、GSK3 α/β であることが確認できました。
- 他社磁性ビーズとの比較も実施しました。
FGビーズが極めてバックグラウンドが低いということが確認できました。



文献1) Nihar R, Jena. Journal of Molecular Modeling 18 (2012) 631-644
文献2) Brehmer, D., Godl, K., Zech, B., Wissing, J., and Daub, H. Molecular & Cellular Proteomics 3.5 (2004) 490-500
文献3) Roberts, NA., Haworth, RS., Avkiran, M., J Pharmacol. 145(4) (2005) 477-489

Materials and method

Materials

1. Bisindolylmaleimide VIII
2. NHS beads
3. HeLa cell extracts (cytosolic fraction) – 3mg/ml
4. Binding & Washing Buffer (20mM HEPES-NaOH(pH7.9), 100mM KCl, 1mM MgCl₂, 0.2mM CaCl₂, 0.2mM EDTA, 10%(v/v) glycerol, 0.1% NP-40, 1mM DTT, 0.2mM PMSF)
5. Elution Buffer (0.0625M Tris-HCl (pH6.8), 0.005% BPB, 2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercapto ethanol)
6. Mouse monoclonal anti-GSK3α/β (from Santa Cruz Biotechnology)
7. Anti-Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab Sheep (from GE Healthcare)
8. Starting Block™ (TBS) Blocking Buffer (from Thermo scientific)
9. TBS-T buffer (137mM NaCl, 2.68mM KCl, 25mM Tris-HCl, pH7.4, 0.1w/v% Tween-20)

Methods 1 (Immobilization)

1. Apply

FG beads

- 0.5mg NHS beads and 0.1mM Bis VIII in 100ul DMF
- 0.5mg NHS beads and NO Bis VIII in 100ul DMF (Negative Control)

Competitor A

- 0.5mg NHS beads and 1mM Bis VIII in 100ul DMF
- 0.5mg NHS beads and NO Bis VIII in 100ul DMF (Negative Control)

2. Reaction

1) Immobilization

70min at r.t.

2) Masking

Inactivate unreacted NHS according to recommended conditions of each beads.

Methods 2 (Affinity purification)

1. Wash

Wash beads with washing buffer 3 times at 4°C (on ice).

2. Add sample solution

Add 1000ul HeLa cell extracts (Bis VIII Competition : -) or Bis VIII added HeLa cell extracts (Bis VIII Competition : +) to beads. (0.1mM Bisindolylmaleimide VIII is added to HeLa cell extracts and preincubated for 120min before incubation with the beads.)

3. Reaction

Incubate for 240min at 4°C.

4. Wash

Remove sample solution.
Wash beads with washing buffer 3 times at 4°C (on ice).

5. Elution

Add 40ul elution buffer and resuspend beads.
Boil for 5min at 98°C and remove beads.

Analyze the samples by SDS-PAGE and silver staining.

Methods 3 (Western blotting)

Perform SDS-PAGE and transfer the protein to a PVDF membrane. Block the membrane with the blocking buffer for 15min at room temperature. Dilute the anti-GSK3α/β antibody with the blocking buffer to 1/200. Incubate for 60min at room temperature. Dilute the secondary antibody with the TBS-T buffer to 1/1000. Incubate for 60min at room temperature. Wash the membrane with TBS-T buffer three times. Detect with a chemiluminescence substrate.

FG beads information

Product name	NHS beads
Product number	TAS8848N1141
Storage temperature	-20°C
Storage buffer	Isopropyl alcohol
Size of beads	190nm ± 20nm
Functional groups	200 - 300nmol/mg

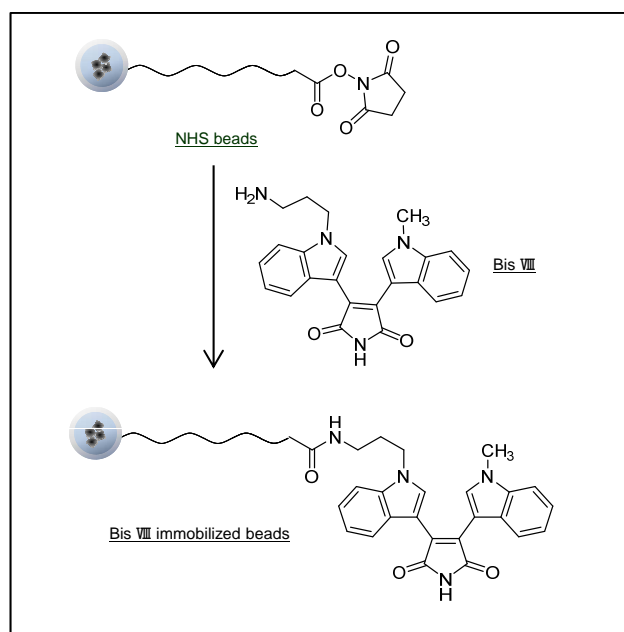


Fig.1 Immobilization of Bis VIII on NHS beads

Methods 4 (MS)

Excising the bands from the gel.
Wash the band pieces, then dry the band pieces.
Add 500ul/band of 10mM DTT/25mM NH₄HCO₃.
Incubate for 60min at 56°C.
Add 500ul/band of 55mM iodeacetamide/25mM NH₄HCO₃.
Incubate for 60min at room temperature.
Wash the band pieces with 200ul of 25mM NH₄HCO₃ for 10min.
Wash the band pieces with 500ul of 25mM CH₃CN/NH₄HCO₃ (50:50 v/v) for 10min.
Dry the band pieces.
Add 10ul/band of 10ug/ml trypsin in 25mM NH₄HCO₃.
Incubate overnight at 37°C.
Add 50ul/band of 25mM CH₃CN/trifluoroacetic acid/ultrapurewater (50:5:45 v/v).
Incubate for 30min at room temperature.
Transfer supernatant to a new clean tube.
Dry the peptides in the tube.
Injection on the MS.