

Studi SHP dan Protein Stat pada Transduksi Signal Hormon Pertumbuhan (*Growth Hormone*) dengan Teknik *Blotting*

A Study on SHP in Termination Signal Transducers and Activators of Transcription (Stat) Signaling Protein Activated Growth Hormone Using Blotting Technique

Anwar Ma'arif¹, Nove Hidajati²
Laboratorium Ilmu Faal, Departemen Kedokteran Dasar Veteriner¹
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga Surabaya
Telp : 031-5992785 psw.305 E-mail: an_ma@telkom.net

Abstract

The long-term objective of this study was to identify the expression pattern of SHP1 signaling protein in *broiler* during growth period due to increase of growth hormone (GH). This study used ten male *broilers* Lohman (MB 202 P) from PT. Multibreeder Indonesia Tbk. *Broilers* were kept within batheried cage, with a capacity of one *broiler*. The *broilers* were fed twice a day at 6 a.m. and 6 p.m. with the amount of feed 10% less than standard. At day 21 the *broilers* were sacrificed to obtain samples of liver for (1) isolation of SHP1 protein from liver, and muscles of the *broiler*, (2) analysis of SHP1 protein using SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoreses) method, and (3) identification of SHP1 protein using Western blot method by means of protein detection using electrophoresis with polyacrylamide gels. Results of examination on protein in hepatic tissue of *broilers* in growth period using dot blot revealed that SHP1 protein was present in those tissues. This finding was followed-up with SDS-PAGE examination, from which we found existence of protein band between the markers of 55 and 84 kDa, with molecular weight of 68 kDa. To prove that protein band formed between marker 55 and 84 kDa was the SHP1, Western blot examination was conducted using mouse monoclonal antibody SHP1. The result showed formation of the protein band, indicating presence reaction between antigen SHP1 protein and SHP1 protein antibody. In conclusion, SHP1 protein is presence in hepatic tissue, with molecular weight of 68 kDa

Keywords : *broiler*, SHP1, growth hormone

PENDAHULUAN

Reseptor GH adalah anggota famili reseptor sitokin yang diketahui berasosiasi dengan dan mengaktifkan tirosin kinase (Endo *et al.*, 1997). Terikatnya GH dengan reseptornya dapat mengaktifkan *Janus Kinase 2* (JAK 2) dan selanjutnya memfosforilasi tirosin dalam kompleks GH-reseptor-JAK 2. Tirosin ini kemudian membentuk tempat ikatan untuk sejumlah protein *signaling*, seperti *signal transducers and activators of transcription* (STAT). *Growth hormone* diketahui mengaktifkan STATs 1, 3, 5A dan 5B. Aktifnya protein STAT akan mempengaruhi pola ekspresi dan

gen target. Untuk mengakhiri *signaling* protein STAT yang diaktifkan GH ternyata diperlukan suatu protein fosfatase SHP1 dan SHP2. Dua fosfatase tersebut sangat berperan sebagai regulator negatif *signaling* yang diaktifkan GH.

Pada tikus GH akan mengikat reseptor pada plasma membran. Kompleks GH-GHR (*growth hormone reseptor*) adalah bagian dari *recycle* dimana reseptor selalu disintesis oleh *golgi apparatus* dan kemudian ditransfer ke plasma membran. Kadar GHR plasma meningkat sesuai dengan pulsatil GH plasma. Reseptor yang disekresi *golgi*

² Departemen Biokimia Veteriner Departemen Ilmu Kedokteran Dasar Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya

apparatus dengan yang ada dalam plasma membran akan disesuaikan dengan pulsatil GH sehingga dapat disimpulkan bahwa GHR banyak terdapat di *golgi apparatus* dan kemudian ditransfer ke plasma membran yang selnya peka terhadap GH (Vleuric, 1996). Efek GH sangat dipengaruhi oleh terikat tidaknya GH dengan GHR. Mutasi gen GHR (*deletions, abnormal splicing, missense mutation*) akan menurunkan atau mencegah pengikatan GH ditempat target.

Dengan mengetahui struktur dan susunan asam amino protein SHP-1, maka ada peluang besar untuk membuat protein spesifik yang dapat memperlambat kerja SHP1 dan SHP2 sehingga efek metabolik GH menjadi lebih lama. Sayangnya penelitian tentang protein SHP banyak dilakukan pada tikus, mencit, domba dan manusia, sedangkan pada ayam pedaging belum banyak dilakukan.

METODE PENELITIAN

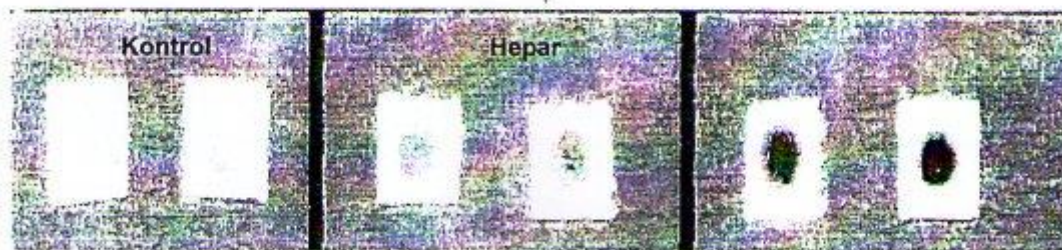
Penelitian ini menggunakan sampel berupa hepar ayam pedaging jantan galur *Lohman* (MB 202 P) yang dipelihara mulai umur 1 hari sampai dengan 21 hari. Ayam ditempatkan dalam kandang baterai dengan kapasitas satu ekor satu kandang dengan mendapat pakan dua kali sehari yaitu pukul 06.00 WIB dan 18.00 WIB dengan jumlah 10 % lebih kecil dari standar. Pada umur 21 hari ayam dipotong untuk diambil sampelnya berupa jaringan hepar untuk dilakukan pemeriksaan sebagai berikut (1) Isolasi protein fosfatase SHP-1 dari jaringan hepar ayam pedaging, (2) Analisis protein fosfatase SHP-1 dari jaringan hepar ayam pedaging dengan menggunakan metode *dot blot* dan kemudian dilanjutkan dengan SDS-PAGE (3) Identifikasi berat molekul protein fosfatase

SHP-1 dengan metode *blotting* yaitu teknik *Western Blot* dengan menggunakan protein yang diuraikan secara *elektrophoreses* dari gel *polyacrylamide*. Antibodi yang digunakan untuk *Western Blotting* adalah *Mouse Monoclonal Antibody SHP-1 Ab-1* (Clone 1SH01, 11D7C8H5) dari *Lab Vision Corporation*.

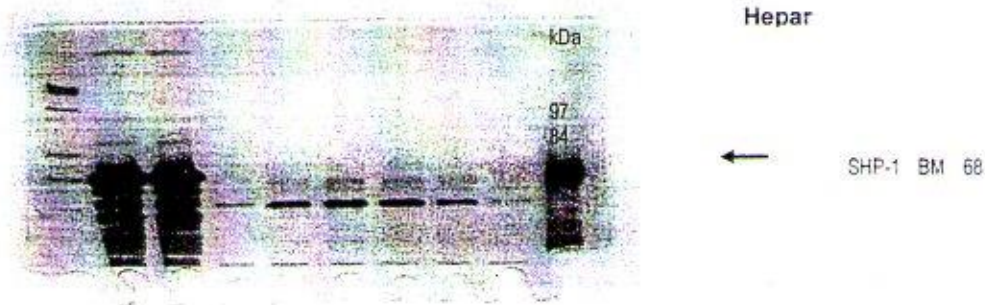
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pemeriksaan protein SHP-1 dengan *dot blot* menunjukkan bahwa pada jaringan hepar positif adanya protein SHP-1 seperti pada Gambar 1. Hasil *dot blot* menunjukkan bahwa protein SHP-1 ditemukan pada jaringan hepar ayam pedaging fase pertumbuhan. Protein SHP-1 yang ada pada hepar terlihat sangat jelas. Protein SHP-1 yang ada pada hepar diduga ada kaitannya dengan fungsi dan peran *growth hormone* dalam menimbulkan efek metabolik. Efek metabolik *growth hormone* diantaranya adalah meningkatkan sintesis protein, menurunkan penggunaan karbohidrat sebagai sumber energi dan meningkatkan penggunaan lemak sebagai sumber energi.

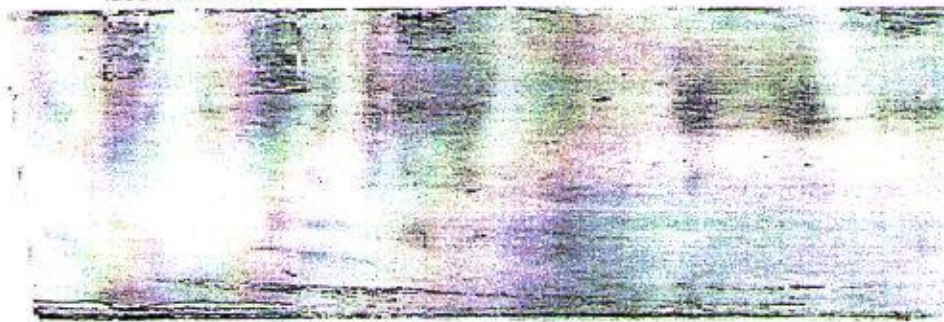
Protein fosfatase SHP-1 yang ada di hepar ada kaitannya dengan fungsi GH dalam memacu pertumbuhan secara tidak langsung yaitu dengan merangsang sekresi hormon *insulin-like growth factor I* (IGF-I) dari hepar. Peningkatan IGF-I selanjutnya akan merangsang pertumbuhan. Hasil SDS-PAGE protein SHP-1 pada jaringan hepar menunjukkan adanya protein SHP-1 seperti pada Gambar 2. Berdasarkan hasil *dot blot* bahwa pada jaringan hepar terdapat protein SHP-1, maka kemudian dilanjutkan uji analisis protein SHP-1 yang ada pada jaringan



Gambar 1. Hasil dot blot jaringan hepar ayam pedaging fase pertumbuhan



Gambar 2. Hasil SDS-PAGE protein fosfatase SHP-1 jaringan hepar ayam pedaging fase Pertumbuhan



Gambar 3. Hasil *Western blot* protein SHP-1 jaringan hepar ayam pedaging fase pertumbuhan

an tersebut dengan SDS-PAGE. Hasil SDS-PAGE menunjukkan bahwa terdapat beberapa pita yang tampak pada marker 97 dengan 84 kDa, terdapat satu pita protein, marker 84 dengan 55 kDa terdapat dua pita protein dan marker 55 kDa juga terdapat satu pita protein. Sedangkan antara marker 55 dengan 36 kDa terdapat dua pita protein.

Pita protein yang terbentuk antara marker 84 dengan 55 kDa diduga protein SHP-1. Pita protein yang terbentuk pada hepar sangat jelas. Hal ini sesuai dengan hasil dot blot yang juga menunjukkan bahwa pada jaringan hepar tampak terjadi reaksi antigen antibodi paling kuat. Hasil SDS-PAGE protein jaringan hepar yang menunjukkan adanya pita protein antara marker 84 dengan 55 kDa adalah protein dengan berat molekul 68 kDa. Protein berat molekul 68 kDa hasil SDS-PAGE belum menunjukkan secara pasti apakah itu protein SHP-1 atau tidak. Hal ini dikarenakan

diantara marker tersebut juga terbentuk beberapa pita protein yang lain. Untuk membuktikan bahwa terbentuknya pita protein dengan berat molekul 68 kDa adalah protein SHP-1 maka perlu dilakukan pemeriksaan dengan *Western blot*.

Hasil *Western blot* protein SHP-1 pada jaringan hepar menunjukkan adanya protein SHP-1 dengan berat molekul 68 kDa, seperti pada gambar 3. Untuk memastikan bahwa hasil analisis protein dengan SDS-PAGE adalah protein SHP-1 maka dilakukan *Western blot* dengan menggunakan *mouse monoclonal antibody* SHP-1 Ab-1 (*Lab Vision Corporation*). Pada gambar 3 tampak terbentuk satu pita protein dengan berat molekul 68 kDa. Pita protein yang terbentuk pada jaringan hepar kurang begitu jelas. Terbentuknya pita protein dengan berat molekul 68 kDa menunjukkan bahwa protein hasil SDS-PAGE yang diuji dengan *Western blot* adalah benar protein SHP-1. Hal ini

karena terjadi ikatan antara protein SHP-1 hasil SDS-PAGE dengan *mouse monoclonal antibody* SHP-1, sedangkan SHP 2 belum bisa ditentukan karena hanya menggunakan *mouse monoclonal antibody* SHP-1 Ab-1.

Protein SHP-1 dengan berat molekul 68 kDa pada jaringan hepar menunjukkan bahwa pada ayam pedaging fase pertumbuhan protein SHP-1 sama dengan yang ada pada manusia. Diharapkan dengan diketahuinya protein SHP-1 pada ayam pedaging akan menjadi dasar untuk mengetahui sejara jelas mekanisme *growth hormone* dalam mengatur pertumbuhan dan metabolisme tubuh.

Growth hormone memainkan peran dalam mengatur pertumbuhan dan komposisi tubuh (Foster, 1998). *Growth hormone* secara nyata mempunyai efek biologik yang dipengaruhi oleh *insulin-like growth factor 1* (IGF-I) dalam meningkatkan pertumbuhan otot skelet (Younken, 2000). Pemberian faktor pertumbuhan secara *in vivo* pada ayam pedaging menyebabkan peningkatan kecepatan pertumbuhan dan massa otot sebesar 15 % dan diperlukan pakan 6,5 % lebih sedikit dari pakan normal. Peningkatan pertumbuhan ini mempunyai implikasi dan daya tarik yang besar bagi dunia perunggasan. Tetapi pola ekspresi gen faktor pertumbuhan selama masa pertumbuhan sampai saat ini belum diketahui secara jelas (Killefer, 2000).

Protein STAT berperan penting dalam regulasi transkripsi gen oleh GH dan sitokin lain yang mengaktifkan *Janus Kinase* (JAK). Protein STAT yang semula diidentifikasi dalam jalur *signaling* interferon (IFN) (Darnell *et al.*, 1994) adalah faktor sitoplasmik yang mengandung domain SH-2. Pada fosforilasi tirosil yang sering melalui kaskade berinisiasi JAK kinase, protein STAT sitoplasma membentuk suatu kompleks dengan protein STAT lain melalui interaksi tirosin yang mengalami fosforilasi pada domain SH-2, mengadakan translokasi menuju ke nukleus, berikatan dengan DNA, dan selanjutnya mengaktifkan transkripsi pada gen sasaran. (Ihle, 1996).

Growth hormone diketahui mengaktifkan STATs 1, 3, 5A dan 5B. Fosforilasi tirosil STATs 1, 3, 5A dan 5B yang tergantung GH dijumpai dalam fibroblas 3T3-

F442A, hepar tikus yang mengalami hipofisektomi, biakan sel hati dan pada berbagai sistem overekspresi. Fosforilasi tirosil STATs 5A dan 5B juga dijumpai pada sel IM-9 manusia dan otot hepar serta otot rangka tikus normal (Smit *et al.*, 1999).

STAT1 yang juga disebut P91, diidentifikasi sebagai anggota kompleks gen faktor 3 yang yang dirangsang oleh IFN α (FU, 1992). Analisis *signaling* GH pada sel defisiensi JAK2 dan sel yang mengalami mutasi dalam mengekspresikan reseptor GH menunjukkan bahwa aktivasi STATs 1, 3, 5A dan 5B yang tergantung GH memerlukan aktivasi JAK2 (Smit *et al.*, 1997). Hal ini sesuai dengan temuan bahwa aktivasi JAKs diperlukan untuk aktivasi STAT (Muller *et al.*, 1993). JAK1 atau JAK2 yang diekspresikan berlebih secara aktif dalam sel COS akan merangsang terikatnya STAT1 ke DNA (Silvennoinen, 1993).

Penelitian tidak langsung menunjukkan bahwa GH menstimulasi fosforilasi STATs 1, 3 dan 5 pada serin atau treonin dalam hepar. Fosforilasi ini akan meningkatkan pengikatan DNA STAT1, DNA STAT3 dan mengubah secara substansial pengikatan DNA STAT5 (Ram *et al.*, 1996). STAT 1, 3, dan 5A mengandung *conserved consensus sequence* untuk fosforilasi yaitu MAP kinase dan penelitian awal menunjukkan bahwa MAP kinase bertanggung jawab atas fosforilasi seril STAT1, STAT3 dan STAT5A. Sedangkan STAT5B karena tidak mengandung *conserved consensus sequence* maka fosforilasi dilakukan oleh kinase lain selain MAP kinase. Protein STAT 1, 3, 5A dan 5B juga mengandung protein kinase C dan kasein kinase untuk proses fosforilasi. Hal ini menunjukkan bahwa jalur *signaling* ganda dapat menyatu pada protein STAT untuk aktivasi transkripsi oleh GH.

Terminasi *signaling* protein STAT yang diaktifkan GH melibatkan dua jenis peristiwa *signaling*: (1) defosforilasi tirosin pada GHR, JAK2 dan STATs oleh fosfatase, (2) ekspresi protein *suppressors of cytokine signaling* (SOCS). Terminasi *signaling* protein STAT yang diaktifkan GH memerlukan aktivasi tirosin fosfatase pada kompleks GHR/JAK2. Fosfatase ini selanjutnya akan mendefosforilasi GHR, JAK2 dan STAT untuk mengadakan *down-regulate signaling*.

Karena STAT memerlukan GHR terfosforilasi untuk *docking* dan aktivasi selanjutnya oleh JAK2 maka defosforilasi GHR diduga akan mengakhiri aktivasi STAT. Defosforilasi GHR juga menandai terjadinya degradasi (Gebert *et al.*, 1999). Defosforilasi tirosin dalam domain kinase JAK2 diduga akan menginaktivkan JAK2, sedangkan defosforilasi tirosin dalam STAT akan menghambat pengikatan DNA sehingga akan mengakhiri *signaling*.

Fosfatase yang berperan sebagai *regulator* negatif *signaling* protein STAT yang diaktifkan GH adalah SHP-1 dan SHP-2 yang mengandung domain SH2 (Feng *et al.*, 1993). SHP-1 diketahui sebagai *regulator* negatif *signaling* JAK/STAT yang diperantari reseptor sitokin dalam sel hematopoietik (Haque *et al.*, 1998). SHP-1 akan berasosiasi dengan JAK2 untuk mendefosforilasi JAK2 pada hepar (Heckett *et al.*, 1997). SHP-1 dan SHP-2 dianggap sebagai fosfatase potensial untuk STAT 5 (Yu *et al.*, 2000). SHP-2 berasosiasi dengan GHR sebagai respon terhadap GH, mutasi residu tirosin dalam GHR yang berfungsi sebagai tempat pengikatan SHP-2 akan memperpanjang fosforilasi tirosil GHR, JAK2 dan STAT5B sehingga efek metabolik GH semakin lama (Stofega *et al.*, 2000).

KESIMPULAN

Protein SHP-1 terdapat pada jaringan hepar ayam pedaging fase pertumbuhan dengan berat molekul untuk SHP1 68 kDa.

DAFTAR PUSTAKA

- Darnell J, Lodish H, Baltimore D., 1990. Molecular cell biology. 2nd Edition, New York : Scientific America Books, p 715
- Endo TA, Masuhara M, Yokuuchi M, *et al.*, 1997. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 387: 921-924
- Feng GS, Hui CC and Pawson T., 1993. SH2-containing phosphotyrosine phosphatase as a target of protein-tyrosine kinases. *Science* 259:1607-1611
- Foster DN, Froudman JA, Harmon SA, Foster LK., 1998. Baculovirus-mediated expression of chicken GH. *Tektran* p 14
- Fu XY., 1992. Transcription factor p91 interacts with the EGF receptor and mediates activation of the c-fos gene. *Cell* 70, 323-335
- Gebert CA, Park S-H and Waxman DJ., 1999. Termination of growth hormone pulse-induced STAT5b signaling. *Mol Endocrinol.* 13:38-56
- Hackett RH, Wang YD, Sweitzer S *et al.*, 1997. Estrogen Inhibits GH Signaling by Suppressing GH-Induced JAK2 Phosphorylation, an Effect Mediated by SOCS-2. *J. Biol Chem.* 272:11128-11132
- Haque SJ, Harbor P, Tabrizi M *et al.*, 1998. Protein-tyrosine phosphatase Shp-1 is a negative regulator of IL-4- and IL-13-dependent signal transduction. *J. Biol Chem.* 273 33893-33896
- Ihle JN., 1996. STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* 84: 331-334
- Killefer K, Kenny PB., 2000. *Anim Vet Sci* 18:77
- Muller M, Briscoe J, Laxton C *et al.*, 1993. The state of the STATs: recent developments in the study of signal transductions to the nucleus. *Nature* 366: 129-135
- Ram PA, Park SH, Choi HK and Waxman DJ., 1996. Growth hormone activation of Stat 1, Stat 3 and Stat 5 in rat liver. Differential kinetics of hormone desensitization and GH-stimulation of both tyrosine phosphorylation and serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem* 271:5929-5940
- Savendahl L., 1999. Fasting increases serum total cholesterol, LDL cholesterol and apolipoprotein B in healthy, nonobese human. *J Nutr* 129:2005-2008
- Silvennoinen O, Ihle JN, Schlessinger J and Levy DE., 1993. Interferon-induced nuclear signalling by Jak protein tyrosine kinases. *Nature* 366: 583-585
- Smit LS, Meyer DJ, Argetsinger LS *et al.*, 1999. *Handbooks of Physiology*. Oxford University Press: New York, pp445-480.
- Smit LS, VanderKuur JA, Stimage *et al.*, 1997. Growth Hormone-Induced Tyrosyl Phosphorylation and Deoxyribonucleic Acid Binding Activity of Stat5A and Stat5B. *Endocrinology* 138:3426-3434
- Stofega MR, Wang H, Ullrich A and Carter-Sue C., 2000. *J Biol Chem*. Submitted
- Vleuic L, Van Veldhoven PP, Decuypera E, Khun ER., 1996. Distribution of GH receptors in chicken liver. In Abstract Form : International Symposium on Avian Endocrinology Chateau Lake Louise, Alberta, p 30
- Younken RV, Zaou Y, Wang X *et al.*, 2000. *J Endocrinol* 166:620-690
- Yu C-L, Jin Y-J and Burakoff SJ., 2000. Cytosolic tyrosine dephosphorylation of STAT5: potential role of SHP-2 in STAT5 regulation. *J Biol Chem*. 275:599-604