

ANALISIS IN-SILICO PROTEIN TIOL-DISULFIDA ISOMERASE FAMILI *Bacillus*

Maureen Kumaunang¹, Jemmy Abidjulu¹ dan Vanda S. Kamu¹

¹Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Sam Ratulangi, Manado

Diterima 19-09-2010; Diterima setelah direvisi 27-10-2010; Disetujui 29-10-2010

ABSTRACT

Kumaunang *et al.*, 2010. Characterization of transcript genome product from Chaperone *Bacillus* sp. RP1.

Protein folding is facilitated by chaperone molecule an folding catalyst. The aim of this research was to characterize the gene product of thiol-disulfide oxidoreductase gene from thermophilic organism *Bacillus* sp. Method used in this research were isolation and purification of deduced gene and characterization of gene product. The result showed that isolated gene has 1.4 kbp in length. Characterization of gene product indicated three proteins, Bdbdred, Bdbdcox, and Etda, that have thioredoxin and DsbA motifs, and also active site and bonding site with Zn. Structure prediction of these three proteins showed similarity among them.

Keywords : chaperone, thiol-disulfide oxidoreductase, thioredoxin, DsbA, Bdbd

PENDAHULUAN

Keberadaan protein dalam sel tidak hanya bergantung pada kebenaran proses transkripsi dan translasi (Wickner *et al.*, 1999). Untuk menjadi molekul protein yang aktif dan memiliki fungsi fisiologis, molekul protein harus mengalami proses pelipatan untuk mencapai konformasi tiga-dimensi yang tepat (Hartl dan Hartl, 2002). Pelipatan protein membutuhkan bantuan molekul *chaperone* serta katalis pelipatan. Paradigma mendasar dari molekul *chaperone* adalah bahwa molekul *chaperone* mengenal dan mengikat bentuk protein non-natif secara selektif untuk membentuk struktur kompleks yang stabil (Fink, 1999).

Kebanyakan rantai polipeptida yang dihasilkan ribosom memerlukan perlindungan terhadap kondisi lingkungan, seperti *heat-shock* (kejutan panas) dan stres oksidatif (Wickner *et al.*, 1999). Kondisi lingkungan di bawah tekanan seperti itu dapat menyebabkan molekul protein tidak melipat atau bahkan salah melipat. Protein yang tidak melipat atau yang salah melipat dapat mengalami interaksi dengan permukaan hidrofobik protein non-natif lainnya. Hal ini dapat menyebabkan terjadinya agregasi pada protein yang merupakan pemicu timbulnya berbagai jenis penyakit, seperti Alzheimer dan Parkinson. Selain itu, kesalahan pelipatan protein dapat menyebabkan protein mengalami degradasi. Degradasi protein merupakan pemicu timbulnya sejumlah penyakit, misalnya *cystic fibrosis*, retinitis pigmentosa, dan penyakit Gaucher (Dobson, 2001).

Untuk mencegah terjadinya kesalahan dalam pelipatan protein dibutuhkan sistem *chaperone*, yang berfungsi membantu proses pelipatan protein dan juga dapat membantu pelipatan kembali molekul protein yang telah salah melipat (Bukau dan Horwich, 1998). Molekul *chaperone* DnaJ merupakan molekul homodimer, yang terdiri dari empat domain, yaitu domain-J, GF-region, Cys-rich, dan domain terminal-C. Domain Cys-rich memiliki empat motif yang mirip dengan urutan asam amino -CXXCXXG-, yang merupakan motif lestari tioredoksin, protein pengkode oksidoreduktase sehingga diduga memiliki aktivitas tiol-disulfida oksidoreduktase (Crouy-Chanel *et al.*, 1995).

Berdasarkan pemikiran adanya aktivitas tiol-disulfida oksidoreduktase dalam *chaperone*, membuat penelitian ini akan dilaksanakan untuk mengkarakterisasi produk gen tiol-disulfida oksidoreduktase dari sumber organisme termofilik *Bacillus*.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bacillus sp. RP1 diperoleh dari Laboratorium Protein dan Enzim, Departemen Kimia, ITB (Putra, 1999). *Escherichia coli* Top10 (*F-mcrA*, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), ϕ 80*lacZ* Δ *M15*, Δ *lacX74*, *recA1*, *araD139*, *galU*, *galK*, Δ (*ara-leu*)7697, *rpsL* (*StrR*), *endA1*, *nupG*), diperoleh dari Laboratorium Protein

dan Enzim, Departemen Kimia, ITB, dan digunakan sebagai sel inang untuk perbanyak DNA plasmid. Plasmid yang digunakan adalah pGEM[®]-T (*Promega*) yang diperoleh dari Laboratorium Rekayasa Genetika, eks KPP Bioteknologi, ITB.

Amplifikasi Gen dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Primer yang digunakan dalam proses PCR dirancang berdasarkan urutan nukleotida gen *PDI-like* dari operon *DnaK B. stearothermophilus* (Q45552). Komposisi reaksi PCR terdiri atas templat DNA kromosom *Bacillus* sp. RP1 ± 200 ng, primer *forward*, DJF1 1 µM, primer *reverse*, DJR2 1 µM, dNTP *mix* 0,2 µM, bufer PCR 1X, MgCl₂ 2 mM, dan *Taq* Polimerase sebanyak 1,25 unit. Reaksi PCR dilakukan dalam volume total 20 µL. Denaturasi templat DNA dilakukan pada suhu 94 °C selama 1 menit. *Annealing* dilakukan pada suhu 48 °C selama 1 menit. Polimerisasi dilakukan pada suhu 72 °C selama 1,5 menit. Siklus ini dilakukan sebanyak 25 kali.

Pemurnian Fragmen DNA

Fragmen DNA hasil reaksi PCR dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa. Fragmen DNA dimurnikan dengan *GFX[™] PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (*Amersham Pharmacia Biotech*). Gel agarosa yang mengandung fragmen DNA dipotong dan ditimbang. Untuk setiap miligram potongan gel ditambahkan 10 µL *capture buffer* dengan volume akhir tidak melebihi 300 µL. Campuran dihomogenkan dengan cara divorteks, dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu 60 °C selama 5 – 15 menit agar semua gel larut. Campuran yang telah homogen dimasukkan ke dalam kolom *GFX*, diinkubasi selama 1 menit pada temperatur ruang, selanjutnya disentrifugasi pada 13.600 x g selama 30 detik. Supernatan dibuang, kemudian kolom dicuci dengan 500 µL bufer pencuci, lalu disentrifugasi pada 13.600 x g selama 30 detik. Kolom *GFX* yang mengikat fragmen DNA dimasukkan ke tabung *Eppendorf* 1,5 mL, kemudian elusi dengan 40 µL ddH₂O steril dan diinkubasi selama 2 menit pada suhu ruang. Setelah itu, campuran disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 13.600 x g. Fragmen DNA hasil pemurnian dielektroforesis pada tegangan 80 V selama 30 menit. Konsentrasi relatif DNA ditentukan dengan cara membandingkan intensitas pita DNA dengan pita DNAλ/*Hind*III yang digunakan sebagai marker yang telah diketahui konsentrasinya.

Penentuan Urutan Nukleotida Gen *Chaperone Bacillus* sp.

Penentuan urutan nukleotida dilakukan dengan memanfaatkan fasilitas dan prosedur *sequencing* dari *Macrogen* (www.macrogen.com).

Karakterisasi Produk Gen *Chaperone Bacillus* sp.

Fragmen DNA hasil PCR dianalisis produk gen-nya secara *in-silico* dengan menggunakan DNASTar, ClustalX, dan *GeneDoc*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi Gen dengan Menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Elektroforegram hasil PCR ditunjukkan dalam Gambar 1.



Gambar 1. Elektroforegram hasil PCR. Lajur 1 adalah marka DNAλ/*Hind*III; lajur 2 dan 3 adalah hasil PCR yang sudah dimurnikan dengan *GFX*

Berdasarkan hasil PCR pada Gambar 1, diperkirakan bahwa gen yang berhasil diamplifikasi berukuran sekitar 1,4 kpb. Selanjutnya dilakukan sekuensing untuk menentukan urutan nukleotida hasil PCR. Hasil sekuensing kemudian diterjemahkan menjadi urutan protein, dan dikarakterisasi sebagai produk gen tiol-disulfida oksidoreduktase. Sebagai hasilnya, diperoleh protein: Bdbred (rantai A protein Bdb *Bacillus* dalam keadaan tereduksi), Bdbbox (rantai A protein Bdb *Bacillus* dalam keadaan teroksidasi), dan Etda (rantai A protein Bdb *Etda-treated Bacillus*).

Karakterisasi Produk Gen *Chaperone Bacillus*

Produk gen *Chaperone Bacillus* sp. dikarakterisasi dengan menggunakan program Clustal

X, Genedoc, dan Geno3D. Berturut-turut hasilnya ditampilkan dalam Lampiran 1, 2 dan 3.

Karakterisasi produk gen *chaperone* dilakukan dengan menganalisis struktur hasil prediksi dengan program Geno3D. Prediksi struktur ketiga gen tersebut ditampilkan dalam Lampiran 3. Struktur ketiga protein hasil karakterisasi menunjukkan kemiripan. Ketiganya memiliki 5 untai β dan 8 untai α . Bdbred dan Bdbbox memiliki sisi aktif sisi aktif pengikatan Zn, sedangkan Etda tidak memilikinya. Rangkuman karakterisasi ditampilkan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Karakterisasi protein *chaperone Bacillus*

Karakter	Jenis Protein		
	Bdbdred	Bdbbox	Etda
Jumlah asam amino penyusun	202	202	202
Sisi aktif	Ada	Ada	Ada
Sisi pengikatan Zn	Ada	Ada	Tidak ada
Jumlah untai β	5	5	5
Jumlah untai α	8	8	8
Posisi motif tioredoksin	25 – 188	25 – 188	25 – 188
Posisi motif DsbA	32 – 174	32 – 174	32 – 174

Chaperone DnaJ *E. coli* memiliki empat motif berulang –CXXCXG–, di mana motif CXXC merupakan motif lestari pada sisi aktif berbagai protein tiol disulfida oksidoreduktase, yaitu tioredoxin, Protein Disulfida Isomerase (PDI), dan dsbA (Crouy-Chanel, 1995). Berdasarkan rangkuman hasil karakterisasi ketiga protein dalam tabel 1, ditemukan bahwa ketiga protein tersebut memiliki motif tioredoksin dan DsbA. Sehingga, ketiga protein hasil karakterisasi tersebut termasuk dalam famili protein tiol-disulfida oksidoreduktase dan memiliki aktivitas oksidoreduktase.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa ketiga protein hasil karakterisasi, yaitu Bdbdred, Bdbbox, dan Etda, memiliki kemiripan struktur, serta termasuk dalam famili protein tiol-disulfida oksidoreduktase karena memiliki motif pengenal protein tiol-disulfida oksidoreduktase, yaitu tioredoksin dan DsbA.

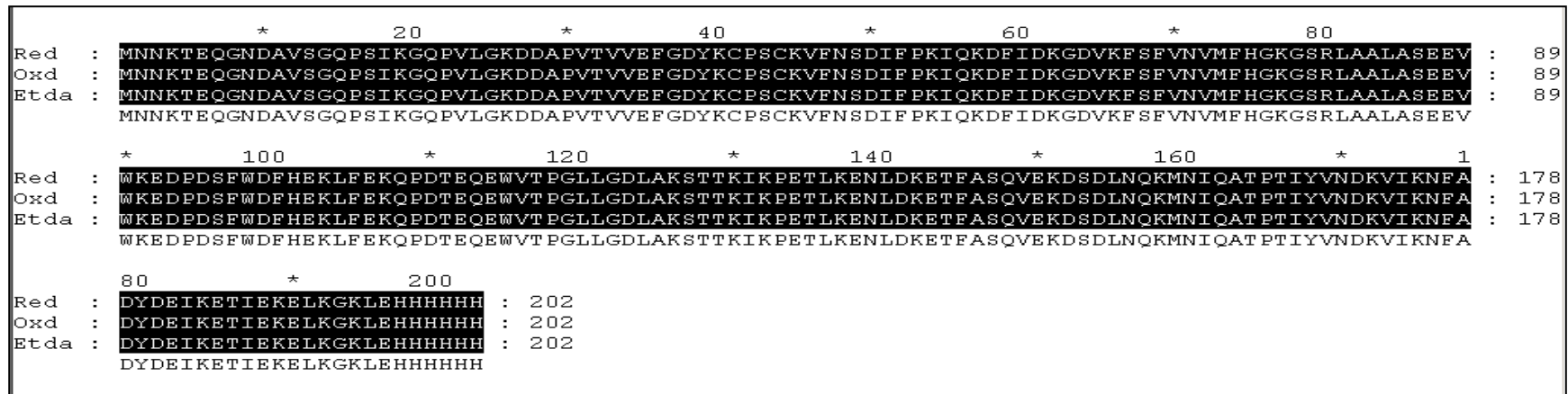
DAFTAR PUSTAKA

- Bukau, B. dan A. L. Horwich. 1998, The Hsp 70 and Hsp 60 Chaperone Machines, *Cell*, 92, 351
- Crouy-Chanel, A., Kohiyama, M. dan G. Richarme. 1995. A novel function of *Escherichia coli* chaperone DnaJ, *J Biol Chem*, 270, 22669.
- Dobson, C.M. 2001. The structural basis of protein folding and its links with human disease, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 356, 133.
- Fink, A.I. 1999. Chaperone-Mediated Protein Folding, *Phys. Rev.*, 79 (2), 425-449
- Hartl, F.U. dan M. H. Hartl. 2002, Molecular Chaperones in the Cytosol: from Nascent Chain to Folded Protein, *Science*, 295, 1852-1858
- Wickner, S., Maurizi, M.R. dan S. Gottesman. 1999. Posttranslational Quality Control: Folding, Refolding, and Degrading Proteins, *Science*, 286, 1888-1893.

Lampiran 1. Gambar Hasil ClustalX



Lampiran 2. Gambar Hasil Genedoc



Lampiran 3. Gambar Prediksi struktur *chaperone Bacillus* (A. Struktur Bdbred, B. Struktur Bdbdox, C. Struktur Etda)

