

KARAKTERISASI PRODUK GEN PENGKODE *Chaperone Bacillus* sp. RP1

Maureen Kumaunang¹ dan Yohanis Mandik²

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

²Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Cendrawasih, Jayapura

Diterima 19-04-2010; Diterima setelah direvisi 27-04-2010; Disetujui 29-04-2010

ABSTRACT

Kumaunang, M. and Y. Mandik, 2010. Characterization of transcript genome product of Chaperone *Bacillus* sp. RP1.

Molecular chaperone is the group of protein that assist in the correct folding or assembly of other proteins in vivo. The objective of this research was to characterize the product of gene encoding chaperone from *Bacillus* sp. RP1 by using in-silico analysis. Analysis of 1053 bp from DNA fragment isolated by PCR showed that it has 97% similarity with *putative chaperone* of *Geobacillus kaustophilus* (BA000043.1) and 86% similarity with DnaK operon of *B. stearothermophilus* (X90709.1). Structure prediction of DnaJ *Bacillus* sp. RP1 showed that it has similar J-domain with that of DnaJ *Escherichia coli* but *cys-rich* domain is different.

Keywords : chaperone, gene characterization, in-silico analysis.

PENDAHULUAN

Keberadaan protein dalam sel tidak hanya bergantung pada kebenaran proses transkripsi dan translasi. Untuk menjadi molekul protein yang aktif dan memiliki fungsi fisiologis, molekul protein harus mengalami proses pelipatan untuk mencapai konformasi tiga-dimensi yang tepat (Hartl & Hayer-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 (Gething and Sambrook, 1992). 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 (Radford and Dobson, 1999). 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 (Frydman, 2001). Sistem DnaK, yang terdiri dari protein-protein *heat-shock* DnaK, DnaJ, dan GrpE, merupakan salah satu sistem *chaperone* utama dalam sitosol *Escherichia coli* (Langer *et al.*, 1992). 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 -CXXCXGXG-, yang merupakan motif lestari protein pengkode oksidoreduktase sehingga diduga memiliki aktivitas tiol-disulfida oksidoreduktase (Linke *et al.*, 2003).

Telah banyak dilakukan studi analisis *in-silico* terhadap produk gen (Lira-Ruan *et al.*, 2003; Wada and Shigemori, 2006; Sivasudha and Kumar, 2008; Kumaunang *et al.*, 2009). Studi *in-silico* dapat dilakukan sebagai studi pendahuluan hubungan antara struktur, fungsi, dan stabilitas suatu protein sebagai produk gen (Radford & Dobson, 1999). Berdasarkan pemikiran adanya aktivitas tiol-disulfida oksidoreduktase dalam *chaperone*, membuat penelitian ini akan dilaksanakan untuk mengkarakterisasi produk gen pengkode *chaperone* dari sumber organisme termofilik *Bacillus* sp. RP1.

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 80lacZ 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.

Manipulasi DNA

Prosedur manipulasi DNA *in vitro* dan teknis transformasi telah dilaporkan (Kumaunang dan Natalia, 2007).

Penentuan urutan nukleotida fragmen *dnaJ* dan Analisis *in-silico*

Penentuan urutan nukleotida *dnaJ* dilakukan dengan prosedur meliputi perbanyak DNA dengan PCR *Big DyeTM Terminator* serta penentuan urutan nukleotida menggunakan *Automatic Sequencer 3730x1*. Analisis urutan nukleotida dilakukan dengan menggunakan program *BLASTn*, *ClustalX*, *DNASar*, dan *Genedoc*. Analisis struktur dilakukan dengan menggunakan program *Geno3D* (Combet *et al.*, 2002), sedangkan tampilan struktur digunakan program *Yasara* (<http://www.YASARA.org>).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Urutan nukleotida hasil sekuensing fragmen DNA molekul *chaperone Bacillus* sp. RP1 hasil pemurnian dengan *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit* dengan primer DJF1 (*forward*) dan DJR2 (*reverse*) berturut-turut diberi nama DNAJF-DJF1 dan DNAJR-DJR2. Dengan menggunakan primer DJF1 berhasil disekuensing sejumlah 926 pb. Melalui program *Editseq* dari *DNASar*, ditentukan urutan nukleotida komplemennya. Selanjutnya dilakukan *BLASTn* terhadap 926 pb DNAJ-DJF1 tersebut. Analisis ini dilakukan untuk mengetahui tingkat kesamaan nukleotida DNAJF-DJF1 dengan urutan nukleotida yang ada pada basis data *Genebank*. Analisis terhadap 717 pb urutan nukleotida DNAJF-DJF1 (Gambar 1) menunjukkan tingkat kesamaan 95% dengan protein *chaperone G. kaustophilus* (BA000043.1). Sedangkan 279 nukleotida hasil sekuensing DNAJF-DJF1 menunjukkan tingkat

kesamaan 83% dengan operon *DnaK* dari *B. stearothersophilus* (X90709.1).

Pada sekuensing terhadap DNAJR-DJR2 dengan menggunakan primer DJR2 berhasil diperoleh 1099 nukleotida. Selanjutnya dilakukan analisis *BLASTn* terhadap ke-1099 pb DNAJ-DJR2. Analisis terhadap 204 pb DNAJR-DJR2 (Gambar 2) menunjukkan tingkat kesamaan 97% dengan protein *chaperone G. kaustophilus* (BA000043.1). Sedangkan sebanyak 138 nukleotida menunjukkan tingkat kesamaan 87% dengan operon *DnaK* dari *B. stearothersophilus* (X90709.1).

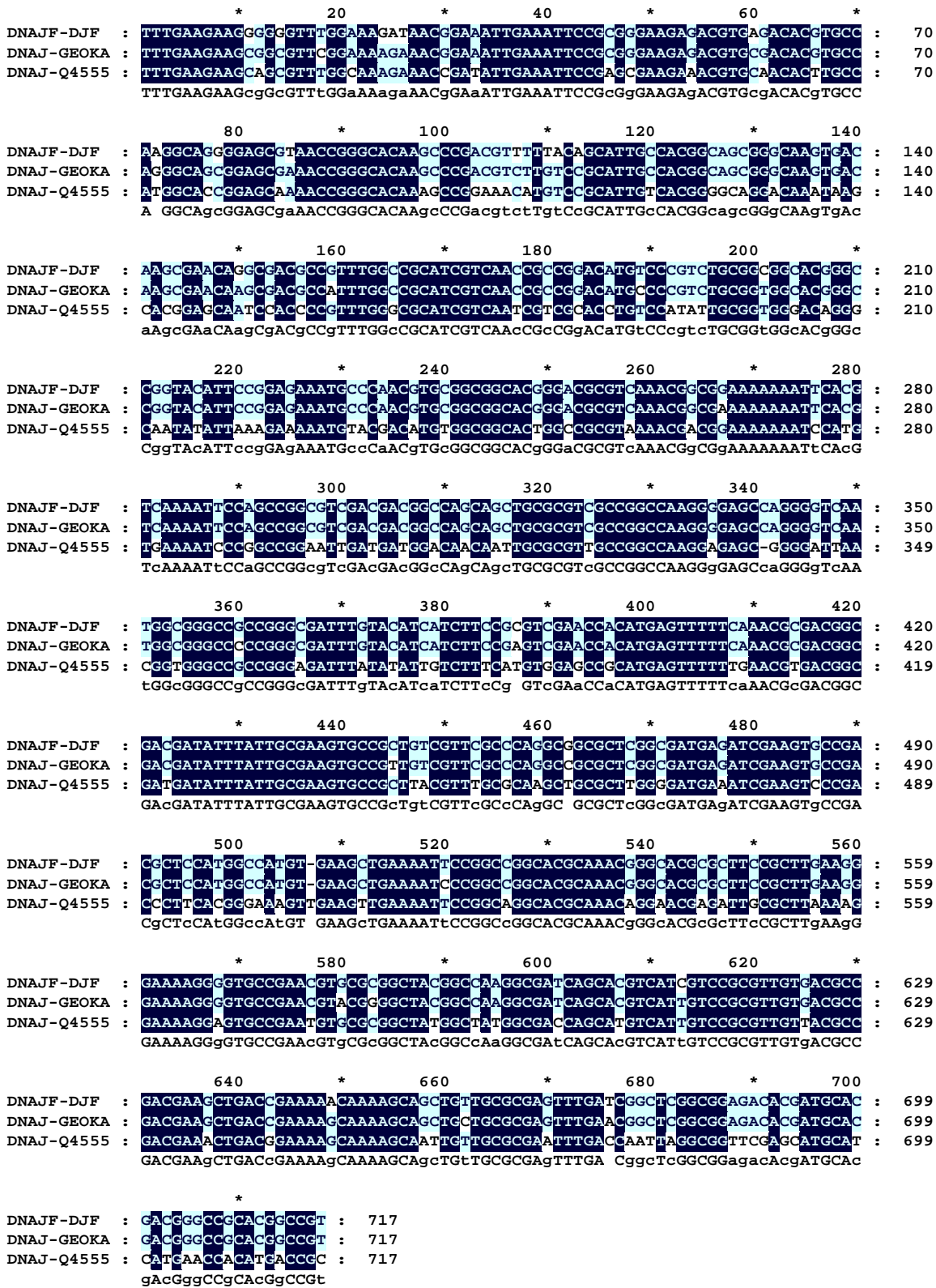
Hasil sekuensing terhadap DNAJ-DJF1 dan DNAJ-DJR2 selanjutnya digabungkan untuk memperkirakan urutan nukleotida *dnaJ Bacillus* sp. RP1. Selanjutnya dilakukan penjajaran terhadap hasil penggabungan DNAJ-DJF1 dan DNAJ-DJR2 tersebut terhadap urutan nukleotida *chaperone putative G. kaustophilus* (BA000043.1) serta *dnaJ B. stearothersophilus* (Q45552), dengan menggunakan program *ClustalX* dan *Genedoc*. Analisis *BLASTn* terhadap 1053 pb hasil penggabungan urutan nukleotida *dnaJ Bacillus* sp. RP1 menunjukkan tingkat kemiripan 97% terhadap *chaperone putative G. kaustophilus* (BA000043.1) serta 86% terhadap operon *DnaK* dari *B. stearothersophilus* (X90709.1).

Deduksi terhadap urutan asam amino *dnaJ Bacillus* sp. RP1, berhasil ditemukan daerah lestari pada ujung N-terminal, yang merupakan motif pengenalan untuk *DnaJ*, yaitu urutan His-Pro-Asp. Selain itu, ditemukan pula empat motif pengikatan Zn (-C-X-X-C-X-G-X-G-) pada domain *cys-rich*.

Prediksi model struktur *DnaJ Bacillus* sp. RP1 dilakukan dengan menggunakan program *Geno3D* (Combet *et al.*, 2002). Model struktur domain-J *DnaJ Bacillus* sp. RP1 diperkirakan terdiri dari empat struktur α -heliks. α I terdiri atas Asp5 sampai Gly11, α II terdiri atas Thr17 sampai Lys30, α III terdiri atas Asp41 sampai Ser57, sedangkan α IV terdiri dari Asp59 sampai Arg67. Motif lestari HPD berada di antara α II dan α III (Gambar 3).

Pemodelan selanjutnya dilakukan terhadap 81 asam amino yang berada pada domain *cys-rich* (Gambar 4). Dari hasil pemodelan diperoleh bahwa domain *cys-rich DnaJ Bacillus* sp. RP1 memiliki kemiripan dengan *DnaJ E. coli* (PDB ID: 1EXKA, Martinez-Yamout *et al.*, 2000). Dari hasil pemodelan struktur struktur diperkirakan bahwa domain *cys-rich DnaJ Bacillus* sp. RP1 memiliki empat motif pengikatan Zn²⁺. Motif I adalah -CDTCQGRG-, motif II: -CQHCHGSG-, motif III: -CCPVCGGTG-, dan motif IV: -CPTCGGTG-. *DnaJ Bacillus* sp. RP1 memiliki bentuk seperti huruf V yang diperpanjang. Masing-masing sayap yang membentuk V terdiri atas

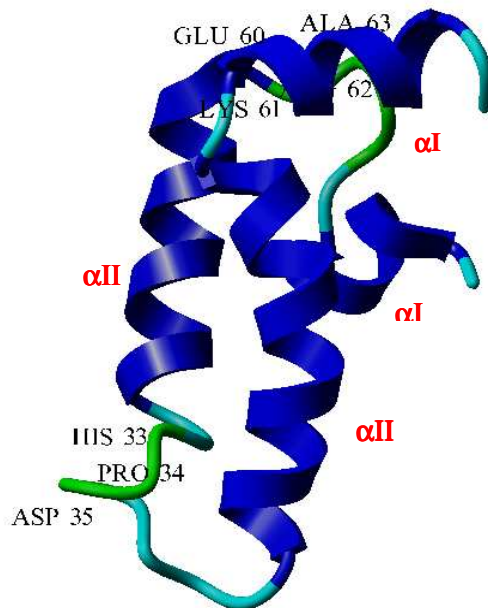
dua motif untuk pengikatan Zn²⁺. Motif I dibentuk dari Cys12, Cys15, Cys69, dan Cys72, sedangkan motif II dibentuk oleh Cys29, Cys32, Cys55, dan Cys58.



Gambar 1. Penjajaran nukleotida DNAJF_DJF1 *dnaJ Bacillus sp. RP1*, dengan DnaJ *G. kaustophilus* (DNAJ-GEOKA, BA000043.1), dan DnaJ *B. stearothersophilus* (DNAJ-Q4555, X90709.1)

	*	20	*	40	*	
DNAJ-GEOKA :	CGGCGTCAGCA	AAAAACGCGAC	GAAAGAC	GAGATCA	AAAAAAGCGTAT	CGAAAGCTT : 55
DNAJ-Q4555 :	CGGAGTCAGCA	AAAAACGCGAC	AAAAGA	AGAGATT	AAAAAAGCGTAC	CGGAAGCTT : 55
DNAJR-DJR2 :	CGCCGTCAC	--AAAACGCGAC	GAA-GAC	GAGATCA	AAAAAAGCGTAT	CGAAAGCTT : 52
	CGgcGTCAgcaAAAAACGCGACgAAAGAcGAGATcAAAAAAGCGTATCGaAAGCTT					
	60	*	80	*	100	*
DNAJ-GEOKA :	TCGAAgCAGTAT	CATCCAGAT	GTGAACAAAG	CCCCGAC	CGCCGCGGAGAAG	TTTA : 110
DNAJ-Q4555 :	TCGAAAAAGTAT	CATCCAGAT	GTAAACAAAG	AGCCCGAT	TGCGGCGGAGAAA	TTTA : 110
DNAJR-DJR2 :	TCGAAgCAGTAT	CATCCAGAT	GTGAACAAAG	CCCCGAC	CGCCGCGGAGAAG	TTTA : 107
	TCGAAgCAGTATCATCCAGATGTgAACAAAGccCCgGAcGCcGCGGAGAAgTTTA					
	120	*	140	*	160	
DNAJ-GEOKA :	AGGAAATTAAGAG	GCGTACGAAGT	GTTAAGCGAT	GATCAAAAAG	CGGGCCCCGCTA	: 165
DNAJ-Q4555 :	AAGAAATTAAGAA	GCGTACGAAGT	TTAAGCGAT	GATCAAAAAG	CGGGCCCCATTA	: 165
DNAJR-DJR2 :	AGGAAATTAAGAG	GCGTACGAAGT	GTTAAGCGAT	GATCAAAAAG	CGGGCCCCGCTA	: 162
	AgGAAATTAAGAgGCGTACGAAGTgTTAAGCGATGATgAAAAAGCGGGCCCCgCTA					
	*	180	*	200		
DNAJ-GEOKA :	CGACCGCTTT	TGGCCATG	CCGACCCG	AACGAAAC	CGTTTGG : 204	
DNAJ-Q4555 :	CGATCAATTT	TGGCCAGG	CCGATCCA	AATCA-AG	GCTTCG : 203	
DNAJR-DJR2 :	CGACCGCTT	CGCCATG	CCGACCC	ACCCAC	CGTTTGA : 201	
	CGAcCgcTTtGGCCAtGCCGAcCCgAaccA AcGtTTgg					

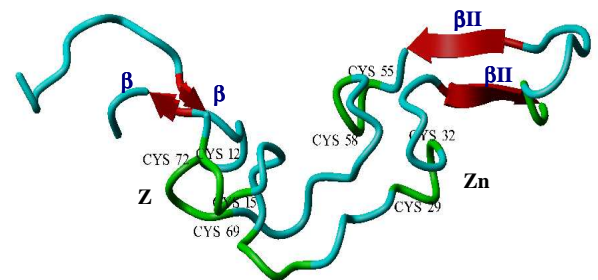
Gambar 2. Penjajaran nukleotida DNAJR_DJR2 *dnaJ* *Bacillus* sp. RP1, dengan DnaJ *G. kaustophilus* (DNAJ-GEOKA, BA000043.1), dan DnaJ *B. stearothermophilus* (DNAJ-Q4555, X90709.1)



Gambar 3. Prediksi struktur domain-J DnaJ *Bacillus* sp. RP1. Struktur pita menunjukkan untai α -heliks.

Pada Gambar 4 terlihat pula bahwa DnaJ *Bacillus* sp. RP1 memiliki 4 untai β . Untai β 1 dibentuk oleh residu Glu10 yang paralel dengan untai β 4 yang tersusun oleh residu Val78. Sedangkan, untai β 2 yang dibentuk oleh residu Val38 sampai Ser40 paralel

dengan untai β 3 yang tersusun dari residu Asn51 sampai Arg53. Model struktur domain *cys-rich* DnaJ *Bacillus* sp. RP1 menunjukkan adanya perbedaan dengan domain *cys-rich* *E. coli* (Martinez-Yamout *et al.*, 2000) dan DnaJ Q45552 yang keduanya memiliki 6 untai β , juga dengan DnaJ Q5KWZ8 yang memiliki 2 untai β .



Gambar 4. Prediksi struktur domain *cys-rich* DnaJ *Bacillus* sp. RP1. Untai- β ditunjukkan dengan pita berwarna merah. Residu sistein berwarna hijau. Analisis struktur dilakukan dengan menggunakan program Geno3D (Combet *et al.*, 2002), sedangkan tampilan struktur digunakan program Yasara (<http://www.YASARA.org>).

Hasil-hasil di atas menunjukkan bahwa gen yang diperoleh dari isolasi dengan metode PCR menggunakan primer-primer yang dirancang berdasarkan urutan nukleotida *dnaJ* *B.*

stearothermophilus diperkirakan merupakan gen pengkode DnaJ dari *Bacillus* sp. RP1. Hal ini diperkuat dengan hasil studi *in silico* terhadap produk gen tersebut, di mana motif lestari yang dimiliki oleh DnaJ, yaitu motif HPD dan QKRA pada domain-J serta motif CXXCXGXG pada domain *cys-rich*, dimiliki juga oleh gen hasil isolasi. Prediksi terhadap model struktur juga memperkuat dugaan bahwa produk gen yang dihasilkan adalah DnaJ, karena prediksi model struktur domain-J DnaJ *Bacillus* sp. RP1, memiliki kemiripan dengan domain-J DnaJ *E. coli* yang telah berhasil ditentukan, sedangkan prediksi struktur domain *cys-rich* DnaJ *Bacillus* sp. RP1.

KESIMPULAN

Analisis terhadap urutan nukleotida pengkode DnaJ *Bacillus* sp. RP1 sebanyak 1053 pb menunjukkan tingkat kesamaan 97% dengan *chaperone putative G. kaustophilus* (BA000043.1) serta 86% dengan operon DnaK *B. stearothermophilus* (X90709.1). Selain itu, DnaJ *Bacillus* sp. RP1 juga ditemukan memiliki motif lestari HPD dan QKRA pada domain-J, serta motif CXXCXGXG pada domain *cys-rich*. Sedangkan prediksi terhadap struktur DnaJ *Bacillus* sp. RP1 menunjukkan kemiripan dengan struktur domain-J DnaJ *E. coli* sedangkan domain *cys-rich* menunjukkan perbedaan.

DAFTAR PUSTAKA

Combet, C., M. Jambon., G. Deleage. and C. Geourjon. 2002, *Bioinformatics*, 18, 213-217.

- Fink, A.L. 1999, Chaperone-mediated protein folding, *Physiol Rev*, 79, 425-449.
- Frydman, J. 2001, Folding of newly translated proteins *in vivo*: the role of molecular chaperones, *Annu Rev Biochem*, 70, 603-647.
- Gething, M.J., Sambrook, J. 1992, Protein folding in the cell, *Nature*, 355, 33-45.
- Hartl, F.U. and M. Hayer-Hartl. 2002, Molecular chaperones in the cytosol: from nascent protein to folded protein, *Science*, 295, 1852-1858.
- Kumaunang, M., V. Kamu. Dan Y. Mandik. 2009. Analisis *in silico* Protein DnaJ *Bacillus stearothermophilus*, *Chem. Prog.*, 2(1): 47-51.
- Kumaunang, M. Dan D. Natalia. 2007. Isolasi dan Kloning *dnaJ Bacillus* sp. RP1. *Sains*. 7:2.
- Langer, T., Lu, C., Echols, H., Flanagan, J., Hayer, M.K. and F. U. Hartl. 1992, Successive action of DnaK, DnaJ, and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding, *Nature*, 356, 683-689.
- Lira-Ruan V., G. Sarath., R. V. Klucas. and R. Arredondo-Peter. 2003. *In silico* analysis of a flavohemoglobin from *Sinorhizobium meliloti* strain 1021, *Microbiol. Res.*, 158, 215-227.
- Putra, R. 1999, Isolasi dan karakterisasi bakteri termofilik sumber air panas Cimanggu dan deteksi aktivitas glukosa isomerase, skripsi, ITB.
- Radford, S.E. and C. M. Dobson. 1999, From computer simulations to human disease: emerging themes in protein folding, *Cell*, 97, 291-296.
- Sivasudha, T. and P. A. Kumar. 2008. Isolation, Sequencing, and *in silico* Analisis of Sorghum (*Sorghum bicolor*) Sucrose Synthase Promoter, *J. Plant Sci.*, 3(3):203-215.
- Wada, Y. and T. Shigemori. 2006. *In Silico* Analysis of Repeat Sequences from the Porcine and Bovine Genome., *Bull. Fac. Agr. Saga Univ.*, 91, 37-43.