

Konstruksi Mutan Protein Disulfida Isomerase pada *Saccharomyces cerevisiae* (Construction Protein Disulphide Isomerase Mutant on *Saccharomyces cerevisiae*)

JUMIARTI AGUS

Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Jalan Tentara Pelajar No. 3A, Bogor 16111

Tel. 62-251-337975 pes. 224 Faks. 62-251-338820

Protein disulphide isomerase (PDI) is an enzyme that catalyses disulphide-bond formation in protein to maintain the native conformation, either through redox or isomerization reactions. Few PDI's have been isolated from various organism such as mammalian livers, plants, green algae and *Saccharomyces cerevisiae*. Disruption of the PDI in *S. cerevisiae* is haplo lethal indicating that the product of this gene is essential for viability. PDI consist of 1590 pb, but the essential domain on PDI gene have not been known complete. To study characteristics PDI protein domains, in this research was undertaken construction PDI mutant on *S. cerevisiae*. In vitro mutagenesis was carried out using hidroxilamin (HA) as mutagen. Recombinant plasmid were constructed by ligation of mutated DNA fragment (758 pb) into a vector (6300 pb) using T4 DNA ligase. The result showed some mutants were lethal, indicated that b and b' domains are essential for PDI on *S. cerevisiae*. Few mutants poorly growth, and the other showed well growth.

Key words: construction, protein disulfide isomerase, *Saccharomyces cerevisiae*

Pada umumnya protein ekstraseluler, seperti protein yang terdapat pada jalur pencernaan dan permukaan sel, mempunyai ikatan disulfida (Freedman *et al.* 1984). Ikatan disulfida berperan penting untuk menstabilkan struktur protein tersier dan kuaterner sehingga protein tersebut mempunyai aktivitas biologi yang khas. Meskipun kondisi redoks dalam sel memungkinkan pembentukan ikatan disulfida secara spontan, namun ikatan disulfida alami terbentuk melalui peran enzim foldase, salah satunya ialah *protein disulphide isomerase* (PDI) (Freedman *et al.* 1984).

Protein disulphide isomerase (E.C. 5.3.4.1) merupakan protein retikulum endoplasma, enzim ini mempunyai kemampuan yang luas terhadap substrat dan dapat berperan dalam tiga tipe reaksi, antara lain: pembentukan ikatan disulfida, reduksi ikatan disulfida, dan isomerisasi ikatan disulfida. Berlangsungnya reaksi di atas ditentukan oleh potensial reduksi ditiol atau disulfida substrat protein dan kondisi lingkungan (Freedman *et al.* 1984).

Pembentukan ikatan disulfida terjadi pada saat berlangsungnya biosintesis protein, yaitu pada tahap kotranslasi dan pascatranslasi. Pada eukariota, pembentukan ikatan ini terjadi dalam lumen retikulum endoplasma. Sedangkan pada sel prokariota, misalnya pada *Escherichia coli*, tidak ditemui adanya PDI, fungsinya digantikan oleh DsbC yang berperan penting untuk pembentukan ikatan disulfida protein periplasma. Reduksi dan isomerisasi ikatan disulfida terjadi apabila ada kesalahan pasangan ikatan disulfida, pada substrat protein.

Protein disulphide isomerase merupakan enzim homodimer, masing-masing monomernya terdiri atas beberapa domain antara lain: sekuen sinyal (ss), sisi aktif (a dan a'),

sisi pengikatan substrat (b dan b'), serta sisi retensi pada retikulum endoplasma (c) (Natalia 1994). Fungsi utama PDI ialah sebagai katalis untuk pembentukan ikatan disulfida alami dan pelipatan protein, namun PDI juga mempunyai fungsi lain yaitu sebagai subunit dari sistem enzim yang lebih kompleks. *Protein disulphide isomerase* merupakan komponen dari enzim prolil-4-hidroksilase (P4H). Enzim ini mengkatalisis pembentukan residu 4 hidroksi-prolil pada polipeptida kolagen yang baru dibentuk. Enzim P4H merupakan tetramer $\alpha_2\beta_2$ yang subunit α -nya merupakan bagian utama tempat residu sisi aktif, sedangkan subunit β ialah PDI yang diduga berperan untuk mempertahankan keberadaan enzim tersebut di dalam retikulum endoplasma (Noiva & Lennarz 1992).

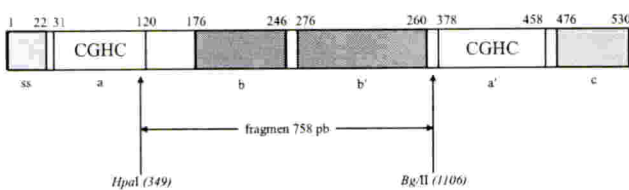
Protein disulphide isomerase telah diisolasi, dimurnikan, dan dikarakterisasi dari berbagai sumber, seperti hati mamalia, tanaman (Freedman *et al.* 1984), *Clamydomonas reinhardtii*, dan *Saccharomyces cerevisiae* (khamir) (Mizunaga *et al.* 1990). Dalam rangka mendapatkan informasi mengenai fungsi *in vivo* PDI untuk sistem eukariota, *S. cerevisiae* digunakan sebagai model karena merupakan organisme eukariota yang mudah tumbuh, memiliki siklus hidup yang singkat, dan dapat memperlihatkan sebagian besar sifat eukariota tingkat tinggi, serta mempunyai sistem genetika yang terdefinisi dengan baik (Mizunaga *et al.* 1990).

Pada saat ini, sekuen nukleotida gen PDI *S. cerevisiae* telah ditentukan, sisi aktif dan peta restriksinya telah diketahui. Gen yang menyandikan PDI khamir dikenal dengan *PDI1*. Beberapa kelompok peneliti secara terpisah menemukan bahwa gen PDI khamir terdiri atas 1590 nukleotida, yang ekuivalen dengan 530 residu asam amino, dan sekitar 30% identik dengan PDI mamalia, kemiripan paling tinggi

ditemukan pada daerah sisi aktif (Farquhar 1991, Mizunaga *et al.* 1990).

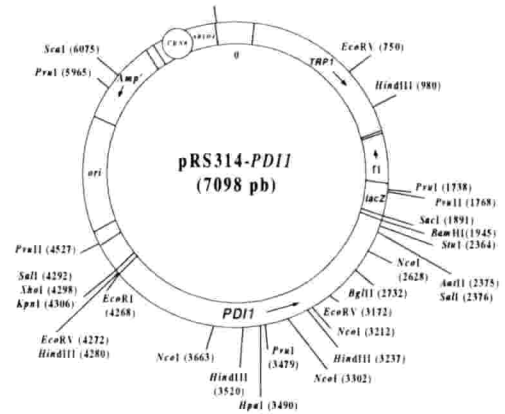
Pada khamir protein PDI bersifat esensial, tanpa fungsi protein ini khamir tidak akan tumbuh. Perusakan gen *PDII* dengan *allele HIS3* bersifat *haplo-lethal*, artinya khamir akan mati bila gen PDI pada kromosom dirusak karena gen tersebut merupakan gen kopi tunggal dalam genom khamir. Mutasi pada sisteina pertama, dari kedua pusat aktif enzim (CGHC → SGHC), bersifat letal pada khamir (Anderson *et al.* 1997). Daerah b dan b' diduga sebagai sisi pengikatan substrat (Farquhar *et al.* 1991, Natalia 1994). Delesi asam amino pada daerah abb' juga menyebabkan khamir menjadi letal (Muntholib 1998). Studi pada daerah C yang merupakan sisi retensi pada retikulum endoplasma juga telah dilakukan; delesi sebanyak 35 residu asam amino dari C terminal menyebabkan penurunan aktivitas enzim, namun tidak menyebabkan kematian pada khamir (LaMantia & Lennarz 1993).

Untuk mempelajari karakter domain pada gen PDI perlu dilakukan studi struktur-fungsi gen PDI, hal ini dapat dilakukan dengan pendekatan analisis mutan PDI khamir. Pada penelitian ini dilakukan konstruksi mutan PDI pada *S. cerevisiae* menggunakan hidroksilamina, daerah yang dimutasi meliputi domain b dan b' (Gambar 1). Penggunaan hidroksilamina (HA) untuk tujuan mutasi mempunyai beberapa keuntungan karena HA dapat langsung digunakan untuk DNA sasaran berupa *double stranded* (beberapa mutagen kimia menggunakan DNA sasaran berupa *single stranded*) dan metode yang digunakan lebih sederhana. Disamping itu hidroksilamin telah terbukti efektif untuk menghasilkan mutan dan sering digunakan untuk mendapatkan mutan pada khamir.



Gambar 1. Domain dan daerah mutasi hidroksilamina pada gen *PDII* *S. cerevisiae*. Angka-angka di atas menunjukkan urutan residu asam amino pada polipeptida dari ujung N; huruf pada bagian bawah diagram menunjukkan domain: ss=sekuen sinyal, a dan a'= sisi aktif, b dan b'= diduga sisi pengikat substrat, c = sisi retensi pada retikulum endoplasma; GCHC ialah pusat aktif PDI. Daerah yang dimutasi sekitar 758 pb yang terletak diantara *HpaI* (349) dan *BglII* (1106) (Mizunaga *et al.* 1990).

Pembuatan mutan dilakukan dengan cara subkloning daerah *HpaI* - *BglII* yang telah termutasi HA, ke dalam vektor pRS314-*PDII* (Gambar 2) yang telah dipotong dengan enzim yang sama. Plasmid rekombinan yang diperoleh diperbanyak di dalam *E. coli*, selanjutnya digunakan untuk transformasi khamir. Untuk menyeleksi dan menguji mutan yang diperoleh dilakukan pertukaran plasmid (*shuffling*) terhadap transforman khamir 2736 menggunakan media *fluoroorotid acid* (FOA) sehingga diperoleh khamir yang hanya membawa PDI yang telah termutasi pada daerah *HpaI* - *BglII*.



Gambar 2. Peta restriksi plasmid pRS314-*PDII*, gen PDI disisipkan pada sisi pemotongan *BamHI* (1936) dan *EcoRI* (4265). Ori = origin of replication; Cen = centromere; Amp^r = ampicilin resistant; ARS = autonomously replicating sequence (Mizunaga *et al.* 1990).

BAHAN DAN METODE

***Saccharomyces cerevisiae*, Bakteri, dan Plasmid.**

Dalam penelitian ini digunakan *S. cerevisiae* galur 2736 (*MATα*, *ura3-1*, *leu2-3,-112*, *his3-11,-15*, *ade2-1*, *trp1-1*, *pdi:: HIS3*) [*pCT37*] yang diperoleh dari Tom Stevens, University of Oregon, USA.

Bakteri yang digunakan ialah *E. coli* DH5α dengan genotipe *supE44 ΔlacU169 (θ80lacZAM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1* (Sambrook *et al.* 1989) yang diperoleh dari Laboratorium Rekayasa Genetika PAU Bioteknologi ITB, Bandung.

Plasmid yang digunakan ialah pRS314-*PDII* yang diperoleh dari William J. Lennarz, Stony Brook University USA.

Media yang digunakan untuk pertumbuhan *E. coli* ialah media Luria-Bertani Broth (Atlas 1993). Untuk transformasi *E. coli* dan isolasi plasmid digunakan media LB yang mengandung ampisilin dengan konsentrasi akhir 50 µg/ml Sedangkan untuk pertumbuhan khamir digunakan media YEPD (Atlas 1993), untuk tujuan seleksi digunakan media sintetik yeast nitrogen base (YNB) tanpa asam amino (Difco. Lab. Detroit. MI. USA) 0.7% (b/v), glukosa 2%, bakto agar (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO) 2%, dan larutan suplemen stok yang sesuai dengan fenotipe khamir, masing-masing 1% (v/v). Larutan suplemen stok terdiri atas triptofan 2 g/l, histidin 2 g/l, leusina 1 g/l, urasil 1 g/l, dan adenina 1 g/l (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO). Media yang digunakan untuk pertukaran plasmid ialah media YNB (dibubuhi asam amino adenina, leusina, urasil) dan *fluoroorotid acid* (FOA) (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO) 1 g/l.

Plasmid sebagai Sumber DNA yang Akan Dimutasi.

Plasmid pRS-314 *PDII* membawa gen PDI khamir secara utuh. Perbanyakkan plasmid dilakukan pada inang *E. coli*. Koloni tunggal *E. coli* ditumbuhkan pada media steril pada suhu 37°C selama 12 - 16 jam dan penanaman pada media cair dilakukan dengan pengocokan 150 rpm. Penanaman khamir dilakukan pada suhu 30°C selama 2 - 3 hari (fase stasioner). Pertumbuhan sel diamati secara spektrofotometri.

metri dengan mengukur absorbansi biakan pada panjang gelombang 600 nm, sebagai blanko digunakan larutan media. Prosedur transformasi *E. coli* dilakukan menurut Cohen (Sambrook *et al.* 1989)

Escherichia coli hasil transformasi diisolasi plasmidnya mengikuti teknik isolasi plasmid skala kecil sedangkan isolasi plasmid skala besar dilakukan dengan menggunakan metode Birnboim dan Doly (Sambrook *et al.* 1989). Plasmid hasil isolasi, baik skala kecil maupun skala besar, dipotong dengan enzim restriksi untuk selanjutnya dielektroforesis.

Fragmen DNA Termutasi. Fragmen DNA yang akan dimutasi (758 pb) yang terletak di antara dua sisi aktif enzim PDI dipotong menggunakan enzim *HpaI* dan *BglIII*. Teknik pemotongan plasmid dilakukan sesuai dengan spesifikasi yang diberikan oleh produsen. Fragmen vektor dan fragmen sisipan dipotong secara bertahap. Plasmid dipotong dengan enzim *HpaI* atau *BglIII*, dipresipitasi dengan etanol, selanjutnya dipotong dengan enzim yang kedua.

Hasil pemotongan plasmid yang telah sempurna dielektroforesis dalam jumlah yang banyak. Elektroforesis pada gel agarosa (Difco, Lab. Detroit MI. USA) 1% dalam bufer TAE 1x (tris-asetat 0.04 M, EDTA 0.001 M) dilakukan pada kondisi 60-80 V hingga warna biru *loading* bufer bermigrasi sekitar 2/3 panjang gel. Gel agarosa direndam dalam larutan EtBr 0.5 µg/ml TAE (1x) selama 5-10 menit, selanjutnya dipindahkan ke dalam larutan MgSO₄ 10 mM selama 30 menit. Pita DNA diamati dengan bantuan sinar UV dan didokumentasikan dengan menggunakan film polaroid 667 (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

Untuk memisahkan vektor (6300 pb) dan fragmen sisipan (758 pb) digunakan metode *bioclean MP kit* (Boehringer, Mannheim, Asia Pacific, Pte. Ltd). Gen PDI pada daerah *HpaI* - *BglIII* (758 pb) yang diperoleh dari hasil *bio-clean* dimutasi dengan mutagen hidroksilamin (HA). Perlakuan mutasi dilakukan menurut Kaiser *et al.* (1994).

Plasmid Rekombinan. Untuk mendapatkan plasmid rekombinan dilakukan ligasi antara vektor (6300 pb) dengan fragmen sisipan termutasi HA (758 pb) menggunakan enzim ligase DNA T4 (Boehringer, Meinnhein, Asia Pacific, Pte. Ltd). Perbandingan molekul vektor dengan fragmen sisipan ialah 1:3. Enzim ligase DNA T4 dapat meligasi 80% dari 1 µg DNA untuk *blunt end* dan 95% untuk *sticky end*. Berdasarkan ketentuan di atas maka untuk ligasi 500 µg DNA digunakan dua unit enzim dengan total volume 30 µl. Reaksi dilakukan pada 16°C selama 16 jam. Hasil ligasi digunakan untuk transformasi *E. coli*, transforman *E. coli* diharapkan membawa plasmid rekombinan pRS314-*pdi1*. Untuk mendapatkan plasmid rekombinan dalam jumlah banyak dengan variasi mutasi yang tinggi terhadap semua transforman yang diperoleh diinokulasikan pada media cair untuk isolasi plasmid skala besar.

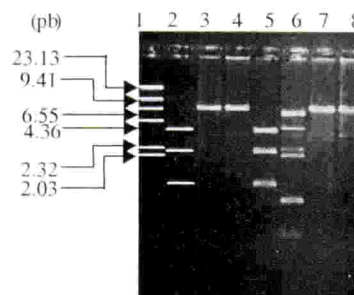
Transformasi *S. cerevisiae* dan Pertukaran Plasmid. Teknik transformasi khamir dilakukan menurut Ito *et al.* (1983) dan pertukaran plasmid menurut Sikorsi & Boeke (1991) yang dimodifikasi. Pembuatan media pertukaran plasmid dilakukan dengan sistem *top agar* dengan bagian yang mengandung FOA ada pada lapisan atas media padat.

Larutan FOA (dua kali konsentrasi, 2 x 1 g/l) diperoleh dengan cara pemanasan pada suhu 55°C hingga semua FOA larut, sterilisasi dilakukan dengan milipore, kemudian dicampurkan dengan media YNB (2 kali komposisi, komposisi perliter: YNB 0.7%, glukosa 2%, agar bacto 2%), selanjutnya dicawankan sebagai lapisan atas media pertukaran plasmid.

Penanaman pada media FOA dilakukan dengan cara membuat suspensi sel khamir. Biakan diambil dengan menggunakan tusuk gigi steril, kemudian disuspensikan ke dalam 50 ml akuades. Selanjutnya suspensi sel khamir diambil sebanyak 5 µl untuk masing-masing transforman khamir, dan ditanam pada media FOA. Biakan diinkubasi pada suhu 30°C selama 3-5 hari. Koloni dipindahkan pada media YNB yang dibubuhi asam amino adenina, leusina, dan urasil untuk diamati pertumbuhannya masing-masing.

HASIL DAN PEMBAHASAN

DNA Vektor untuk Ligasi. Terhadap transforman *E. coli* yang diduga membawa plasmid pRS314-*PDII* dilakukan analisis restriksi, hal ini bertujuan untuk memastikan apakah transforman tersebut membawa plasmid yang diharapkan. Analisis restriksi terhadap plasmid hasil isolasi dilakukan dengan menggunakan enzim *HpaI*, *BglIII*, *EcoRV*, dan *HindIII*. Hasil elektroforesis agarosa, menunjukkan bahwa pita DNA yang diperoleh mempunyai pola yang sama dengan peta plasmid pRS314-*PDII* (Gambar 2). Misalnya pemotongan dengan enzim *HpaI* atau *BglIII* akan menghasilkan satu pita seperti pada kolom 3, 4, 7, dan 8 (Gambar 4).



Gambar 4. Elektroforegram gel agarosa hasil pemotongan plasmid pRS314-*PDII* dengan enzim restriksi. 1: DNA λ dipotong dengan *HindIII*; 2: pRS314-*PDII* kontrol/ *EcoRV*; 3,7: pRS314-*PDII*/*HpaI*; 4,8: pRS314-*PDII*/*BglIII*; 5: pRS314-*PDII*/*EcoRV*; 6: pRS314-*PDII*/*HindIII*

Pemotongan dengan enzim *EcoRV* menghasilkan tiga pita karena ada tiga sisi pada plasmid yang dikenali oleh enzim *EcoRV* seperti terlihat pada kolom 2 dan 5. Kecuali pada kolom 6, pemotongan plasmid dengan enzim *HindIII* seharusnya diperoleh empat pita, tetapi pada hasil elektroforesis diperoleh lima pita, hal ini diduga karena pemotongan yang tidak sempurna. Berdasarkan hasil analisis restriksi tersebut maka dapat dipastikan bahwa transforman *E. coli* yang diperoleh membawa plasmid pRS314-*PDII*.

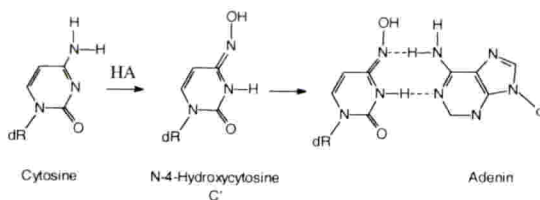
Penyiapan kerangka vektor dilakukan dengan cara pemotongan plasmid pRS314-*PDII* menggunakan enzim *HpaI* - *BglIII*, kemudian fragmen DNA dipisahkan melalui elektroforesis gel agarosa. Fragmen DNA dengan ukuran

6300 pb digunakan sebagai kerangka vektor, sedangkan fragmen DNA yang berukuran 758 pb digunakan untuk fragmen sisipan. Isolasi pita DNA dari gel elektroforesis dilakukan dengan menggunakan metode *bioclean* dan hasil yang diperoleh seperti terlihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Elektroforegram hasil pemotongan plasmid dengan *HpaI*-*BglII* dan hasil isolasi masing-masing fragmen dengan metode *Bioclean*. 1 = DNA λ /*HindIII*; 2 = vektor (6300 pb); 3 = fragmen sisipan (758 pb); 4 = pRS314-*PDII/HpaI* (kontrol)

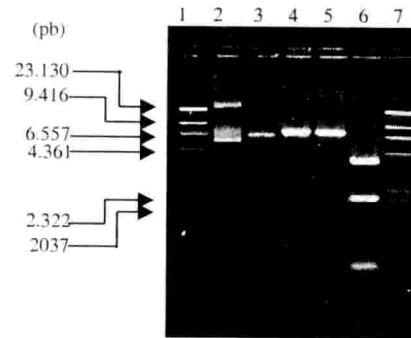
Fragmen DNA Sisipan. Untuk mendapatkan mutan yang termutasi pada daerah *HpaI*-*BglII* dari gen PDI khamir, terhadap fragmen DNA yang berukuran 758 pb, dilakukan mutasi dengan menggunakan hidroksilamin. Perlakuan mutasi dengan hidroksilamin memberikan kecenderungan mutasi transisi GC→AT. Mekanisme yang telah diusulkan untuk mutasi ini ialah terjadinya hidroksilasi gugus NH₂ bebas pada basa sitosina, menyebabkan sitosina cenderung termodifikasi untuk berinteraksi dengan adenina, sebagai konsekuensinya timina akan menggantikan posisi C yang seharusnya komplemen dengan guanina. Mekanisme reaksi secara terperinci dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Mekanisme mutasi menggunakan hidroksilamin. HA: hidroksilamin, dR: deoksiribosa.

Untuk mendapatkan plasmid rekombinan dilakukan ligasi antara kerangka vektor dengan fragmen sisipan termutasi HA menggunakan enzim ligase DNA T4. Keberhasilan ligasi sangat dipengaruhi oleh kondisi reaksi ligasi, perbandingan jumlah kerangka vektor dengan fragmen sisipan, serta adanya pengaruh logam lain yang mengganggu kerja enzim. Plasmid rekombinan selanjutnya digunakan untuk transformasi *E. coli*, hal ini bertujuan untuk memperoleh klon yang sebanyak-banyaknya dengan variasi mutasi yang cukup tinggi dibandingkan dengan penggunaan plasmid rekombinan tersebut langsung untuk transformasi khamir. Terhadap beberapa transforman *E. coli* yang membawa plasmid rekombinan juga dilakukan

analisis restriksi. Hasil analisis restriksi plasmid rekombinan seperti terlihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Hasil analisis restriksi plasmid rekombinan pRS314-*pdi1*. 1,7: DNA λ /*HindIII*; 2: pRS314-*pdi1* utuh; 3: pRS314-*PDII/HpaI*; 4: pRS314-*PDII/HpaI*; 5: pRS314-*pdi1/BglII*; 6: pRS314-*pdi1/HindIII*

Plasmid rekombinan selanjutnya diisolasi dari semua transforman *E. coli* yang diperoleh dan digunakan untuk transformasi khamir. Hal ini bertujuan untuk memperoleh mutan PDI khamir dengan variasi mutasi yang tinggi. Sebagai sel inang digunakan khamir galur 2736 (*MAT α* , *ura3-1*, *leu2-3,-112*, *his3-11,-15*, *ade2-1*, *trp1-1*, *pdi::HIS3*) [*pCT37*]. Galur ini tidak dapat mensintesis asam amino leusina, triptofan, dan adenina karena mengalami kerusakan pada gen-gen yang bertanggung jawab untuk mensintesis enzim-enzim yang dibutuhkan dalam biosintesis asam amino seperti disebutkan di atas. Enzim yang dimaksud ialah β -*isopropylmalate dehydrogenase* (untuk sintesis leusina), *phosphoribosylaminoimidazole carboxylase* (untuk sintesis adenina), dan N-5(*phospho ribosyl*)-*anthranilate* (untuk sintesis triptofan).

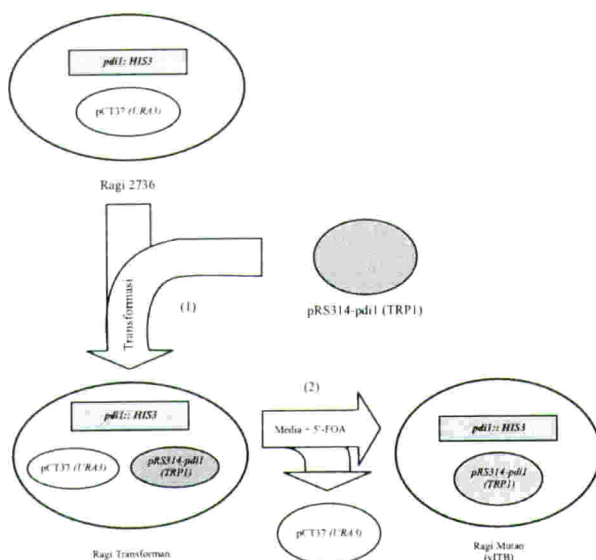
Hasil transformasi khamir 2736 dengan plasmid pRS314-*pdi1* (*TRP*) akan menghasilkan transforman yang membawa dua plasmid, yaitu *pCT37* (*URA3*) dan pRS314-*pdi1* (*TRP*). Hal ini dapat dibuktikan dengan uji auktotropi terhadap beberapa koloni transforman. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa semua transforman hidup pada media tanpa penambahan asam amino triptofan dan urasil. Sebagai kontrol digunakan galur 2736 (*URA3*) dan khamir 2736 yang hanya mengandung plasmid yang membawa *TRP*. Hal ini menyarankan bahwa transforman di atas membawa plasmid hasil mutasi.

Pertukaran Plasmid. Untuk mengisolasi mutan PDI yang diharapkan dilakukan pertukaran plasmid terhadap transforman khamir di atas dengan menggunakan media seleksi yang mengandung FOA. Plasmid *pCT37* dengan penanda *URA3* diharapkan akan terusir dari sel, sedangkan plasmid pRS314-*pdi1* dengan penanda *TRP* tetap tinggal dalam sel sehingga fungsi PDI digantikan oleh gen yang telah termutasi.

Senyawa FOA dapat diubah oleh enzim orotidin-5-fosfat dekarboksilase yang diperlukan untuk biosintesis urasil menjadi 5-fluorourasil yang beracun bagi sel khamir. Untuk mempertahankan hidupnya sel tidak boleh membawa gen *URA3* yang dibawa oleh plasmid *pCT37*. Melalui suatu mekanisme yang belum diketahui

dengan pasti, plasmid pCT37 dapat diusir dari sel transforman (Gambar 8). Fenotipe khamir hasil pertukaran plasmid diamati setelah 3-5 hari, beberapa di antaranya tumbuh subur, kurang subur, sangat tidak subur, dan letal.

Untuk memastikan bahwa plasmid pCT37 telah terusir dari sel khamir dilakukan konfirmasi hasil pertukaran plasmid dengan menumbuhkan khamir pada media tanpa urasil dan tanpa triptofan. Pada media yang tidak mengandung urasil semua koloni memperlihatkan fenotipe letal karena plasmid yang membawa *URA3* telah terusir. Pada media tanpa triptofan semua koloni hidup karena khamir mempunyai plasmid pRS314-*pdi1* dengan penanda *TRP*. Pertukaran plasmid dilakukan beberapa kali untuk melihat konsistensi fenotipe mutan.



Gambar 8. Mekanisme pertukaran plasmid di dalam sel khamir. (1) Transformasi khamir dengan plasmid rekombinan yang termutasi pada daerah *HpaI*-*BglII*, (2) Pertukaran plasmid pCT37 dengan menggunakan media seleksi FOA.

Fenotipe Mutan. Perbedaan fenotipe khamir yang telah mengalami pertukaran plasmid mungkin disebabkan oleh pengaruh mutasi terhadap gen PDI hasil induksi oleh hidroksilamin. Pada khamir yang digolongkan tumbuh subur, kemungkinan mutasi tidak terjadi pada gen PDI-nya sehingga fungsi PDI sama dengan tipe liarnya; mutasi terjadi pada gen PDI plasmid pRS314, pada daerah yang tidak penting sehingga perubahan asam amino tidak menimbulkan perubahan struktur PDI atau mutasi terjadi pada daerah yang penting, tetapi tidak mengubah asam amino yang dikode sehingga struktur protein PDI tetap; mutasi menimbulkan perubahan asam amino, tetapi perubahan ini dapat ditolerir oleh rangkaian asam amino pada protein PDI sehingga PDI tetap berada dalam konfirmasi aktifnya.

Mutan dengan fenotipe kurang subur, mungkin disebabkan karena terjadinya perubahan asam amino pada daerah yang cukup penting, sehingga pelipatan protein agak berubah dari konfirmasi aktifnya. Mutan yang tumbuh sangat tidak subur mungkin terjadi mutasi pada posisi yang cukup berarti untuk interaksi PDI dengan substratnya. Sehingga PDI bekerja tidak optimal, menyebabkan protein-protein sel yang membutuhkan aktivitas PDI, tidak dapat berfungsi optimal, akhirnya khamir pun tidak dapat hidup dengan baik, karena pemenuhan kebutuhan energi sel menjadi lambat terpenuhi, sehingga untuk bisa membelah dibutuhkan waktu yang lebih lama dibandingkan dengan *wild tipe*.

Mutan yang mati setelah pengusiran plasmid pCT37, mungkin disebabkan karena terjadi mutasi yang cukup berat di sepanjang daerah *HpaI* - *BglII* atau mutasi terjadi pada titik yang sangat berarti untuk interaksi PDI dengan substratnya. Perubahan asam amino pada titik tersebut akan menimbulkan perubahan struktur dan pelipatan PDI sehingga kereaktifan PDI untuk berinteraksi dengan substrat protein menjadi berkurang. Akibatnya, banyak protein dalam sel khamir yang tidak mempunyai pelipatan protein yang tepat sehingga mudah terdegradasi. Bila protein itu terdegradasi mengakibatkan fungsi biologinya tidak berjalan normal, sehingga reaksi biokimia yang dibutuhkan untuk kelangsungan hidup khamir dapat terganggu. Sebagai konsekuensi akhir dapat menimbulkan kematian khamir. Jadi kerusakan yang serius pada PDI dapat menimbulkan gangguan total terhadap sistem metabolisme khamir. Disamping itu, PDI juga diduga berfungsi untuk pembentukan dinding sel. Perusakan ikatan disulfida dinding sel akan meningkatkan porositas dan menurunkan integritas struktural dinding tersebut, sehingga dalam keadaan ekstrem akan menyebabkan kematian sel khamir.

Diperolehnya mutan yang mati setelah pertukaran plasmid memperkuat dugaan bawa daerah b dan b' memang merupakan daerah yang penting pada gen PDI untuk berinteraksi dengan substratnya. Dengan demikian daerah b dan b' mengandung asam amino yang esensial untuk fungsi PDI dalam ragi. Untuk mengetahui asam amino yang bertanggungjawab terhadap keesensialan gen PDI maka mutan yang diperoleh perlu dianalisis baik secara *in vivo* maupun secara *ex vivo*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada proyek URGE yang telah mendanai penelitian ini, juga kepada Ibu Dr. Muliawati Sindumarta, Bapak Akhmaloka, Ph.D., Ibu Dessy Natalia, Ph.D. yang telah membantu penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, E.A., J.M. Luz & J.W. Lennarz, 1997. An investigation of the mechanism of catalysis by protein disulfide isomerase, abstr. A927. *J. Faseb.* 11: 927.
- Atlas R.M. 1993. *Handbook of Microbiological Media*. London: CRC Press, Inc.
- Farquhar, R., N. Honey, S.J. Murant, R.P. Bosier, L. Schultz, D. Montgomery, R.W. Ellis, R.B. Freedman & M.F. Tuite 1991. Protein disulphide isomerase is essential for viability in *S. cerevisiae*. *Gene* 108:81-89.
- Freedman, R.B., B.E. Brockway & N. Lambert. 1984. Protein disulphide isomerase and the formation of native disulphide bonds. *Biochem. Soc. Trans.* 12:929-932.
- Ito, H.F., Y. Murata, K. & A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153:163 - 168.
- Kaiser, C., S. Michaelis & A. Mitchell. 1994. *Methods in Yeast Genetics*. New York: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual.
- LaMantia, M.L. & W.J. Lennarz. 1993. The essential function of yeast protein disulfide isomerase does not reside in its isomerase activity. *Cell* 74:899-908.
- Mizunaga, T., Y. Katakura, T. Miura & Y. Mariyama. 1990. Purification and characterization of yeast protein disulphide isomerase. *J. Biochem.* 108:846-851.
- Muntholib. 1998. Manipulasi Gen PDI1 dengan cara delesi internal dan pengaruhnya terhadap viabilitas sel *S. cerevisiae*. Tesis. Bandung: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Teknologi Bandung.
- Natalia, D. 1994. Studies on yeast protein disulphide isomerase. Tesis. Centerbury: The Faculty of Natural Sciences, University of Kent.
- Noiva, R. & W.J. Lennarz. 1992. Protein disulfide isomerase: a multifunctional protein resident in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 267:3553-3556.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Ed. ke-2. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sikorski, R.S. & J.D. Boeke. 1991. *In vitro* mutagenesis and plasmid shuffling: from cloned gene to mutant yeast, hlm. 302-318. Di dalam: C. Guthrie & G.R. Fink (ed), *Methods of Enzymology No. 194*. San Diego: Academic Press.