

BULETIN *AgroBio*

ISSN 0853-9022

Vol. 3, No. 2, 2000

JURNAL TINJAUAN ILMIAH RISET BIOLOGI DAN BIOTEKNOLOGI PERTANIAN

Identifikasi Bahan Makanan Alternatif dan Teknologi Pengolahannya untuk Ketahanan Pangan Nasional	Sri Widowati ...	45
Prospek dan Produksi Enzim α -amilase dari Mikroorganisme	Nur Richana	51
Protein Disulfida Isomerase: Pembentuk Ikatan Disulfida dan Pelipatan Protein	Jumiarti Agus ...	59
Kajian Metode Skrining Padi Tahan Kekeringan	Didi Suardi ...	67
Peranan dan Potensi <i>Dietary Insecticidal Protein</i> dalam Rekayasa Genetika Tanaman Tahan Hama	Bahagiawati Amirhusin	74



Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian

Penerbit

Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian
Departemen Pertanian

Alamat Penerbit

Jalan Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111, Indonesia

E-mail: borif@indo.net.id & rifcb@indo.net.id

Telepon: (0251) 339793, 337975

Faksimile: (0251) 338820

Kala Terbit

Dua nomor per volume

Penanggung Jawab

Sugiono Moeljopawiro
Kepala Balai Penelitian
Bioteknologi Tanaman Pangan

Redaktur Teknis

Novianti Sunarlim
Sutrisno
Ida Hanarida Somantri
Sri Widowati

Redaktur Pelaksana

Suyono
Ida N. Orbani

Buletin AgroBio (dahulu bernama **Buletin Penelitian**) memuat artikel tinjauan ilmiah hasil riset dalam bidang biologi dan bioteknologi tanaman. Naskah (boleh ditulis dalam bahasa Indonesia atau Inggris) yang diajukan untuk diterbitkan hendaknya belum pernah dipublikasikan pada media cetak manapun dan ditulis sesuai dengan "Pedoman Bagi Penulis" (lihat sampul belakang bagian dalam). Dewan Redaksi berhak menyunting naskah tanpa mengubah isi dan makna tulisan atau menolak menerbitkan suatu naskah.

Naskah dapat bersifat tinjauan ilmiah (kritis) atau tinjauan informatif (anotasi) terhadap subjek tertentu, atau gabungan antara keduanya. Tinjauan ilmiah merupakan hasil evaluasi, sintesis, dan analisis kritis tentang riset bagi kepentingan ilmu pengetahuan dan teknologi, sedangkan tinjauan informatif merupakan hasil evaluasi bagi kepentingan pengguna.

Isi naskah dapat membahas salah satu dari butir-butir berikut, yaitu: (a) status riset pada subjek tertentu, baik yang telah, sedang, maupun yang akan dikerjakan, (b) pengungkapan masalah dan pemecahannya, (c) pengembangan suatu metode atau konsepsi, dan (d) gagasan dan pendekatan yang dapat dijadikan landasan bagi suatu usulan riset. Sumber bacaan seyogyanya meliputi bahan pustaka terbitan dalam dan luar negeri yang terkini dan relevan.

Protein Disulfida Isomerase: Pembentuk Ikatan Disulfida dan Pelipatan Protein

Jumiarti Agus

Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor

ABSTRACT

Protein Disulfide Isomerase: Protein Disulfide Bond Formation and Protein Folding. Jumiarti Agus. Protein is synthesized by the ribosomes *in vivo* as linear polypeptide chains and they have to fold to their final conformations either during or after its biosynthesis. There are two proteins involved in the protein folding process, namely molecular chaperones and catalysts. Protein disulfide isomerase (PDI, E.C. 5.3.4.1) is an enzyme that plays a role in protein disulfide bond formation and protein folding. PDI have been isolated from various organisms, such as mammalian livers, plant, green algae, and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). PDI enzymes that were isolated from the various organisms had similarities, they were homodimer enzymes. Each monomer had two active site domains (a and a') that contained a cysteine-glycine-histidine-cysteine (C-G-H-C) sequence. PDI gene from *S. cerevisiae* is haplo-lethal, but up to date the essential amino acids involved in the PDI activity and viability are not known. PDI is a multifunctional protein that acts as a β sub-unit of prolyl-4 hydroxylase, a component of microsomal triglyceride transfer protein (MTP), an enzyme bonding peptide or protein, and as chaperones. A number of proteins that have similar function to that of PDI had been identified, particularly around the active site C-G-H-C sequence. These proteins were thioredoxin, DsbA, and Eug1p.

Key words: Protein disulfide isomerase, formation of disulfide bond, protein folding

Protein yang baru disintesis di ribosom belum mempunyai aktivitas biologi, karena masih merupakan untaian linier dari polipeptida. Agar protein tersebut mempunyai aktivitas biologi, polipeptida tersebut harus mengalami pelipatan (*folding*), di mana pelipatan protein yang tepat akan menghasilkan struktur tiga dimensi protein fungsional. Proses pelipatan protein dapat terjadi pada saat biosintesis protein (ko-translasi) maupun setelah sintesis protein (pascatranslasi). Protein yang akan mengalami pelipatan, segera melewati membran retikulum endoplasma (RE) dan selanjutnya masuk ke dalam lumen RE.

Pelipatan protein tidak bisa terjadi dengan sendirinya, karena proses pembentukan ikatan disulfida alami hanya terjadi melalui bantuan protein lain, walaupun kondisi redoks di dalam sel memungkinkan

untuk pembentukan ikatan disulfida. Ada dua kelompok protein yang berperan penting dalam proses pelipatan rantai polipeptida, yaitu enzim foldase dan molekul chaperon (Bardwell *et al.*, 1993; Wang, 1997).

Dikenal dua tipe enzim foldase, yakni protein disulfida isomerase (PDI) dan peptidil prolil cis/trans isomerase (PPI). PDI berperan untuk menghasilkan pelipatan protein, melalui pembentukan ikatan disulfida antarresidu sistein, pada substrat protein. Bila terjadi kesalahan pembentukan ikatan disulfida, maka PDI akan mengoreksi dengan cara mengkatalisis reaksi penataan ulang ikatan S-S (aktivitas isomerase) sedangkan PPI merupakan enzim yang mengkatalisis isomerisasi cis/trans terhadap residu prolin (Gilbert, 1990). Lain halnya dengan molekul chaperon, yang berperan dalam proses pelipatan polipeptida tanpa melibatkan modifikasi kovalen (Ellis dan van der Vies, 1997).

PROTEIN DISULFIDA ISOMERASE

Protein disulfida isomerase (E.C. 5.3.4.1) merupakan enzim yang mengkatalisis pembentukan ikatan disulfida melalui reaksi redoks atau reaksi isomerisasi pada protein, sehingga protein mempunyai konformasi yang tepat. Ikatan disulfida banyak ditemukan pada protein ekstraseluler, seperti protein yang terdapat pada pencernaan dan permukaan sel (Freedman *et al.*, 1984). Ikatan tersebut berperan penting untuk menstabilkan struktur tersier dan kuaterner protein, sehingga protein mempunyai aktivitas biologi yang khas (Kaska *et al.*, 1990). Penamaan PDI didasarkan atas aktivitas katalitik *in vitro* yang ditunjukkannya, yaitu kemampuan enzim ini mereaktivasi *scrambled* RNase dengan menyusun kembali ikatan disulfida yang tidak benar (Freedman *et al.*, 1984; Laboissiere *et al.*, 1995).

PDI terdapat di dalam retikulum endoplasma (RE), yaitu organel sel terbesar yang dibungkus oleh membran plasma. Protein ini terdapat dalam jumlah yang melimpah pada jaringan mamalia dan konsentrasinya di dalam RE mencapai tingkat milimolar, sedangkan pada *Saccharomyces cerevisiae* PDI hanya ditemukan dalam jumlah sedikit (Mizunaga *et al.*, 1990; Noiva dan Lennarz, 1992; Natalia, 1994).

Enzim PDI mempunyai spesifisitas yang luas terhadap substrat. PDI dapat berperan dalam tiga tipe reaksi yang berbeda, 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 ko-translasi dan pascatranslasi.

Pembentukan ikatan ini terjadi dalam lumen retikulum endoplasma dari sel eukariot. Pada sel prokariot, misalnya pada *Escherichia coli*, tidak ditemui adanya PDI. Fungsi PDI digantikan oleh protein lain yang dikenal dengan DsbC, berperan penting untuk pembentukan ikatan disulfida protein periplasma (Missiakas *et al.*, 1994).

PDI merupakan enzim homodimer, di mana masing-masing monomer terdiri dari domain yang identik. Pada kedua monomer ditemui dua domain yang merupakan pusat aktif enzim, yaitu domain a dan a'. Urutan asam amino pada pusat aktifnya terdiri dari sistein-glisin-histidin-sistein (CGHC).

Mariana (1998) menemukan bahwa enzim PDI termasuk enzim alosterik (enzim yang mempunyai sisi pengikatan lain selain sisi aktif) yang berinteraksi secara kooperatif positif terhadap substratnya dengan nilai koefisien Hill (h) sebesar 4. Basitrasin merupakan modulator negatif bagi PDI. Hasil studi kinetika enzim menunjukkan bahwa PDI tergolong sebagai enzim alosterik K, artinya kenaikan konsentrasi modulator menyebabkan perubahan harga konstanta Michaelis Menten (K_M) tetapi harga laju reaksi maksimum (V_{max}) tetap.

PROTEIN DISULFIDA ISOMERASE PADA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Dalam rangka mendapatkan informasi mengenai fungsi *in vivo* PDI untuk sistem eukariot, maka pada kebanyakan penelitian menggunakan *S. cerevisiae* sebagai model. Hal ini disebabkan karena ragi merupakan organisme eukariot yang mudah tumbuh, memiliki siklus hidup yang singkat, dan dapat memperlihatkan sebagian besar sifat eukariot tingkat tinggi, serta mempunyai sistem genetik yang telah terdefinisi dengan baik (Mizunaga

et al., 1990). PDI bersifat esensial bagi viabilitas ragi, di mana tanpa PDI ragi tidak bisa hidup. Sehingga sifat ini banyak digunakan untuk studi struktur fungsi PDI, dalam usaha menemukan fragmen dan asam amino yang bertanggung jawab terhadap sifat esensialitas dari gen PDI. Studi mutasi pada gen PDI ragi yang telah dilakukan disajikan pada Tabel 1.

Gen yang mengkode PDI ragi dikenal dengan PDII (Gunther *et*

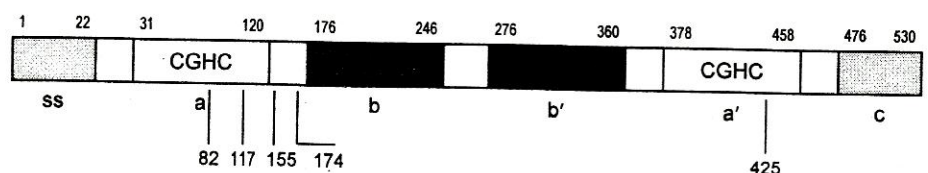
al., 1993). Beberapa kelompok peneliti secara terpisah menemukan, bahwa gen PDI ragi terdiri atas 1590 nukleotida yang ekuivalen dengan 530 residu asam amino dan sekitar 30% identik dengan PDI mamalia, di mana kemiripan paling tinggi ditemukan pada daerah sisi aktif enzim (Farquhar *et al.*, 1991; Mizunaga *et al.*, 1990; Scherens *et al.*, 1991).

Gen struktural PDII *S. cerevisiae* terdiri dari domain sinyal pepti-

Tabel 1. Mutasi pada gen PDI1 dan pengaruhnya terhadap aktivitas isomerase serta viabilitas sel *Saccharomyces cerevisiae*

Perlakuan mutasi	Viabilitas sel <i>S. cerevisiae</i>	Aktivitas terhadap PDI wild type (%)	Pustaka
Substitusi residu aa salah satu sisi aktif	+	55-60	Kaska <i>et al.</i> , 1990
Substitusi residu aa kedua sisi aktif	+	< 5	Kaska <i>et al.</i> , 1990
Pemotongan 35 residu aa mulai dari ujung c	+	82	Kaska <i>et al.</i> , 1990
Pemotongan 152 residu aa dari ujung c	+	39	Kaska <i>et al.</i> , 1990
Pemotongan 218 residu aa dari ujung c	-	33	Kaska <i>et al.</i> , 1990
Pemotongan 416 residu aa dari ujung c	-	12	Kaska <i>et al.</i> , 1990
Pemotongan 97 residu aa dari ujung N	TD	47	Natalia, 1994
Inseri oligonukleotida <i>double stranded</i> pada basa nomor 1474 dari kodon terminasi	+	71	Natalia, 1994
Inseri HIS3 pada basa nomor 1551	+	TD	Natalia, 1994
Inseri HIS3 pada basa nomor 1111	+	TD	Kaska <i>et al.</i> , 1990
Inseri HIS3 pada basa nomor 793	-	TD	Kaska <i>et al.</i> , 1990
Substitusi residu sistein di luar sisi aktif	+	12-20	Anderson <i>et al.</i> , 1997
Delesi abb'	-	TD	Muntholib, 1998
Mutasi random sepanjang bb' dengan hidrosilamin	Beberapa letal	TD	Jumiarti, 1998
Mutasi random dengan PCR	Beberapa letal	TD	Mudzakkar, 1998

Keterangan: TD = tidak ditentukan, aa = asam amino



Keterangan: ss = urutan sinyal (*signal sequence*), a dan a' = sisi aktif (CGHC), b dan b' = domain yang diduga sebagai sisi pengikat protein, c = sisi retensi pada retikulum endoplasma (RE)

Angka pada bagian atas menunjukkan urutan residu asam amino, sedangkan angka yang ditunjukkan oleh anak panah, merupakan sisi potensial untuk glikosilasi N

Gambar 1. Domain-domain protein disulfida isomerase

da (*signal sequence*, ss) yang berperan untuk transfer protein ke dalam rumen retikulum endoplasma, dua domain sisi aktif (a dan a'), dua domain yang diduga merupakan sisi pengikat protein (b dan b'), dan domain sisi retensi pada retikulum endoplasma (c), yang merupakan urutan residu asam amino yang bersifat asam (Farquhar *et al.*, 1991; Natalia, 1994). Domain-domain ini dapat dilihat pada Gambar 1.

Daerah N-terminal PDI mengandung suatu sinyal peptida hidrofo-bik, menyarankan bahwa PDI dapat ditransfer ke dalam lumen retikulum endoplasma (Kaska *et al.*, 1990). Daerah ini merupakan ciri prekursor protein RE yang akan mengalami pemutusan pada saat berlangsungnya translokasi PDI ke RE. Pemutusan sinyal peptida diduga terjadi setelah residu asam amino ke-22 (Farquhar *et al.*, 1991; Natalia, 1994).

Daerah c terminal merupakan domain poli asam, terdapat 4 residu asam amino yang merupakan ciri protein komponen RE, yaitu histidin-aspartat-glutamat-leusin (Farquhar *et al.*, 1991). Keberadaan PDI di dalam RE dipertahankan melalui interaksi domain ini dengan protein reseptor Erd2p (Natalia, 1994). PDI ragi mempunyai 5 sisi yang potensial untuk glikosilasi-N yang ditemui pada urutan residu asam amino asparagin-X-serin/threonin. Hidrolisis PDI ragi hasil isolasi menggunakan enzim endoglukosa-minidase-H, menyebabkan penurunan Mr monomer PDI dari 70 kD menjadi 60 kD (Gunther *et al.*, 1991; Mizunaga *et al.*, 1990; Scherens *et al.*, 1991). Penurunan berat molekul sebesar 10 kDa tersebut menunjukkan bahwa PDI ditranslokasikan ke dalam RE (Mizunaga *et al.*, 1990).

Gen PDI1 merupakan gen kopi tunggal dalam genom ragi, kerusakan gen ini dengan alel *HIS3* bersifat haplo-lethal. Mutasi pada setiap sisi

aktif PDI, dengan cara substitusi sistein pertama menjadi serin, menyebabkan ragi menjadi lethal.

Sedangkan delesi daerah abb' juga menyebabkan ragi menjadi lethal (Muntholib, 1998). Hal ini menyarankan bahwa fungsi esensial PDI, tidak hanya ditentukan oleh aktivitas isomerisasinya, tetapi ada aktivitas lain yang belum terdefinisikan (Farquhar *et al.*, 1991; LaMantia *et al.*, 1991; Tachikawa *et al.*, 1991; Anderson *et al.*, 1997) yang berada di luar sisi aktif enzim.

Dari beberapa penelitian PDI ragi, diduga domain b dan b' mempunyai peranan yang penting. Pemotongan sebanyak 35 residu asam amino (domain yang masih ada abb'a') dan 152 residu asam amino dari ujung c (domain yang ada abb'), menurunkan aktivitas PDI, namun ragi masih tetap hidup. Sedangkan pemotongan sebanyak 218 residu asam amino (daerah yang didelesi c hingga sebagian daerah b') dan 416 residu asam amino dari ujung c (hanya ada domain a), menyebabkan ragi menjadi lethal (LaMantia dan Lennarz, 1993). Perlakuan mutasi random dengan hidrosilamin pada daerah di antara dua sisi aktif enzim (b dan b'), beberapa di antaranya menghasilkan mutan yang bersifat lethal, hal ini menyebabkan terdapat asam amino yang menentukan esensialitas PDI pada daerah b dan b', namun belum diketahui posisi dan jenis asam amino tersebut pada domain PDI (Jumiarti, 1998). Oleh ka-

rena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan secara detil residu asam amino dan posisinya yang menentukan esensialitas dari gen PDI.

PROTEIN DISULFIDA ISOMERASE DARI ORGANISME LAIN

PDI telah diisolasi, dimurnikan dan dikarakterisasi dari berbagai sumber, seperti hati mamalia (Lambert dan Freedman, 1993), embrio ayam, tanaman (Freedman *et al.*, 1984), alga hijau *Chlamydomonas reinhardtii* (Kaska *et al.*, 1990) dan *S. cerevisiae* (Mizunaga *et al.*, 1990).

PDI dari berbagai sumber menunjukkan beberapa persamaan di mana semuanya merupakan enzim homodimer, mempunyai dua sisi katalitik untuk masing-masing monomer, dengan urutan residu asam amino cys-gly-his-cys. Massa molekul relatif dari berbagai PDI yang telah diisolasi berkisar antara 100-140 kDa dengan subunitnya ~55-70 kDa, mempunyai pI antara 4-4,9. PDI dari berbagai sumber, mempunyai aktivitas optimum pada pH di atas 7, yaitu sekitar 7,5-8,5. Sifat PDI dari berbagai organisme disajikan pada Tabel 2.

Masing-masing subunit PDI tidak memberikan aktivitas yang sama dalam mengkatalisis substratnya. Residu sistein pertama dari masing-masing sisi aktif enzim sangat berperan dalam aktivitas isomerisasi enzim (Tabel 3).

Tabel 2. Sifat protein disulfida isomerase dari berbagai organisme

Organisme	Mr (kDa)		pI	pH optimum
	Natif	Tereduksi		
Hati sapi	107	57	4,2	7,8
Hati tikus	-	57	4,3	-
Embrio ayam	140	55	4,4	7,5-7,8
<i>C. reinhardtii</i>	120	60	-	7,4-7,6
<i>Humicola insolens</i>	120	60	3,5	-
<i>S. cerevisiae</i>	140	70	4,0	8,5

Keterangan: Berat molekul relatif ditentukan dengan gel filtrasi, berat molekul tereduksi ditentukan dengan SDS PAGE

Berbeda dengan PDI yang terdapat pada sistem vertebrata, PDI pada *C. reinhardtii*, tidak merupakan subunit β dari protein enzim prolil-4-hidroksilase, yaitu enzim yang mengkatalisis pembentukan residu 4-hidroksiprolil pada polipeptida kolagen yang baru dibentuk.

PROTEIN DISULFIDA ISOMERASE MERUPAKAN ENZIM MULTIFUNGSI

Fungsi utama dari PDI adalah sebagai katalis untuk pembentukan ikatan disulfida alami dan pelipatan protein. Di samping itu, PDI juga mempunyai fungsi lain, yaitu sebagai subunit sistem enzim yang lebih kompleks, sehingga PDI dikenal sebagai enzim multifungsi.

PDI merupakan komponen dari enzim prolil-4-hidroksilase (P4H). Enzim ini mengkatalisis pembentukan residu 4 hidroksiprolil pada polipeptida kolagen yang baru dibentuk. P4H merupakan tetramer $\alpha_2\beta_2$, di mana subunit α dengan berat molekul 64 kDa, merupakan bagian utama yang memuat residu sisi aktif, sedangkan subunit β dengan berat molekul 60 kDa merupakan PDI.

Pada kompleks ini PDI diduga berperan untuk mencegah agregasi subunit α dan untuk mempertahankan keberadaan kompleks didalam retikulum endoplasma (Noiva dan Lennarz, 1992; Pihlajaniemi *et al.*, 1987; Vuori *et al.*, 1992).

PDI juga merupakan komponen dari *microsomal triglyceride transfer protein* (MTP), yaitu protein retikulum endoplasma untuk transfer trigliserida, kolesterol ester, dan sebagian kecil fosfatidilkolin. MTP terdiri dari dua subunit, yaitu *triglyceride transfer protein* yang berukuran 88 kDa dan PDI berukuran 58 kDa. Fungsi PDI di dalam kompleks MTP berperan untuk mempertahankan aktivitas katalitik dan mencegah terjadinya agregasi kompleks *trigly-*

ceride transfer protein (Natalia, 1994; Wetterau *et al.*, 1991).

PDI memperlihatkan aktivitas seperti molekul chaperon karena dapat mempertahankan pelipatan, mencegah agregasi, dan memediasi pelipatan terhadap protein yang tidak punya ikatan disulfida. Fungsi ini dibuktikan oleh Hayano *et al.* (1995), di mana PDI mutan yang kehilangan aktivitas isomerisasinya dapat mempercepat pelipatan intraselular untuk lisozim manusia secara *in vivo*. Fungsi sebagai molekul *chaperon* tidak terletak pada sisi aktif PDI, tetapi pada sisi pengikatan polipeptida (Wang, 1997).

Protein-protein sekresi di dalam RE akan berinteraksi dengan PDI, apakah protein itu punya residu sistein atau tidak. Hanya saja aktivitas pengikatan PDI terbatas pada protein linier (polipeptida) atau protein yang melipat sebagian (*partially folded*) (Freedman dan Klappa, 1998).

Di samping adanya aktivitas pengikat protein, PDI juga mempunyai fungsi sebagai pengikat peptida. Afinitas pengikatan oleh PDI sebanding dengan panjangnya rantai peptida. Semakin panjang rantai peptida maka afinitas pengikatan

PDI semakin besar. Adanya residu sistein pada rantai peptida akan memperbesar afinitas pengikatan oleh PDI. Bila panjang rantai peptida sama, maka afinitas PDI lebih besar 4-8 kali pada rantai peptida yang mempunyai residu sistein. Bagian yang bertanggung jawab dalam pengikatan rantai peptida adalah domain retensi pada retikulum endoplasma (Mizunaga *et al.*, 1990; Natalia *et al.*, 1994).

SIFAT KATALISIS PROTEIN DISULFIDA ISOMERASE

PDI mengkatalisis pembentukan dan pemecahan ikatan disulfida pada protein. Reaksi yang dikatalisis dapat dibedakan berdasarkan kondisi substrat dan lingkungannya. Katalisis oksidasi ditiol atau reduksi ikatan disulfida tergantung pada kondisi redoks lingkungannya dan pada tipe reaksi ini terjadi perubahan potensial reduksi dari substrat dan enzim (Gilbert, 1990). Sedangkan selama isomerisasi ikatan disulfida, substrat tidak mengalami perubahan keadaan oksidasi.

Pembentukan ikatan disulfida protein, terjadi bila substrat dalam keadaan tereduksi (RNase tereduksi).

Tabel 3. Pengaruh mutasi pada sisi aktif enzim protein disulfida isomerase dari berbagai sumber terhadap aktivitasnya

Pengukuran	Mutan	Aktivitas (%)	Referensi
sRNase/DTT(SH)	SGHC..CGHC	46	Vuori <i>et al.</i> , 1992 (manusia)
	CGHC..SGHC	47	
	SGHC..SGHC	2	
rBPTI/DTT (SS)	CLHS..CGHC	60	LaMantia dan Lennarz, 1993 (<i>S. cerevisiae</i>)
	CGHC..CIHS	60	
	CLHS..CIHS	5	
sRNase/GSH/GSSG	SGHC..SGHC	2	Laboissiere <i>et al.</i> , 1995 (tikus)
	CGHS..CGHS	92	
rRNase/GSH/GSSG	SGHC..SGHC	-	
	CGHS..CGHS	3	
rRNase/GSH/GSSG	CGHS..CGHS	18-30	Lu <i>et al.</i> , 1992 Lyles and Gilbert, 1994 Walker <i>et al.</i> , 1996 (tikus)
	SGHS..SGHS	-	
	CGHC..SGHS	23-50	
	CGHS..SGHS	3-8	
	SGHC..SGHS	-	
	SGHS..CGHC	23-27	
	SGHS..CGHS	9-18	
	SGHS..SGHC	-	

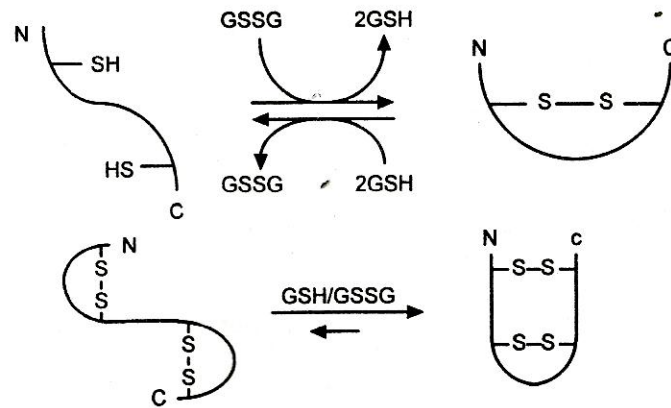
Keterangan: sRNase = *scrambled ribonuclease*, rRNase = *reduced ribonuclease*, rBPTI = *reduced bovine pancreatic trypsin inhibitor*

si) dan bila ada oksidan ringan (O_2) atau campuran glutation GSSG/GSH. Reaksi isomerisasi ikatan disulfida terjadi bila protein substrat mengandung ikatan *nonnative*, maka enzim mengkatalisis penataan ulang ikatan disulfida, contohnya pada *scramble* RNase (RNase yang mempunyai ikatan disulfida yang salah). Kondisi reduksi untuk reaksi ini adalah 10^{-5} M DTT atau 10^{-3} M GSH. Sedangkan reduksi substrat protein, terjadi bila kondisi reduksi lebih kuat (10^{-2} M GSH) dan protein substrat dalam keadaan teroksidasi. Secara sederhana model pembentukan ikatan disulfida dan isomerisasi ikatan disulfida seperti Gambar 2 (Laboissiere *et al.*, 1995).

MEKANISME KATALISIS PROTEIN DISULFIDA ISOMERASE

Salah satu model mekanisme katalisis *in vivo* PDI, diusulkan oleh Wunderlich *et al.* (1995). Pada saat polipeptida memasuki RE, PDI segera mengenali dan mengikat polipeptida tersebut sebagai substrat.

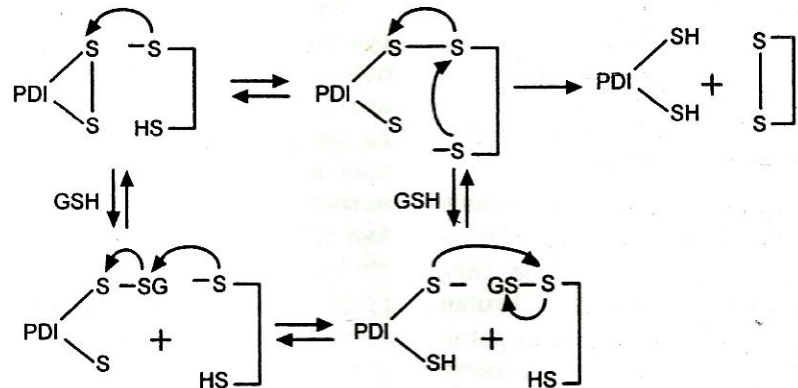
Selanjutnya PDI yang berada dalam keadaan teroksidasi mengambil elektron atau atom hidrogen dari residu sistein substrat polipeptida sehingga terbentuk kompleks enzim substrat. Kompleks enzim substrat tersebut tidak stabil. Pada saat ini proses pembentukan lipatan polipeptida dimulai, pelipatan yang benar dipandu oleh informasi yang terdapat pada rantai polipeptida. Kompleks enzim substrat yang sangat reaktif tersebut kemudian memindahkan ikatan disulfidanya ke residu sistein lain pada substrat polipeptida dengan kontrol potensial reduksi, sehingga terbentuk ikatan disulfida antara molekul substrat. Secara sederhana proses pembentukan ikatan disulfida terjadi melalui transfer ikatan disulfida dari sisi aktif enzim PDI pada molekul substrat mengikuti proses reaksi redoks. Bufer glutation berfungsi



Keterangan: PDI mengkatalisis oksidasi ditiol dan reduksi ikatan disulfida (bagian atas); Reaksi isomerisasi ikatan disulfida (bagian bawah)

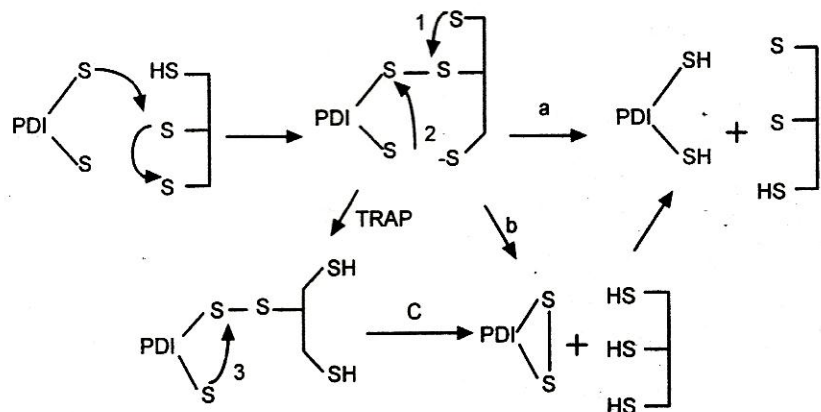
Gambar 2. Model reaksi yang dikatalisis oleh PDI secara *in vitro*

Sumber: Laboissiere *et al.*, 1995



Gambar 3. Mekanisme pembentukan ikatan disulfida oleh enzim protein disulfida isomerase

Sumber: Wunderlich *et al.*, 1995



Keterangan: Penataan ulang ikatan disulfida dengan hanya melibatkan satu gugus tiol pada sisi aktif enzim (a); penataan ulang melalui reaksi reduksi/reoksidasi yang melibatkan kedua gugus tiol pada sisi aktif; substrat yang ditrap (diperangkap) oleh PDI mengalami penataan ulang dengan menggunakan kedua residu sistein pada pusat aktif enzim (c)

Gambar 4. Model mekanisme katalisis reaksi isomerisasi ikatan disulfida oleh protein disulfida isomerase

untuk memediasi reaksi pembentukan ikatan disulfida. Setelah proses pembentukan ikatan disulfida selesai, enzim PDI yang berada dalam keadaan tereduksi akan dioksidasi kembali oleh bufer glutathione teroksidasi. Mekanisme reaksi disajikan pada Gambar 3. Sedangkan mekanisme reaksi isomerisasi ikatan disulfida dapat dilihat pada Gambar 4.

PROTEIN YANG MENYERUPAI PROTEIN DISULFIDA ISOMERASE

Beberapa protein menunjukkan kemiripan dengan PDI, kemiripan itu ditemui pada domain yang memuat sisi aktif enzim PDI (a dan a'). Protein-protein tersebut adalah tioreduksin, DsbA, dan Euglp. PDI mempunyai urutan asam amino sistein-glisin-histidin-sistein (cys-gly-his-cys) pada sisi aktifnya.

Tioreduksin merupakan protein enzim berukuran 12 kDa, ditemukan pada archaea, eubacteria, ragi, tanaman, dan mamalia. Urutan asam amino pada sisi aktifnya terdiri dari sistein-glisin-prolin-sistein (cys-gly-pro-cys). Tioreduksin berperan dalam memediasi reaksi redoks dan nonredoks dalam sel prokaryot dan eukaryot. Aktivitas katalitik tioreduksin dalam pembentukan ikatan disulfida sangat rendah, mungkin disebabkan karena residu histidin pada PDI diganti dengan prolin pada tioreduksin. Mutasi pada residu prolin menjadi histidin menyebabkan aktivitas tioreduksin meningkat menjadi 10 kali. Hawkins *et al.* (1991), menemukan aktivitas PDI 25 kali lebih besar dibandingkan dengan tioreduksin.

Protein lain yang menyerupai PDI adalah DsbA, merupakan protein periplasma yang ditemukan pada bakteri dengan ukuran 21 kDa. DsbA mempunyai aktivitas seperti PDI (pada eukaryot). Urutan asam amino pada sisi aktifnya terdiri dari

sistein-prolin-histidin-sistein (cys-pro-his-cys) (Bardwell *et al.*, 1993).

Euglp merupakan protein retikulum endoplasma yang terglukosilasi, berukuran 65-67 kDa (Natalia, 1994). Berbeda dengan protein lain yang menyerupai PDI, di mana Euglp hanya mempunyai satu residu sistein pada setiap pusat aktifnya, yaitu triptopan-sistein-leusin-histidin-serin-glutamin (trp-cys-leu-his-ser-gln) dan triptopan-sistein-isoleusin-histidin-serin-lisin (trp-cys-ile-his-ser-lys).

PEMANFAATAN PROTEIN DISULFIDA ISOMERASE

Faktor utama penyebab rusaknya protein adalah terjadinya perubahan struktur protein dari struktur alaminya. Protein dapat rusak karena pengaruh suhu, perubahan pH atau adanya ion pengganggu. Peningkatan suhu dapat mengakibatkan putusnya ikatan tertentu dalam struktur protein sehingga lipatan protein menjadi terbuka (atau tidak kompak lagi), mengakibatkan protein kehilangan aktivitasnya sebagai enzim, hormon atau reseptor.

Seperti yang telah diketahui bahwa enzim PDI berperan membentuk dan mempertahankan lipatan protein di dalam sel. Melalui rangkaian penelitian yang terarah, diharapkan PDI dapat dimanfaatkan untuk mempertahankan lipatan protein untuk produksi enzim-enzim ekstraseluler, karena enzim ekstraseluler sangat mudah rusak oleh perubahan kondisi lingkungan. Dengan demikian, aktivitas enzim ekstraseluler dapat dipertahankan.

Di samping itu, PDI juga dapat digunakan untuk produksi vaksin yang digunakan sebagai pencegah penyakit tertentu pada hewan atau ternak. Umumnya produksi vaksin sulit dilakukan karena sering terjadi denaturasi ketika mengekstrak protein dari sumbernya, sehingga protein yang dihasilkan tidak berfungsi

lagi. Dalam kasus ini PDI dapat digunakan untuk memperoleh vaksin yang mempunyai struktur atau pelipatan yang fungsional. Di mana terhadap inang dilakukan transformasi menggunakan vektor pembawa gen PDI, di samping gen pengkode vaksin sehingga vaksin dan PDI akan terekspresi di dalam sel inang. Dengan demikian pelipatan dari vaksin akan dibentuk dan dipertahankan oleh PDI agar tetap berada dalam bentuk alami, sehingga aktivitas dari vaksin tidak rusak, dan kendala dalam memproduksi serta mengekstraksi vaksin dapat diatasi. Peran PDI untuk produksi vaksin yang sedang diterapkan di Indonesia adalah untuk vaksin *scruam fly* (penyakit pada ternak sapi yang dapat mematikan, di Indonesia banyak ditemukan di daerah Kalimantan).

Di samping untuk produksi vaksin, PDI juga dapat digunakan untuk produksi hormon yang sulit dilakukan secara alami.

KESIMPULAN

Protein yang baru disintesis di ribosom belum berfungsi secara biologi. Aktivitas protein diperoleh setelah protein tersebut mempunyai lipatan yang benar. Enzim yang berperan dalam proses pelipatan protein adalah enzim foldase salah satunya protein disulfida isomerase (PDI), yang terdapat pada sistem eukaryot. PDI merupakan enzim retikulum endoplasma (RE). PDI mengkatalisis pembentukan, reduksi dan isomerisasi ikatan disulfida pada protein. PDI dari berbagai sumber (hati mamalia, embrio ayam, tanaman, alga hijau *C. reinhardtii*, dan *S. cerevisiae*) memperlihatkan kemiripan, enzim ini merupakan enzim homodimer. Masing-masing monomer mempunyai dua domain yang memuat sisi aktif enzim dengan urutan asam amino sistein-glisin-histidin-sistein (cys-gli-

his-cys). Pada ragi PDI bersifat unik, di mana ragi akan mati tanpa adanya PDI. Ragi banyak digunakan sebagai model dalam studi struktur fungsi untuk mengetahui asam amino yang esensial bagi aktivitas PDI dan viabilitas ragi. Dari berbagai hasil penelitian ternyata esensialitas PDI tidak hanya ditentukan oleh aktivitas isomerisasinya, diduga sisi b dan b' juga berperan penting. PDI merupakan enzim multifungsi, di mana PDI ditemukan sebagai subunit dari prolil-4-hidroksilase, komponen kompleks *microsomal triglyceride transfer protein* (MTP), enzim pengikat peptida dan protein serta sebagai molekul chaperon. Beberapa protein menunjukkan kemiripan dengan PDI, kemiripan itu terletak pada domain yang memuat sisi aktif enzim PDI (a dan a'). Protein-protein itu antara lain tioreduksin, DsbA, dan Eug1p. PDI dapat diaplikasikan untuk produksi enzim ekstraseluler (enzim, hormon, dan vaksin) yang fungsional melalui transformasi, dan ekspresi PDI pada sel inang, di samping ekspresi protein yang diinginkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, E.A., J.M. Luz, and J.W. Lennarz. 1997. An investigation of the mechanism of catalysis by protein disulfide isomerase. *The FASEB Journal* 11: A927.
- Bardwell, J.C.A., J.O. Lee, G. Jander, and N. Martin. 1993. A pathway for disulfide bond formation *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:1038-1042.
- Ellis, R.J. and S.M. van der Vies. 1997. Molecular chaperones. *Annual Review in Biochemistry* 60:321-347.
- Farquhar, R., N. Honey, S.J. Murant, P. Bosier, L. Schultz, D. Montgomery, R.W. Ellis, R.B. Freedman, and M.F. Tuite. 1991. Protein disulphide isomerase is essential for viability in *S. cerevisiae*. *Gene* 108:81-89.
- Freedman, R.B., B.E. Brockway, and N. Lambert. 1984. Protein disulphide isomerase and the formation of native disulphide bonds. *Biochem. Soc. Trans.* 12:929-932.
- Freedman, R.B. and P. Klappa. 1998. Protein disulphide isomerase: A catalyst of thiol: Disulphide interchange and associated protein folding. Research School of Biosciences, Univ. of Kent, Canterbury. In Press. p. 1-26.
- Gilbert, H.F. 1990. Molecular and cellular aspect of thiol-disulfide exchange. *Adv. Enzymol.* 63:69-172.
- Gunther, R.B., B.C. Janetzky, H.H. Foster, I.M. Ehbrecht, L. Lehle, and H. Kuntzel. 1991. The *Saccharomyces cerevisiae* TRG1 gene is essential for growth and encodes a luminal endoplasmic reticulum glycoprotein involved in the maturation of carboxypeptidase. *The Journal of Biochem.* 266:24557-24563.
- Gunther, R., M. Srinivasan, S. Haugejorden, M. Green, I.M. Ehbrecht, and H. Kuntzel. 1993. Functional replacement of *S. cerevisiae* TRG1/PDI1 protein by members of the mammalian protein disulphide isomerase. *The Journal of Biological Chemistry* 268:7728-7732.
- Hayano, T., M. Hirose, and M. Kikuchi. 1995. Protein disulfide isomerase mutant lacking its isomerase activity accelerates protein folding in the cell. *FEBS Letters* 377:505-511.
- Hawkins, H.C., M. de Nardi, and R.B. Freedman. 1991. Redox properties and cross-linking of the dithiol/disulfide active sites of mammalian protein disulphide isomerase.
- Jumiarti, A. 1998. Studi mutagenesis acak pada daerah Hpal-BglII gen PDI1 *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis.
- Kaska, D.D., K.I. Kivirikko, and R. Myllyla. 1990. Purification and characterization of protein disulphide isomerase from the unicellular green algae *Chlamydomonas reinhardtii* A 120 kDa dimer antigenically distinct from the vertebrate enzyme. *Biochemical Journal* 268:63-68.
- Laboissiere, M.C.A., S.L. Sturley, and R.T. Raines. 1995. The essential function of protein-disulfide isomerase is too unscramble nonnative disulfide bonds. *The Journal of Biological Chemistry* 270:28006-28009.
- LaMantia, M.L., T. Miura, H. Tachikawa, H.A. Kaplan, W.J. Lennarz, and T. Mizunaga. 1991. Glycosylation site binding protein and protein disulphide isomerase are identical and essential for cell viability in yeast. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 88:4453-4457.
- LaMantia, M.L. and W.J. Lennarz. 1993. The essential function of yeast protein disulfide isomerase does not reside in its isomerase activity. *Cell* 74:899-908.
- Lambert, N. and R.B. Freedman. 1993. Structural properties of homogeneous protein disulfide isomerase from bovine liver purified by a rapid high yielding procedure. *Biochemical Journal* 213:225-234.
- Lu, X., H.F. Gilbert, and J.W. Harper. 1992. Conserved residues flanking the thiol/disulfide centers of protein disulphide isomerase are not essential for catalysis of thiol/disulfide exchange. *Biochemistry* 31:4205-4210.
- Lyles, M.M. and H.F. Gilbert. 1994. Mutations in the thioreduxin sites of protein disulfide isomerase reveal functional nonequivalence of the N- and C-terminal domains. *J. Biol. Chem.* 269:30946-30952.
- Mariana, W. 1998. Isolasi, pemurnian, dan karakterisasi protein isomerase dari *Saccharomyces cerevisiae* [pUKC470]. Tesis.
- Missiakas, D., C. Geogopoulos, and S. Raina. 1994. The *Escherichia coli* DsbC (*xprA*) gene encodes a periplasmic protein involved in disulfide bond formation. *The EMBO Journal* 13:2013-2020.
- Mizunaga, T., Y. Katakura, T. Miura, and Y. Mariyama. 1990. Purification and characterization of yeast protein disulphide isomerase. *Journal of Biochemistry* 108:846-851.
- Mudzakkar, A.Q. 1998. Mutagenesis random *in vitro* terhadap gen PDI1 *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis.

- Muntholib, A. 1998.** Manipulasi gen PDI1 dengan cara delesi internal dan pengaruhnya terhadap viabilitas sel *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis.
- Natalia, D. 1994.** Studies on yeast protein disulphide isomerase. Thesis. The Faculty of Natural Sciences of the University of Kent.
- Noiva, R. and W.J. Lennarz. 1992.** Protein disulfide isomerase: A multifunctional protein resident in the lumen of the endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry* 267:3553-3556.
- Pihlajaniemi, T., T. Helakoski, K. Tasanen, R. Myllyla, M. Hntala, J. Koivu, and K.I. Kivirikko. 1987.** Molecular cloning of the β -subunit of human prolyl 4-hydroxylase. This subunit and protein disulphide isomerase are products of the same Gene. *The EMBO Journal* 6:643-649.
- Scherens, B., E. Dubois, and F. Messenguq. 1991.** Determination of the sequence of the yeast YCL313 gene localized on chromosome III: Homology with the protein disulfide isomerase (PDI) gene product of other organism. *Yeast* 7:185-193.
- Tachikawa, H., T. Miura, Y. Katalura, and T. Mizunaga. 1991.** Molecular structure of a yeast gene, PDI1, encoding protein disulfide isomerase that is essential for cell growth. *Journal Biochemistry* 110:306-313.
- Vuori, K., R. Myllyla, T. Pihlajaniemi, K.I. Kivirikko. 1992.** Expression and site-directed mutagenesis of human protein disulfide isomerase in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 267:7211-7214.
- Walker, K.W., M.M. Lyles, and H.F. Gilbert. 1996.** Catalysis of oxidative protein folding by mutants of protein disulfide isomerase with a single active-site cysteine. *Biochemistry* 35:1972-1980.
- Wang, C.C. 1997.** Isomerase and chaperone activities are both required for function of protein disulfide isomerase as a foldase. *Bulletin of the Philippine Society for Biochemistry and Molecular Biology* 16:C14.
- Wetterau, J.R., K.A. Combs, L.R. McLean, S.N. Spinner, and L.P. Anggerbeck. 1991.** Protein disulfide isomerase appears necessary to maintain the catalytically active structure of the microsomal triglyceride transfer protein. *Biochemistry* 30:9728-9735.
- Wunderlich, M., A. Otto, K. Maskos, M. Mucke, R. Seckler, and R. Glockshuber. 1995.** Efficient catalysis of disulfide formation during protein folding with a single active-site cysteine. *Journal Mol. Biol.* 247:28-33.
-