

KONSTRUKSI TRIPLE DISRUPTAN GEN PENGKODE PROTEIN FOSFATASE DAN PROTEIN KINASE *Saccharomyces cerevisiae*

Hermansyah Hermansyah^{1*} dan Susilawati Susilawati²

¹Jurusan Kimia FMIPA Universitas Sriwijaya

²Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya

*email: hermansyah@unsri.ac.id

Abstrak

Konstruksi triple disruptan pada *Saccharomyces cerevisiae* dibuat dengan menyilangkan (crossing) atau melakukan mating antara strain BY4739 (*MAT α ura3 Δ 0 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 kin3 Δ ::KanMX*) dengan strain SH6793 (*MAT α ptp2 Δ ::CgHIS3 msg5 Δ ::CgLEU2 ura3-52 his3- Δ 200 leu2 Δ 1 lys2 Δ 202 trp1 Δ 63*). Dari 10 aski yang menghasilkan 40 koloni triple disruptan, hanya 3 koloni yang memiliki fenotip dapat tumbuh di media SC-his, SC-leu, dan YPDA + 100 μ g/mL genitisin disulfat. Uji lanjut terhadap tiga koloni tersebut menggunakan amplifikasi PCR dan pemotongan dengan enzim restriksi *NruI* menghasilkan hanya satu koloni yang memiliki *ptp2 Δ* . Data ini mengindikasikan bahwa kemungkinan hanya satu koloni yang memiliki triple disruptan *ptp2 Δ msg5 Δ kin3 Δ* yaitu koloni 7B.

Kata kunci: triple disruptan, *Saccharomyces cerevisiae*, metode crossing (persilangan)

Abstract

Triple disruptant were constructed by crossing or mating between strain BY4739 (*MAT α ura3 Δ 0 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 kin3 Δ ::KanMX*) and strain SH6793 (*MAT α ptp2 Δ ::CgHIS3 msg5 Δ ::CgLEU2 ura3-52 his3- Δ 200 leu2 Δ 1 lys2 Δ 202 trp1 Δ 63*). Out of 10 asci generating 40 colonies which have triple disruptant, only 3 colonies showed phenotypics growing on SC-his, SC-leu, and YPDA+ 100 μ g/mL geniticine disulfate medium. Further test to these three colonies by using PCR amplification and digesting by restriction enzyme *NruI* resulted only one colony showing *ptp2 Δ* . This data indicated that only one colony had *ptp2 Δ msg5 Δ kin3 Δ* triple disruptant, colony 7B.

Keywords: triple disruptant, *Saccharomyces cerevisiae*, crossing method

Pendahuluan

Protein fosfatase dan protein kinase merupakan dua kelompok protein yang berperan penting dalam pengendalian berbagai proses seluler pada eukariot. Kedua protein tersebut masing-masing mengontrol fosforilasi dan defosforilasi protein/enzim pada jalur signal transduksi (Hunter, 1995). Dengan demikian masing-masing protein kinase dan protein fosfatase bekerja dengan mengaktifkan dan menginaktifkan protein/ enzim.

Akibat dari pengontrolan ini, protein/enzim yang terfosforilasi atau terdefosforilasi dapat mengalami peningkatan atau penurunan aktivitas, sehingga kerusakan protein kinase atau protein fosfatase akan menyebabkan abnormalitas fosforilasi protein/enzim yang dapat menyebabkan banyak penyakit (Zolnierowicz and Bollen, 2000). Kerusakan gen penyandi protein kinase dan protein fosfatase menyebabkan ketidakseimbangan reaksi fosforilasi.

Fungsi fisiologi protein fosfatase pada sistem eukaryot terus dieksplor untuk mengetahui fungsinya dalam sel. *Saccharomyces cerevisiae* merupakan salah satu mikroorganisme yang secara intensif digunakan sebagai model. Terdapat 117 protein kinase dan 38 protein fosfatase dari sekitar 6.600 gen *S.cerevisiae* (Sakumoto *et al.*, 1999 and Sakumoto *et al.*, 2002). Gen *S.cerevisiae* mudah dilakukan analisis secara molekuler karena seluruh urutan gen-gen pengkode protein dalam *S.cerevisiae* telah diketahui, dipetakan, diklon, dan dibua mutan untuk mempermudah dalam menganalisis dan mempelajari fungsi gen tersebut.

Kerusakan dua protein fosfatase, Ptp2p dan Msg2p menyebabkan strain memiliki fenotip sensitif terhadap kalsium (Hermansyah *et al.*, 2009). Pencarian gen lain yang dapat menekan fenotip sensitif kalsium akan memperjelas mekanisme fenotip tersebut. Ide dasar pembentukan triple disruptan atau merusak tiga gen pada *S.cerevisiae* adalah berdasarkan hipotesis bahwa sensitivitas kalsium disebabkan oleh dua model. Pertama, sensitivitas disebabkan oleh akumulasi substrat terfosforilasi unknown dari Ptp2p and Msg5p, dan model kedua sensitivitas disebabkan oleh kekurangan substrat terfosforilasi pada Ptp2p and Msg5p.

Dengan demikian kerusakan $\Delta pkase$ akan menekan fenotip sensitif kalsium double disruptan $\Delta ptp2\Delta msg5$. Pada artikel ini akan dibuktikan apakah kerusakan gen penyandi protein kinase kin3 akan menekan sifat sensitif kalsium. Protein Kin3 adalah protein kinase serin/threonin non esensial yang mungkin berperan pada kerusakan DNA yang merespon fenotip toleran etanol kadar tinggi (Jones *et al.*, 1990, Moura *et al.*, 2010; Pais *et al.*, 2010).

Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah *hot plate*, termometer, PCR dan seperangkat alat gelas. Bahan

pada penelitian ini adalah strain SH6793 yang memiliki genotip *MATa ptp2 Δ ::CgHIS3 msg5 Δ ::CgLEU2 ura3-52 his3- Δ 200 leu2 Δ 1 lys2 Δ 202 trp1 Δ 63*. BY4739 (*MAT α ura3 Δ 0 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 Pkase::KanMX*). Medium YPDA diperkaya dengan suplemen adenine 0.4 mg/ml (Sigma- Aldrich Co). Media selektif terdiri atas yeast nitrogen base tanpa amino acids 0,67%, glukosa 2%, bakto agar 2% dan suplemen-suplemen auksotropi seperti L-triptopan 20mg/L, L-histidin (HCl) 20mg/L, L-arginin (HCl) 20mg/L, L-metionin 20mg/L, urasil 20mg/L, L-tirosin 30mg/L, L-isoleusin 30mg/L, L-lisin (HCl) 30mg/L, L-leusin 100 mg/L, L-valin 150mg/L, L-treonin 200mg/L, dan adenin 400mg/L).

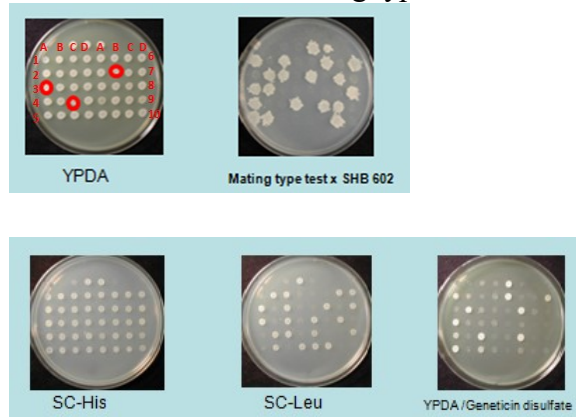
Prosedur Penelitian

Konstruksi *triple disruptant* dilakukan menurut Hermansyah *et al.* (2010). Persilangan atau *mating* dilakukan dengan metode crossing antara strain BY4739 (*MAT α ura3 Δ 0 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 kin3 Δ ::KanMX*) dengan strain SH6793 yang memiliki genotip *MATa ptp2 Δ ::CgHIS3 msg5 Δ ::CgLEU2 ura3-52 his3- Δ 200 leu2 Δ 1 lys2 Δ 202 trp1 Δ 63*. Setelah inkubasi pada 30°C selama semalam, sel diploid ditumbuhkan pada media SPM selama 4 hingga 7 hari hingga terbentuk aski. Spora aski dipisahkan dengan mikromanipulator menggunakan media YPDA yang diinkubasi selama 2-3 hari. Koloni yang tumbuh dilakukan replika plating ke media sintetik tanpa histidin dan leusin, serta media yang mengandung genitisin disulfat (Kan). Koloni yang mengandung *triple disruptant ptp2 Δ msg5 Δ kin3 Δ* dilakukan konfirmasi dengan PCR. Uji fenotip dilakukan pada media yang mengandung 0,6 M CaCl₂, 50 μ g/ml calcofluor, dan 100 μ g/ml genitisin disulfat.

Hasil dan Pembahasan

Konstruksi *triple disruptant ptp2 Δ msg5 Δ kin3 Δ* dibuat dengan metode penyilangan (*crossing*) *double disruptant*

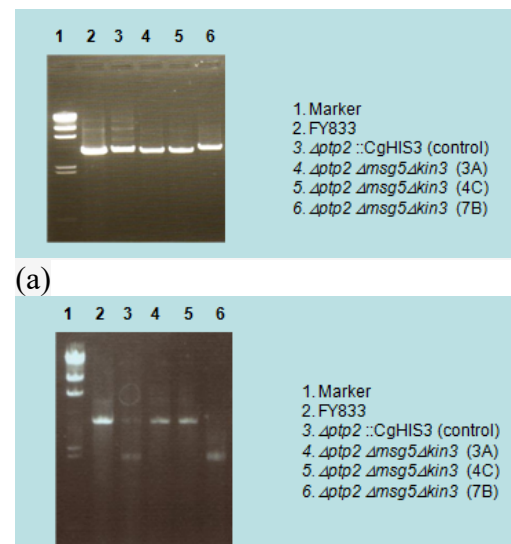
protein fosfatase *ptp2Δ msg5* dengan *single disruptant* protein kinase *Δkin3Δ*. Sepuluh aski yang tumbuh di media sporulasi SPM, setelah dipisahkan dengan mikromanipulator, ditumbuhkan di media YPD dan diidentifikasi di media : tanpa histidin (SC-His), tanpa Leusin (SC-Leu), YPD + 100 µg/ml geneticin disulfat. Dari 10 aski yang menghasilkan 40 koloni yeast, hanya 3 koloni yang tumbuh di ketiga media tersebut, artinya ketiga koloni mengandung *ptp2Δ::CgHIS3* ; *msg5Δ::CgLEU2*; dan *kin3Δ::KanMX* yaitu koloni 3A, 4B dan 7B seperti terlihat pada Gambar 1. Koloni haploid yang memiliki mating type a atau mating type α. Pada Gambar hasil persilangan dengan strain SHB 602 yang memiliki mating type a, koloni yang tumbuh adalah strain haploid dengan mating type α, sedangkan yang tidak tumbuh adalah mating type a.



Gambar 1. Koloni yang dihasilkan dari pemisahan 10 aski. Tiga koloni memiliki fenotip *ptp2Δ::CgHIS3* (di media SC-His) ; *msg5Δ::CgLEU2* (di media SC-Leu); dan *kin3Δ::KanMX* (di media YPDA geneticin disulfat) yaitu koloni 3A, 4B, dan 7B.

Selanjutnya koloni tersebut dikonfirmasi apakah mengandung disruptant pada *ptp2Δ::CgHIS3* ; *msg5Δ::CgLEU2*; atau *kin3Δ::KanMX*. Pada penelitian ini hanya dilakukan konfirmasi keberadaan gen *ptp2Δ::CgHIS3*, dengan anggapan bahwa triple disruptan yang dihasilkan dari persilangan strain BY4739 yang memiliki

genotif *MATα ura3Δ0 leu2Δ0 lys2Δ0 Δkin3::KanMX* dengan SH6793 yang memiliki genotip *MATa Δptp2::CgHIS3 Δmsg5::CgLEU2 ura3-52 his3-Δ200 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63* pasti memiliki *Δptp2::CgHIS3*. Dengan menggunakan pasangan primer Kfc PTP2 (-1000 to -979 of PTP2) :5'CTC AAGCTT GGACACTCGT TTAATTTAGC CA3' dan Krc PTP2 (+479 to +500 of PTP2)5'CTC AAGCTT ATTCGGTATT GGCACAAACT TT '3 kerusakan gen *ptp2Δ::CgHIS3* diverifikasi lebih lanjut. Hasil penelitian menunjukkan bahwa hanya pada line 6 (koloni 7B) yang memiliki ukuran 4,154 pb yang merupakan ukuran *ptp2Δ::CgHIS3*, sedangkan yang lain memiliki ukuran gen PTP wild type 3,753 pb (Gambar 2a).



Gambar 2. Elektrogram produk PCR, a) Line 1= marker; line 2,3,4,5 gen PTP wild type berukuran 3,753 pb ; line 6 *ptp2Δ::CgHIS3* berukuran 4,154 pb; b) Line 1 = marker; line 2= PTP2 wild type; line 3 *ptp2Δ::CgHIS3/NruI* (control +); line 4,5 uncut ; line 6 *Δptp2::CgHIS3* dari sampel 7B

Konfirmasi adanya *ptp2Δ::CgHIS3* dilakukan dengan menggunakan enzim restriksi *NruI*. Gen wild type PTP2 tidak memiliki sisi restriksi untuk enzim restriksi *NruI*, sedangkan gen *CgHIS3*

memiliki satu sisi pemotongan pada urutan 1516 bp. Hasil elektrogram elektroforesis menunjukkan bahwa hanya koloni 7B yang mengkonfirmasi adanya disruptan $\Delta ptp2::CgHIS3$.

Kesimpulan

1. Konstruksi triple disruptan $ptp2\Delta msg5\Delta kin3\Delta$ berhasil dilakukan dengan menyilangkan single disruptan protein kinase $kin3\Delta$ dengan double disruptan protein fosfatase $ptp2\Delta msg5\Delta$.
2. Dari tiga koloni yang positif memiliki fenotip yaitu tumbuh pada media SC-his, SC-leu, dan YPD mengandung 10 $\mu\text{g/ml}$ genitacin disulfat, berdasarkan data amplifikasi PCR dan konfirmasi menggunakan enzim restriksi *NruI*, hanya satu koloni, 7B, yang mengandung $ptp2\Delta$.

Ucapan Terima Kasih

Prof. Satoshi Harashima atas penggunaan strain dan fasilitas yang diberikan.

Daftar Pustaka

- Hermansyah, Laviña, W.A., Sugiyama, P., Kaneko and Y., Harashima, S. (2010). Identification of protein kinase disruptions as suppressors of the calcium sensitivity of *S. cerevisiae* $\Delta ptp2 \Delta msg5$ protein phosphatase double disruptant, *Archives of microbiology* 192, 157 – 165.
- Hermansyah, Sugiyama, P., Kaneko, Y. and Harashima, S. (2009). Yeast protein phosphatase Ptp2p and Msg5p are involved in G1-S transition, *CLN2* transcription, and vacuole morphogenesis, *Archives of microbiology*. 191, 721 – 733.
- Hunter, T. (1995). Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling, *Cell*, 80, 225 – 236.
- Jones, D. G. and Rosamond, J. (1990). Isolation of a novel protein kinase-encoding gene from yeast by oligodeoxyribonucleotide probing, *Gene*, 90, 87 – 92.
- Moura, D.J., Castilhos, B., Immich, B. F., Cañedo, A. D., Henriques, J. A., Lenz, G., Saffi, J. (2010). Kin3 protein, a NIMA-related kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, is involved in DNA adduct damage response, *Cell Cycle*, 9, 2220 – 2229.
- Pais, T. M., Foulquié-Moreno, M. R., Hubmann, G., Duitama, J., Swinnen, S., Goovaerts, A., Yang, Y., Dumortier, F., and Thevelein, J. M. (2010). Comparative polygenic analysis of maximal ethanol accumulation capacity and tolerance to high ethanol levels of cell proliferation in yeast, *PLoS Genetics*, 9
- Sakumoto, N., Matsuoka, I., Mukai, Y., Ogawa, N., Kaneko, Y. and Harashima, Y. (2002). A series of double disruptants for protein phosphatase genes in *Saccharomyces cerevisiae* and their phenotypic analysis, *Yeast*, 19, 587 – 599.
- Sakumoto, N., Mukai, Y., Uchida, K., Kouchi, T., Kuwajima, J., Nakagawa, Y., Sugioka, S., Yamamoto, E., Furuyama, T., Mizubuchi, H., Ohsugi, N., Sakuno, T., Kikuchi, K., Matsuoka, I., Ogawa, N., Kaneko, Y. and Harashima, S. (1999). A series of protein phosphatase gene disruptants in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* 15, 1669 – 1679.
- Zolnierowicz, S. and Bollen, M. (2000). Protein phosphorylation and protein phosphatases, *The EMBO Journal*, 19, 483 – 488.