

# THE ENGINEERING OF ACTINIDIN PROTEIN AND ITS EXPRESSION IN THE YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

AGUNG ASTUTI<sup>1)</sup>, TRIWIBOWO YUWONO<sup>2)</sup>, SUKARTI MOELJOPAWIRO<sup>3)</sup>

<sup>1)Postgraduate Program in Biotechnology, <sup>2)Research Center for Biotechnology, and  
Faculty of Agriculture, Gadjah Mada University,  
<sup>3)Faculty of Biology, Gadjah Mada University</sup></sup></sup>

## ABSTRACT

Actinidin is an intracellular cysteine protease found in the fruit of Chinese gooseberry (*Actinidia chinensis*) or Kiwi fruit. A variant of actinidin-encoding DNA sequence has been constructed by amplifying a specific region of the full-length actinidin cDNA using PCR method. Amplification was targeted to construct an actinidin-encoding DNA sequence consisting of mature actinidin-encoding DNA plus part of the N-terminal extension (carrying the QRTN motif) and part of the C-terminal extension without QR sequence motif. The amplified fragment was then cloned in an expression-secretion vector (pYSV9) and expressed in *Saccharomyces cerevisiae*.

The results of this study demonstrated that the cloned fragment had a smaller size as compared to the PCR amplification product, suggesting that a rearrangement event occurred during the cloning process. Yeast culture supernatant was analysed for expression of actinidin by using anti-actinidin polyclonal antibody raised in chicken. The expression of the cloned fragment in *S. cerevisiae*, however, did not result in any detectable expression product on the immunoblot.

*Keywords* : Actinidin, expression and secretion, *Saccharomyces cerevisiae*

## PENDAHULUAN

Actinidin adalah enzim protease kuat yang terdapat di dalam buah kiwi (*Actinidia chinensis*), tersusun oleh suatu polipeptida dengan 220 residu asam amino yang mempunyai BM 23,6 kD (Dowall, 1970; Carne dan Moore, 1978). Gen yang mengkode actinidin telah berhasil diklon dan disekuen secara lengkap, cDNA actinidin terdiri atas ORF (*Open Reading Frame*) dengan 380 kodon yang mengkode sekuen actinidin yang 'sudah jadi' / *mature* (220 asam amino) diapit oleh *N-terminal extension* (126 asam amino) dan *C-terminal extension* (33 asam amino) (Praekelt, 1987; Podivinsky *et al.*, 1989; Snowden dan Gardner, 1990).

Varian DNA yang mengkode actinidin telah berhasil diekspresikan pada khamir *Saccharomyces cerevisiae*. Hasil penelitian Yuwono (1991) menunjukkan bahwa sekuen lengkap gen actinidin memberikan hasil ekspresi protein actinidin di dalam

sel *S. cerevisiae*. Penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa protein tersebut ditranslokasikan ke dalam vakuola.

Analisis sekuen DNA actinidin menunjukkan bahwa baik pada *N-terminal* maupun *C-terminal extension* terdapat sekuen yang mengkode asam amino Q R. Studi pada kelompok protein lain menunjukkan bahwa sekuen asam amino Q R merupakan bagian *vacuolar targeting signal* yang terdapat pada protein *phaseolin* (QRFD), *pea legumin* (QRDE), *ricin* (QRDG) dan *phytohemagglutinin* (QRDA). Hal ini memberikan indikasi bahwa sekuen Q R adalah sekuen *conserved* (Tague *et al.*, 1990). Selain itu diketahui bahwa 20 asam amino pertama mempunyai sifat hidrofobik yang merupakan sifat khas suatu sekuen sinyal sekresi (Yuwono, 1991). Hal ini memberikan indikasi bahwa pada bagian *N-terminal extension* dan *C-terminal extension* terdapat urutan asam amino Q R yang merupakan sinyal translokasi ke vakuola.

Penghilangan *N-terminal extension* dan asam amino Q R pada *C-terminal extension* menghasilkan ekspresi dan sekresi actinidin, meskipun terjadi perubahan struktural protein karena ukuran actinidin heterolog yang dihasilkan lebih kecil dibanding dengan ukuran molekul actinidin alami. Sebaliknya, konstruksi yang mengandung *N-terminal extension* tanpa motif Q R dan *C-terminal extension* yang mengandung motif Q R, ternyata tidak menghasilkan ekspresi yang dapat dideteksi (Yuwono, 1998).

Hasil-hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa *N-terminal extension* dan *C-terminal extension* pada polipeptida actinidin mempunyai peranan penting dalam pemrosesan maupun translokasi actinidin. Untuk mengetahui apakah proses translokasi actinidin ditentukan oleh motif Q R pada *N-terminal extension* dan *C-terminal extension* maka pada penelitian ini dilakukan modifikasi struktur polipeptida dengan cara rekayasa melalui amplifikasi PCR sekuen actinidin secara spesifik. Hal ini dilakukan dengan menghilangkan motif Q R pada *C-terminal extension* tetapi tetap mempertahankan motif Q R pada *N-terminal extension*. Sekuen yang telah dimodifikasi tersebut selanjutnya diekspresikan pada *S. cerevisiae* dengan menggunakan vektor plasmid ekspresi-sekresi. Hasil ekspresi dianalisis dengan metode *immunoblotting* dengan menggunakan antibodi poliklonal terhadap actinidin yang diisolasi dari buah Kiwi (Cleland dan Craik, 1996; Yuwono, 1991; Yuwono 1998).

Tujuan penelitian ini adalah mengekspresi dan mensekresi protein actinidin pada khamir *S. cerevisiae* dengan melakukan rekayasa terhadap gen pengkode actinidin. Ekspresi dari varian DNA actinidin yang menghasilkan enzim ekstraselular akan memberikan keuntungan praktis karena dapat digunakan untuk menghasilkan protease yang berguna untuk kepentingan industri atau kepentingan lain.

## **BAHAN DAN METODE**

### Mikroorganisme

Dalam penelitian ini digunakan bakteri *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  [F<sup>-</sup>,  $\phi$ 80*dlacZ* $\Delta$ M15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*(r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>), *supE44*, *relA1*, *deoR*,  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169] sebagai inang perbanyak plasmid. Untuk ekspresi digunakan khamir *S. cerevisiae* DBY 746 ( $\alpha$ ) (*MAT $\alpha$  his3- $\Delta$ 1 leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289*).

### Plasmid

Plasmid yang digunakan adalah plasmid pYSV9 yang merupakan plasmid ekspresi-sekresi pada khamir *S. cerevisiae* DBY 746 . Plasmid ini mengandung *preproregion MF $\alpha$ 1* dan *terminator CYC1*.

### Pembuatan varian DNA actinidin dengan PCR

Varian DNA actinidin R4 diperoleh dari hasil amplifikasi gen actinidin dengan metode PCR menggunakan primer spesifik TW1 : 5'- CC GAA GCT TTC AAC GCC AAA AAC TTG -3' dan P8 : 3' -CCT CAT CTG CTA CCT ATT CAG CTG TTT-5'. Denaturasi dilakukan pada suhu 95<sup>0</sup> C, suhu annealing 55<sup>0</sup> C dan sintesis pada suhu 72<sup>0</sup> C, dengan 25 kali siklus amplifikasi.

Varian DNA actinidin R4 kemudian diligasi dengan plasmid pYSV9 pada sisi restriksi *HindIII* dan *SalI*. Hasil ligasi selanjutnya digunakan untuk transformasi ke bakteri *E. coli* DH5a menggunakan metode Sambrook *et al.*, (1989). Plasmid rekombinan yang diperoleh kemudian digunakan untuk transformasi khamir *S. cerevisiae* dengan metode induksi lithium asetat.

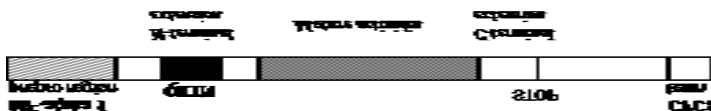
### Analisis ekspresi dan sekresi

Khamir yang membawa plasmid rekombinan ditumbuhkan pada medium YEPD cair selama 48 jam. Supernatan kemudian dipisahkan menggunakan metode BSA, selanjutnya dielektroforesis pada SDS-PAGE. Hasil elektroforesis selanjutnya dipindah ke membran nilon dan protein pada membran kemudian dideteksi dengan menggunakan

antibodi poliklonal terhadap actinidin. Reaksi antigen-antibodi dideteksi menggunakan *anti-antibodi chicken -alkaline phosphatase conjugate*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi varian DNA actinidin R4 dilakukan dengan metode PCR. Varian DNA actinidin R4 dimulai dari asam amino ke-24, yaitu seluruh *N-terminal extension* yang mengandung asam amino QRTN, sampai asam amino ke-374 dari *C-terminal extension* yaitu sebelum asam amino QR. Primer yang digunakan dalam penelitian ini adalah primer spesifik yang dirancang sesuai susunan basa yang komplemen dengan ujung 5' dan ujung 3' dari gen actinidin dan ditambahkan sisi restriksi *HindIII* pada ujung 5' (TW1) dan *SalI* pada ujung 3' (P8) untuk memudahkan kloning ke dalam plasmid pYSV9 (Yuwono, 1991). Plasmid rekombinan hasil kloning selanjutnya diberi nama pYSV9-R4, konstruksi tata letak bagian plasmid rekombinan tersebut tersaji pada Gambar 1.



Gambar 1. Konstruksi tata letak bagian plasmid rekombinan pYSV9-R4 *MF-alpha 1 prepro region*: daerah pengatur ekspresi yang berasal dari gen *MF $\alpha$ 1 S. cerevisiae*, STOP: kodon pengakhiran translasi, *CYC1 term*: terminator yang berasal dari gen *CYC1*

Penambahan sisi restriksi *HindIII* sangat penting agar varian DNA actinidin R4 tersambung secara tepat (*in-frame*) dengan  *$\alpha$ -factor leader sequence* pada sisi restriksi *HindIII* dari plasmid pYSV9. Sekuen sisi restriksi *HindIII* tersambung secara tepat dengan asam amino Fenilalanin (Phe) yaitu asam amino ke-24 yang mengawali polipeptida bagian *N-terminal extension*. Dengan konstruksi semacam ini, polipeptida yang diekspresikan oleh promoter gen *MF $\alpha$ 1* akan dipotong oleh endoprotease *KEX2* pada posisi asam amino arginin (R). Selanjutnya asam amino glutamat (E) dan alanin

(A) akan diproses oleh enzim dipeptidil aminopeptidase (DPAPaseA), sehingga akan menghasilkan polipeptida actinidin secara tepat karena terjadi pemrosesan yang tepat (Yuwono, 1991).

Penambahan sisi restriksi *SalI* pada ujung 3' dimaksudkan untuk mempermudah kloning pada pYSV9. Selain itu juga perlu ditambahkan sekuen TAA sebagai stop kodon. Varian DNA actinidin akan tersambung secara tepat (*in-frame*) dengan sisi restriksi *SalI* pada *polycloning site* plasmid pYSV9 yang terletak sebelum sekuen *CYCI-term*. Dengan demikian proses translasi akan berhenti pada asam amino asam aspartat (D) sebelum stop kodon (TAA).

Hasil amplifikasi PCR varian DNA actinidin R4 pada gel agarose 0,8 % menunjukkan adanya satu pita DNA yang spesifik (Gambar 2). Varian DNA actinidin R4 mengandung sekitar 1050 basa ditambah sisi restriksi *HindIII* dan *SalI*, sehingga jumlah total sekitar 1062 basa. Hasil analisis elektroforesis gel agarose 0,8 %, menunjukkan pita DNA sekitar 1,0 kb.

Untuk mengetahui ekspresi-sekresi varian DNA actinidin R4 maka dilakukan kloning pada plasmid pYSV9 dan ditransformasi ke *E. coli* DH5 $\alpha$ . Analisis restriksi dari 223 transforman menghasilkan satu koloni rekombinan *E. coli* DH5 $\alpha$  yang membawa plasmid rekombinan pYSV9-R4.

Hasil pemotongan plasmid pYSV9 dengan enzim *EcoRI* menunjukkan ada 4 pita DNA pada elektroforesis gel agarose 0,8 % (gambar 3). Hal ini karena plasmid pYSV9 mempunyai 4 sisi restriksi *EcoRI* sehingga analisis dengan enzim restriksi *EcoRI* menghasilkan 4 pita DNA sesuai konstruksi plasmid (Gambar 4). Analisis restriksi plasmid rekombinan juga menghasilkan 4 pita DNA, namun dengan pola yang berbeda. Hal ini karena varian DNA actinidin R4 yang diligasikan akan terdapat di dalam salah satu potongan DNA sehingga akan memperbesar ukurannya. Dengan demikian jika dibandingkan antara plasmid pYSV9 dengan plasmid rekombinan maka akan terdapat perbedaan ukuran salah satu potongan DNA yang dihasilkan oleh enzim *EcoRI*. Pita DNA ukuran terkecil pada pYSV9 akan tampak menjadi lebih besar pada plasmid pYSV9-R4.

Hasil analisis restriksi terhadap plasmid pYSV9-R4 dengan dua enzim *HindIII* dan *SalI* menunjukkan ada 2 pita DNA pada elektroforesis gel agarose 0,8 % (Gambar 5). Hal ini dapat diterangkan bahwa pita DNA pertama yang berukuran besar (sekitar

10,9 kb) adalah plasmid vektor pYSV9 dan pita DNA kedua yang ukurannya kecil (< 947 bp) adalah varian DNA actinidin R4. Ukuran pita varian DNA actinidin R4 hasil kloning menjadi lebih kecil bila dibanding dengan varian DNA actinidin R4 hasil PCR (sumur nomor 4 dan 5). Hal ini kemungkinan disebabkan terjadinya pengaturan kembali (*re-arrangement*) sehingga ukuran DNA sisipan menjadi lebih pendek. Meskipun demikian analisis restriksi dengan enzim *HindIII* dan *SalI* menunjukkan hasil yang spesifik bahwa fragmen DNA sisipan adalah DNA yang diligasikan dengan plasmid vektor pYSV9.

Untuk mempelajari ekspresi-sekresi protein pada khamir, maka plasmid rekombinan selanjutnya digunakan untuk transformasi khamir dan diperbanyak pada medium YEPD cair. Analisis protein ekstraselular dan protein intraselular pada SDS-PAGE dari khamir *S. cerevisiae* DBY 746 disajikan pada Gambar 6.

Dari Gambar 6 terlihat tidak ada perubahan pola pita protein intraselular khamir baik yang tidak membawa plasmid maupun yang membawa plasmid pYSV9 dan rekombinan pYSV9-R4 (sumur 5, 6 dan 7). Hasil elektroforesis protein supernatan kultur khamir yang membawa plasmid rekombinan pYSV9-R4 (sumur 2) menunjukkan ekspresi protein, yang tidak dijumpai pada protein ekstraselular khamir dengan plasmid pYSV9 (sumur 3). Meskipun demikian hal ini tidak secara jelas menunjukkan keberadaan protein yang merupakan ekspresi gen actinidin. Hal ini disebabkan adanya fraksi protein BSA yang terikat di dalam presipitat protein supernatan.

Untuk membuktikan ekspresi gen actinidin maka dilakukan pengujian *immunoblotting* dengan menggunakan antibodi poliklonal terhadap actinidin yang diisolasi dari buah Kiwi. Hasil *immunoblotting* menunjukkan bahwa pada membran nilon tidak terdeteksi adanya pita yang menunjukkan reaksi spesifik sebagai protein actinidin. Setelah dilakukan optimalisasi dengan berbagai variasi konsentrasi larutan *blocking* dan waktu inkubasi, tampak bahwa *blotting* berjalan dengan baik. Meskipun demikian protein yang spesifik juga tidak terdeteksi walaupun konsentrasi antibodi dan *conjugate* ditingkatkan dua kali lipat. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh antibodi atau *conjugate* yang tidak berfungsi dengan baik.

## KESIMPULAN

Penelitian ini telah berhasil merekayasa gen actinidin dengan metode PCR dan menghasilkan varian DNA actinidin R4 yang telah diklon pada bakteri *E. coli* DH5 $\alpha$  menghasilkan plasmid rekombinan pYSV9-R4. Pengujian ekspresi dan sekresi pada khamir *S. cerevisiae* menunjukkan protein ekstraselular BM sekitar 23,6 kD, namun belum dapat dibuktikan sebagai protein heterolog actinidin.

## DAFTAR PUSTAKA

- Carne, A., and Moore, C.H. 1978. The amino acid sequence of the tryptic peptides from actinidin, a proteolytic enzyme from the fruit of *Actinidia chinensis*. *Biochem J.* 173 : 73-83.
- Cleland, J.L., and Craik, C.S. 1996. Protein Engineering. Principles and Practice. Wiley-Liss Inc. Publication, New York.
- Dowall, M.A. 1970. Anionic proteinase from *Actinidia chinensis*. Preparation and properties of the crystalline enzyme. *Eur. J. Biochem.* 14 : 214-221.
- Esser, K., Kuck, U., Lang-Hinrichs, C., Lemke, P., Osiewacz, H.D. Stahl, P., and Tudzynsky, P. 1986. Plasmid of Eukaryotes. Fundamentals and Applications. Springer-Verlag, Berlin.
- Podivinsky, E., Forster, R.L.S., and Gardner, R.C. 1989. Nucleotide sequence of actinidin, a kiwi fruit protease. *Nucleic Acid Res.* 17 : 8363.
- Praekelt, U.M. 1987. Molecular Analysis of Actinidin. PhD thesis. University of Leicester.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Snowden, K.C., and Gardner, R.C. 1990. Nucleotide sequence of an actinidin genomic clone. *Nucleic Acids Res.* 18 : 6684.
- Tague, B.W., Dickinson, C.D., and Chrispeels, M.J. 1990. A short domain of the plant vacuolar protein phytohemagglutinin invertase to the yeast vacuole. *The Plant Cell.* 2 : 533-546.
- Yuwono, T. 1991. A Study of Actinidin Expression in Yeast. PhD Thesis. University of Leicester, UK.
- Yuwono, T. 1998. Studi Translokasi Enzim Actinidin (Protease) Pada Khamir *Saccharomyces cerevisiae* Dengan Pendekatan Rekayasa Protein dan Kemungkinan Penerapannya. Laporan Riset RUT III. DRN, Jakarta.