

# ANALISA PASANGAN JEMBATAN GARAM RESIDU GLU15-LYS4 PADA KESTABILAN TERMAL PROTEIN 1GB1

K. N. Sawitri<sup>1\*</sup>, T. Sumaryada<sup>1,2</sup>, L. Ambarsari<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Departemen Fisika, FMIPA-IPB Jalan Meranti Kampus Dramaga Bogor 16680

<sup>2</sup>Pusat Studi Biofarmaka Institut Pertanian Bogor  
Jalan Taman Kencana No.3 Bogor 16128

<sup>3</sup>Departemen Biokimia, FMIPA-IPB Jalan Agatis Kampus Dramaga Bogor 16680

\* kania09@apps.ipb.ac.id

## ABSTRACT

*Simulation on protein G domain B1 (1GB1) have been performed using NAMD2. This protein is well-known for its high thermal stability (melting point about 363 K) and attract many scientists to study it. The aim of this research is to study the effect of mutation on salt-bridge pairs GLU15-LYS4 to the thermal stability of 1GB1 protein. The pair was chosen based on simulation analysis for native structure (wild-type) in which non-binding energy towards zero when unfolding occurred ( $t=678$  ps). Mutations were done by interchanging the position of the pair, neutralizing one of the residue, and neutralizing both residues in the pair. This research is focused on observing the changes caused by the mutations without paying attention to the change of protein function. The results show that neutralizing GLU15 to ASN 15 would increase the thermal stability which indicated by longer unfolding time at 820 ps.*

*Keywords: thermal stability, 1GB1, point mutation, salt-bridge*

## ABSTRAK

*Telah dilakukan simulasi protein G domain B1 (1GB1) menggunakan NAMD2. Protein ini dikenal memiliki kestabilan termal yang tinggi (titik leleh 363 K) sehingga mengundang banyak perhatian para peneliti. Tujuan penelitian ini adalah mempelajari pengaruh mutasi pasangan jembatan garam GLU15-LYS4 terhadap kestabilan termal protein 1GB1. Pasangan residu tersebut dipilih berdasarkan hasil analisa simulasi struktur asli (wild-type), dimana nilai energi non-ikatannya berubah menjadi nol saat unfolding terjadi (pada  $t=678$  ps). Mutasi dilakukan dengan cara menukar posisi kedua residu, menetralkan salah satu residu, dan menetralkan kedua residu. Penelitian ini dilakukan sebatas mengamati perubahan yang terjadi akibat mutasi, tanpa memperhitungkan pengaruh perubahan struktur terhadap fungsi dari protein itu sendiri. Hasil analisa menunjukkan bahwa menetralkan GLU15 menjadi ASN15 dapat meningkatkan sifat kestabilan termal ditunjukkan oleh penundaan waktu unfolding menjadi 820 ps.*

*Kata kunci: kestabilan termal, 1GB1, mutasi titik, jembatan garam*

## PENDAHULUAN

Protein merupakan senyawa organik kompleks dengan bobot molekul tinggi. Protein juga merupakan suatu polimer yang terdiri dari monomer-monomer asam amino yang dihubungkan dengan ikatan peptida. Protein memiliki banyak fungsi diantaranya sebagai enzim, hormon dan antibodi. Di alam, bentuk protein spesifik untuk suatu fungsi. Oleh karena itu agar suatu polipeptida yang baru dibentuk siap menjadi protein yang berfungsi secara biologis dan mampu mengkatalisis suatu reaksi metabolik, menggerakkan sel, atau makromolekul, polipeptida tersebut harus mengalami pelipatan membentuk susunan tiga dimensi tertentu atau konformasi<sup>1</sup>. Sehingga pembukaan lipatan protein (unfolding) dapat mengubah struktur sekunder yang akhirnya mengubah fungsi protein tersebut.

Protein 1GB1 merupakan urutan asam amino 228-282 dari 448 asam amino yang terkandung dalam protein G. Domain B1 ini sendiri berfungsi membantu organisme *Streptomyces griseus* menghindari pertahanan inang melalui sifat pengikatan immunoglobulin (mengikat antibodi inang)<sup>2</sup>.

Simulasi dinamika molekul atau pemodelan komputer merupakan salah satu teknik yang digunakan dalam mempelajari struktur protein memanfaatkan prinsip mekanika klasik. Lintasan protein selama simulasi ditentukan dari koordinat awal dan temperatur tiap atom. Protein 1GB1 termasuk protein yang memiliki kestabilan termal tinggi (363K)<sup>2</sup> sehingga simulasi dinamika molekul protein 1GB1 dilakukan pada suhu tinggi (350 K – 500 K). Banyak penelitian yang telah mensimulasikan fragmen beta-hairpin dari protein 1GB1 dan menerangkan bahwa faktor penentu kestabilannya adalah interaksi hidrofobik, ikatan hidrogen dan jembatan garam<sup>3,4,5,6,7,8</sup>. Tetapi jarang penelitian yang mensimulasikan keseluruhan protein. Oleh karena itu penelitian ini diharapkan dapat menjelaskan kestabilan termal untuk keseluruhan protein 1GB1.

Rekayasa genetika dengan mutasi beberapa residu dapat meningkatkan atau menurunkan sifat termostabilitas dari mutan. Strategi yang dilakukan dapat dengan cara random (acak) atau terarah. Dalam penelitian ini rekayasa dilakukan terarah yaitu dengan mengganti beberapa residu spesifik yang dianggap berpotensi menjaga kestabilan termal protein 1GB1. Pemilihan residu yang akan dimutasi berdasarkan hasil analisis simulasi struktur *wild-type*.

## EKSPERIMENTAL

### Simulasi dinamika molekul

Data koordinat dan temperatur protein diunduh melalui Protein Data Bank ([www.rscb.org](http://www.rscb.org)) dengan index 1GB1<sup>9</sup>. Simulasi dilakukan untuk keseluruhan protein 1GB1 (56 residu) menggunakan NAMD2 dengan potensial CHARMM++<sup>10</sup>. Keadaan awal yang dipakai adalah rata-rata 60 model konformasi yang telah diminimisasi selama 100ps.

Protein ditempatkan dalam kotak dengan ukuran (65x54x50) Å yang dikelilingi oleh air TIP3P yang telah diekuilibrasi dengan protokol Langevin pada suhu 500K. Temperatur simulasi ditingkatkan per 25°C dengan langkah waktu 2.0 fs. Semua kekangan yang diberikan dihilangkan pada tahap produksi MD (*molecular dynamic*) yang dijalankan selama 2.0 ns.

### Mutasi titik

Hasil analisa simulasi *wild-type* protein 1GB1 menunjukkan bahwa energi non-ikatan pasangan jembatan garam GLU15-LYS4 menuju nol saat *unfolding* terjadi. Sehingga pasangan residu tersebut menjadi target mutasi. Masing-masing terletak di struktur beta-sheet 2 dan beta-sheet 1. Mutan 1 dipilih dengan menukar posisi kedua residu tersebut menjadi GLU4-LYS15<sup>11</sup>. Mutan 2 dipilih dengan menetralkan LYS4 menjadi THR4. Mutan 3 dipilih dengan menetralkan GLU15 menjadi ASN15. Mutan 4 dipilih dengan menetralkan kedua residu menjadi THR4 dan ASN 15. Masing-masing mutan disimulasikan selama 2.0 ns pada suhu 500K.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Struktur sekunder

Struktur sekunder utama protein 1GB1 terdiri dari 4 beta-sheet (kuning), 2 turn (hijau), 2 coil (putih) dan 1 alpha-helix (ungu). Selama simulasi beberapa residu menjadi fleksibel sehingga struktur tersebut dapat berubah-ubah. Pada simulasi 500K, alpha-helix dari *wild-type* hancur (678 ps) dan tergantikan oleh coil dan turn. Sedangkan struktur beta-sheet hanya sedikit terganggu (Gambar 1(a)). Pada mutan 2, pertukaran posisi pasangan jembatan garam tidak mengubah waktu lainnya *unfolding* tetapi struktur alpha-helix menjadi lebih pendek dan struktur beta sheet hancur (Gambar 1(b)).

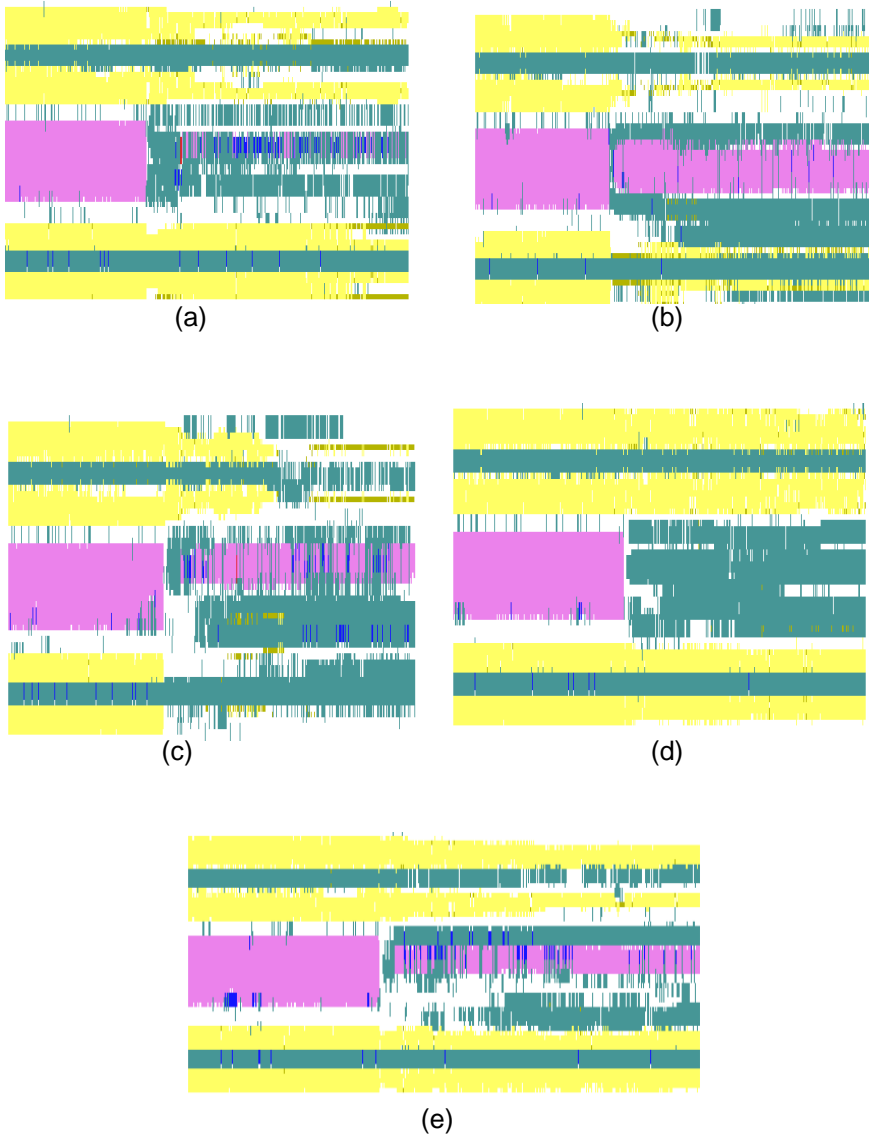
Penetralkan LYS4 menjadi THR4 membuat protein 1GB1 lebih stabil (*unfolding* pada 754 ps) walaupun struktur sekundernya banyak yang terganggu (Gambar 1(c)). Dari keseluruhan mutan yang paling stabil secara termal adalah mutan 3 karena mengalami *unfolding* pada 820 ps. Penetralkan GLU15 menjadi ASN15 membuat hancurnya alpha-helix menjadi coil dan turn, sedangkan struktur beta-sheet masih utuh hingga akhir simulasi (Gambar 1(d)). Kestabilan termal mutan 4 sama dengan mutan 2 walaupun struktur beta-sheet lebih dipertahankan (Gambar 1(e)).

### Root mean square deviation (RMSD)

RMSD didefinisikan sebagai besaran jarak antara dua buah atom.

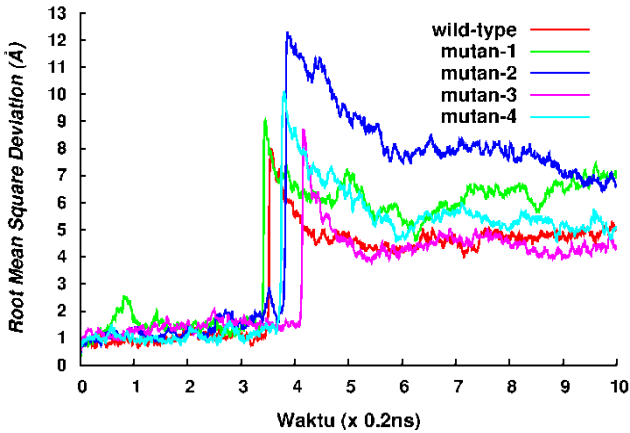
$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_{\text{atoms}}} (r_i(t_1) - r_i(t_2))^2}{N_{\text{atoms}}}}$$

dimana  $N_{atoms}$  adalah jumlah atom yang posisinya dibandingkan dan  $r_i(t_1)$  adalah posisi atom ke-i pada waktu ke-t.  $r_i(t_2)$  adalah posisi atom ke-i pada waktu  $t_2=0$ <sup>12</sup>. Nilai RMSD didapatkan melalui program VMD dengan terlebih dahulu dilakukan pensejajaran terhadap struktur pembanding<sup>5</sup>. Pensejajaran ini bertujuan untuk memperkecil nilai deviasinya<sup>13</sup>.

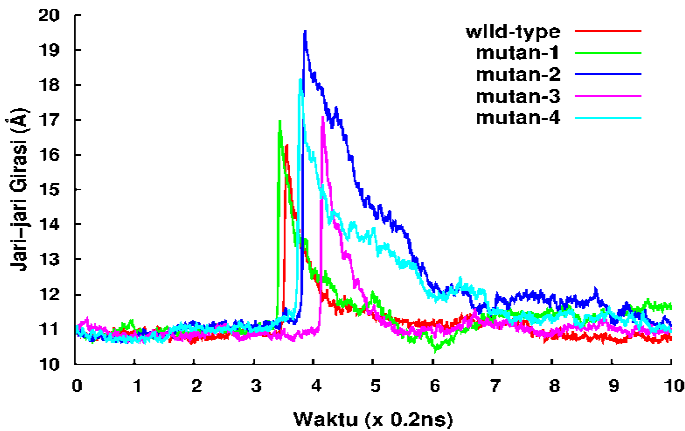


Gambar 1. Perubahan struktur sekunder selama simulasi; (a) *wild-type*, (b) mutan 1, (c) mutan 2, (d) mutan 3, (e) mutan 4.

Nilai peningkatan RMSD terbesar dimiliki oleh mutan 2 sekitar 10.50 Å, kemudian mutan 4 dengan 8.80 Å, mutan 1 dengan 7.80 Å, dan wild-type dengan 7.30 Å, terakhir mutan 3 dengan peningkatan sekitar 7.10 Å (Gambar 2). Nilai rata-rata peningkatan RMSD terendah terdapat pada mutan 3 yang mengindikasikan bahwa tidak terlalu banyak perubahan konformasi yang terjadi selama simulasi pada mutan 3 ini sebagaimana ditunjukkan oleh struktur *beta-sheet*-nya yang relatif tetap utuh dan bertahan.



Gambar 2. RMSD protein 1GB1 selama simulasi



Gambar 3. Jari-jari girasi protein 1GB1 selama simulasi

## Jari-jari girasi

Jari-jari girasi  $R_g$  adalah parameter yang menjelaskan konformasi seimbang dari sistem total dan kekompakan protein.

$$R_g^2 = \sum_{i=1}^N (r_i - R_C)^2 / N$$

dimana  $r_i$  adalah jarak atom ke-i terhadap pusat massa,  $R_C$  adalah koordinat pusat massa dan  $N$  adalah jumlah atom<sup>14</sup>. Peningkatan nilai  $R_g$  pada suatu simulasi menunjukkan membesarnya volume protein secara geometri atau berkurangnya kerapatan molekul protein sehingga protein tidak lagi kompak<sup>13</sup>. Oleh karena itu saat terjadi unfolding nilai jari-jari girasi meningkat drastis. Pada simulasi *wild-type*  $R_g$  meningkat hingga 5.26 Å, pada mutan 1 peningkatan  $R_g$  sebesar 6.01 Å, mutan 2 sebesar 8.29 Å, mutan 3 sebesar 6.26 Å, dan pada mutan 4 sebesar 6.86 Å (Gambar 3)

## SIMPULAN

Pasangan jembatan garam GLU15-LYS4 termasuk penentu kestabilan termal protein 1GB1. Hal ini terlihat dari beberapa perubahan drastis pada parameter struktur sekunder, RMSD, dan jari-jari girasi akibat mutasi titik di pasangan tersebut. Untuk menjaga kestabilan termal protein maka mutasi yang lebih baik adalah mutan 3 dimana GLU15 yang sifatnya polar negatif digantikan oleh ASN15 yang sifatnya polar netral karena didapatkan waktu *unfolding* yang lebih lama dan perubahan struktur sekundernya lebih teratur. Diketahui bahwa GLU termasuk residu yang kuat menghancurkan beta-sheet dengan nilai  $p$  (*conformational parameter*) sebesar 0.26, sedangkan ASN termasuk residu yang lemah menghancurkan beta-sheet dengan nilai  $p$  sebesar 0.65<sup>15</sup>. Kestabilan termal 1GB1 kemungkinan dapat lebih ditingkatkan lagi jika GLU15 digantikan oleh residu yang lebih kuat membentuk beta-sheet, seperti misalnya residu ILE.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang sangat tinggi kepada Direktorat Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia atas dukungan dana penelitian yang diperoleh melalui skema penelitian BOPTN dengan nomor kontrak 237/IT3.41.2/L2/SPK/2013 kode 2013.089.521219

## DAFTAR PUSTAKA

1. Murray, R. K., Graner, D. K., and Rodwell, V. W. Harper's Illustrated Biochemistry 28th edition. 2009.

2. Gronenborn, A. M., Clore, G. M. Structural Studies of Immunoglobulin- Binding Domains of Streptococcal Protein G, *Immunomethods*, Vol.2, 1993, pp. 3-8.
3. Pande, V. S., and Rokhsar, D. S. Molecular dynamics simulations of unfolding and refolding of beta-hairpin fragment of protein G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. Vol. 96, August 1999, pp. 9062-9067.
4. Guo, C., Levine, H., and Kessler, D. A. How does a  $\beta$ -hairpin fold/unfold? Competition between topology and heterogeneity in a solvable model. *PNAS*. 2000. Vol. 97, No 20, pp. 10775-10779.
5. Tsai, J., and Levitt, M. Evidence of turn and salt bridge contributions to  $\beta$ -hairpin stability: MD simulation of C-terminal Fragment from the B1 domain of protein G. *Biophysical Chemistry*. 2002. Pp. 187-201
6. Chen, C., and Xiao, Y. Observation of multiple folding pathways of  $\beta$ -hairpin trpzip2 from independent continuous folding trajectories. *BIOINFORMATICS*. Vol. 24 No 5, 2008, pp. 659-665.
7. Wu, X., and Brooks, B. R.  $\beta$ -hairpin folding mechanism of a nine-residue peptide reveals from molecular dynamic simulations in explicit water. *Biophysical Journal*. Vol. 86, 2004, pp. 1946-1958.
8. Zhou, R. and Berne, B. J. Can a continuum solvent model reproduce the free energy landscape of a  $\beta$ -hairpin folding in water?. *PNAS*. Vol. 99, No 20, 2002, pp. 12777-12782.
9. Phillips, J. C., Braun, S., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kale, L., Schulten, K., Scalable Molecular Dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, Vol. 26 No 16, May 2005, pp. 1781-1802.
10. Nakahara, Miwako.[Thesis] Simulation of The Interaction between Proteins and a Charge-Nanopatterned Surface. The Faculty of The Graduate School of Cornell University. January, 2005.
11. Aksimentiev, Alek, et. al. *Using VMD*. www.ks.uiuc.edu. 2012.
12. Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics" *J. Molec. Graphics* 1996, Vol. 14.1, pp. 33-38.
13. Randy, Ahmad. [Tesis]. Desain Peningkatan Termostabilitas Lipase B *Candida antarctica* dengan Rekayasa Penambahan Ikatan Disulfida Pada Enzim. Program Studi Ilmu Kimia. Fakultas MIPA. Universitas Indonesia. 2011.
14. Lobanov, M. Yu., Bogatyreva, N. S., Galzitskaya, O. V. Radius Gyration as an Indicator of Protein Structure Compactness. *Molecular Biology*. 2008. Vol. 8 No 4, March 2008 pp. 623-628
15. Biological Magnetic Resonance Data Bank. Amino Acid Secondary structure preferences. [Terhubung berkala]. Diakses pada tanggal 10- 03-2014. www.bmrb.wisc.edu/referenc/choufas.html