

4000006314



HADIAH

PENGEKSPRESAN DAN PENULENAN SER/THR FOSFOPROTEIN

FOSFATASE, PpP DARIPADA *Mycobacterium bovis*

BCG PASTEUR 1173P2

CHUAH CHOON SIANG

**PERPUSTAKAAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH**

**TESIS INI DIKEMUKAKAN UNTUK MEMENUHI
SEBAHAGIAN DARIPADA SYARAT MEMPEROLEHI IJAZAH
SARJANA MUDA SAINS DENGAN KEPUJIAN**

**PROGRAM BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH**

PERPUSTAKAAN UMS



1400006314

fac 2005



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

JUDUL: Pengekspresan dan penulisan Postprotein Fosfatase, daripada mycobacterium bovis BCG Pasteur 1173P. PPP

Ijazah: Sarjana muda bioteknologi

SESI PENGAJIAN: 2004/2005 (Tahun 3) Sem 2

Saya CHUAH CHUAN SIANG

(HURUF BESAR)

mengaku membenarkan tesis (~~LPS Sarjana Doktor Falsafah~~)* ini disimpan di Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dengan syarat-syarat kegunaan seperti berikut:

1. Tesis adalah hakmilik Universiti Malaysia Sabah.
2. Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dibenarkan membuat salinan untuk tujuan pengajian sahaja.
3. Perpustakaan dibenarkan membuat salinan tesis ini sebagai bahan pertukaran antara institusi pengajian tinggi.
4. **Sila tandakan (/)

SULIT

(Mengandungi maklumat yang berdarjah keselamatan atau kepentingan Malaysia seperti yang termaktub di dalam AKTA RAHSIA RASMI 1972)

TERHAD

(Mengandungi maklumat TERHAD yang telah ditentukan oleh organisasi/badan di mana penyelidikan dijalankan)

TIDAK TERHAD

Disahkan oleh

chuls

(TANDATANGAN PENULIS)

(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

Alamat Tetap: 19, tingkat implan indah 3,
Taman Implan Indah, Alme,
14600 Bukit Mertajam, S.P.T)

Nama Penyalia

Peny
Tarikh: 23/3/2005

Tarikh: _____

CATATAN: * Potong yang tidak berkenaan.

** Jika tesis ini SULIT atau TERHAD, sila lampirkan surat daripada pihak berkuasa/organisasi berkenaan dengan menyatakan sekali sebab dan tempoh tesis ini perlu dikelaskan sebagai SULIT dan TERHAD.

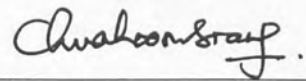
@ Tesis dimaksudkan sebagai tesis bagi Ijazah Doktor Falsafah dan Sarjana secara penyelidikan, atau disertasi bagi pengajian secara kerja kursus dan penyelidikan, atau Laporan Projek Sarjana Muda (LPSM).



PENGAKUAN

Saya akui bahawa karya yang berjudul "PENGEKSPRESAN DAN PENULENAN SER/THR FOSFOPROTEIN FOSFATASE, PpP DARIPADA *Mycobacterium bovis* BCG PASTEUR 1173P2" merupakan hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang tiap-tiap satunya telah saya jelaskan sumbernya.

31 Mac 2005



CHUAH CHOON SIANG

HS2002/ 3031

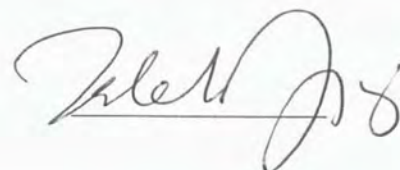


DIPERAKUKAN OLEH

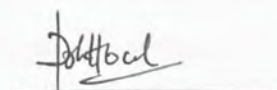
Tandatangan

1. PENYELIA

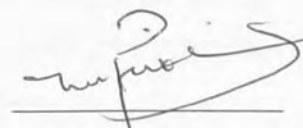
(Dr. Lee Ping Chin)
(Diwakili oleh Dr. Zaleha Abdul Aziz)

**2. PEMERIKSA 1**

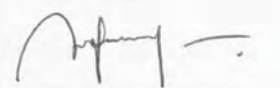
(Dr. Roziah Hj. Kambul)

**3. PEMERIKSA 2**

(Pn. Teoh Peik Lin)

**4. PEMERIKSA 3**

(Dr. Ivy Wong Nyet Kui)

**5. DEKAN**

(Prof. Madya Dr. Amran Ahmed)



PENGHARGAAN

Saya berasa bersyukur disebabkan disertasi yang bertajuk "PENGEKSPRESAN DAN PENULENAN SER/THR FOSFOPROTEIN FOSFATASE, PpP DARIPADA *Mycobacterium bovis* BCG PASTEUR 1173P2" dapat disempurnakan pada tarikh yang ditetapkan.

Dalam ruangan ini, izinkan saya merakamkan ribuan terima kasih kepada penyelia projek saya iaitu Dr. Lee Ping Chin yang telah banyak membantu dan memandu serta tunjuk ajar mahupun nasihat untuk menyempurnakan disertasi ini. Tidak dikecualikan juga para pembantu makmal yang sedia menyediakan kelengkapan dan peralatan di sepanjang analisa di makmal.

Di samping itu, saya berasa bangga dan gembira dapat mengenali pelajar master Ainol Azifa Mohd. Faik dan Glenda wong yang banyak memberi nasihat dan segala tunjuk ajar yang bernas untuk menjayakan analisis berkenaan.

Akhir sekali, saya ingin menglafazkan penghargaan ini buat sahabat sebidang disertasi ini iaitu Lee Hoong Fatt, Ng Wei Keong, Lau Sing Leng, dan Lin Li Shin yang banyak menolong dan menghulurkan bantuan kepada saya sama ada secara langsung atau tidak langsung.

Sesungguhnya bantuan, jasa, sokongan, tunjuk ajar dan doa sekalian tidaklan saya lupai atau balas buat selama-lamanya. Terima kasih sekali lagi saya mengucapkan buat kalian semua .

CHUAH CHOON SIANG

Mac 2005.

Program Bioteknologi
Sekolah Sains dan Teknologi



ABSTRAK

Dalam kajian ini, gen yang mengekodkan STPPs daripada *M.bovis* BCG Pasteur 1173P2 yang belum dicirikan telah dibentuk sebagai *ppP* (Serina/Threonina fosfoprotein fosfatase). Sebelum itu, primer yang direka bentuk ini diampifikasikan menerusi teknik PCR. Produk PCR (*ppP*) yang bersaiz 1545 bp diklonkan ke dalam plasmid pUC19. Seterusnya, produk plasmid pUC19 dibataskan dengan enzim pembatasan dan dicantum semula dengan vektor pengekspresan pET-16b menerusi T4 DNA ligase untuk membentuk rekombinan plasmid pET16b-*ppP*. Plasmid ini akan diklonkan dan diekspreskan di dalam perumah *Escherichia. coli* BL21(DE3)pLysS. Rekombinan protein yang dihasilkan dituliskan dengan menggunakan matriks agarose Ni-NTA sebagai protein PpP-10x *his tagged*. Akhirnya, protein rekombinan PpP dianalisis dan disahkan oleh kaedah SDS-PAGE seberat 56 kDa diikuti penentuan kepekatan proteinnya. Maklumat tambahan turut disertakan dalam tesis ini agar dapat memudahkan proses penyelidikan seperti ramalan fungsi protein fosfatase yang mungkin terlibat dalam transduksi isyarat untuk proses pengawalatur selular. Jadi, analisis bioinformatik mampu memaparkan maklumat tambahan mengenai rangkaian nukleotid PpP daripada *M. Bovis* BCG Pasteur 1173P2 menerusi *Reverse Position Specific BLAST* (RPS-BLAST) dan PSI-BLAST menunjukkan jujukan PpP mempunyai domain katalitik PP2C yang boleh dijumpai dikebiasakan keluarga STPPs 2C. Domain katalitik fosfatase hampir serupa dengan *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv, *M. bovis* AF2122/97, dan *Mycobacterium leprae*, iaitu masing-masing mencatat 99 %, 100% dan 95%. Analisis TMHMM dan TMAP mendapati bahagian heliks transmembran terletak di C-terminal pada kedudukan di antara 301-323 asid amino residu untuk rantai peptide PpP. Sementara analisis AASTATS menunjukkan bahawa berat molekul PpP sebanyak 53764 Da untuk 514 asid amino residu. Dengan ini, Perbandingann dengan STPPs yang lain mendapati PpP tergolong dalam keluarga PP2C yang berkemungkinan mengawal pelbagai proses selular misalnya pembezaan sel, pengawalaturan proses metabolik dan gerak balas terhadap tekanan persekitaran.



ABSTRACT

In this study, gen encoding STPPs of *M.bovis* BCG Pasteur 1173P2 not yet be characterized was formed as *ppP* (Serine/ Threonine phosphoprotein phosphatase). Before that, these designed primers were amplified through PCR technique. Size PCR product (*ppP*) 1545 bp was cloned into pUC19 plasmid. Followed by plasmid product pUC19 was digested by restriction enzyme and recombined to form plasmid recombinant pET16b-*ppP*. This plasmid will be cloned and be expressed in *Escherichia. coli* BL21(DE3)pLysS hosts. Yielded protein recombinat was purify by used Ni-NTA agarose matrix as protein PpP 10x His-tagged. Finally, rekombinan protein PpP was analyzed dan was proved by SDS-PAGE methods as 56 kDa and followed by determination protein concentration. Additional information also apply into this thesis to facilitate researching process as possible protein phosphatase functional prediction that involved in signal transduction to regulate cellular process That why, Bioinformatics analysis can revealed that additional information about PpP sequence of *M. Bovis* BCG Pasteur 1173P2 Reverse Position Specific BLAST (RPS-BLAST) and PSI-BLAST has showed that PpP have PP2C catalytic domain can be founded in most of STPPs family 2C. Domain catalytic phosphatase closely similiar to *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv , *M. bovis* AF2122/97, and *Mycobacterium leprae* namely note as 99 %, 100%, and 95%.representively. TMhMM and TMAP analysis noted that transmembrane helices region located at C-terminus at position 301-323 acid amino residues for PpP peptide chain. Meanwhile AASTATS analyses show that molecular weigh PpP as 53764 Da for 514 residue acid amino. Hereby, comparison other STPPs note that Ppp include in PP2C family as possible regulate large cellular process especially cell differentiation, regulation of metabolic process and response to environmental stresses.



KANDUNGAN

Muka Surat

PENAKUAN	II
PENGESAHAN	III
PENGHARGAAN	IV
ABSTRAK	V
ABSTRACT	VI
SENATAI KANDUNGAN	VII
SENARAI JADUAL	IX
SENARAI RAJAH	X
SENARAI SIMBOL	XI
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 PENGENALAN	1
1.2 OBJEKTIF KAJIAN	3
BAB 2 ULASAAN PERPUSTAKAAN	4
2.1 PROTEIN FOSFORILASI-DEROSFORILASI	4
2.1.1 Protein (serina dan threonina) fosfat fosfatase	6
2.1.2 Klasifikasi protein serina / threonina fosfatase	7
2.1.3 Fungsi PP2C dalam kepelbagaian organisma	9
2.2 <i>MYCOBACTERIUM</i>	10
2.2.1 <i>Mycobacterium sp</i> : Ciri-ciri umum	10
2.2.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	11
2.2.3 Penyakit tuberkolosis	14
2.2.4 Perbandingan di antara <i>Mycobacteriu</i>	15
BAB 3 METODOLOGI	17
3.1 CARTA ALIRAN PROTOKOL	17
3.2 PROTOKOL UMUM	18
3.2.1 Perumah pengekspresan (JM 109/ {BL21 (DE)/ pLysS})	18
3.2.2 Penyediaan mini-plasmid (alkali)	19
3.2.3 Elektroporesis gel agarose	20
3.3 PENGESAHAN <i>ppP</i> (pUC 19)	21



3.4 PENCERNAAN	22
3.5 LIGASI VEKTOR PENGEKSPRESAN pET-16b	22
3.6 PENGEKSPRESAN	23
3.7 PENULENAN (KOLUM Ni-NTA)	23
3.8 ANALISIS PROTEIN (SDS-PAGE)	24
3.9 ASEI PROTEIN (BIO-RAD)	26
BAB 4 KEPUTUSAN DAN ANALISIS DATA	27
4.1 ANALISIS SERPIHAN <i>ppP</i> DALAM REKOMBINAN PUC19	27
4.2 ANALISIS SERPIHAN <i>ppP</i> DALAM VEKTOR pEt16b- <i>ppP</i>	28
4.3 ANALISIS SDS-PAGE UNTUK PROTEIN PpP-HIS	29
4.4 PENENTUAN KEPEKATAN REKOMBINAN PpP-HIS	32
4.5 ANALISIS BIOINFORMATIK JUJUKAN PpP	34
BAB 5 PERBINCANGAN	40
5.1 PENGKLONAN <i>ppP</i> KE DALAM pUC19	41
5.2 PENCERNAAN pUC19- <i>ppP</i> DAN pET-16b	43
5.3 PEMBENTUKKAN pET16b- <i>ppP</i>	43
5.4 PENGEKSPRESAN DALAM PERUMAH BL21(DE3)pLysS	45
5.5 PROTEIN REKOMBINAN PpP	47
BAB 6 KESIMPULAN	48
RUJUKAN	49
LAMPIRAN	56



SENARAI JADUAL

No. Jadual	Muka urat
2.1 Pengelasan serina/ threonina fosfoprotein fosfatase (STPPs)	6
2.2 Projek penjujukan genom mycobacteria	12
2.3 Keputusan keseluruhan genom perbandingan	18
3.1 Program therma kitaran	21
3.2 Pencernaan plasmid pET-16b	22
3.3 Pencernaan plasmid pUC19	22
4.1 Bacaan serapan cahaya (OD_{595nm}) bagi siri kepekatan protein BSA (gml^{-1})	32
4.2 Penentuan jumlah protein rekombinan melalui pencairan sebanyak 30x	32



SENARAI RAJAH

No. Rajah	Muka surat
2.1 Protein fosforilasi dan defosforilasi	5
2.2 Domain struktur subunit katalitik dalam preotein Ser / Thr fosfatase	9
4.1 Plasmid rekombinan pUC19- <i>ppP</i> bagi agarose gel elektroforesis	27
4.2 Rekombinan pET16b- <i>ppP</i> bagi agarose gel elektroforesis	28
4.3 Fotograf bagi pengenalpastian sasaran protein rekombinan PpP	29
4.4 Graf serapan cahaya (OD_{595nm}) melawan jumlah protein (μg)	34
4.5 Bahagian protein PpP yang kaya dengan prolina	35
4.6 Keputusan analisis TMHMM	37
4.7 Kedudukan komponen utama dalam urutan asid amino PpP	37
4.8 Keputusan susunatur jujukan berganda	39
5.1 Rangkai protein rekombinan PpP	47



SENARAI SIMBOL

STPKs	Serina/Threonina Protein Kinase
STPPs	Serina/Threonina Protein fosfatase
<i>ppP</i>	Gen untuk Ser/ Thr fosfoprotein fosfatase
PpP	Protein Ser/ Thr fosfoprotein fosfatase
PP2C	Protein fosfatase bergantung kepada Mg^{2+} dan Mn^{2+}
BCG	<i>Bacille Calmette Guerin</i>
dH ₂ O	Air suling
ppm	pusung per minit
mM	mili molar
ml	mililiter
mgml ⁻¹	miligram per mililiter
µg	microgram
°C	Darjah celcius
OD	Kepadatan optik
A	Serapan cahaya
kDa	kilo Dalton
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
µgml ⁻¹	mikrogram per mililiter
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
APS	<i>Ammonium persulfate</i>
TEMED	<i>N,N N' N' tetramethylethylene diamine</i>
kb	kilo bes
bp	Pasangan bes

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 PENGENALAN

Mycobacterium bovis ialah agen penyebab tuberkulosis dalam julat species haiwan dan manusia dengan kerugian pengeluar pertanian tahunan sebanyak tiga ribu juta (Garnier *et al.*, 2003). Penyakit juga disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*, dan *M. africanum*. Sebilangan daripada bakteria patogenik menggunakan protein kinase sebagai perantaraan dalam rangkaian transduksi isyarat pada selular sel perumah lalu menggalakkan pertumbuhan bakteria tersebut. Ini disebabkan kebolehan *M. tuberculosis* yang memasuki makrofaj dengan mengelakkan dirinya dibunuh termasuklah asidifikasi fagosome (Koul *et al.*, 2001) dalam penentangan pemprosesan antigen, melemahkan aksi gamma interferon dan mengaktifkan protein kinase C dalam makrofaj. Gerak balas keimunan perumah terhadap tuberkulosis sangat kompleks malah melibatkan T sel, mononuclear fagosit dan sitokine (Av-Gay *et al.*, 1999).

Penterjemahan isyarat ekstraselular ke dalam gerak balas intraselular melibatkan protein fosforilasi. Proses fosforilasi dan defosforilasi dimangkin oleh



protein kinase dan protein fosfatase dalam transduksi isyarat sel prokariot dan eukariot (Peirs *et al* 1996.). Protein fosfatase boleh dikelaskan ke dalam PP1, PP2A, PP2B, dan PP2C berdasarkan pembezaan substrat yang spesifik dan kesensitifan pada aneka pengawal atur terbahagi kepada dua kategori utama iaitu jenis 1 dan 2. Protein tirosina fosfatase (PTP) juga tidak dikecualikan untuk mengfosforilasikan fosfotirosina.

Oleh sebab tuberkulosis masih menjadi masalah penyakit seluruh dunia, maka kebanyakan ahli penyelidik menumpu perhatian mereka terhadap diagnosis jangkitan *M. tuberculosis* untuk mencari calon vaksin dan kemudaratan. Analisis lengkap genom *M. tuberculosis* H37Rv dan *M. bovis* AF2122/97 telah meramalkan kehadiran 11 *putative* STPK dan 4 protein fosfatase dalam gram positif bakteria ini (Molle *et al.*, 2003; Koul *et al.*, 2001; Av-Gay *et al.*, 1999). Kemunculan STPK dan fosfatase mungkin boleh menjadi kunci pengawalan di dalam proses metabolik, perkembsangan sel dan interaksi dengan sel perumah. Berikutan kebolehan protein fosfatase mengawal proses defosforilasi pada aktiviti protein kinase dan proses lain yang mungkin seperti reaksi tekanan persekitaran. Tambahan pula, jujukan DNA pada genom *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* AF2122/97 hampir sama dengan jujukan DNA pada *strain M. bovis* BCG Pasteur 1173P2 yang telah dilemahkan, maka gen yang dikenali sebagai *ppP* telah dijujuk keluar dengan saiznya berukuran 1.5 kb untuk dikajikan dan dicirikan. Analisis jujukan *ppP* dengan menggunakan *reverse position specific BLAST* (RPS-BLAST) telah mendapati protein PpP dari *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2 mempunyai domain katalitik PP2C yang wujud di kalangan STPPs keluarga 2C dengan kehadiran dwivalen ion (Mg^{2+}/Mn^{2+}).



1.2 OBJEKTIF KAJIAN

Projek ini dijalankan dengan objektif:

- i) Untuk mengklonkan gen *ppP* daripada *Mycobacterium bovis* BCG 1173P2 ke dalam vector pengklonan pET-16b
- ii) Untuk pengepresan dan penulenan Serina/ Threonina fosfoprotein fosfatase (PpP) *Mycobacterium bovis* BCG 1173P2.



BAB 2

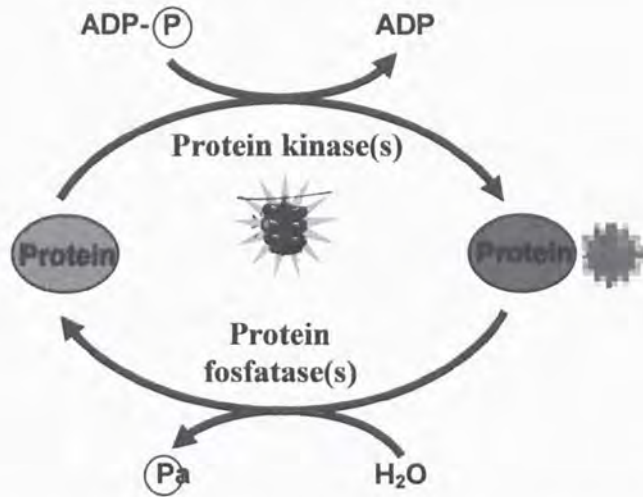
ULASAN PERPUSTAKAAN

2.1 PROTEIN FOSFORILASI DAN PROTEIN DEFOSFORILASI

Semenjak penemuan protein fosforilasi dan protein defosforilasi pada pertengahan tahun 1950an, didapati protein ini menjadi asas proses trasduksi isyarat di dalam sel prokariot dan eukariot. Dalam sel prokariot, proses fosforilasi kerap berlaku pada Histidina/ Asparagina residu di dalam sistem transduksi isyarat dua komponen. Manakala dalam sel eukariot pula, kebanyakan proses fosforilasi berlaku pada residu Tyrosina, Serina dan Threonina (Peirs *et al.*, 2000).

Proses pembalikkan bukan sahaja dikawal oleh protein fosforilasi iaitu protein kinase tetapi juga dikawal oleh protein fosfatase. Sasaran protein adalah memfosforilan pada tapak spesifik melalui protein kinase dan fosfat ini disingkir oleh spesifik protein fosfatase (Rajah 2.1). Bentangan fosforilasi pada suatu tapak tertentu boleh dikawal oleh perubahan sejenis aktiviti PKs (protein kinase) atau PPs (protein fosfatases) ataupun kedua-duanya (Hunter, 1995).





Rajah 2.1 Protein fosforilasi dan defosforilasi

Protein (serina/ threonina) fosfat fosfatase (STPPs) yang klasik menunjukkan bahawa terdapat empat jenis enzim protein fosfatase yang dinamakan PP1, PP2A, PP2B, dan PP2C seperti dalam jadual 2.1 (Chen *et al.*, 1992). Keempat-empat enzim ini boleh diklasifikasikan ke dalam dua kelas utama. Klasifikasi keempat-empat protein ini berdasarkan kepada pemdefosforilan serina dan threonina residu oleh fosfatase pada pengkhususan substrat dan kesensitifan terhadap pengaktif dan perencat tertentu sahaja. Jenis pertama, protein fosfatase (protein fosfatase 1) dengan memilih defosforilan pada β subunit dari fosforilan kinase dan direncat oleh kepekatan nanomolar dari protein pengawalatur termostabil iaitu perencat-1 dan perencat-2. Jenis kedua protein fosfatase (PPM) memilih defosforilan pada α subunit dari fosforilan kinase dan tidak peka akan terhadap perencat-1 dan perencat-2 (Cohen, 1997).

Jadual 2.1 Pengelasan Serina/ Threonina fosfoprotein fosfatase (STPP_s)

Lama		Perencat	Pengaktif	Baru	
Jenis	Nama			Jenis	Nama
1	PP1	perencat-1&-2	-	PPP	PPP1
2	PP2A	Acid okadaik	-	PPP	PPP2
2	PP2B	trifluoperazine	Ca- calmodulin	PPP	PPP3
2	PP2C	EDTA	Mg ²⁺ , Mn ²⁺	PPM	PPM

2.1.1 Protein serina/ threonina fosfoprotein fosfatase

Pada awal tahun 1938, enzim glikogen fosforilase boleh wujud dalam dua bentuk iaitu a dan b, dapat dibezakan berdasarkan keperluan nukleotide 5-AMP bagi aktiviti pemgekspresan penuh. Pada pertengahan 1959an, Sutherland dan Wosilait membuat pemerhatian bahawa enzim penyingkiran kumpulan prostetik (PR-enzyme) sebenarnya ialah protein fosfatase yang memangkin pembebasan fosfat inorganik daripada fosforilase a untuk menghasilkan fosforilase b. Friedman dan Larner pula mendemonstrasi protein fosfatase menukarkan bentuk glikogen synthase b kepada a (Shenolikar dan Ingebritsen, 1984). Pada tahun 1968, penemuan aktiviti fosforilase kinase fosfatase telah membawa kepada pengelasan protein fosfatase ke dalam PP1, PP2A, PP2B, dan PP2C berdasarkan pembezaan substrat yang spesifik dan kesensitifan kepada aneka pengawal atur telah membawa kepada klasifikasi peotein

fosfatase ke dalam dua kategori iaitu jenis 1 dan 2. Tidak dikecualikan, terdapat protein tyrosine fosfatase (PTP) yang mengfosforilasikan fosfotirosina seperti PtpA (*S. coelicolor*A3(2)) {Li dan Strohl, 1996}.

Terdapat dua mekanisme untuk mengawal atur protein fosfatase I (PPI) telah dikenal pasti. Pertama, PP1 melibatkan fosforilasi perencat-1 pada residu threonina yang spesifik dengan *cyclic AMP dependent protein kinase*. Bentuk fosfo pada protein adalah perencat poten PP1 dan bentuk defosfo tidak aktif. Kedua, pengawalan protein fosfatase 1 dilaporkan oleh Merlevede dan Riley dalam tahun 1966 menyatakan bahawa fosfolase fosfatase aktiviti diekstrak daripada bovine adrenal kortex adalah meberangsangkan selepas diinkubasi dalam kehadiran Mg ATP. Jenis II protein fosfatase dipisahkan ke dalam tiga spesies iaitu protein fosfatase 2A, 2B, dan 2C dengan perbezaan relative spesifiknya kepada substrat fosfoprotein dan dikawal oleh kation divalen. (Shenolikar dan Ingebritsen, 1984)

2.1.2 Klasifikasi protein Serina / Threonina fosfatase

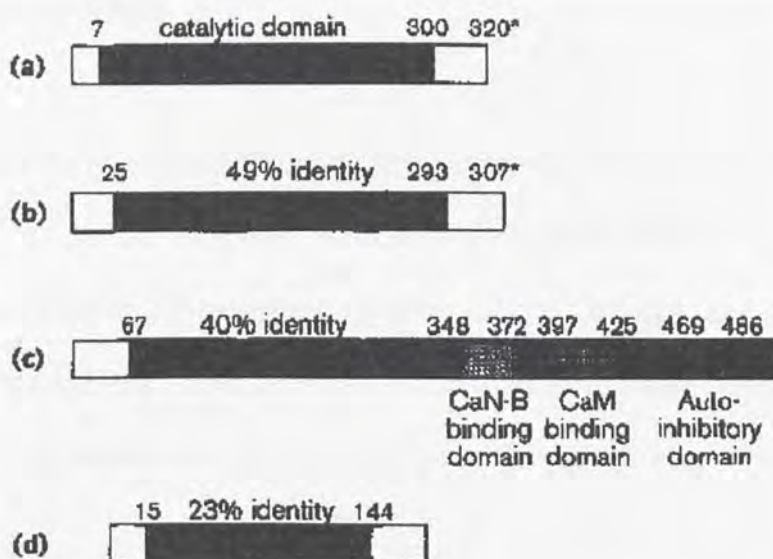
Kesemua protein fosfaatase yang diketahui spesifik untuk fosforilan serina dan threonina yang dikodkan oleh dua keluarga gen yang tidak bersaudara dikenali sebagai PPM dan PPP. Famili PPM terdiri daripada structural Mg^{2+} bergantung fosfatase berhubung dengan PP2C, famili PPP pula secara tradisional dibahagikan kepada tiga subfamili, berhubung dengan ke PP1, PP2A, dan PP2B (calcineurin) (Andreeva dan Kutuzov, 2001). Sedangkan PP2C adalah enzim monomerik dan kemunculannya tidak berkaitan dengan yang lain, PP1, PP2A and PP2B pula adalah multimerik dan mempunyai darjah kesamaan yang tinggi dalam subunit katalitikanya seperti dalam



raja 2.2 (Villafranca *et al.*, 1996). Penyiasatan fosfatase ini mendedahkan peranan mereka dalam proses metabolisme, pengawalatur kitaran sel dan penggabungan RNA, mengawal atur banyak protein kinase, pengaktifan T-cell, dan pembentukan memori. Kesemua dibezakan dengan tindakan pada pretein kinase dan kesensitifan terhadap sesetengah penrgaktif serta perencat. Malahan terdapat capahan novel kumpulan PPP fosfatase yang dikenali sebagai sub-keluarga PP5/rdgC sudah diiktirafkan. Ia terdiri daripada enzim yang dikaitkan kepada mamalia da fungi PP5/PPT, protein fosfatase dengan *EF-hand* domain (PPEF, istilah rdgC dalam *Drosophila*), dan plant PP7 (Andreeva dan Kutuzov, 2001).

Jenis II (PP2A, PP2B dan PP2C) protein fosfatase boleh dibezakan dalam banyak cara tetapi keberkesanan bergantung kepada permintaan kation divalent dan gerak balas terhadap promoter tumor asid okadaic toksik hati dikenali sebagai mikrocistin LR. PP2A tidak ada kerperluan permintaan yang tertentu untuk kation divalen, sedangkan PP2B ialah bergantung kepada Ca^{2+} , Calmodulin merangsangkan enzim dan PP2C bergantung kepada Mg^{2+} . PP2A adalah direncat oleh kepekatan subnanomolar asid akadaik dan tnicrocystin , sedangkan PP2B adalah lebih 1000 kali ganda kurang sensitif dan PP2C adalah menentang toksik ini. PP 1 adalah sangat sensitif terhadap asid okadaik dan microcystin





(Villafranca et al., 1996)

Rajah 2.2 Domain struktur subunit katalitik dalam pretein Ser / Thr fosfatase (a) PPI (arnab), (b) PP2A (manusia), (c) PP2B (manusia) dan (d) bakteiofaj dalam perayusan fosfatase.

2.1.3 Fungsi PP2C dalam kepelbagaian organisma

Kumpulan protein fosfatase yang terbesar muncul di dalam prokariot dan eukariot ialah PP2C yang tergolong dalam keluarga PPM). Dalam eukariot, salah satu peranan PP2C ialah menterbalikkan laluan protein kinase yang diaktifkan di bawah keadaan tekanan persekitaran. Contohnya: di dalam hepatosit mamalia, PP2C mencegah perencatan biosistesis kolesterol dan asid lemak akibat nisbah AMP-ATP yang tinggi. Dalam yis pula enzim tidak mengawal laluan kinase PBS2/HOG1-MAP yang diaktifkan dalam gerak balas terhadap osmotik dan kejutan haba. *Arabidopsis*, PP2C penting untuk memindahkan isyarat oleh asid abscisik hormone untuk penyelenggaraan dorman biji benih dan perencatan tumbesaran. Peranan PP2C seakan protein fosfatase dalam mengawal atur laluan gerak balas tekanan juga wujud dalam prokariot seperti SpoIIE daripada *Bacillus subtilis* (Duncan et al., 1995.)

2.2 MYCOBACTERIUM

Genus *Mycobacterium* terdiri daripada organisma berbentuk rod dan memiliki *acid-fastness* yang tersendiri. Sifat-sifat ini adalah disebabkan kehadiran lapisan selaput lipid pada permukaan sel mycobacteria yang dikenali sebagai asid mikolik. Pada umumnya, mycobacteria boleh dibahagikan kepada dua kumpulan utama, spesies yang pertumbuhannya lambat dan spesies yang pertumbuhannya cepat (Madigan *et al.*, 2003).

2.2.1 *Mycobacterium sp*: Ciri-ciri umum

Dinding sel mycobacteria terdiri daripada bahan *waxy*, hidrofobik dan mempunyai kandungan lipid yang tinggi. Lebih daripada 60% berat kering organisma ini memiliki asid mikolik yang berantai panjang dan mempunyai cabang asid lemak. Jenis asid mikolik digunakan boleh membezakan mycobacteria yang lain. Asid mikolik dan rantai asid lemak yang pendek membentuk selaput palsu pada bahagian luaran dan bertanggungjawab untuk pewarnaan yang luar biasa. Dinding ini bertanggungjawab sebagai daya hidrofobik organisma ini dan perkembangan *delayed type hypersensitivity* (DTH). Kesemua patogen mycobacteria adalah patogen intraselular di mana dindingnya menolong organisma ini hidup dalam makrofaj dengan menentang kerosakan oksidatif

Sel Mycobacteria amat hidrofobik dan membentuk sekatan ketertelapan yang luar biasa, dan lazimnya memaparkan ketahanan terhadap beraneka jenis agen antimicrob. Ini disebabkan struktur dinding sel mycobacteria yang unik dan kehadiran



asid lemak yang panjang (C_{60} - C_{90}) dan asid mikolik. Saluran penbentukan protein yang berfungsi seakan-akan sama dengan liang umum daripada bacteria gram negatif seperti yang terdapat dalam *Mycobacterium chelonae* dan *M. smegmatis* mendedahkan bagaimana molekul hidrofilik boleh melintasi dinding sel hidrofobiknya.

Mycobacterium spp. unik disebabkan oleh kandungan asid mikolik yang tinggi. Bahan *waxy* yang terkandung di dalam dinding selnya. Bahan *waxy* ini menyekat penyerapan nutrient dan menyebabkan sel berkelompok. Faktor ini menyumbang kepada kadar pertumbuhan yang lambat. *Mycobacterium* tidak tumbuh di luar persekitaran perumah (boleh hidup tetapi bukan menggandakannya) kecuali dalam media kultur (Madigan *et al.*, 2003).

2.2.2 *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis mempunyai kandungan GC yang tinggi (Jadual 2.3) dari ahli gram-positif aktinobakteria. Dinding sel mycobacteria mengandungi pelbagai kompleks lipid dan merupakan perantaraan di antara bacterium dengan persekitarannya. Biosintesis asid lemak memainkan peranan penting dalam Pembina komponen dinding sel. Asid mikolik telah disasarkan oleh kebanyakan dadah untuk merawat jangkitan *M. tuberculosis*.

Genus *Mycobacterium* mengandungi kira-kira 70 spesies termasuk patogen manusia *Mycobacterium tuberculosis* dan *Mycobacterium leprae*. Ia dianggarkan bahawa 25 tahun yang akan datang, sebanyak 40 juta orang akan mati akibat tuberkulosis. Kelengkapan projek penjujukan genom mycobacteria seperti yang



dipaparkan dalam jadual 2.2 telah banyak membantu menyelidik penyakit ini dengan harapan mampu mencari suatu mekanisme untuk menghindari dirinya berada dalam sistem keimunan perumah serta caba menghuraikan jalan metaboliknya.

Jadual 2.2 Projek penjujukan genom mycobacteria

Jenis <i>Mycobacterium</i> spp.	Tapak network
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_tuberculosis
<i>M. bovis</i>	http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_bovis
<i>M. bovis</i> BCG	http://www.pasteur.fr/recherche/unites/Lgmb
<i>M. leprae</i>	http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_leprae
<i>M. tuberculosis</i> CDC1551 (CSU93)	http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdb.html#progress
<i>M. avium</i>	http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdb.html#progress

(Brosch *et al.*, 2000)

Mycobacterium tuberculosis mengancam kesihatan manusia, berikutan kebolehan *M. tuberculosis* memasuki makrofaj dan mengelak dirinya dicernakan oleh intraselular. Gerak balas keimunan perumah terhadap tuberkulosis adalah kompleks, melibatkan T sel, mononuclear fagosit, dan sitokine. Oleh itu, Genom *M. tuberculosis* H₃₇Rv, *M. tuberculosis* H₃₇Ra, *M. bovis*, dan *M. bovis* BCG Pasteur diperbandingkan dalam gabungan berbeza-beza dengan menggunakan aneka kaedah *subtractive genomic hybridization*, *bacterial artificial chromosome* (BAC), *restriction profile analysis*, *BAC array*, *DNA microarrays*, dan *southern blotting*.

Dengan ini, sebilangan bahagian perbezaan (RD) telah dikenal pasti di antara berbagai-bagai organisma. Salah satu bahagian RD1 pencoretan dengan saiznya 9, 505



RUJUKAN

- Andreeva, A. V., dan Kutuzov, M. A., 2001. *PPP Family of Protein Ser/Thr Phosphatases: Two Distinct Branches?* Mol. Biol. Eva., 18, 448-452.
- Av-Gay, Y., Jaamil, S. dan Drews, S. J., 1999. *Expression and Characterization of the Mycobacterium tuberculosis Serine/Threonine Protein Kinase PknB.* Infect. Immun., 67, 5676-5682.
- Barford, D., 1996. *Molecular mechanisms of Protein Serine/Threonine Phosphatases.* Trend Bioche. Sci., 21, 407-412.
- Behr, m.A dan Small, P.M., 1999. *A historical and molecular phylogeny of BCG strains.* Vaccine 17, 915-922.
- Blaber M. 1998 Spring. *Web Page for Lecture 25 of Molecular Biology and Biotechnology Course: Prokaryotic Expression Vectors*
- Bradford, M. 1976. *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding".* Anal. Biochem. 72:248-254.
- Brosch, R., Gordon, S.V., Pym, A., Eiglmeier, K., Garnier, T., dan Cole, S.T., 2000. *Comparative genomics of the mycobacteria.* Int. J. Med. Microbiol. 290, 143-152.
- Bork, P., Brown, N.P., Hegyi, H., Schultz, J., 1996. *The Protein Phosphatase 2C (PP2C) superfamily: Detection of Bacterial Homologues.* Protein Sci., 5, 1421-1425.
- Chopre, P., Bhuminder, S., Ramandeep, S., Vohra, R., Koul, A., Meena, L. S., Koduri, H., Ghildiyal, M., Deol, P., Das, T. K., Tyagi, A. K., dan Yogendra, S., 2003.



Phosphoprotein Phosphatase of Mycobacterium tuberculosis Dephosphorylates Serine/ threonine Kinases PknA and PknB. Biochem. And Biophys. Res. Commun., 311, 112-120.

Chen, M. X., Chen, Y. H., dan Cohen, P. T.w., 1992. *Polymerase Chain Reactions using Saccharomyces, Drosophila and Human DNA Predict a Large Family of Protein Serine/Threonine phosphatases*. FEBS Letters, UK, 54-58.

Cohen, P. T. W., 1997. *Novel Protein serine / Threonine Phosphatases: Variety is a Spice of Life*. Elsevier Science Ltd, 245-251.

Cohen, P.T.W., Brewis, N.D., Hughes, V., dan Mann, D.J., 1990. *Protein serine/threonine phosphatases; an expanding family*. FEBS Letters, UK, 355-359.

Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., III, Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, A., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborn, J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S., dan Barrell, B.G., 1998. *Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence*. Nature 393, 537-544.

Das, A.K., Helps, N.R., Cohen, P.T.W., dan Barford, D., 1996. *Crystal Structure of the Protein Serine/ Threonine Phosphatase 2C at 2.0 Å resolutions*. EMBO J., 15, 6798-6809.

Dale, J. W and Schantz, M. V., 2002. *From Gene to Genomes: Concepts and Applications of DNA Technology*. John Willey & Sons, Ltd. 31-39.



- Duncan, L., Alper, S., Arigoni, F., Losick, R., dan Stragier, P., 1995. *Activation of cell-specific transcription by a serine phosphatase at the site of asymmetric division*. Science 270, 641-644.
- Dye, C., Scheele, S., Dolin, P., Pathania, V., dan Raviglione, M.C. 1999. *Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance Monitoring Project J Am Med Assoc* 282: 677-686.
- Egloff, M. P., Johnson, D. F., Moorhead, G., Cohen, P. T. W., Cohen, P., dan Barford, D., 1997. *Structural basis for the recognition of regulatory subunit by the catalytic subunit of protein Phosphatase 1*. EMBO J., 16, 1876-18
- Egloff, M. P., Cohen, P. T., Reinemer, P., dan Barford, D., 1995. *Crystal Structure of the Catalytic subunit of Human Protein Phosphatase 1 and Its Complex with tungstate*. J. Mol. Biology, 254, 942-959.
- Elhay, M.J., Oettinger, T., dan Anderson, P., 1998. *Delayed-type hypersensitivity responses to ESAT6 and MPT64 from Mycobacterium tuberculosis in the guinea pig*. Lancet 345, Infect. Immun. 66, 3454-3456.
- Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J. C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., Duthoy, S., Grondin, S., Lacroix, C., Monsempe, C., Simon, S., Harris, B., Atkin, R., Doggett, J., Mayes, R., Keating, L., Wheeler, P. R., Parkhill, J., Barrell, B. G., Cole, S. T., Gordon, S. V., dan Hewinson, R. G., 2003. *The Complete Genome Sequence of Mycobacterium bovis*. PNAS, Boston, 1-6.
- Gey van Pittius, N. C., Gamielien, J., Hide, W., Siezen, R. J., dan Beyers, A. D., 2001. *The ESAT-6 Gene Cluster of Mycobacterium tuberculosis and High G+C Gram-Positive Bacteria*, BioMed Central Ltd., Netherlands, 0044.1-0044.18.



- Griffith, J. P., Kim, J. L., Kim, E. E., Sintchak, M. D., Thomson, J. A., Fitagibbon, M. J., Fleming, M. A., Caron, P. R., Hsiao, K., dan Navin, M. A., 1005. *X-ray Structure of Calcineurin Inhibited by the Immunophilin-immunosuppresant FKBP12-FK506 Complex. Cell*, 82, 507-522.
- Goldberg, J., Huang, H., Kwon, Y., Greengard, P., Nairn, A. C., dan Kuriyan, J., 1995. *Three-dimensional Structure of the Catalytic subunit of Protein Serine/Threonine Phosphatase-1*. 376, 745-753.
- Herzig, S., dan Neuman, J., 2000. *Effects of Serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. Physiol. Rev.*, 80, 173-210.
- Hochuli, E., Döbeli, H. & Schacher, A., 1987. *New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighboring histidine residues. J. Chromatogr.* 411:177-184
- Horwitz, M.A., Lee, B.W., Dillon, B.J., dan Harth, G., 1995. *Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellualr proteins of Mycobacterium tuberculosis. Proc. NATl. Acad. Sci. USA*, 92, 1530-1534.
- Hunter, T., 1995. *Protein kinases and phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling. Cell.* 80, 225-236.
- Jia, Z., 1997. *Protein phosphatases structures and implications. Bioche. Cell Biology*, 75, 17-26.
- Kissinger, C. R., Parge, H. E., Knighton, D. R., Lewis, C. T., Pelletier, L. A., Tempezyk, A., Kalish, V. J., Tucker, K. D., Showalter, R. E., Moomaw, E. W., Baker, J. E., Baequet, R., dan Villafranca, J. E., 1995. *Crystal Structure of Human Calcineurin and the Human FKBP12-FK506- Calcyneurin Complex. Nature*, 378, 641-644.



- Koul, A., Choidas, A., Tyagi, A. K., Drlica, K., Singh, Y., dan Ullrich, 2001. *Serine/Threonine Protein Kinases PknF and PknG of M. tuberculosis Characterization and Localization*. J. Micro., 147, 2307-2314.
- Li, Y., dan Strohl, W.R., 1995. *Cloning, purification, and properties of a phosphotyrosine protein phosphatase from Streptomyces coelicolor A5(2)*. J. Bacteriol 178, 136-142.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., dan Parker. J., 2003. *Biology of Microorganisms*. Ed. 10th. Pearson Education Inc., 414-415.
- Mahairas, G.G., Sabo, M.I., Hickey, M.J., Singh, D.C., dan Stover, C.K., 1996. *Molecularanalysis of genetic diffences between Mycobacterium bovis BCG and virulent M. bovis*. J. Bacteriol. 178, 1274-1282.
- Molle, V., Girard-Blane, C., Kremer, L., Doublet, P., Cozzone, A. J., dan Prost, J.-F., 2003. *Protein PknE, a Novel Transmembrane Eukaryotic-like Serine/Threonine from M. tuberculosis*. Bioche. and Biophy. Res. Commu., 308, 820-852.
- Moszer, I., Jones, L. M., Moreira, S., Fabry, C. & Danchin, A., 2002. *SubtiList : the reference database for the Bacillus subtilis genome*. Nucleic Acids Res 30, 62±65
- Obuchowski, M., Madec, E., Delattre, D., Boel, G., Iwanicki, A., Foulger, D., Seror, S.J., 2000. *Characterization of PrpC from Basillus. Subtilis, a Member of the PPM Phosphatase Family*. J. Bacteriol. 182, 5634-5638.
- Peirs, P., Parmentier, B., Wit, L. D., dan Content, J., 2000. *The Mycobacterium bovis Homologous Protein of the Mycobacterium Iuberculosis Serine / Threonine Protein Kinase Mbk (PknD) is truncated*. FEMS Microbiology Letters, Belgium, 135-139.



- Prescott, L.M., Harley, J.P., dan Klein, D.A., 1999. *Microbiology*. Ed. Ke-4. WCB/McGraw-Hill. 773-775.
- Roach, Peter J., 1984. *Methods in Enzymology: protein Kinases*. Academic Press Inc., 81-101.
- Rosenberg, A. H., Lade, B. N., Chui, D., Lin, S., Dunn, J. J., dan Studier, F. W., 1987. *Gene*. 10, 49-56.
- Rosenkrands, I., Rasmussen, P.B., carnio, M., Jacobsen, S., Theisen, M., dan Andersen, P., 1998. *Identifiication and characterization of a 29 kiloDalton protein from Mycobacterium tuberculosis culture filtrate recognized by mouse memory effector cells*. *Infect. Immun.* 66, 2728-2735.
- QIAGEN, 2003. *Ni-NTA Spin Handbook*. 1-26.
- Studier, F. w., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., dan Dubendorff, J. W., 1990. *Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes*. *Math. Enzymol.* 185, 60-89.
- Studier, F. w., 1991. *Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system*. *J. Mol. Biol.* 219, 37-44.
- Sharma, K., Dhandra, H., Gupta, P. K., Pathak, M., Narayan, A., Meena, L. S., D'souza, R. C. J., Chopra, P., Ramachandran, S., dan Yogendra, S., 2004. *PktnH, a Membrane Hank's Type Serine/ Threonine Kinase from Mycobacterium tuberculosis is Differentially Expressed under Stress Conditions*. *FEMS Microbiol. Let.*
- Shenolikar, S., dan Ingebritsen, T. S., 1984. *Methods in Enzymology: Protein (Serine and Threonine) Phosphate Phosphatases*. Academic Press. Inc., 102-129.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., dan Maniatis, T., 1989. *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor, NY.



- Stoscheck, C. 1990 "Quantification of Protein" *Methods in Enzymology* , 182:50-68
- Tyagi, J. S., dan Sharma, D., 2004. *Signal transduction systems of mycobacteria with special reference to M. tuberculosis*. *Current Science, India*, 93-102.
- Villafranca, J. E., Kissingert, C. R., dan Parge, H. E., 1996. *Protein Serine/Threonine Phosphatases*. *Current Biology Ltd*, 397-402.
- Wayne, L. G. dan Kubica, G. P., 1986. The Mycobacteria. *In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, pp. 1435-1457. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe dan J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) *Gene* 33, 103-119

