

PENGENALPASTIAN GLIKOPROTEIN TAMM HORFALL DAN O-GLIKAN  
DARIPADA OTAK DAN BUAH PINGGANG TIKUS

NORAZILA SANIMAN

PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

DISERTASI YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMENUHI SEBAHAGIAN  
DARIPADA SYARAT MEMPEROLEHI IJAZAH SARJANA MUDA SAINS  
DENGAN KEPUJIAN DALAM BIOTEKNOLOGI

BIOTEKNOLOGI  
SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

APRIL 2007



**UMS**  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BORA NG PENGESAHAN STATUS TESIS@

JUDUL: Pengenalpastian Glikoprotein Tamm Horsfall dan O-glitiran  
dampak Otak dan buah pinggang tikus

Ijazah: Sarjana Muda Sains dengan Kepujian

SESI PENGAJIAN: 2004-2007

Saya NORAZILA SANIMAN

(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 hak milik 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 berdasarkan keselamatan atau  
kepentingan Malaysia seperti yang termaktub di dalam  
AKTA PERPUSTAKAAN SABAH RASMI 1972)

TERHAD

PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

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

TIDAK TERHAD

Disahkan oleh

*Ivy Wong*

(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

*Dr. Ivy Ngat Wong Nyet kui*  
Natha Penyelia

Alamat Tetap: No. 304 blok 1,  
Jln 2/1 seksyen 2, 43650,  
Bandar Baru Bangi, Selangor

Tarikh: 20/4/2007

Tarikh: 20/4/2007

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 diklasaskan 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 karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan and ringkasan tiap-tiap satunya telah saya jelaskan sumbernya.

**20 April 2007**

---

NORAZILA SANIMAN

HS2004-2643

PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

**DIPERAKUKAN OLEH**

Tandatangan

**1. PENYELIA**

(Dr. Ivy Wong Nyet Kui)

**2. PEMERIKSA 1**

(Dr. Roziah Kambol)

**3. PEMERIKSA 2**

(Dr. Lee Ping Chin)

**4. DEKAN**

(SUPT/KS Prof Madya Dr. Shariff A. Kadir S. Omang)

PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

**UMS**  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

## PENGHARGAAN

Saya ingin mengucapkan terima kasih kepada Dr. Ivy Wong Nyet Kui selaku penyelia projek tahun akhir saya kerana memberikan nasihat dan bantuan sepanjang projek ini berlangsung. Penghargaan juga ditujukan kepada Dr. Roziah Kambol dan Dr. Lee Ping Chin selaku pemeriksa. Selain daripada itu, terima kasih juga saya ucapkan kepada pelajar master, En. Awang, Cik Ainol, Mr. Kenneth, Mr. Ho, Mr. Chong, Ms. Laura, Mr. Lee Boon Beng, dan Ms. Catherine yang banyak memberi nasihat dan pandangan serta bantuan peralatan yang tiada sepanjang eksperimen ini. Terima kasih juga diucapkan kepada pembantu makmal Sekolah Sains dan Teknologi yang banyak membantu dari segi peralatan dan bahan kimia iaitu En. Rizal, Cik. Radizah, En. Saufi dan En. Musbah. Penghargaan juga ditujukan kepada rakan-rakan seperjuangan iaitu Hasrizal dan Syahidah yang bersama-sama dalam usaha menyiapkan projek ini walaupun terdapat pelbagai halangan dan kesukaran. Rakan-rakan program bioteknologi, Aizati, Farrah, Hana, Raha, Farhana, Miza, Huda, dan rakan-rakan saya, Liyana, Rohana, Aini, Yani dan Nizam yang banyak mendorong dan memberi semangat serta bantuan. Akhir sekali kepada keluarga saya yang memberi sokongan dan semangat.

## ABSTRAK

Glikoprotein Tamm-Horsfall (THP) terdapat dalam pelbagai jenis mamalia terutamanya di dalam buah pinggang. THP memainkan peranan dalam pertahanan terhadap serangan bakteria, sistem fisiologi dan patologi dalam mamalia. Dalam projek ini, THP diasingkan daripada organ tikus untuk memeriksa kehadiran THP dan O-glikan. Untuk tujuan tersebut, organ tikus diekstrak, dipencarkan dan ditulenkan untuk mendapatkan THP serta mengesahkan kehadiran THP melalui penggunaan SDS-PAGE. Keputusan yang diperolehi mengesahkan kehadiran THP pada kedudukan kira-kira 83-84kDa pada jalur gel SDS-PAGE bagi sampel otak manakala bagi sampel buah pinggang pula adalah antara 85-100 kDa. Ini adalah berpadanan dengan esei Bradford yang menunjukkan kepekatan protein di dalam otak adalah lebih tinggi berbanding di dalam buah pinggang iaitu 5.299 µg bagi sampel MO1 dan 4.746 µg bagi sampel MO2. Sementara sampel MBP1 pula adalah 3.917 µg dan kepekatan MBP2 adalah 2.585 µg. Seterusnya, kehadiran gula galaktosa di dalam O-glikan yang telah dilepaskan oleh enzim  $\beta$ -galaktosidase diuji dengan menggunakan kromatografi lapisan nipis. Walaubagaimanapun, tiada O-glikan dikesan melalui kaedah ini. Selain itu, aktiviti THP terhadap serum foetal bovin (FBS) juga diuji. Tiada algutinasi dan pemendakan diperhatikan. Ini menunjukkan THP tidak mempunyai reseptor untuk bertindak dengan serum-serum tersebut.

## ABSTRACT

Tamm Horsfall glycoprotein (THP) gene is widely conserved in mammalian species especially in kidney. THP plays important roles in the protection against bacterial infection, physiology and pathology system in mammals. In this project, THP is isolated from mouse organs to identify the presence of THP and O-glycan. For this purpose, mouse organs is extracted, isolated and purified to get the THP and then identify the presence of THP by using SDS-PAGE. There are bands in 85-100 kDa range for mouse brain and bands approximately 83-84 kDa for mouse kidney. This shows the presence of THP in mouse's kidney and mouse's brain. The Bradford assay also show brain's protein concentration higher than the kidney. Concentration of MO1 is 5.299 µg and 4.746 µg for MO2 sample. Meanwhile, the MBP1 concentration is 3.917 µg and 2.585 µg for MO2. The presence of the galactose sugar in O-glycan released by the enzyme  $\beta$ -galactosidase is examined by using Thin Layer Chromatography (TLC). However, TLC result showed no galactose of mouse THP's O-glycan indicated by sugar standard. Activity of THP against Foetal Bovine Serum (FBS) showed no agglutination and precipitation occurred in the sera. In other words, THP has no receptor that will interact with any compound of sera.



## KANDUNGAN

Muka Surat

<b>HALAMAN JUDUL</b>	
PENGAKUAN	ii
PENGHARGAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
ISI KANDUNGAN	vii
SENARAI JADUAL	x
SENARAI RAJAH	xi
SENARAI SIMBOL	xiii
SENARAI APPENDIKS	xv
 <b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	
1.1 Pengenalan	1
 <b>BAB 2 ULASAN LITERATUR</b>	
2.1 Glikoprotein	4
2.2 Proses Glikosilasi	4
2.3 Jenis-jenis Glikoprotein	7
2.3.1 N-Oligosakarida	7
2.3.2 O-Oligosakarida	14
2.3.3 Protein Glikosilfosfatidilinositol (GPI)	17
2.4 Biosintesis Glikan	19
2.4.1 N-Glikosilasi	19
2.4.2 O-Glikosilasi	21
2.4.3 Glikosilasi Protein Glikosilfosfatidilinositol (GPI)	23
2.5 Fungsi-fungsi Glikan	26
2.5.1 Fungsi-fungsi N-Oligosakarida	26
2.5.2 Fungsi-fungsi O-Oligosakarida	30
2.5.3 Fungsi-fungsi GPI anchor	31
2.6 Glikoprotein Tamm Horsfall	33



2.6.1	Struktur Glikoprotein Tamm Horsfall	34
2.6.2	Lokasi Glikoprotein Tamm Horsfall	36
2.7	Glikoprotein Tamm Horsfall dan Uromodulin	38
2.8	Peranan Glikoprotein Tamm Horsfall	40
2.8.1	Fungsi Fisiologi	40
2.8.2	Penglibatan THP dalam Penyakit	46
2.9	Glikoprotein Tamm Horsfall dalam Organ Tikus	49
<b>BAB 3 KAEADAH</b>		
3.1	Pengekstrakan Organ Tikus dan Penulenan THP	57
3.2	SDS-PAGE	57
3.3	Proses Penurunan dan Pengkarboksimetilan	58
3.4	Pencernaan Triptik	58
3.5	Pengekstrakan Peptida	58
3.6	Kromatografi Sep-Pak C18	59
3.7	Penyingkiran Reduktif	60
3.8	Kromatografi Dowex-50	60
3.9	Pemotongan Monosakarida	61
3.10	Kromatografi Lapisan Nipis	61
3.11	Tindak Balas THP terhadap Serum Foetal Bovin (FBS)	61
<b>BAB 4 KEPUTUSAN</b>		
4.1	Pengekstrakan Organ Tikus	63
4.2	Proses Pemencilan THP daripada Organ Tikus	64
4.3	Kehadiran THP di dalam Organ Tikus di kaji dengan menggunakan SDS-PAGE	66
4.4	Anggaran Kepekatan Ekstrak Glikoprotein dan THP di dalam Organ Tikus	68
4.5	Pengekstrakan Peptida	70
4.6	Kromatografi Lapisan Nipis	72
4.7	Aktiviti THP terhadap Serum Foetal Bovin (FBS)	75
<b>BAB 5 PERBINCANGAN</b>		
5.1	Kaedah Pengekstrakan dan Pemencilan Protein	77



5.2	SDS-PAGE	78
5.3	Esei Bradford	82
5.4	Proses Penurunan dan Pengkarboksimetilan	
5.4.1	Penyediaan Gel	83
5.4.2	Proses Penurunan dan Pengkarboksimetilan	83
5.5	Pencernaan Triptik	86
5.6	Pengekstrakan Peptida	88
5.7	Kromatografi Sep-Pak C18	88
5.8	Penyingkiran Reduktif	89
5.9	Kromatografi Dowex-50	91
5.10	Kromatografi Lapisan Nipis	92
5.11	Aktiviti THP terhadap FBS	93
5.12	Kehadiran THP dan O-glikan di dalam Organ Tikus	96
5.13	Masalah	99
<b>BAB 6 KESIMPULAN</b>		
6.1	Kesimpulan	101
<b>RUJUKAN</b>		
<b>LAMPIRAN</b>		



## SENARAI JADUAL

No. Jadual	Muka Surat
3.1 Kuantiti FBS dan Sampel THP dalam Tindak Balas Terhadap Serum	62
4.1 Kadar Penyerapan BSA pada 595nm	68
4.2 Anggaran Kuantiti Protein dalam 2mg Sampel MO dan MBP	69
4.3 Anggaran Kuantiti Protein bagi Jumlah Keseluruhan Sampel MO dan MBP selepas proses pengering beku	70
4.4 Keputusan Tindak Balas THP terhadap Serum (FBS)	75



## SENARAI RAJAH

No.Rajah	Muka Surat
2.1 Laluan Glikosilasi	5
2.2 N-Glikosilasi	7
2.3 Laluan Pemprosesan N-Oligosakarida	8
2.4 Teras Trimannosil	9
2.5 Contoh Oligosakarida High Mannosa	10
2.6 Contoh Oligosakarida Kompleks	11
2.7 Contoh Oligosakarida Hibrid	13
2.8 O-Glikosilasi	14
2.9 Rajah Protein GPI	18
2.10 Sintesis Protein N-Oligosakarida	20
2.11 Langkah Biosintesis Utama dalam Penghasilan Protein GPI	24
2.12 Rajah Skema THP	34
2.13 Kedudukan THP di dalam nefron manusia	37
2.14 THP melekat pada <i>E.coli</i> Jenis 1 Fimbriae	41
2.15 Jujukan cDNA THP Tikus dan terjemahannya	52
2.16 Gambaran Skema Modul Utama dalam Jujukan Asid Amino THP	53
2.17 Lokasi THP di dalam Otak Tikus	55



## SENARAI FOTO

No. Foto		Muka surat
4.1	Pengekstrakan buah pinggang tikus (MBP)	63
4.2	Pengekstrakan otak tikus (MO)	63
4.3	Sampel MO dan MBP di dalam larutan Tris dan SDS	64
4.4	Hasil SDS-PAGE 10% bagi sampel MO dan MBP	65
4.5	Ekstrak MO dan MBP selepas proses pengering beku	66
4.6	Sampel THP selepas pengekstrakan peptida dan proses kromatografi Sep-Pak C <sub>18</sub>	71
4.7	Kromatografi Dowex-50	72
4.8	Proses kromatografi lapisan nipis	73
4.9	Keputusan hasil daripada TLC	74
4.10	Tindak balas THP terhadap FBS	75
5.1	Sistin yang telah diturunkan, dikarboksimetilkkan oleh IAA	85
5.2	Pelepasan O-glikan daripada tulang belakang protein	90



## SENARAI SIMBOL

Asn	Asparagin
BSA	Bovin Serum Albumin
EDTA	Asid Ethylenediamin Tetraasetik
EGF	Faktor Pertumbuhan Epidermal
ER	Retikulum Endoplasma
THP	Glikoprotein Tamm-Horsfall
FBS	Serum Foetal Bovin
Fuc	Fruktosa
NaCl	Natrium Klorida
Gal	Galaktosa
GalNAc	N-asetilgalaktosamina
Glc	Glukosa
GlcNAc	N-asetilglukosamina
GPI	Glikosilfosfatidilinositol
kDa	Kilo Dalton
IL-1	Interleukin 1
IL-2	Interleukin 2
L	Liter
M	Molar
MALDI-TOF	Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight
Man	Mannosa
MCKD2	Medullary Cystic Gouty Nephropathy
mRNA	Messager RNA
MW	Jisim Molekul
NeuAc	N-asetilneuroamina
PMN	Leukosit Polimorfonuklear
TAL	bahagian menaik yang tebal
TLC	Kromatografi Lapisan Nipis



rIL-1	Interleukin 1 Rekombinan
rIL-2	Interleukin 2 Rekombinan
rTNF	Faktor Tumor Nekrosis Rekombinan
TNF	Faktor Tumor Nekrosis
UM	Uromodulin
Xyl	Xylose
$\mu$ g	Mikrogram
$\mu$ L	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromolar



**SENARAI LAMPIRAN**

No. Lampiran	Muka surat	
LAMPIRAN A	Bahan Kimia	115
LAMPIRAN B	Alat dan Radas	116
LAMPIRAN C	Komponen Penimbal	117
LAMPIRAN D	Komponen Gel Mampatan	117
APPENDIKS E	Komponen Gel Resolusi	118



## BAB 1

### PENGENALAN

#### 1.1 Pengenalan

Glikoprotein adalah protein yang mengandungi satu atau lebih kumpulan karbohidrat yang terikat secara kovalen. Karbohidrat ini mungkin terdiri daripada monosakarida tunggal atau banyak monosakarida yang berikat bersama sebagai rantai lurus atau bercabang, dan dikenali sebagai oligosakarida (atau gikan). Jika oligosakarida melekat pada protein, protein ini dikatakan telah diglikosilasikan (Brooks *et al.*, 2002). N-gikan merupakan gikan yang melibatkan karbon asetylglukosamina dan kumpulan amida asparagin (Kimura *et al.*, 1999). Terdapat tiga jenis glikosilasi iaitu N-glikosilasi, O-glikosilasi dan glikosilasi Glikofosfatidilinositol (GPI) (Cooper & Hausman, 2004). Tiga jenis N-gikan yang utama adalah (i) jenis oligomannosa (high mannose), (ii) jenis N-asetillaktosamina (kompleks), dan (iii) jenis hibrid, yang menunjukkan ciri-ciri kedua-dua oligomannosa dan N-asetillaktosamina. Biasanya, O-glikoprotein haiwan mengandungi ikatan  $\alpha$ -N-asetilgalaktosaminil-serin ( $\alpha$ GalNAc-Ser) atau threonin (Thr) yang dikenali sebagai ikatan jenis-mucin, sementara itu, ikatan di dalam tumbuhan adalah  $\alpha$ -L-arabinosilhidroksiprolina (Allen *et al.*, 1992). Glikofosfatidilinositol (GPI) bersambung



kepada rantai polipeptida melalui ikatan amida antara mannosa-6-fosfoetanolamina dan kumpulan karboksil hujung-C. Populasi gula yang melekat pada protein individu bergantung pada jenis sel di mana glikoprotein diekspreskan dan pada status fisiologi sel, dan mungkin dipengaruhi oleh kehadiran penyakit.

Protein yang terdapat banyak di dalam urin manusia di kenali pada mulanya sebagai ‘urinary mucoprotein’ oleh Morner adalah glikoprotein Tamm-Horsfall (THP) (Kumar & Muchmore, 1990) dan dicirikan selanjutnya apabila Tamm dan Horsfall menggunakan kaedah pemendakan garam untuk memencarkan THP daripada air kencing dengan pemendakan berulang menggunakan 0.58 M NaCl, sementara uromodulin dipencarkan daripada urin menggunakan kombinasi kromatografi konkanavalin A-Sepharose, gel penapisan dan pemisahan pemfokusan isoelektrik (Muchmore & Decker, 1985). THP di gambarkan sebagai pengawal atur kitaran dan bioaktiviti antara renal bagi sitokin, penyumbang utama kepada penyakit renal tubulointerstitia, pencetus kas nefropati dalam pelbagai myeloma (bersama-sama dengan protein Bence Jones manusia), dan pertahanan semulajadi terhadap jangkitan bakteria dalam saluran air kencing (dengan memerangkap *Escherichia coli* jenis I fimbriae) (Glauser *et al.*, 2000). Glikoprotein tersebar dengan meluas di dalam haiwan seperti di dalam air kencing anjing, kucing, arnab, hamster, kuda dan kambing biri-biri (Dijk *et al.*, 1979).

Dalam projek ini, kehadiran O-glikan THP di kaji. O-glikan kurang dikaji berbanding N-glikan kerana struktur O-glikan (O-oligosakarida) adalah lebih kompleks berbanding N-glikan (N-oligosakarida). Semua mamalia berkongsi teras



trimannosilkitobios am yang sama, yang diperolehi daripada biosintesis prekursor  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ . Manakala O-glikan pula mempunyai lapan jenis struktur teras menyebabkan kajian terhadap O-glikan adalah lebih sukar berbanding N-glikan. Kedua, kuantiti O-glikan yang melekat pada protein THP adalah sangat rendah.

Dalam projek ini, O-glikan daripada organ tikus iaitu buah pinggang dan otak akan dipencarkan. Selain daripada itu, aktiviti THP terhadap Serum Fetal Bovin (FBS) juga dikaji. Objektif bagi projek ini adalah seperti yang dinyatakan di bawah:

1. Memencarkan dan menulenkan glikoprotein Tamm-Horsfall daripada organ tikus; buah pinggang dan otak tikus.
2. Mendapatkan dan menguji kehadiran glikoprotein Tamm Horsfall dan O-glikan.
3. Menguji aktiviti THP terhadap fetal bovine serum (FBS)



## **BAB 2**

### **ULASAN LITERATUR**

#### **2.1 Glikoprotein**

Glikoprotein dibentuk akibat penambahan berenzim satu atau lebih unit sakarida kepada rantai polipeptida. Julat perubahan bermula dari sakarida pada protein yang mudah, seperti yang ditemui pada kolagen dan glikoprotein nuklear hingga ke struktur bercabang, kompleks dan padat seperti pada mucin dan kompleks rantai sisi glikosaminoglikan yang ditemui pada proteoglikan. Gula yang ditemui di dalam glikoprotein adalah glukosa, galaktosa, mannosa, frukosa, N-asetilgalaktosa (GalNAc), N-asetilglukosamina (GlcNAc), N-asetilneuroamina (NeuAc) (Dell & Morris, 2001). Terdapat tiga jenis pelekatan oligosakarida kepada protein iaitu N-oligosakarida, O-oligosakarida dan struktur glikosiflosfatidilinositol (GPI) (Pennington & Junn, 2002).

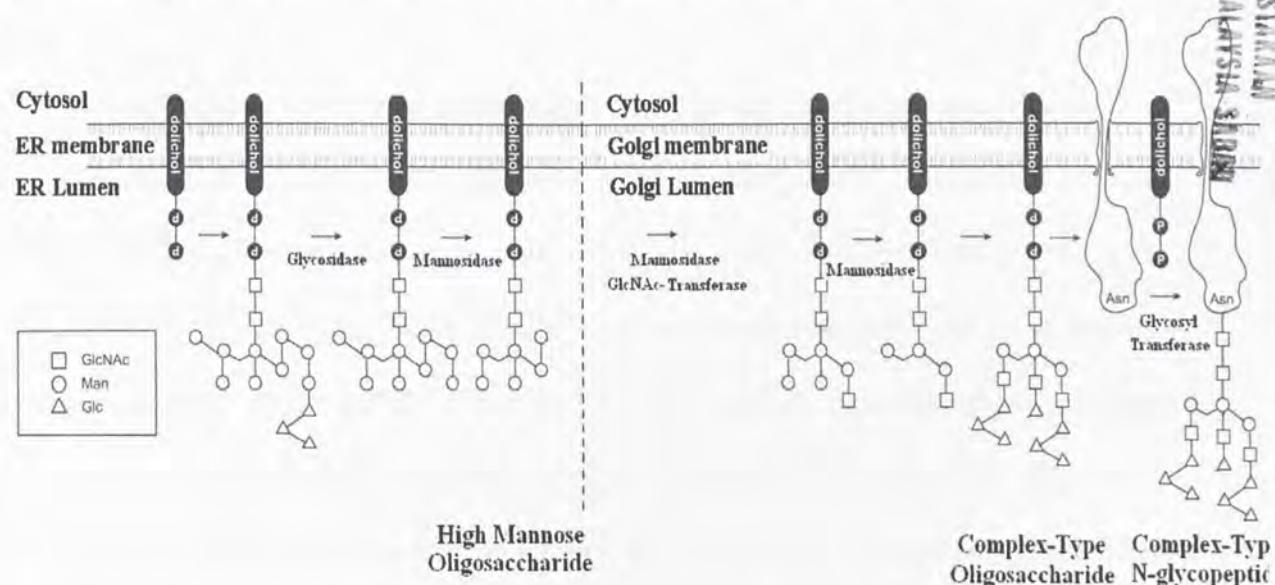
#### **2.2 Proses Glikosilasi**

Proses penambahan rantai gula dikenali sebagai glikosilasi. Glikosilasi adalah hasil penambahan sakarida (gula) seperti monosakarida dan polisakarida kepada protein dan



lipid. Secara ringkasnya, glikosilasi merupakan penambahan kumpulan glikosil kepada protein untuk membentuk glikoprotein. Tindak balas glikosilasi berlaku di dalam lumen retikulum endoplasma (ER) dan di dalam lumen cis-, medial- dan trans- alat Golgi (Karp, 2002). Proses ini melibatkan satu siri tindak balas yang kompleks dimangkinkan oleh glikosiltransferases dan glikosidases.

Bilangan gula yang akan terlekat pada protein bergantung kepada jenis gula di mana glikoprotein diekspreskan dan status fisiologi sel, dan mungkin juga oleh perkembangan dan kitaran penyakit. Rajah 2.1 menunjukkan proses glikosilasi.



**Rajah 2.1** Laluan glikosilasi. Sakarida yang bersambung dengan molekul yang dipanggil dolichol melalui kumpulan firofosfat, dipotong dan ditambah melalui penambahan monosakarida dengan bantuan enzim. Di sini, proses N-glikosilasi berlaku melibatkan bahagian asparagin protein itu (Lewin, 2004).

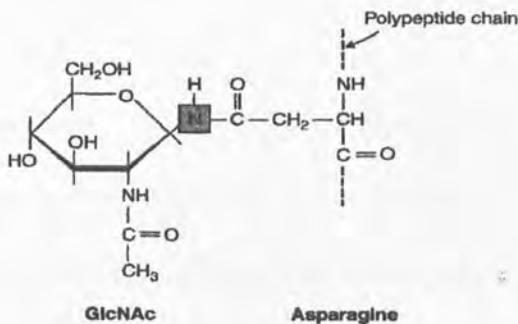
Seperti yang ditunjukkan dalam rajah 2.1, oligosakarida mengandungi dua GlcNAc, sembilan mannosa dan tiga glukosa dibentuk pada lipid khusus, dolichol. Dolichol adalah lipid berhidrofobik yang tinggi dan terletak di dalam membran ER, dengan kumpulan aktifnya yang menghadap lumen. Oligosakarida dibina dengan penambahan gula, dihubungkan kepada dolichol oleh kumpulan firofosfat, dan dipindahkan sebagai satu unit kepada protein yang dikehendaki oleh enzim glikosil transferase yang melekat pada membran di mana tapak aktifnya terdedah di dalam lumen retikulum endoplasma (ER) (Lewin, 2004). Kumpulan penerima asid amino pada rajah di atas adalah bahagian asparagin menunjukkan proses N-glikosilasi berlaku.

N-glikosilasi bermula apabila terdapat tiga glukosa sakarida melekat pada dolichol disingkirkan oleh tindakan enzim glukosida I dan II. Bagi protein yang berada di dalam ER, mannosidase menyingkirkan beberapa mannosa untuk menghasilkan struktur akhir oligosakarida. Mannosidase ER menyerang mannosa yang pertama dengan cepat, dan tiga yang seterusnya dengan perlahan. Jumlah bilangan mannosa yang disingkirkan berbeza mengikut protein substrat individu. Kemudian, sakarida dipindahkan ke alat Golgi. Pemotongan mannosa yang seterusnya oleh Golgi mannosidase I diikuti oleh penambahan gula tunggal oleh enzim N-asetilglukosamina transferase. Kemudian, Golgi mannosidase II menyingkirkan mannosa yang seterusnya menghasilkan struktur yang dipanggil teras dalaman. Struktur ini terdiri daripada jujukan Nac-Glc-Nac-Glc-Man<sub>3</sub>. Penambahan gula pada teras dalaman ini akan menghasilkan bahagian terminal (Lewin, 2004).

## 2.3 Jenis-jenis glikoprotein

### 2.3.1 N-Oligosakarida

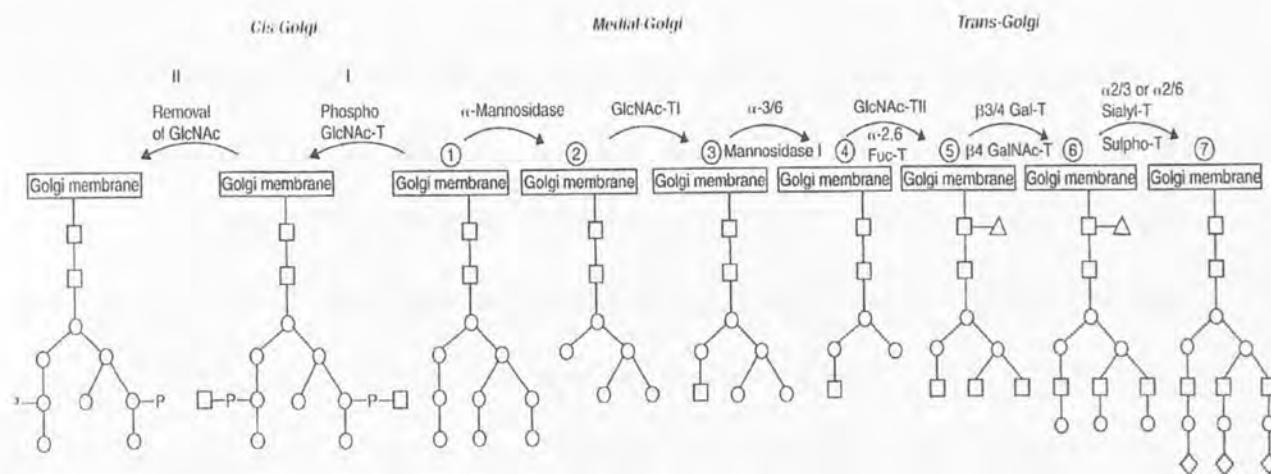
Glikoprotein dikelaskan mengikut kepada jenis rantai oligosakarida yang dibawa, dan juga tapak perlekatan pada molekul protein. N-oligosakarida terjadi apabila oligosakarida berhubung melalui molekul GlcNAc dalam ikatan jenis  $\beta$ -N-glikosidik kepada nitrogen kumpulan amida bagi asid amino asparagin (Asn) pada rantai polipeptida, seperti yang pada rajah 2.2 (Brooks *et al.*, 2002). Pengumpulan N-glikan berlaku di dalam retikulum endoplasma dan alat Golgi di mana struktur umum  $\text{GlcNAc}_2\text{ManGlc}_3$  dipotong dan diubah secara berbeza-beza oleh glikosidases dan glikosiltransferases (Pennington *et al.*, 2002).



**Rajah 2.2** Ikatan jenis-N. Di dalam N-glikoprotein, oligosakarida bersambung kepada molekul GlcNAc di dalam ikatan jenis  $\beta$ -N-glikosidik kepada nitrogen (dihitamkan) kumpulan amino bagi asid amino asparagin pada rantai polipeptida (Brooks *et al.*, 2002).

N-glikosilasi berbeza daripada glikosilasi jenis lain, seperti O-glikosilasi, glikosilasi glikosaminoglikan dan glikolipid, perbezaan ini akan menjadi lebih jelas

melalui perbandingan antara jenis glikokonjugasi dan sintesisnya. Pemahaman mengenai N-glikosilasi adalah hasil daripada kajian terhadap karbohidrat yang memproses perencat dan haiwan transgenik yang kekurangan enzim glikosilasi yang terlibat dalam sintesis N-oligosakarida.



Rajah 2.3 Laluan pemprosesan N-oligosakarida (Brooks *et al.*, 2002).

Laluan pemprosesan bagi N-oligosakarida boleh dijelaskan dengan merujuk kepada rajah 2.3. Selepas memasuki alat Golgi (1), N-oligosakarida diubah mengikut kepada tindakan glikotransferases dan glikosidases (ditunjukkan dalam langkah 1-7). Pada langkah pertama, oligosakarida menjadi jenis oligomannosa melainkan enzim GlcNAc-TI bertindak pada struktur itu. Jika ini berlaku, oligosakarida akan menjadi sama ada seperti jenis hibrid atau kompleks. Penyingkiran mannosa oleh  $\alpha$ -mannosidase (langkah 3-4) membawa kepada penghasilan N-oligosakarida jenis kompleks melalui tindakan berurutan GlcNAc-TII (langkah 4),  $\beta 1, \frac{3}{4}$  Gal-T (langkah 5) dan/atau  $\beta 1, 4$  GalNAc-T (langkah 6),  $\alpha 2, \frac{3}{2}, 6$  ST atau sulfotransferase (langkah 7). Langkah yang

## RUJUKAN

- Allen,G. 1981. *Sequencing of Proteins and Peptides*. Elsevier /North-Holland Biomedical Press, Netherland.
- Allen, H.J., Kisailus, E.C. & Dekker, M. 1992. *Glyconjugates; Composition, Structure and Function*. New York.
- Angeletti, R.H. 1993. *Techniques in Protein Chemistry IV*. Academic Press. Inc., California.
- Beeley J.G., 1985. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Glycoprotein and Proteoglycan Techniques*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 166-186.
- Bleyer, A.J., Hart, T.C., Shihabi, Z., Robins, V. & Hoyer, J.R. 2004. Mutations in the uromodulin gene decrease urinary excretion of Tamm-Horsfall protein. *Kidney International* **66**, ms. 974-977.
- Bleyer, A.J., Woodard, A.S., Shihabi, Z., Sandhu, J., Zhu, H., Satko, S.G., Weller, N., Deterding, E., McBride, D., Gorry, M.C., Xu.L., Ganier, D. & Hart, T.C. 2003. Clinical characterization of a family with a mutation in the uromodulin (Tamm-Horsfall glycoprotein) gene. *Kidney International* **64**, ms. 36-42.
- Brewis, I.A., Ferguson, M.A.J., Mehlert, A., Turner, A.J. & Hooper, N.M. 1995. Structures of the glycosyl-phosphatidylinositol anchors of porcine and human renal membrane dipeptidase. *The Journal of Biological Chemistry* **270**, ms. 22946-22956.

- Brooks, S.A., Dwek, M.V. & Schumacher, U. 2002. *Functional and Molecular glycobiology*. BIOS Scientific Publishers Lmtd, United Kingdom.
- Brooks, S.A., Dwek, M.V. & Schumacher, U. 2002. *Glycobiology-functional and Molecular*. BIOS Scientific Publishers Limited, United Kingdom.
- Brown, K.M., Muchmoreo, A.V. & Rosenstreich, D.L. 1986. Uromodulin, an immunosuppressive protein derived from pregnancy urine, is an inhibitor of interleukin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**, ms. 9119-9123.
- Campbell M.K., Farrell S.O. 2003. *Biochemistry*. Fourth Edition. Thomson Brooks/Cole, Australia, 122-123.
- Carlson, D.M. 1968. Structure and immunochemical properties of oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucins. *The Journal of Biological Chemistry* **243**, ms. 516-626.
- Carvalho, M., Mulinari, R.A. & Nakagawa, Y. 2002. Role of Tamm-Horsfall protein and uromodulin in calcium oxalate crystallization. *Braz J Med Biol Res* **35** (10), ms. 1165-1172.
- Coligan, J.E., Dunn, B.M., Speicher, D.W. & Wingfield, P.T. 2003. *Short Protocols in Protein Science*. John Wiley & Sons, Inc., United States of America.
- Cooper C.A., Packer N.H., Redmond J.W., 1994. The elimination of O-linked glycans from glycoproteins under non-reducing condition. *Glycoconjugate Journal* **11**, 163-167.
- Crabb, J.W. 1995. *Techniques in Protein Chemistry VI*. Academic Press, Inc., United States of America.

- Dawnay, A., McLean, C. & Cattell, W.R. 1980. The development of a radioimmunoassay for Tamm-Horsfall glycoprotein in serum. *Biochem. J.* 1980, ms. 679-687.
- Dell A., Morris H.R., 2001 Glycoprotein Structure Determination by Mass Spectrometry. *Carbohydrates and Glycobiology* **291**, 2351-2356.
- Dennison, C. 1999. *A Guide to Protein Isolation*. Kluwer Academic Publishers. Netherland.
- Devuyst, O., Dahan, K. & Pirson, Y. 2005. Tamm-Horsfall protein or uromodulin: new idea about an old molecule. *Nephrol Dial Transplant* **20**, ms. 1290-1294.
- Dijk, W.V., Lasthuis, A.M. & Ferwerda, W. 1979. Preparation and chemical characterization of calf Tamm-Horsfall glycoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta* **584**, ms. 121-128.
- Doonan, S. 2002. *Peptides and Proteins*. Royal Society of Chemistry, United Kingdom.
- Dussol, B. & Berland, Y. 1996. Urinary kidney stone inhibitors. Where are we? *Nephrol Dial Transplant* **11**, ms. 1222-1224.
- Easton, R.L., Patankar, M.S., Clark, G.F., Morris, H.R. & Dell, A. 2000. Pregnancy-associated changes in the glycosylation of Tamm-Horsfall glycoprotein. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, ms. 21928-21938.
- Fernandez-Botran, R. & Václav Větvička. 2000. *Advanced Methods in Cellular Immunology*. CRC Press., Florida.
- Fernandez-Botran, R. & Václav Větvička. 2001. *Methods in Cellular Immunology*, 2<sup>nd</sup> Edition. CRC Press., Florida.

- Fletcher, A.P., Neuberger, A. & Ratcliffe, W.E. 1970. Tamm-Horsfall urinary glycoprotein-the chemical composition. *Biochem. J.* **120**, ms. 417-424.
- Fletcher, A.P., Neuberger, A. & Ratcliffe, W.E. 1970. Tamm-Horsfall urinary glycoprotein-the subunit structure. *Biochem. J.* **120**, ms. 425-432.
- Fontan, E., Jusforgues-Saklani, H., Briand, E. & Fauve, R.M. 1995. Purification of a 92 kDa human immunostimulating glycoprotein obtained from the Tamm-Horsfall glycoprotein. *Journal of Immunological Methods* **187**, ms. 81-84.
- Glauser, A., Hochreiter, W., Jaeger, P. & Hess, B. 2000. Determinants of urinary excretion of Tamm-Horsfall protein in non-selected kidney stone formers and healthy subjects. *Nephrol Dial Transplant* **15**, ms. 1580-1587.
- Goodall, A.A. & Marshall, R.D. 1980. Effects of freezing on the estimated amounts of Tamm-Horsfall glycoprotein in urine, as determined by radioimmunoassay. *Biochem J.* **189**, ms. 533-539.
- Hard, K., Zadelhoff, G.V., Moonen, P., Kamerling, J.P. & Vliegenthart, J.F.G. 1992. The Asn-linked carbohydrate chains of human Tamm-Horsfall glycoprotein of one male. *Eur. J. Biochem* **209**, ms. 895-915.
- Hart T.C., Gorry M.C., Hart P.S., 2002. Mutations of the *UMOD* gene are responsible for medullary cystic kidney disease 2 and familial juvenile hyperuricaemic nephropathy. *Journal of Medical Genetic* **39**, 882-892.
- Hession C., Decker J.M., Sherblom A.P., Kumar S., Yue C.C., Mattaliano R.J., Tizard R., Kawashima E., Schmeissner U., Heletky S., Chow E.P.C., Burne C.A., Shaw A., Muchmore A.V., 1987. Uromodulin (Tamm-Horsfall Glycoprotein): A Renal Ligand for Lymphokines. *Science* **237**, 1479.

- Holme, D.J. & Peck, H. 1993. *Analytical Biochemistry*. 2<sup>nd</sup> Edition. Longman Scientific & Technical, United Kingdom.
- Hoops, T.C. & Rindler, M.J. 1991. Isolation of the cDNA encoding glycoprotein-2 (GP-2), the major zymogen granule membrane protein. *The Journal of Biological Chemistry* **266**, ms. 4257-4263.
- Howl, J. 2005. *Peptides synthesis and applications*. Humana Press, New York.
- Huang, Z.H., Kirk, K.A., Connelly, K.G. & Sanders, P.W. 1993. Bence Jones Protein bind to a common peptide segment of Tamm-Horsfall glycoprotein to promote heterotypic aggregation. *The Journal of Clinical Investigation* **92**, ms. 2975-2983.
- Hughes, R.C. 1983. *Outline Studies in Biology-Glycoprotein*. Chapman and Hall Ltd, New York.
- Hunt, J.S., McGiven, A.R., Groufsky, A., Lynn, K.L. & Taylor, M.C. 1985. Affinity-purified antibodies of defined specificity for use in a solid-phase microplate radioimmunoassay of human Tamm-Horsfall glycoprotein in urine. *Biochem. J.* **227**, ms. 957-963.
- Iyer, R.N. & Carlson, D.M. 1971. alkaline borohydride degradation of blood group H substance. *Arch. Biochem. Biophys* **142**, ms. 101-105.
- Jan-Christe-Janson & Ryden, L. 1998. *Protein Purification*. John Wiley & Sons. Inc., Canada.
- Johannes, J.M., Rooijen, V., Kamerling, J.P. & Vliegenthart, F.G. 1998. Sulfated di-, tri- and tetraantennary N-glycans in human Tamm-Horsfall glycoprotein. *Eur. J.Biochem* **256**, ms. 471-487.

- Kokot, F. & Dulawa, J. 2000. Tamm-Horsfall protein updated. *Nephron* **85**, ms. 97-102.
- Kimura, Y., Hess, D. & Sturm, A. 1999. The N-glycans of jack bean  $\alpha$ -mannosidase-structure, topology and function. *Eur. J. Biochem* **264**, ms. 168-175.
- Kuriyama S.M., Silverblatt F.J., 1986. Effect of Tamm-Horsfall Urinary Glycoprotein on Phagocytosis and Killing of Type 1-Fimbriated *Escherichia coli*. *American Society for Microbiology* **51**, 193-198.
- Kreft, B, Jabs, W.J., T. Laskay,T., Klinger, M., Solbach, W., Kumar, S. & Zandbergen, G.V. 2002. Polarized expression of Tamm-Horsfall protein by renal tubular epithelial cells activates human granulocytes. *Infection and Immunity* **70**, ms. 2650-2656.
- Kumar, S. & Muchmore, A.V. 1990. Tamm-Horsfall protein-uromodulin (1950-1990). *Kidney International* **37**, ms. 1395-1401.
- Lewin B., 2004. *Genes VIII*. Prentice Hall, London, p789.
- Lohmander, L.S., Lucas, D.C., Nilsson, B., Hascall, V.C., Caputo, C.B., Kimura, J.H. & Heinegard, D. 1980. Oligosaccharides on proteoglycans from the swarm rat chondrosarcoma. *J. Biol. Chem* **255**, ms. 6084-91.
- Lynn, K.L. & Marshall, R.D. 1981. The presence in serum of proteins which are immunologically cross-reactive with Tamm-Horsfall glycoprotein. *Biochem. J.* **194**, ms. 561-568.
- Marshak, D.R. 1996. *Techniques in Protein Chemistry VII*. Academic Press, Inc., United States of America.

Masseyeff, R.F., Albert, W.H. & Staines, N.A. 1993. *Methods of Immunological Analysis Vol.3-Cells and Tissues*. VCH Publishers Inc., New York.

Menozzi F.D., Debrie A.S., Tissier J.P., Locht C., Pethe K., Raze D., 2002. Interaction of human Tamm-Horsfall glycoprotein with *Bordetella pertussis* toxin. *Microbiology* **148**, 1193-1201.

Mo, L., Huang, H.Y., Zhu, X.H., Shapiro, E., Hasty, D.L. & Wu, X.R. 2004. Tamm-Horsfall protein is a critical renal defense factor protecting against oxalate crystal formation. *Kidney International* **66**, ms. 1159-1166.

Montreuil, J., Vliegenthart, J.F.G. & Schachter, H. 1995. *Glycoproteins*. Elsevier Science B.V. Netherland.

Muchmore, A.V. & Decker, J.M. 1986. An immunosuppressive 85-kilodalton glycoprotein isolated from human pregnancy urine is a high affinity ligand for recombinant interleukin 1 $\alpha$ . *The Journal of Biological Chemistry* **261**, ms. 13404-13407.

Muchmore, A.V. & Decker, J.M. 1987. Evidence that recombinant IL 1 $\alpha$  exhibits lectin-like specificity and binds to homogenous uromodulin via N-linked oligosaccharides. *The Journal of Immunology* **138**, ms. 2541-2546.

Muchmore, A.V., Decker, J.M., Blaese, R.M. & Nilsson, B. 1984. Purification and characterization of a mannose-containing disaccharide obtained from human pregnancy urine. *Journal of Experimental Medicine* **160**, ms. 1672-1685.

Muchmore, A.V., Shifrin, S. & Decker, J.M. 1987. In vitro evidence that carbohydrate moieties derived from uromodulin, an 85,000 dalton immunosuppressive glycoprotein isolated from human pregnancy urine, are immunosuppressive in the absence of intact protein. *The Journal of Immunology* **138**, ms. 2547-2553.

- Nagy, A., Gertsensten, M., Vinterstein, K. & Behringer, R. 2003. *Manipulating the Mouse Embryo-A Laboratory Manual.* 3<sup>rd</sup> Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. ms. 252-254, ms. 725-747.
- Olczak, T., Kubicz, A., Kokot, F. & Dulawa, J. 1998. Tamm-Horsfall protein isolated from urine of pregnant and non-pregnant women has similar oligosaccharides. *European Journal of Clinical Investigation* **28**, ms. 475-482.
- Osborn, H. & Tariq Khan. 2000. *Oligosaccharides-Their Synthesis and Biological Roles.* Oxford University Press, New York.
- Pak, J., Pu, Y., Zhang, Z.T., Hasty, D.L. & Wu, X.R. 2001. Tamm-Horsfall protein binds to type 1 fimbriated Escherichia coli and prevents E.coli from binding to uroplakin Ia and Ib receptors. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, ms. 9924-9930.
- Parise, E.R., Taylor, M.E. & Summerfield, J.A. 1984. Effects of iron loading and bacillus Calmette-Guerin on a glycoprotein recognition system on rat hepatic sinusoidal cells. *J. Lab. Clin. Med* **104**, ms. 908-918.
- Pennington, S.R. & Dunn, M.J. 2002. *Proteomics-From Protein Sequence to Function.* Viva Books Private Limited., Delhi. ms. 257-272.
- Prasadan, K., Bates, J., Badgett, A., Dell, M., Sukhatme, V., Yu, H. & Kumar, S. 1995. Nucleotide sequence and peptide motifs of mouse uromodulin (Tamm-Horsfall protein)- the most abundant protein in mammalian urine. *Biochimica et Biophysica Acta* **1260**, ms. 328-332.
- Rhodes D.C.J., 2002. Binding of Tamm-Horsfall protein to complement 1q and complement 1, including influence of hydrogen-ion concentration. *Immunology and Cell Biology* **80**, 558-566.

Rindler, M.J., Naik, S.S., Li, N., Hoops, T.C. & Peraldi, M.N. 265. Uromodulin (Tamm-Horsfall glycoprotein/uromucoid) is a phosphatidylinositol-linked membrane protein. *The Journal of Biological Chemistry* **265**, ms. 20784-20789.

Rodhes D.C.J., Hinsman EJ, Rodhes JA., 1993. Tamm-Horsfall glycoprotein binds IgG with high affinity. *Kidney International* **44**, 1014–21.

Rohfritsch, P.F., Rinnbauer, M., Vliegenthart, J.F.G. & Kamerling, J.P. 2004. Donor specificity in the glycosylation of Tamm-Horsfall glycoprotein: Conservation of the Sd<sup>a</sup> determinant in pairs of twins. *Glycobiology* **14**, ms. 365-372.

Rooijen, J.J.M.V., Voskamp, A.F., Kamerling, J.P. & Vliegenthart, J.F.G. 1998. Glycosylation sites and site-specific glycosylation in human Tamm-Horsfall glycoprotein. *Glycobiology* **9**, ms. 21-30.

Sadhukhan, R. & Sen, I. 1996. Different glycosylation requirements for the synthesis of enzymatically active angiotensin-converting enzyme in mammalian cells and yeast. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, ms. 6429-6434.

Säemann, M.D., Weichhart, T., Zeyda, M., Staffler, G., Schunn, M., Stuhlmeier, K.M., Sobanov, Y., Stulnig, T.M., Shizuo Akira, Gabain, A.V., Ahsen, U.V., Hörl, W.H. & Zlabinger, G.J. 2005. Tamm-Horsfall glycoprotein links innate immune cell activation with adaptive immunity via a Toll-like receptor-4-dependent mechanism. *J. Clin. Invest.* **115**, ms. 468-475.

Sanchez, J.C., Corthals, G.L. & Hochstrasser, D.F. 2004. *Biomedical Applications of Proteomics*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.kGaA, Weinheim.

Sareneva, T., Pirhonen, J., Cantell, K. & Julkunen, I. 1995. N-glycosylation of human interferon- $\gamma$ : glycans at Asn-25 are critical for protease resistance. *Biochem. J.* **308**, ms. 9-14.

Serafini-Cessi, F., Bellabarba, G., Malagolini, N. & Dall'Olio, F. 1989. Rapid isolation of Tamm-Horsfall glycoprotein (uromodulin) from human urine. *Journal of Immunological Methods* **120**, ms. 185-189.

Settineri, C.A., Yu, D.C., Ke, J., Shui, Z.Z. & Burlingame, A.L. 1996. Characterization of the N- and O-linked oligosaccharides from glucoaylase E<sub>4</sub> from *Monascus Rubignosus* using electrospray mass spectrometry and glycosidase digestion. *Techniques in Protein Chemistry* **7**, ms. 173-184.

Sewald, N. & Jakubke, H.D. 2002. *Peptides: Chemistry and Biology*. Wiley-VCH, Weinheim. ms. 61-129, 322-328.

Sherblom, A.P., Decker, J.M. & Muchmore, A.V. 1988. The Lectin-like interaction between recombinant tumor necrosis factor and uromodulin. *The Journal of Biological Chemistry* **263**, ms. 5418-5424.

Sherblom, A.P., Sathymoorthy, N., Decker, J.M. & Muchmore, A.V. 1989. IL-2, A lectin with specificity for high mannose glycopeptides. *The Journal of Immunology* **143**, ms. 939-944.

Sigurdsson, E.M. & Dwek, M.V. 2005. *Amyloid Proteins-Methods and Protocols*. Humana Press, New York.

Sikri, K.L., Foster, C.L., Bloomfield, F.J. & Marshall, R.D. 1979. Localization by immunofluorescence and by light- and electron- microscopic immunoperoxidase techniques of Tamm-Horsfall glycoprotein in adult hamster kidney. *Biochem. J.* **181**, ms. 525-532.

Stevenson, F.K., Cleave, A.J. & Kent, P.W. 1971. The effect of ions on the viscometric and ultracentrifugal behaviour of Tamm-Horsfall glycoprotein. *Biochimica Et Biophysica Acta* **236**, ms. 59-66.

Strong, F.M. 1965. *Biochemistry Laboratory Manual*. Wm.C.Brown Company Publishers, United States if America.

Tandai-Hiruma, M., Endo, T. & Kobata, A. 1999. Detection of novel carbohydrate binding activity of Interleukin-1. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, ms. 4459-4466.

Tizard I.R., 1995. *Immunology: An Introduction*. Thomson Brooks/Cole, Australia, 171-183.

Torffvit, O. & Agardh, C.D. 1993. Tubular secretion of Tamm-Horsfall protein is decreased in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients with diabetic nephropathy. *Nephron* **65**, ms. 227-231.

Tung-Bin, L., Ten-Yung, L. & Choh-Hao, L. 1984. *Biochemical and Biophysical Studies of Proteins and Nucleic Acids*. Elsevier, United States of America.

Villafranca, J.J. 1990. *Current Research in Protein Chemistry: Techniques, Structure and Function*. Academic Press, Inc., United States of America.

Walker, J.M. 2002. *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press, New Jersey.

Wangsiripaisan, A., Gengaro, P.E., Edelstein, C.L. & Schrier, R.W. 2001. Role of polymeric Tamm-Horsfall protein in cast formation: Oligosaccharide and tubular fluid ions. *Kidney International* **59**, ms. 932-940.

Wong, N.K., Easton, R.L., Panico, M., Sutton-Smith, M., Morrison, J.C., Lattanzio, F.A., Morris, H.R., Clark, G.F., Dell, A. & Patankar, M.S. 2003. Characterization of the oligosaccharides associated with the human ovarian tumor marker CA125. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, ms. 28619-28634.

Yue-Jin, H., Chretien, N., Bilodeau, A.S., Jiang, F.Z., Lazaris, A. & Karatzas, C.N. 2005. Goat uromodulin promoter directs kidney-specific expression of GFP gene in transgenic mice. *BMC Biotechnology* **5**.

Zalc, B., Collet, A., Monge, M., Ollier-Hartmann, M.P., Jacque, C., Hartmann, L. & Baumann, N.A. 1984. Tamm-Horsfall protein, a kidney marker is expressed on brain sulfogalactosylceramide-positive astroglial structures. *Brain Research* **291**, ms. 182-187.