

Kajian Bioinformatika Uncoupling Protein 2 (UCP2) dan Mutasi Ala55Val UCP2 Pada Obesitas dan Diabetes Melitus Tipe 2 (DMT2)

T. Susmiarsih^{1,2*}, Hidayat Trimarsanto³

¹ Program Doktor Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta

² Departement Biologi, Fakultas Kedokteran Universitas YARSI, Jakarta

³ Lembaga Biologi Molekul Eijkman, Jakarta

*Korespondensi : email : tri.panjiasih@yarsi.ac.id

Abstrak

Pendahuluan. Kemajuan pengetahuan suatu penyakit sangat didukung oleh kajian tingkat molekuler sampai klinis. Bioinformatika menjembati perkembangan pengetahuan analisis seluler dan molekuler dengan klinis. Selain dipengaruhi faktor lingkungan, faktor genetik diketahui berperan dalam patomekanisme penyakit obesitas dan DMT2. UCP2 berpengaruh terhadap BMI (*basal mass index*) pada penderita obesitas dan berpengaruh terhadap sekresi insulin pada penderita diabetes melitus tipe 2. Kajian ini bertujuan mengetahui informasi genetik gen dan protein UCP2 serta peran mutasi Ala55Val pada obesitas dan diabetes melitus tipe 2.

Metode. Kajian bioinformatika gen dan mutasi UCP2 menggunakan data base situs <http://www.ncbi.nlm.gov>, <http://www.uniprot.org> dan <http://www.ensembl.org>. Profil, struktur dan fungsi protein UCP2 dikaji dengan situs <http://www.expasy.org>, <http://www.cbs.dtu.dk>, <http://www.wolfsort.org>, <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/> dan <http://www.pdb.org>. Disain primer dan titik mutasi Ala55Val UCP2 dikaji dengan situs Primer3 dan REBASE.

Hasil dan kesimpulan. Gen UCP2 *Homo sapiens* (NC_000011.9) terdiri atas 8 ekson dan 7 intron dengan panjang basa nukleotida 8174 bp. Protein UCP2 (NP_003346) mempunyai 309 asam amino, merupakan protein integral yang berlokasi di membran mitokondria bagian dalam. Struktur protein terdiri atas heliks dan koil. Fungsi UCP2 sebagai protein transporter, *uncoupling* proton pada fosforilasi oksidatif, termogenesis dan keseimbangan energi dengan cara mengubah gradien proton. Mutasi Ala55Val dapat dianalisis dengan mengamplifikasi target sekuen yang diinginkan dengan cara mendesain primer dan titik mutasi dideteksi dengan enzim restriksi yang mengenali titik tersebut. Ala55Val merupakan mutasi *missense* yang terjadi di posisi mRNA ke 164, mengubah GCC menjadi GTC, mengubah translasi protein nomer 55 alanin menjadi valin. Titik mutasi ini berdekatan dengan situs fosforilasi Protein C Kinase (PCK) protein, situs yang berperan mengatur jumlah ATP dalam proses termogenesis dan sekresi insulin. Informasi genetik gen, protein UCP2 serta peranannya dalam obesitas dan diabetes melitus tipe 2 dapat diperoleh dengan menggunakan database bioinformatika.

Kata kunci : Uncoupling protein, Primer desain and Missense mutation

Pendahuluan

Kemajuan pengetahuan suatu penyakit sangat didukung oleh kajian tingkat dasar molekuler sampai tingkat klinis. Bioinformatika menjembati perkembangan pengetahuan analisis seluler dan molekuler dasar dengan klinis. Pada tingkat klinis, perawatan pada pasien melibatkan diagnosis, prognosis, preventif dan terapi, yang didasari oleh penemuan biologik dari berbagai penelitian. Bioinformatika melibatkan perhitungan, penyimpanan dan analisis data biologik dasar, termasuk sekuen DNA, ekspresi RNA, protein

dan molekul kecil yang berada di dalam dan sekitar sel (Altman, 2012). Penelitian bioinformatika mengembangkan dan mengaplikasikan metode yang menjembati pengetahuan molekuler, data genetik dan seluler dengan konsep-konsep klinik seperti metode pengobatan, penyakit dan gejala-gejala yang diderita pasien (Altman dan Miller, 2010).

Obesitas merupakan suatu masalah kesehatan bagi sebagian besar negara di dunia, dengan prevalensi yang cenderung meningkat setiap tahun dan dapat memicu timbulnya sindroma metabolik lainnya, seperti diabetes mellitus tipe 2 (DMT2). Obesitas

adalah suatu gangguan atau gejala yang ditandai penimbunan lemak yang berlebih di bawah kulit. Sementara itu Diabetes mellitus (DM) didefinisikan sebagai suatu penyakit metabolik yang mempunyai ciri ditemukannya kadar glukosa darah yang tinggi (hiperglikemia) akibat adanya gangguan dalam sekresi insulin atau kerja insulin di jaringan target. Selain dipengaruhi faktor lingkungan, faktor genetik diketahui turut berperan dalam patomekanisme penyakit obesitas dan DMT2. Banyak studi yang mengkaitkan kedua penyakit tersebut dengan genetik melalui mekanisme keseimbangan energi, terutama termogenesis dan homeostatis glukosa (Rousset *et al.*, 2004). Pengaturan keseimbangan energi dan metabolisme dalam termogenesis terjadi di mitokondria, organel sel ini menginduksi perpindahan proton dalam menghasilkan ATP melalui proses fosforilasi oksidatif (*oxidative phosphorylase*, OXPHOS) dan berperan menurunkan radikal bebas (*reactive oxygen species*, ROS) (Bouillaud, 2010).

Salah satu komponen mitokondria yang penting untuk mengatur jumlah ATP intraseluler adalah *uncoupling protein 2* (UCP2). Pengaturan jumlah ATP ini berperan terhadap proses termogenesis dan sekresi insulin oleh sel beta pankreas. Kedua proses tersebut menjadi dasar pemikiran biologi molekular dalam mempelajari patomekanisme obesitas dan diabetes. Banyak penelitian yang telah dilakukan untuk mempelajari peran gen ini dalam obesitas dan diabetes mellitus. Wang *et al.* (2004), Boulotta *et al.* (2005) dan Lapice *et al.* (2010) membuktikan bahwa varian UCP2 berpengaruh terhadap BMI (*basal mass index*) pada penderita obesitas dan berpengaruh terhadap CRP (*c-reactive protein*), sekresi insulin pada penderita diabetes melitus tipe 2. UCP2 merupakan molekul target untuk mempelajari etiologi dan perlakuan obesitas (Heidari *et al.* 2010). Polimorfisme gen UCP2 dapat susceptibel terhadap diabetes melitus pada etnis tertentu (Xu *et al.* 2011).

Penelitian peran mutasi SNP (*single nucleotide polymorphisme*) Ala55Val gen UCP2 pada obesitas dan diabetes melitus sangat membutuhkan penelusuran bioinformasi, baik pengetahuan tentang gen, protein maupun penelusuran informasi penting lainnya yang

mendukung suatu penelitian. Diharapkan dengan penelusuran bioinformasi ini, penelitian menjadi lebih terarah dan mudah dilaksanakan. Makalah ini bertujuan untuk menelusuri dan mengkaji bioinformasi genetik UCP2 dan peran mutasi Ala55Val pada obesitas dan diabetes melitus tipe 2.

Material dan Metoda

Material

Gen UCP2 yang diperoleh dari situs <http://www.ncbi.nlm.gov> dengan *accession number* NC_000011.9, mRNA UCP2 dengan NM_03355.2 dan protein UCP2 dengan NP_003346.

Metoda

1. Analisis struktur, transkrip dari gen UCP2 dan fungsinya dengan menggunakan database bioinformatika dari situs <http://www.ncbi.nlm.gov> menu *gene* dan *PubMed*, <http://www.uniprot.org> dan <http://www.ensembl.org>
2. Analisis mutasi Ala55Val UCP2 dapat menggunakan situs <http://www.uniprot.com>, situs <http://www.ncbi.nlm.gov> menu *OMIM* dan *SNP*.
3. Analisis komposisi, profil dan lokasi dari protein UCP2 dan mutan Ala55Val UCP2 menggunakan situs <http://www.expasy.org>, <http://www.cbs.dtu.dk> *TargetP*, *SignalP*, *TMHMM*, <http://www.wolfpsort.org> dan <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/> menu *MEMSAT3* & *MEMSAT-SVM*
4. Analisis struktur sekunder melalui situs <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/> menu *PSIPRED* dan *3D* protein UCP2 serta analisis komparatif dengan Ala55Val UCP2 menggunakan situs <http://www.pdb.org> menu *Swiss Model* dan software *PYMO*L
5. Desain primer yang digunakan untuk mengidentifikasi mutasi dengan menggunakan situs *Primer3*, situs *PerlPrimer* dan menentukan titik retriksi untuk mengidentifikasi mutasi dengan situs *REBASE*.

Hasil Penelusuran Dan Diskusi

Analisis UCP2 : Struktur Gen, Transkrip mRNA dan Protein

Kajian terhadap struktur gen UCP2 *Homo sapiens* dapat dicari melalui situs <http://www.ncbi.nlm.gov> menu gene. *Accession number* gen UCP2 yang diambil adalah sekuen referensi (*reference sequence*, refseq) untuk genom NC_000011.9, sekuen memiliki struktur dengan panjang basa nukleotida 8174 bp, berbentuk DNA linear, tersusun mulai dari daerah komplemen (73685716..73693889), lokasi pada kromosom 11q13 dari *Homo sapiens*. Lokasi gen UCP2 ditunjukkan pada Gambar 1. Gen UCP2 *Homo sapiens* ini terdiri atas 8 ekson dan 7 intron dimana ekson 1 dan 2 tidak ditranslasikan. Panjang basa nukleotida gen UCP2 sekitar 8.7 kb (kilobasa) dan lokasinya terletak 7-8.2 kb arah hilir dari gen UCP3 (Argyropoulous *et al.*, 1998; Pecqueur *et al.*, 1999; Ricquier dan Bouillaud, 2000).

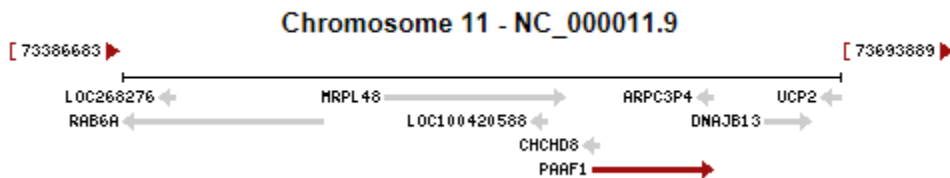
Hasil pencarian mRNA UCP2 melalui situs <http://www.ncbi.nlm.gov> menu gene dengan *accession number* NM_03355.2 mempunyai panjang sekuen 1646 bp, berbentuk linear. Hasil transkrip menunjukkan gen UCP2 mempunyai 8 ekson (ekson 1 posisi basa 1...124, ekson 2 posisi pada basa 125...281, ekson 3 posisi pada basa 282...506, ekson 4 posisi pada basa 507...717, ekson 5 posisi pada basa 718...912, ekson 6 posisi pada basa

913...1014, ekson 7 posisi pada basa 1015...1195 dan ekson 8 posisi pada basa 1196...1646).

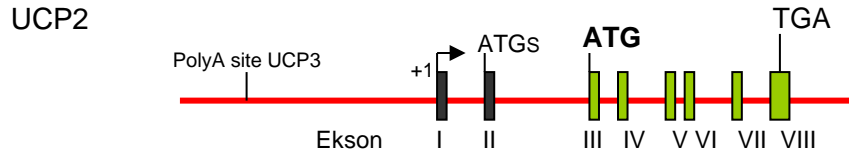
Menurut Riquier dan Bouillaud (2000) transkrip mRNA dimulai dari ekson III, ekson I dan II tidak ditranslasikan (*untranslated*). Sedangkan Pecqueur *et. al* (1999) mengatakan daerah promoter gen UCP2 tidak mempunyai boks TATA atau boks CAAT namun daerah ini banyak mengandung basa G dan C (Gambar 2).

Protein UCP2 yang diambil melalui situs <http://www.ncbi.nlm.gov> menu protein dengan *accession number* NP_003346 (sumber refseq NM_003355) mempunyai 309 asam amino yang berbentuk linear. Melalui situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> menu BLAST—protein BLAST, dapat ditelusuri kemiripan (homologi) sekuen protein UCP2 *Homo sapiens* ini dengan spesies lain (orthologi) atau dengan sekuen protein lain (paralogi) dalam *Homo sapiens* itu sendiri. Didasarkan pada nilai identifikasi (*query coverage*) 100%, nilai E ≤ 0, sumber sekuen referensi (refseq) yang serupa (NP) dan paling dekat nilainya maka *accession number* yang diambil untuk orthologi adalah NP_0011268.11.1 (UCP2 *Pongo abelii*) dan untuk paralogi adalah NP_003347.1 (UCP3 *Homo sapiens*) (Gambar 3).

Perbandingan fungsi dan atribut protein UCP2 *Homo sapiens*, orthologinya UCP2 *Pongo abelii* dan paraloginya UCP3 *Homo sapiens* dapat ditelusuri melalui situs <http://www.uniprot.org> menu UniProtKB.



Gambar 1. Lokasi gen UCP 2 pada kromosom 11.



Gambar 2. Daerah Ekson UCP2. UCP2 terdiri dari 8 ekson, transkripsi dimulai dari ekson III, situs inisiasi transkripsi (ATG) terletak 7-8,2 kb hilir dari situs poliadenilasi UCP3.

A		B	
<p>GENE ID: 100173815 UCP2 uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier) [Pongo abelii]</p> <p>Score = 635 bits (1637), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 308/309 (99%), Positives = 308/309 (99%), Gaps = 0/309 (0%)</p>		<p>GENE ID: 7352 UCP3 uncoupling protein 3 (mitochondrial, proton carrier) [Homo sapiens] (Over 100 PubMed links)</p> <p>Score = 462 bits (1190), Expect = 7e-166, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 226/313 (72%), Positives = 257/313 (82%), Gaps = 5/313 (2%)</p>	
Query 1	MVGFKATDVPPPTATVKFLGAGTAACIADLITFPFLDTAKVRLQIQGESQGPVRATASAQYR 60	Query 1	MVGFKATDVPPPTATVKFLGAGTAACIADLITFPFLDTAKVRLQIQGESQGPVRATASAQYR 60
Sbjct 1	MVGFKATDVPPPTATVKFLGAGTAACIADLITFPFLDTAKVRLQIQGESQGPV ATASAQYR 60	Sbjct 1	MVGLKPSDVPPPTMAVKFLGAGTAACFADLITFPFLDTAKVRLQIQGENQA-VQTARLVQYR 59
Query 61	GVMGTLTLMVRETEGPRSLYNGLVAGLQRMQSFASVRIGLYDSVKQFYTKGSEHASIGSRL 120	Query 61	GVMGTLTLMVRETEGPRSLYNGLVAGLQRMQSFASVRIGLYDSVKQFYTKGSEHASIGSRL 119
Sbjct 61	GVMGTLTLMVRETEGPRSLYNGLVAGLQRMQSFASVRIGLYDSVKQFYTKGSEHASIGSRL 120	Sbjct 60	GVLGTLTLMVRETEGPRSLYNGLVAGLQRMQSFASVRIGLYDSVKQFYTKGADNSSLTR 119
Query 121	LAGSTTGALAVAVAQPTDVVVKRFQARAGGGRRYQSTVNAVYKTIAREEGFRGLWKGTS 180	Query 120	LLAGSTTGALAVAVAQPTDVVVKRFQARAG---GRRYQSTVNAVYKTIAREEGFRGLW 176
Sbjct 121	LAGSTTGALAVAVAQPTDVVVKRFQARAGGGRRYQSTVNAVYKTIAREEGFRGLWKGTS 180	Sbjct 120	+LAG TTGA+AV AQPTDVVVKRFQA G R+Y T++AV+TIAREEG RGLW 179
Query 181	PNVARNAIVNCAELVYDILKDALIKANLMTDDLPCFHTSAFGAGFCTIVIASPVDVVKY 240	Query 177	KGTSFNVARNAIVNCAELVYDILKDALIKANLMTDDLPCFHTSAFGAGFCTIVIASPVD 236
Sbjct 181	PNVARNAIVNCAELVYDILKDALIKANLMTDDLPCFHTSAFGAGFCTIVIASPVDVVKY 240	Sbjct 180	KGILFNIMENNAIVNCAELVYDILKDALIKANLMTDDLPCFHTSAFGAGFCTIVIASPVD 239
Query 241	RYNSALGQYSSAGHCALTMLQKEGPRAFYKGFMPFSLRLGSSWVVMFVYEQKRALMA 300	Query 237	VVXTRIMNS gqY S C + M+ +EGP AFYKGF PSFLRLGSSWVVMFVYEQKLR 296
Sbjct 241	RYNSALGQYSSAGHCALTMLQKEGPRAFYKGFMPFSLRLGSSWVVMFVYEQKRALMA 300	Sbjct 240	VVXTRIMNSPFGqYFSFLDCMKHVAQEGGTAFYKGFPSFLRLGSSWVVMFVYEQKLR 299
Query 301	ACTSREAPF 309	Query 297	ALMAACTSREAPF 309
Sbjct 301	ACTSREAPF 309	Sbjct 300	ALMKVQMLRESFP 312

Gambar 3. Homologi protein UCP2 *Homo sapiens*. A. Orthologi UCP2 *Homo sapiens* adalah protein UCP2 *Pongo abelii* dengan kemiripan sekuennya 99%. B. Paralogi UCP2 *Homo sapiens* adalah protein UCP3 *Homo sapiens* dengan kemiripan sekuennya 72%.

Hasil penelusuran menunjukkan bahwa protein UCP2 *Homo sapiens* (akses nomer P55851), protein UCP2 *Pongo abelii* (akses nomer Q5R5A8) dan protein UCP3 *Homo sapiens* (akses nomer P55916), memiliki fungsi yang sama yaitu sebagai protein transporter, *uncoupling* proton fosforilasi oksidatif, termogenesis dan keseimbangan energi serta ketiga protein tersebut berada pada membran mitokondria bagian dalam.

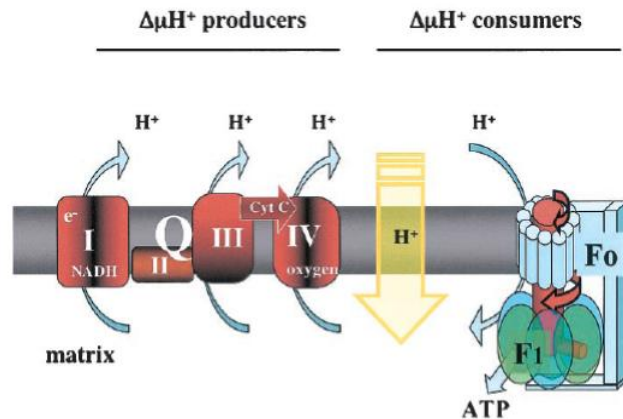
Eksresi dan Fungsi Klinis UCP2 pada Obesitas dan DMT2

Kajian bioinformatika fungsi dari UCP2 dapat diakses melalui situs <http://www.ncbi.nlm.gov> menu PubMed. UCP merupakan anggota dari protein transporter mitokondria yang memperantarai perpindahan

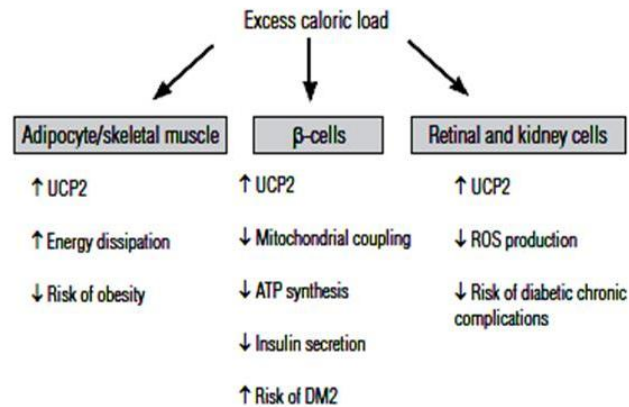
proton secara *uncoupling* yang melintasi membran mitokondria bagian dan proton tersebut dihasilkan oleh transpor elektron dalam proses respirasi dan sintesis ATP dari ADP (Dalgaard dan Pedersen, 2001; Pankow et al. 2001). Proses uncoupling ini lebih banyak menghasilkan panas dibanding energi (Wang et al. 2004), sehingga UCP2 sangat terkait dengan termogenesis dalam tubuh. Hingga tahun 1997 sudah dikenal 3 gen homolog dari UCP yaitu UCP1, UCP2 dan UCP3. UCP2 ini memiliki asam amino yang identik 59% dengan UCP1, jumlah asam aminonya 309 dan berat molekul 33,2 kDa, sedangkan UCP3 memiliki homologi sekitar 73% dengan UCP2 (Riquier dan Bouillaud, 2000). UCP2 diekspresikan dalam ginjal, paru-paru, sel makrofag, sel T dan secara luas diekspresikan di jaringan adiposa putih, otot skeletal, sel pankreas dan sistem

saraf pusat (Fleury et al. 1997 dan Saleh et al. 2002).

Untuk mendapatkan informasi tentang fungsi dan peran klinis protein UCP dapat membuka situs <http://www.ncbi.nlm.gov> menu OMIM, PubMed atau membuka situs <http://www.uniprot.com> menu UniProtKB. Protein UCP berperan pada termogenesis, pengaturan sintesis ATP, mengontrol produksi ROS dan menghambat sekresi insulin. Protein UCP berperan pada manifestasi klinis berupa obesitas dan diabetes melitus. Fungsi UCP dengan cara mengubah gradien proton untuk menghasilkan panas merupakan dasar molekular pengeluaran energi yang penting untuk mempelajari obesitas dan DMT2 (Gambar 4). Kaitan protein UCP2 dengan obesitas dan DMT2 dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 4. Peran UCP dalam rantai respirasi sel. Gradien proton H^+ , yang dihasilkan oleh kompleks senzim respirasi, digunakan oleh ATP sintetase untuk fosforilasi ADP menghasilkan ATP. Mekanisme lain untuk penggunaan gradien proton adalah UCP yang meng*uncoupling* H^+ , yang akan menurunkan sintesis ATP (Rousset et al. 2004).



Gambar 5. **Peran utama UCP2 pada obesitas dan DMT2.** Peningkatan ekspresi UCP2 menurunkan risiko obesitas pada jaringan lemak dan otot skelet, namun pada sel pankreas, retina dan sel ginjal dapat meningkatkan risiko DMT2 (de Souza et al. 2011).

Varian genetik UCP2 : Ala55Val

Untuk mengetahui variasi genetik alami dan perannya dari gen UCP2 dapat ditelusuri melalui situs <http://www.uniprot.com> dan <http://www.ncbi.nlm.gov> menu SNP atau PubMed. Hasil pencarian dengan kode P55851 menunjukkan gen UCP2 mempunyai 5 macam variasi alami yaitu Ala55Val (rs660339), Arg76Gln (rs45541732), Arg154Gln (rs45486692), Ala268Gln (rs45490393) dan Ser282Cys (rs45596837). Hasil pencarian dengan menu Pubmed, ada variasi lain yang sudah diteliti yaitu mutasi pada daerah promotor G(-866)A (rs659399) dan Ins/Del di ekson 8.

Selain dengan situs di atas, eksplorasi bioinformasi varian UCP2 dapat juga di telusuri melalui situs <http://www.ensemble.org>. Mutasi Ala55Val merupakan mutasi *missense* yang terjadi di posisi CDS mRNA ke 164, mengubah kodon GCC menjadi GTC, perubahan ini menyebabkan perubahan translasi protein nomer 55 alanin menjadi valin. UCP2 merupakan faktor risiko terhadap DMT2 pada individu Asia tetapi tidak berpengaruh terhadap individu Eropa (Xu et al. 2011), di populasi Indian Asia polimorfisme ini menurunkan risiko DMT2 (Vimaleswaran et al. 2011). Mutasi Ala55Val UCP2 (rs660339) dapat dijadikan marker risiko terjadinya obesitas pada wanita

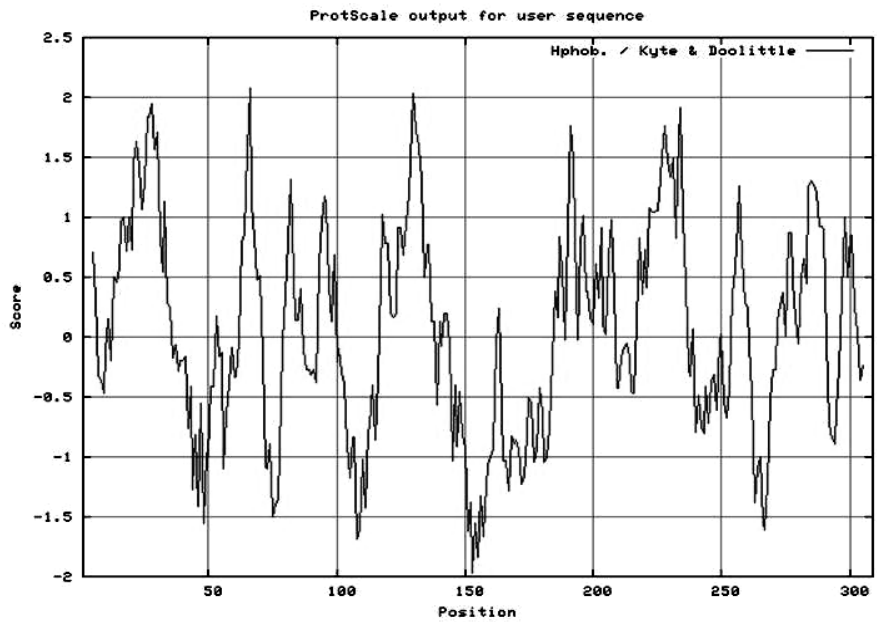
namun tidak pada pria di populasi Jepang (Kosuge et al. 2008), varian ini merupakan faktor predisposisi obesitas dan meningkatnya sekresi insulin pada populasi aborigin di Taiwan (Wang et al. 2007). Hasil studi yang berbeda-beda pada berbagai populasi ini mungkin disebabkan variasi genetik Ala55Val gen UCP2 menghasilkan pengaruh yang berbeda pada beragam ras dalam hal pengeluaran energi (Kimm et al., 2002).

Analisis protein UCP2 : Komposisi, profil dan lokasi

Untuk mengetahui komposisi protein digunakan situs <http://www.expasy.org> menu ProtParam. Hasil pencarian menunjukkan komposisi protein UCP2 (Tabel 1). Dari hasil ProtParam diketahui ada beberapa perbedaan komposisi mutan Ala55Val UCP2 dengan protein normal antara lain berat molekul 33257.4, jumlah atom 4691, indeks alifatik 83.07 dan GRAVY 0.075. Hasil penyelidikan lebih lanjut ke situs <http://www.expasy.org/protscale>, profil skala asam amino menunjukkan bahwa berat molekul, nilai hidrofobik (*hydrophobic*, hphob) (Gambar 6), polaritas dan hplc dari masing-masing molekul yang menyusun protein normal dan mutan Ala55Val UCP2 mempunyai nilai yang sama.

Tabel 1. Komposisi protein UCP2

Komposisi UCP2	Komposisi UCP2
- Jumlah asam amino : 309	- Formula: C1476H2353N413O427S16
- Berat molekul : 33229.3 Dalton	- Jumlah atom: 4685
- Nilai pI : 9.74	- Estimasi waktu paruh pada mamalia : 30 jam
- Komposisi Atom :	- Indeks instabilitas : 41.95
Carbon C 1476	- Indeks alifatik : 82.46
Hydrogen H 2353	- Grand average of hydropathicity (GARVY) : 0.067
Nitrogen N 413	
Oxygen O 427	
Sulfur S 16	



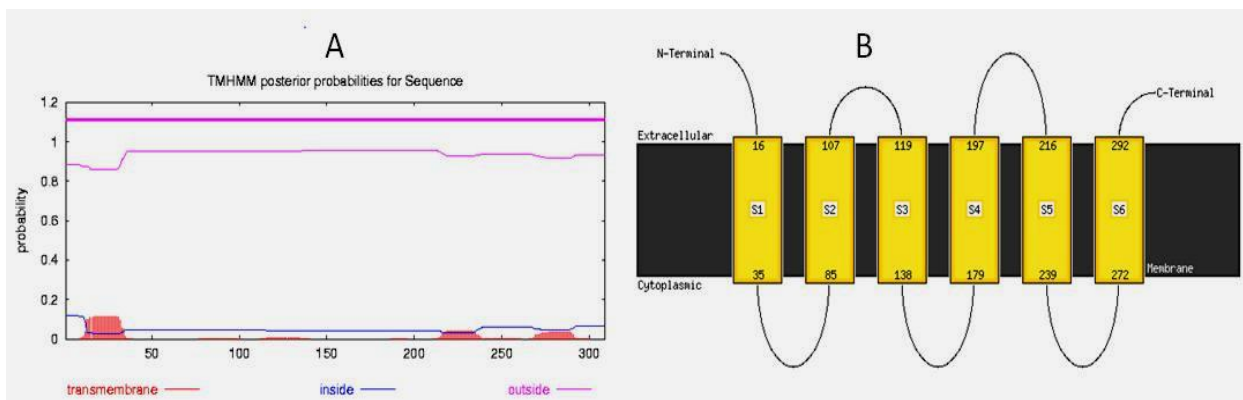
Ala: 1.800 Arg: -4.500 Asn: -3.500 Asp: -3.500 Cys: 2.500 Gln: -3.500 Glu: -3.500 Gly: -0.400
 His: -3.200 Ile: 4.500 Leu: 3.800 Lys: -3.900 Met: 1.900 Phe: 2.800 Pro: -1.600 Ser: -0.800
 Thr: -0.700 Trp: -0.900 Tyr: -1.300 Val: 4.200 : -3.500 : -3.500 : -0.490

Gambar 6. Profil skala nilai hidrofobik (hphob) protein normal dan Ala55Val UCP2. Profil skala nilai hphob antara protein normal dan mutan adalah sama.

Lokasi protein UCP2 dapat diprediksi keberadaannya melalui situs <http://www.cbs.dtu.dk> TargetP. TargetP merupakan program untuk memprediksi lokalisasi protein subseluler eukariotik yang didasari pada sekuen N-terminal dari motif protein, program ini untuk membedakan protein mitokondria, kloroplas, protein sekretori dan protein lainnya (Emanuelsson et al. 2007). Penelusuran topologi protein UCP2 melalui situs <http://www.cbs.dtu.dk> TMHMM menunjukkan protein ini bukanlah merupakan protein transmembran (Gambar 7). Namun penelusuran melalui situs <http://www.uniprot.org> dan <http://www.ncbi.nlm.gov> menu PubMed menunjukkan bahwa lokasi subseluler protein UCP2 *Homo sapiens* (P55816) berada di membran mitokondria bagian dalam dan merupakan protein integral. Prediksi lokasi protein dilanjutkan dengan penelusuran melalui situs <http://www.wolfsort.org> yang menyatakan bahwa protein UCP2 *Homo sapiens* teridentifikasi 100% berlokasi di membran mitokondria bagian dalam dan merupakan protein integral.

WoLF PSORT merupakan suatu program yang sering digunakan untuk memprediksi lokasi protein subseluler. WoLF PSORT mengkonversi sekuen asam amino menjadi gambaran lokalisasi numerik yang didasari pada sinyal, komposisi asam amino dan motif fungsional (Horton et al. 2007). Topologi protein juga dapat ditelusuri melalui situs <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/> menu MEMSAT3 & MEMSAT-SVM yang menyatakan UCP2 merupakan protein transmembran dengan 6 domain (Gambar 7).

Kajian bioinformatik untuk menelusuri ada tidaknya N-terminal sinyal peptida dan letak situs pemotongan dari sinyal peptida untuk protein yang akan disekresi keluar sel (protein sekretori) juga dapat dilakukan melalui situs SignalP. Dari hasil penelusuran, protein UCP2 dan mutan Ala55Val UCP2 bukan merupakan protein sekretori (*non secretory protein*) dengan probabilitas *signal peptide* 0.066, probabilitas *signal anchor* 0.002 dan probabilitas letak situs pemotongan 0.020 pada asam amino antara posisi 27 dan 28.



Gambar 7. **Prediksi topologi protein UCP2.** A. Protein UCP2 bukan merupakan protein transmembran (situs www.cbs.dtu.dk TMHMM). B. Protein UCP2 merupakan protein transmembran dengan 6 domain Kedua ujung terminal N maupun C menghadap ruang intra membran. Protein terdiri dari 6 heliks asam amino yang dihubungkan oleh *loop* (situs <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/result/464098>).

Analisis protein UCP2 : Struktur sekunder dan 3D

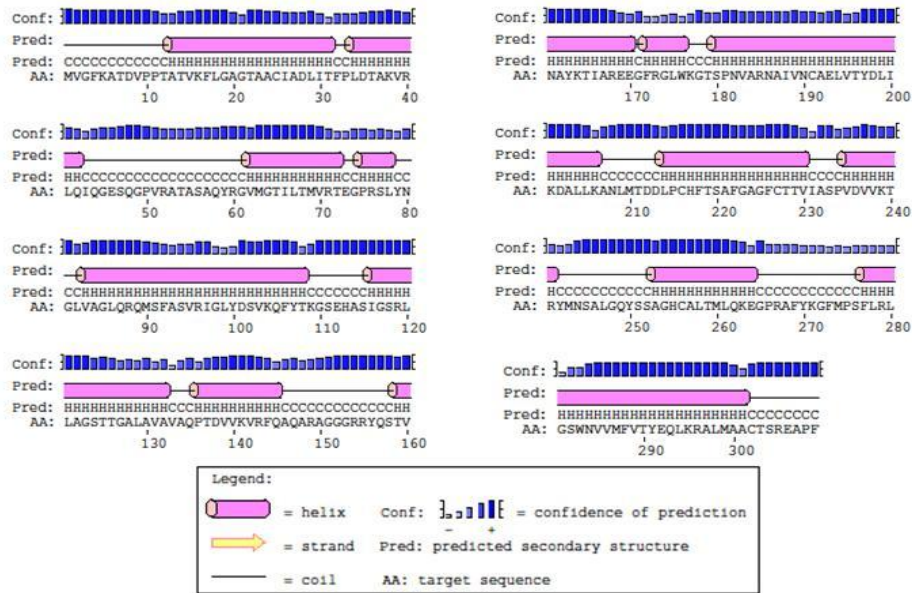
Pengetahuan tentang struktur protein berperan penting untuk mengerti fungsi protein (Watson et al. 2005), rekonstruksi struktur

protein (Dawyer et al. 2004) dan studi interaksi protein dengan protein (Russell et al. 2004). Prediksi struktur protein dengan menggunakan bioinformatik meliputi pencarian sekuen yang serupa, membandingkannya dengan berbagai sekuen, identifikasi dan karakterisasi domain,

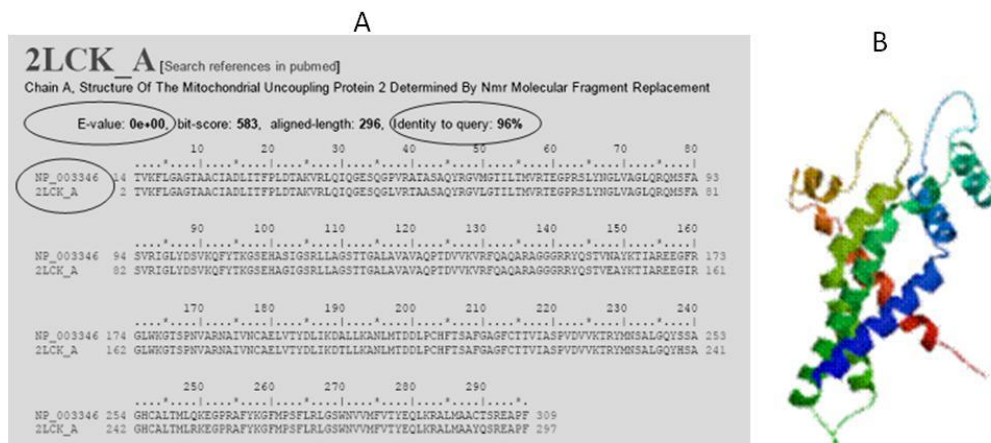
prediksi struktur sekunder, penanda protein, mengkonstruksi dan memvalidasi model tiga dimensi (Edwards dan Cottage, 2003).

Struktur sekunder merupakan distribusi residu asam amino yang spesifik yang berada di sekeliling hingga ujung menyusun rantai α -heliks atau β -strand (Duan et al. 2008). Untuk memprediksi struktur sekunder protein dapat dicari melalui situs <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/> menu PSIPRED. Protein UCP2 dan Ala55Val UCP2 memiliki struktur sekunder yang tersusun heliks dan koil (Gambar 8). Situs PSIPRED

merupakan situs untuk memprediksi struktur protein berdasarkan sekuen asam aminonya dengan akurasi tinggi (McGuffin et al. 2000) dan paling banyak digunakan. Untuk mencari model struktur protein 3 dimensi (3D) dapat ditelusuri melalui situs <http://www.ncbi.nlm.gov> menu BLAST atau <http://www.rcsb.org/pdb/> Hasil pencarian menunjukkan model protein UCP2 mirip dengan 2LCK_A (GI:342350770) yang sudah dipublikasi oleh peneliti sebelumnya (Gambar 9).



Gambar 8. Struktur sekunder protein UCP2.

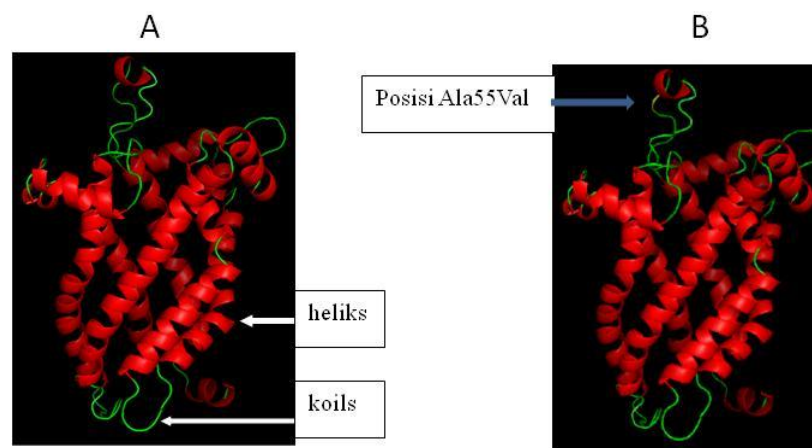


Gambar 9. Model 3D protein UCP2. A. Model protein UCP2 mirip dengan molekul 2LCK_A dengan kemiripan sekuen 96% dan nilai E-value 0e+00. B. Model 3D protein 2LCK_A.

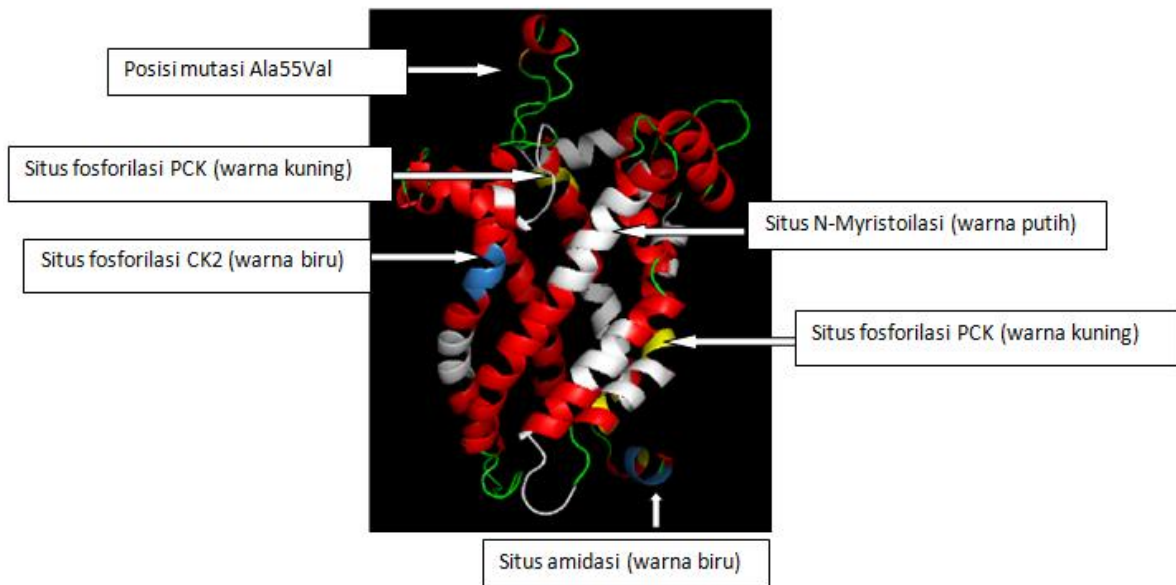
Jika protein yang dicari belum mempunyai model struktur 3D maka dapat meminta bantuan ke situs <http://www.exspasy.com> menu SwissModel dan klik *automated mode*, atau situs <http://www.pdb.org>. Pembuatan model struktur 3 dimensi harus dimulai dengan menyimpan data model dalam bentuk PDB *file* yang merupakan hasil pencarian dari situs <http://www.pdb.com> atau hasil dari pencarian di situs <http://www.exspasy.com> menu SwissModel sub menu *Automated mode* yang dikirim *server* ke alamat email kita. Kemudian dengan program PYMOL kita dapat merekonstruksi model struktur UCP2.

Mutasi *missense* SNP Ala55Val terletak di struktur 3D UCP2 asam amino urutan ke 55 yang mengubah Alanin (A) menjadi Valin (V) (data RefSNP/dbSNP rs660339). Dilihat dari *Scoring Matrix* perubahan A menjadi V mempunyai nilai 0, artinya kedua asam amino tersebut secara bermakna tidak similaritas (A = hidrofobik, *non polar*, alifatik; V = hidrofobik, *non polar*, *tiny*) (Gambar 10). Untuk melakukan analisa fungsi protein mutan, terlebih dahulu kita mencari situs aktif dari protein UCP2 melalui <http://www.exspasy.com> menu Prosite. Protein UCP2 Homo sapiens mempunyai 4 situs aktif yaitu situs fosforilasi protein kinase C (PKC pada posisi basa 14-16, 36-38, 94-96, 102-104, 303-305), situs N-miristoilasi (pada posisi

basa 19-24, 21-26, 61-66, 64-69, 81-86, 98-103, 110-115, 123-128, 174-179, 178-183, 223-228, 248-253, situs amidasi (posisi 152-155) dan situs fosforilasi casein kinase II (CK2 pada posisi basa 233-236, 303-306). Setelah kita mempunyai data situs aktif protein dari Prosite, kemudian merekonstruksi protein mutan Ala55Val dan situs aktif protein dengan PYMOL (Gambar 11). Dari hasil rekonstruksi posisi SNP Ala55Val dengan situs aktif, posisi *single nucleotide polymorphisme* (SNP) (basa nukleotida ke 164, mengubah kodon GCC menjadi GTC) berdekatan dengan situs fosforilasi Protein C Kinase (PCK), posisi yang berdekatan ini mungkin dapat mengganggu fungsi fosforilasi PKC protein UCP2. Salah satu komponen mitokondria yang penting untuk mengatur jumlah ATP intraseluler adalah *uncoupling protein 2* (UCP2). Pengaturan jumlah ATP ini berperan terhadap proses termogenesis dan sekresi insulin oleh sel beta pankreas. Peningkatan ekspresi UCP2 dapat menurunkan risiko obesitas pada jaringan lemak dan otot skelet, namun pada sel pankreas dapat meningkatkan risiko DMT2 melalui hambatan sekresi insulin (de Souza et al. 2011). Kedua proses tersebut menjadi dasar pemikiran biologi molekular dalam mempelajari patomekanisme obesitas dan diabetes.



Gambar 10. **Model struktur 3D protein UCP2.** A. Struktur 3D protein UCP2 tersusun atas bentuk heliks (pilin) dan koil (untai). B. Struktur 3D Ala55Val UCP2 sama dengan protein normal UCP2 hanya ada satu mutasi asam amino no 55 yang mengubah alanin menjadi valin.



Gambar 11. **Struktur protein dan situs aktifasi Ala55Val UCP2.** Titik mutasi Ala55Val berada dekat dengan situs fosforilasi PCK.

Identifikasi Ala55Val UCP2 : Disain primer dan situs retriksi

Desain primer merupakan tahap inisiasi yang penting untuk melakukan *polymerase chain reaction* (PCR) dengan target amplifikasi yang sesuai keinginan. Banyak faktor yang dapat membatasi keberhasilan primer antara lain dimer, temperatur *melting* yang ekstrem, produk alternatif amplifikasi, variasi spesifik genotip (Li dan Brownley, 2010). Primer3 merupakan program komputer untuk mencari kandidat pasangan primer yang spesifik untuk mengamplifikasi sekuen nukleotida target. Untuk mendesain primer, diawali dengan pencarian titik mutasi melalui situs <http://www.uniprot.org> dan <http://www.ncbi.nlm.gov> menu SNP. Hasil penelusuran menunjukkan protein UCP2 (akses P55851) mempunyai variasi genetik alami antara lain mutasi titik asam amino no 55 yang mengubah A menjadi V, akses dbSNP rs660339 dari NCBI menginformasikan merujuk refseq gene NG_011478 mutasi Ala55Val UCP2 terjadi pada posisi basa nukleotida 9786, merujuk refseq mRNA NM_003355 mutasi

berada pada posisi 544 yang mengubah basa C menjadi T (Gambar 12) dan refseq NP_003346.2 titik mutasi pada asam amino no. 55 yang mengubah residu asam amino Alanin (Ala) menjadi Valin (Val). Mendesain primer dapat menggunakan Primer3 Plus atau primer BLAST dari situs <http://www.ncbi.nlm.gov>. Untuk Primer3 Plus, data yang dipakai adalah data fasta dari refseq gene, sedangkan primer BLAST data yang dipakai dapat refseq genom atau mRNA. Hasil Primer BLAST memberi beberapa pasang primer, pemilihan pasangan primer terbaik didasari atas panjang basa primer, suhu *melting* (TM), kandungan GC, terbentuknya palindroma (dimer dan false priming), sekuen 3'-end dan primer yang dapat degenerasi (Abd-Elsalam, 2003). Disain primer untuk mutasi Ala55Val UCP2 dengan software Primer Blast didapatkan :

Forward Primer

GCATCATGGTTGGGTTCAAGGCCA panjang 24 bp Tm 59.94

Reverse Primer

GCCGGCAACCAGCCCATTGTA panjang 21 bp Tm 59.98

Kemudian kedua primer tersebut dianalisa dengan PerlPrimer, hasilnya kedua primer stabil ($\Delta G \leq -3$) namun masih memungkinkan terjadinya dimer antar primer. Aligmenasi primer menunjukkan spesifik untuk UCP2 Homo sapiens.

Pencarian enzim restriksi untuk mengenali mutasi Ala55Val UCP2 dengan memakai software REBASE dengan pilihan NEBcutter. Mutasi Ala55Val terjadi pada ekson 4 (disandi basa nukleotida urutan 507...717) yang mengubah basa C posisi 544 dari sumber mRNA atau mengubah basa C posisi 9786 dari sumber genom. Mutasi ini tidak menyebabkan perubahan *splicing* karena letak mutasi tidak berdekatan dengan intron atau ekson 3 (286...506). Dengan memasukkan data fasta

genom atau mRNA ke dalam software didapatkan enzim restriksi untuk mutasi Ala55Val adalah CviKI-1. Mutasi Ala55Val UCP2 dapat dideteksi dengan metode *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) menggunakan enzim restriksi CviKI-1. Enzim ini akan memotong situs antara basa G dan C dengan pola pemotongan *blunt end*. Jika individu normal/*wildtype* maka situs GC dapat dikenali, jika individu mutan dengan perubahan C menjadi T maka situs GT (mutan) tidak dapat dikenali enzim CviKI-1 (Gambar 13). Selain enzim CviKI-1, mutasi Ala55Val UCP2 juga dapat dideteksi dengan enzim-enzim antara lain Afel, Alul, BsrBI, BstUI, EcoRV, HaeII dan HincII.

Homo sapiens uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier) (UCP2), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_003355.2

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS NM_003355 1646 bp mRNA linear PRI 11-SEP-2011
 DEFINITION Homo sapiens uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier) (UCP2), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.
 ACCESSION NM_003355
 VERSION NM_003355.2 GI:13259540

```

421 ctgtgaagtt tcttggggct ggcacagctg cctgcatcgc agatctcatc accttctctc
481 tggatactgc taaagtccgg ttacagatcc aaggagaaag tcaggggcca gtgcgcgcta
541 cagcagcgc ccagtaccgc ggtgtgatgg gcaccattct gaccatggtg cgtactgagg
601 gccccgaag cctctacaat gggctggtt cggcctgca gcgccaaatg agctttgcct
661 ctgtccgcat cggcctgtat gattctgtca aacagttcta caccaagggc tctgagcatg
  
```

Mutasi 544

Gambar 12. Refseq mRNA NM_003355 UCP2 Homo sapiens. Titik mutasi berada pada posisi basa ke 544 yang mengubah basa C menjadi T.

CviKI-1

```

5' ... R G C Y ... 3'
3' ... Y C G R ... 5'
  
```

Gambar 13. Situs pengenal enzim CviKI-1. Enzim restriksi CviKI-1 memotong ikatan antara basa G dan C.

Kesimpulan

Gen UCP2 *Homo sapiens* (NC_000011.9) terdiri atas 8 ekson dan 7 intron dengan panjang basa nukleotida 8174 bp. Protein UCP2 (NP_003346) mempunyai 309 asam amino, merupakan protein integral yang berlokasi di membran mitokondria bagian dalam. Struktur protein terdiri atas heliks dan koil. Fungsi UCP2 sebagai protein transporter, *uncoupling* proton pada fosforilasi oksidatif, termogenesis dan keseimbangan energi dengan cara mengubah gradien proton. Mutasi Ala55Val dapat dianalisis dengan mengamplifikasi target sekuen yang diinginkan dengan cara mendesain primer dan titik mutasi dideteksi dengan enzim restriksi yang mengenali titik tersebut. Ala55Val merupakan mutasi *missense* yang terjadi di posisi mRNA ke 164, mengubah GCC menjadi GTC, mengubah translasi protein nomer 55 alanin menjadi valin. Titik mutasi ini berdekatan dengan situs fosforilasi Protein C Kinase (PKC) protein, situs yang berperan mengatur jumlah ATP dalam proses termogenesis dan sekresi insulin. Informasi genetik gen, protein UCP2 serta peranannya dalam obesitas dan diabetes melitus tipe 2 dapat diperoleh dengan menggunakan database bioinformatika.

Daftar Pustaka

- Abd-Elsalam, K. 2003. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design African Journal of Biotechnology Vol. 2 (5), pp. 91-95.
- Altman RB. 2012. Translational bioinformatics: linking the molecular world to the clinical world. Clin Pharmacol Ther. Jun; 91 (6): 994-1000.
- Altman RB, Miller KS. 2010. Translational bioinformatics year in review. J Am Med Inform1 Jul-Aug;18(4):358-66.
- Argyropoulos G, Brown AM, Peterson R, Likes CE, Watson DK, Garvey WT. 1998. Structure and organization of the human Uncoupling Protein 2 gene and identification of a common biallelic variant in Caucasian and African-American subject. Diabetes. 47: 685-687.
- Bulotta A, Ludovico O, Coco A, Di Paola R, Quattrone A, Carella M, et al. 2005. The common 866G/A polymorphism in the promoter region of the UCP-2 gene is associated with reduced risk of type 2 diabetes in Caucasians from Italy. J Clin Endocrinol Metab. 90:1176-1180.
- Dalgaard LT and Pedersen O. 2001. Uncoupling proteins: functional characteristics and role in the pathogenesis of obesity and Type II diabetes. Diabetologia 44: 946 – 965.
- De Souza BM, Assmann TS, Kliemann LM, Gross JL, Canani LH, Crispim D. 2011. The role of uncoupling protein 2 (UCP2) on the development of type 2 diabetes mellitus and its chronic complications. Arq Bras Endocrinol Metab. 55/4 239.
- Duan M, Huang M, Ma C, Li L, Zhou Y. 2008. Position specific residue preference features around the ends of helices and strands and a novel strategy for the prediction of secondary structures. Protein Science. 17 :1505-1512.
- Dwyer, M.A., Looger, L.L., and Hellinga, H.W. 2004. Computational design of a biologically active enzyme. Science 304: 1967-1971.
- Edwards YJ, Cottage A. 2003. Bioinformatics Methods to predict protein structure and function. A practical approach. Mol Biotechnol. 23(2):139-66.
- Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2007. Locating proteins in the cell using Target P, Signal P and related tools. Nat Protoc. 2(4):953-71.
- Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D, and Warden CH. 1997. Uncoupling protein-2: a novel gene Linked to obesity and hyperinsulinemia. Nat Genet 15: 269-272.
- Heidari J, Akrami SM, Heshmat R, Amiri P, Fakhrazadeh H, Pajouhi M. 2010. Association Study of the -866G/A UCP2 Gene Promoter Polymorphism with Type 2 Diabetes and Obesity in a Tehran Population: A Case Control Study. Archives of Iranian Medicine 13(5):384-390.
- Horton P, Park KJ, Obayashi T, Fujita N, Harada H, Adams-Collier CJ, Nakai K. 2007. WoLF PSORT: localization predictor. Nucleic Acids Res. Jul;35 (Web Server issue):W585-7. Epub 2007 May 21.
- Kosuge K, Soma M, Nakayama T, Aoi N, Sato M, Haketa A, Uwabo J, Izumi Y, Matsumoto K. 2008. Human uncoupling protein 2 and 3 genes are associated with obesity in Japanese. Endocrine. 2008 Aug-Dec;34(1-3):87-95.
- Lapice E, Pinelli M, Pisu E, Monticelli A, Gambino R, Pagano G, Valsecchi S, Cocozza S, Riccardi G, Vaccaro O. 2010. Uncoupling protein 2 G(-866)A

- polymorphism: a new gene polymorphism associated with C-reactive protein in type 2 diabetic patients *Cardiovascular Diabetology* 9:68.
- Li K, Brownley A. 2010. Primer design for RT-PCR. *Methods Mol Biol.* 630:271-99.
- MacGregor AJ, Gallimore JR, Spector TD, Pepys MB. 2004. Genetic effects on baseline values of C-reactive protein and serum amyloid A protein: a comparison of monozygotic and dizygotic twins. *Clin Chem.* 50:130-4.
- Mattiasson G, Sullivan PG. 2006. The Emerging functions of UCP2 in health, disease, and therapeutics. *Antioxid Redox Signal.* 8:1-38.
- McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT. 2000. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics.* 16(4):404-5.
- Pankow JS, Folsom AR, Cushman M, Borecki IB, Hopkins PN, Eckfeldt JH, Tracy RP. 2001. Familial and genetic determinants of systemic markers of inflammation: the NHLBI family heart study. *Atherosclerosis.* 154:681-9.
- Pecqueur C, Cassard-Doulcier AM, Raimbault S, Miroux B, Fleury C, Gelly C, Bouillaud F, Ricquier D. 1999. Functional organization of the human uncoupling protein 2 gene, and juxtaposition to the uncoupling protein 3 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 255(1): 40-6.
- Ricquier D, Bouillaud F. 2000. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem J.* 345(2): 161-79.
- Rousset S, Alves-Guerra MC, Mozo J, Miroux B, Cassard AM, Bouillaud F, Ricquier D. 2004. The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes.* 53 (Suppl 1): S130-5.
- Russell, R.B., Alber, F., Aloy, P., Davis, F.P., Korkin, D., Pochaud, M., Topf, M., and Sali, A. 2004. A Structural perspective on protein-protein interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14:313-324.
- Saleh MC, Wheeler MB, and Chan CB. 2002. Uncoupling protein-2: evidence for its function as a metabolic regulator. *Diabetologia* 45: 174-187.
- Vimalaswaran KS, Radha V, Ghosh S, Majumder PP, Sathyanarayana Rao MR, Mohan V. 2011. Uncoupling protein 2 and 3 gene and their association with type 2 diabetes in Asian Indians. *Diabetes Technol Ther.* 13(1):19-25.
- Wang H, Chu WS, Lu T, Hasstedt SJ, Kern PA, Elbein SC. 2004. Uncoupling protein-2 polymorphisms in type 2 diabetes, obesity, and insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E1-E7.
- Wang TN, Huang MC, Lin HL, Hsiang CH, Ko AM, Chang WT, Ko YC. 2007. UCP2 A55V variant is associated with obesity and related phenotypes in an aboriginal community in Taiwan. *Int J Obes.* 31(11):1746-52. Epub.
- Watson, J.D., Laskowski, R.A., and Thornton, J.M. 2005. Predicting protein function from sequence and structural data. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15: 275-284.
- Xu K, Zhang M, Cui D, Fu Y, Qian L, Gu R, Wang M, Shen C, Yu R, Yang T. 2011. UCP2 - 866G/A and Ala55Val, and UCP3 - 55C/T polymorphisms in association with type 2 diabetes susceptibility: a meta-analysis study. *Diabetologia.* 54 (9):2315-24.