

STUDI IN SILICO CONVERSE REGION ETOPOSITE BINDING DOMAIN Pada ISOZIM HUMAN DNA TOPOISOMERASE II

Tirta Setiawan^{*1}, Laksmi Ambarsari^{1,2}, Tony Ibnu Sumaryada^{2,3}

¹Departemen Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, 16680

²Pusat Penelitian Biofarmaka, Institute Pertanian Bogor, Jalan Taman Kencana No.3, Bogor 16128

³Departemen Fisika, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, 16680

Email: Tirtasetiawan@apps.ipb.ac.id¹, ami_icha@yahoo.com^{1,2}, sumaryada@gmail.com^{2,3}

ABSTRAK: DNA topoisomerase II (Top2) adalah enzim penting yang menangani permasalahan topologi pada DNA. Terdapat dua jenis Top2 pada manusia yaitu Top2A dan Top2B. Top2A diekspresikan pada sel yang aktif membelah seperti sel kanker sedangkan Top2B diekspresikan saat sel dalam fase istirahat. Peran penting inilah yang membuat DNA Top2A menjadi target obat melawan kanker salah satunya obat etoposite. Sisi aktif pengikatan etoposite terhadap Top2B sudah dilakukan namun pada Top2A belum dilakukan. Studi pencarian area yang rapat dengan pensejajaran banyak sekuen pada Top2A dengan Top2B sebagai acuan bertujuan untuk pencarian sisi aktif pengikatan etoposite pada Top2A. Area yang rapat dengan kesamaan residu asam amino yang tinggi dapat digunakan untuk memprediksikan fungsi penting asam amino dalam enzim tersebut. Top2A dan Top2B memiliki kesamaan asam amino sebesar 80% dengan kesamaan struktur 71.81%. Asam amino aktif pengikatan etoposite pada Top2B Gly⁴⁷⁸, Asp⁴⁷⁹, Arg⁵⁰³, Met⁷⁸² dan Gln⁷⁷⁸, dinyatakan mirip dan rapat terhadap residu Gly⁴⁶², Asp⁴⁶³, Arg⁴⁸⁷, Met⁷⁶³ pada Top2A kecuali residu Gln⁷⁷⁸ dari Top2B namun penggantian ini tidak merubah struktur dari enzim tersebut karena sama-sama membentuk struktur alfa-heliks dan terletak pada posisi yang sama sehingga diprediksikan sisi aktif pengikatan etoposite pada enzim Top2B yaitu Gly⁴⁷⁸, Asp⁴⁷⁹, Arg⁵⁰³, Met⁷⁸² dan Gln⁷⁷⁸ memiliki fungsi yang sama dengan residu Gly⁴⁶², Asp⁴⁶³, Arg⁴⁸⁷, Met⁷⁶³ dan Met⁷⁶⁷ dari Top2A. Hal ini menyebabkan etoposite juga dapat menghambat kerja enzim Top2A pada residu yang sama.

Keyword: DNA topoisomerase, area yang rapat, Pensejajaran banyak sekuen.

ABSTRACT: DNA topoisomerase II (Top2) is essential enzyme that solves the topological problems of DNA. Top2A and Top2B are two kind of Top2 in human. Top2A is expressed at differentiation active cells as cancer cells whereas Top2B is expressed at non differentiation cells or quiescent cells. Their critical role makes Top2B an attractive drug target against cancer as etoposite known as Top2 inhibitor. Active site for etoposite binding domain to Top2B has been done but in Top2A has not been done yet. Conserve region study by multiple sequence alignment between Top2A and Top2B as Top2B to be a template was aimed to search an active site for etoposite binding domain in Top2A. A conserve amino acid area with highest similarity was

used to predict essential amino acid activity in the enzyme. Homology study shows that Top2A and Top2B have the same similarity of amino acids of 80% with structure similarity of 71.81%. Active amino acids on Top2B for etoposide binding domain such as Gly⁴⁷⁸, Asp⁴⁷⁹, Arg⁵⁰³, Met⁷⁸² dan Gln⁷⁷⁸ were found to be highly conserve with amino acid Gly⁴⁶², Asp⁴⁶³, Arg⁴⁸⁷, Met⁷⁶³ on Top2A except Gln⁷⁷⁸ from Top2B but this does not change of structure of the enzyme because they have the same alfa-helix formations and positions so that it could be predicted that amino acids Gly⁴⁷⁸, Asp⁴⁷⁹, Arg⁵⁰³, Met⁷⁸² and Gln⁷⁷⁸ on Top2B have similar activity and function with Gly⁴⁶², Asp⁴⁶³, Arg⁴⁸⁷, Met⁷⁶³ and Met⁷⁶⁷ on Top2A. This etoposide could inhibit the activity of the Top2A enzyme at same site.

Keyword: DNA topoisomerase, Conserve region, Multiple sequence alignment

1. PENDAHULUAN

Enzim Topoisomerase adalah enzim yang mampu memodifikasi topologi DNA dan berperan aktif dalam proses replikasi, transkripsi dan segregasi kromosom [1]. Sel manusia memiliki dua anggota keluarga Topoisomerase yaitu: Top1 dan Top2. Ada dua isoform Top2 yaitu Top2A dan Top2B. Sehubungan dengan fungsinya pada pembelahan sel, ekspresi Top2A berkaitan erat dengan proliferasi sel. Ekspresi Top2A sedikit pada fase G1, meningkat pada fase S dan fase G2/M, sedangkan ekspresi Top2B relatif konstan selama siklus sel. Top2A khusus diekspresikan pada sel yang sedang berproliferasi dan Top2B pada sel yang tidak berproliferasi atau istirahat [2,3].

Enzim Top2 membutuhkan dua ATP untuk berkerja, sehingga memiliki bagian ATP *binding* domain. Berdasarkan aktivitasnya enzim ini memiliki sisi katalitik Tyr yang bertugas memotong dan menyambungkan kembali ikatan fosfodiester utas DNA. Selain itu dalam beberapa penelitian, telah dikembangkan beberapa jenis obat yang menargetkan enzim topoisomerase 2 untuk menekan laju proliferasi sel-sel kanker. Mekanisme penghambatannya dibagi dalam dua kategori aktivitas, pertama menyerang domain N-terminal ATPase [4,5]

dan mencegahnya untuk beraktivitas dan meracuni Top2 sehingga menginduksi pemotongan dan mencegah penyambungan kembali DNA [6,7,8].

Etoposide adalah salah satu obat golongan antrasiklin yang berkerja menghambat enzim Top2 dengan kategori aktivitas meracuni Top2. Studi mengenai penggunaannya dapat menghambat kedua jenis enzim Top2 masih belum banyak dilakukan. Walaupun enzim topoisomerase 2A dan 2B merupakan isozim dan mempunyai fungsi spesifik yang sama, namun kedua diekspresikan pada waktu yang berbeda. Pemetaan posisi dan struktur 3D dengan Xray kompleks Top 2B dengan etoposide (PDB ID: 3QX3) telah dilakukan oleh Wu [9] sehingga sudah diketahui *binding domain* Top 2B dengan etoposide namun untuk Top 2A belum diketahui. Enzim Top 2A lebih banyak diekspresikan pada sel-sel kanker yang aktif membelah. Sel mcf-7 diketahui mengekspresikan enzim Top 2A yang sangat tinggi [10]. Setiap aktifitas tersebut pasti disebabkan oleh adanya peran beberapa residu yang rapat (*conserved*) pada enzim tersebut yang tentunya penting dan selalu dipertahankan keberadaannya agar tidak hilang atau termutasi. Berubahnya salah residu ini akan mengakibatkan enzim kehilangan aktivitasnya [11]. Untuk mengetahui residu

asam amino yang berinteraksi dengan etoposite pada Top 2A perlu dilakukan analisis lebih lanjut pada kedua enzim.

Bioinformatika atau *in silico* memiliki potensi yang besar untuk menganalisa dan memprediksikan proses biokimia terutama sekali untuk menentukan hubungan antara struktur dan fungsi biomolekul. Dengan bioinformatika, hubungan residu terhadap struktur dan fungsi dapat diketahui lebih mendalam salah satunya adalah metode homologi protein dan *multiple alignment* untuk melihat daerah yang *conserved*. *Conserved region* dapat digunakan untuk melihat hubungan evolusi antar sekuen, melihat area berulang pada sekuen yang berbeda dapat diprediksikan memiliki struktur yang mirip, jika pada DNA dapat digunakan untuk mencari sekuen regulator dan dapat digunakan untuk menyusun *probe* atau primer DNA yang dapat digunakan untuk penelitian biologi molekular seperti PCR [12]. Selain itu urutan asam amino khas yang dipertahankan terhadap proses evolusi menunjukkan bahwa asam amino yang rapat (*conserved*) tersebut memiliki peran penting dan diprediksikan sebagai salah satu sisi aktif [13].

Penelitian ini bertujuan untuk melihat asam amino yang rapat (*conserved*) etoposite *binding* domain pada enzim Top 2A berdasarkan *template* Top 2B yang memiliki kompleks dengan etoposite (3QX3) dengan memanfaatkan metode *multiple sequence alignment* bioinformatika.

2. PERCOBAAN

2.1 Penentuan sekuen protein Top2A dan Top2B

Sekuen protein Top2A dan Top2B diambil dari *protein data bank* (www.rcsb.org/pdb/) kemudian masing di download file berekstensi (.Fasta).

2.2 Homologi protein Top2A dan Top2B

Blast dilakukan dengan metode BLASTp, masing-masing file fasta di proses dalam fasilitas Blast (www.uniprot.org/blast) diatur masing-masing dengan target *database*: UniProtKB, E-Threshold: 10, Matrix: Auto, Filtering : None, Gapped: yes dan Hitts: 50.

2.3 Analisis daerah aktif (*Conserve region*)

Hitts yang tertampil dari hasil masing-masing data BLASTp enzim topoisomerase 2A dan topoisomerase 2B di download dalam bentuk file (.fasta) untuk kemudian digabungkan dalam satu file (.fasta). *Multiple alignment* dilakukan dengan metode ClustalW2 (www.ebi.ac.uk/tools/msa/clustalw2) kemudian diinput file fasta gabungan tadi. File akan diproses 1 x 24 jam. Publikasi struktur X-ray Top2B yang berkompleks dengan etoposite telah dilakukan oleh Wu *et al.* (2011) [9] dan dijadikan *template* untuk melihat asam amino *conserve* yang sama pada Top2A.

Setelah dianalisis *conserved region* untuk *binding* domain etoposite pada Top2A, dilakukan superimpose struktur sekunder 3D tiap-tiap residu dengan menggunakan VMD 1.9.1 berdasarkan *template* Top2B yang memiliki kompleks dengan etoposite, untuk melihat posisi residu tersebut berjauhan atau berdekatan.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Sekuen protein yang digunakan sebagai bahan penelitian adalah sekuen yang berasal dari topoisomerase 2A manusia (Top2A) dengan *template* topoisomerase 2B (Top2B) berkode PDB ID: 3QX3 yang dipublikasi oleh Wu *et al.* (2011) dengan struktur kristal X-ray Top2B berkompleks dengan etoposite. Pemilihan Top2B sebagai *template* dikarenakan enzim ini memiliki kompleks dengan etoposite karena etoposite merupakan obat antikanker yang bekerja

dengan spesifikasi meracuni Top2, membuat DNA dan Top2 tidak dapat lepas, banyak DNA yang tidak tersambung kembali yang berujung kepada kematian sel. Karena kompleks etoposite-DNA-Top2B sudah berhasil dipetakan, residu yang berinteraksi dengan etoposite juga sudah berhasil dipetakan dengan kode 3QX3_A_AC1_10 (gambar 2) yang dinamai sebagai *site record etoposite binding domain* (sisi aktif pengikatan etoposite) pada Top2B dengan residunya yaitu Gly⁴⁷⁸, Asp⁴⁷⁹, Arg⁵⁰³, Met⁷⁸² dan Gln⁷⁷⁸ [14]. Kelima asam amino inilah yang kemudian akan disejajarkan dengan Top2A dari manusia untuk dilihat kerapatan (*conserve*) asam amino.

Conserved region dapat digunakan untuk melihat hubungan evolusi antar sekuen, melihat area berulang pada sekuen yang berbeda dapat diprediksikan memiliki struktur yang mirip, jika pada DNA dapat digunakan untuk mencari sekuen regulator dan dapat digunakan untuk menyusun *probe* atau primer DNA yang dapat digunakan untuk penelitian biologi molekular seperti PCR [12]. Selain itu daerah yang dipertahankan terhadap proses evolusi evolusi dan semua organisme menunjukkan bahwa residu yang *conserved* tersebut memiliki peran penting dan diprediksikan sebagai salah satu sisi aktif [13].

Pemilihan Top2A dikarenakan enzim Top2A khusus diekspresikan pada sel yang sedang berproliferasi dan enzim Top2B pada sel yang tidak berproliferasi atau istirahat (*quiescent*) [2]. Ekspresi enzim Top2A sedikit pada fase G1, meningkat pada fase S dan fase G2/M, sedangkan ekspresi enzim Top2B relatif konstan selama siklus sel. Enzim Top2A ini diketahui memiliki tingkat ekspresi yang tinggi pada sel-sel kanker dan paling tinggi ekspresinya pada kanker Hati (Hep27) dan kanker payudara (mcf-7) [15]. Sel *line* mcf-7 adalah sel yang diisolasi dari jaringan manusia dan tergolong dalam jenis kanker payudara menunjukkan penurunan drastis tingkat ekspresi top2A ketika diberikan

perlakuan etoposite dan doksorubisin [10]. Enzim Top2 ini merupakan target penting obat kemoterapi golongan antrasiklin seperti etoposite dan doksorubisin. *Namundata site record* obat dengan enzim Top2A juga belum ada publikasinya sehingga perlu dilakukan *multiple alignment sequence* dan analisis daerah yang rapat (*conserve region*) untuk memprediksikan sisi aktif pengikatan etoposite.

Hasil BLASTp dengan Top2B berkode 3QX3 sebagai *template* ditemukan 250 hasil dengan rincian sebelas isoform Top2 dari manusia dan lebih dari seratus yang diketahui berasal dari 14 spesies organisme yang berbeda (Tabel 1) dan semuanya adalah isoform Top2B tidak terdapat satupun dari jenis Top2A. Top2B dari 14 organisme tersebut terlihat memiliki homologi yang sangat tinggi sehingga diprediksikan memiliki kesamaan asam amino dan struktur.

Tabel 1. Hasil BLASTp Top2B Bukan Manusia Dengan *Template* Top2B Manusia

Query	Spesies	Homologi %
H2QCW5	<i>Pan troglodytes</i>	99
K7BYJ3	<i>Pan troglodytes</i>	99
G3RAE1	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	99
A0A096P5G9	<i>Papio anubis</i>	99
F7EVK2	<i>Macaca mulatta</i>	99
F7EVJ4	<i>Macaca mulatta</i>	99
H9YVX9	<i>Macaca mulatta</i>	99
G3S3V9	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	99
F6T9B4	<i>Callithrix jacchus</i>	99
F6S0Y0	<i>Callithrix jacchus</i>	99
H2NU77	<i>Pongo abelii</i>	99
O46374	<i>Sus scrofa</i>	98
L9JX05	<i>Tupaia chinensis</i>	98
G1LN78	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	98
G9KUN2	<i>Mustela putorius furo</i>	98
W5PY48	<i>Ovis aries</i>	98
I3NGU9	<i>Spermophilus tridecemlineatus</i>	98
I3M4Z3	<i>Spermophilus tridecemlineatus</i>	98
L8IH03	<i>Bos mutus</i>	98
F1MDU7	<i>Bos taurus</i>	98
H0WJ18	<i>Otolemur garnettii</i>	97

Terdapat sebelas isozim Top2 hasil BLASPP asal manusia (Gambar 1) dengan rincian empat enzim Top2A manusia dengan homologi 80% terhadap *templat*nya Top2B. Sedangkan untuk enzim Top2B ditemukan tujuh dengan homologi diatas 90%. Data ini menunjukkan bahwa antara enzim Top2A dan Top2B memiliki perbedaan banyak asam amino. Untuk melihat seberapa jauh perbedaan dan komposisi asam aminonya dilakukan *multiple alignment sequence* antara Top2A dan Top2B untuk melihat area yang *conserve*. Namun dua data dengan kode Q59480 dan Q6W6M6 tidak dapat dilakukan *alignment* karena *Match Hits* nya berada jauh dari *template* dan akan berakibat menurunkan ketelitian analisis area yang rapat ketikan menggunakan ClustaW [13].

Dari hasil *multiple alignment sequence* dengan menggunakan *template* Top2B didapatkan data bahwa *active site record* etoposite *binding domain* pada Top2B (gambar 3-5) pada residu Gly⁴⁷⁸, Asp⁴⁷⁹, Arg⁵⁰³, Met⁷⁸² dan Gln⁷⁷⁸ [14], *conserve* terhadap residu Gly⁴⁶², Asp⁴⁶³, Arg⁴⁸⁷, Met⁷⁶³ (tanda titik biru diatas menunjukkan asam amino *conserve* terhadap *site record* etoposite untuk Top2B). Namun residu Gln⁷⁷⁸ dari Top2B digantikan dengan oleh residu Met⁷⁶⁷. Namun penggantian ini tidak merubah struktur dari enzim tersebut karena sama-sama membentuk struktur alfa-heliks. Residu yang diblok berwarna pink (Gambar 3-5) menunjukkan residu yang berperan dalam pembentuka struktur alfa-Heliks, warna coklat berperan dalam pembentukan struktur beta.

Selanjutnya adalah *alignment* struktur 3D (*superimpose*) untuk melihat kemiripan bentuk struktur 3D-nya. Pencarian struktur 3D X-ray Top2 pada PDB bank (Tabel 2) didapatkan data bahwa empat enzim Top2A dari hasil BLASTp memiliki struktur 3D Xray pada PDB bank dengan kode PDB 4RIF,

1ZXM, 1ZXN dan 4FM9. Dilihat dari urutan asam aminonya, Top2A berkode 4FM9 satu-satunya yang memiliki kesamaan *match hits*, oleh karena itu digunakan untuk mewakili enzim Top2A untuk dilakukan *alignment* struktur 3D. Sebelum dilakukan *alignment* 3D, dilakukan minimisasi energi (www.zhanglab.org), hal ini bertujuan agar didapatkan konformasi yang paling stabil. Hasil *alignment* struktur 3D didapatkan hasil kecocokan antara Top2A dan Top2B adalah sebesar 71.81 %. Nilai QH menunjukkan keidentikan bentuk struktur sekunder antara kedua protein, nilai QH 0.1-0.3 menunjukkan keidentikan yang sangat jauh, nilai QH = 1 menunjukkan sangat identik, nilai QH untuk Top2A dan B adalah 0.7181 sehingga dikatakan tidak identik namun terlalu tidak jauh berbeda [16,17]. Komposisi asam amino dari kedua enzim (Tabel 3) menunjukkan jumlah yang berbeda-beda namun memiliki persentase komposisi yang tidak jauh berbeda, hal ini menunjukkan bahwa kedua enzim Top2A dan Top2B adalah Isozim.

Untuk melihat letak residu untuk daerah aktif etoposite antara Top2A dan Top2B, maka dilakukan *superimpose* struktur dengan menggunakan VMD 1.9.1 dengan fasilitas *stamp alignment* dan *multySeq* [18]. Kemudian dilakukan visualisasi antara area yang *conserved* pada sisi aktif daerah pengikatan etoposite dari keduanya yaitu pada residu Gly⁴⁷⁸, Asp⁴⁷⁹, Arg⁵⁰³, Met⁷⁸² dan Gln⁷⁷⁸ dari Top2B dan Gly⁴⁶², Asp⁴⁶³, Arg⁴⁸⁷, Met⁷⁶³ dan Met⁷⁶⁷ dari Top2A. Dari hasil visualisasi terlihat bahwa semua residu terletak pada area dan posisi yang sama (Gambar 7).



Gambar 1. Hasil BLASTp Top 2 dengan Top 2B sebagai *template* pada manusia. (tanda bintang memiliki makna telah tersedia PDB file)

3QX3_A_AC1_10 BINDING SITE FOR RESIDUE EVP A 1 (SOFTWARE)

Gambar 2. Site record daerah aktif etoposite *binding* domain pada topoisomerase 2B yaitu Gly⁴⁷⁸, Asp⁴⁷⁹, Arg⁵⁰³, Met⁷⁸² dan Gln⁷⁷⁸ [14].

Q02880-2	TOP2B_HUMAN	813	GKDAASPRYIFTMLSTLARLLFPAVDDNLLKFLYDDNQRVPEWYIPIIPMVLINGAEGI
Q02880	TOP2B_HUMAN	818	GKDAASPRYIFTMLSTLARLLFPAVDDNLLKFLYDDNQRVPEWYIPIIPMVLINGAEGI
B4DKD0	B4DKD0_HUMAN	737	GKDAASPRYIFTMLSTLARLLFPAVDDNLLKFLYDDNQRVPEWYIPIIPMVLINGAEGI
Q71UH4	Q71UH4_HUMAN	790	GKDAASPRYIFTMLSTLARLLFPAVDDNLLKFLYDDNQRVPEWYIPIIPMVLINGAEGI
E9PCY5	E9PCY5_HUMAN	813	GKDAASPRYIFTMLSTLARLLFPAVDDNLLKFLYDDNQRVPEWYIPIIPMVLINGAEGI
P11388-4	TOP2A_HUMAN	878	GKDSASPRYIFTMLSSLARLLFPPKDDHTLKFLYDDNQRVPEWYIPIIPMVLINGAEGI
P11388-3	TOP2A_HUMAN	833	GKDSASPRYIFTMLSSLARLLFPPKDDHTLKFLYDDNQRVPEWYIPIIPMVLINGAEGI
P11388-2	TOP2A_HUMAN	823	GKDSASPRYIFTMLSSLARLLFPPKDDHTLKFLYDDNQRVPEWYIPIIPMVLINGAEGI
P11388	TOP2A_HUMAN	797	GKDSASPRYIFTMLSSLARLLFPPKDDHTLKFLYDDNQRVPEWYIPIIPMVLINGAEGI

Gambar 3. Multiple alignment Tyr antara topoisomerase 2A dan 2B

Q02880-2	TOP2B_HUMAN	453	GIPKDDANDAGGKHSLECTLILTEGDSAKSLAVSGLGVIIGDRYGVFPLRGKILNVREA
Q02880	TOP2B_HUMAN	458	GIPKDDANDAGGKHSLECTLILTEGDSAKSLAVSGLGVIIGDRYGVFPLRGKILNVREA
B4DKD0	B4DKD0_HUMAN	377	GIPKDDANDAGGKHSLECTLILTEGDSAKSLAVSGLGVIIGDRYGVFPLRGKILNVREA
Q71UH4	Q71UH4_HUMAN	430	GIPKDDANDAGGKHSLECTLILTEGDSAKSLAVSGLGVIIGDRYGVFPLRGKILNVREA
E9PCY5	E9PCY5_HUMAN	453	GIPKDDANDAGGKHSLECTLILTEGDSAKSLAVSGLGVIIGDRYGVFPLRGKILNVREA
P11388-4	TOP2A_HUMAN	518	GIPKDDANDAGGRNSTECTLILTEGDSAKTLAVSGLGVVGRDKYGVFPLRGKILNVREA
P11388-3	TOP2A_HUMAN	473	GIPKDDANDAGGRNSTECTLILTEGDSAKTLAVSGLGVVGRDKYGVFPLRGKILNVREA
P11388-2	TOP2A_HUMAN	463	GIPKDDANDAGGRNSTECTLILTEGDSAKTLAVSGLGVVGRDKYGVFPLRGKILNVREA
P11388	TOP2A_HUMAN	437	GIPKDDANDAGGRNSTECTLILTEGDSAKTLAVSGLGVVGRDKYGVFPLRGKILNVREA

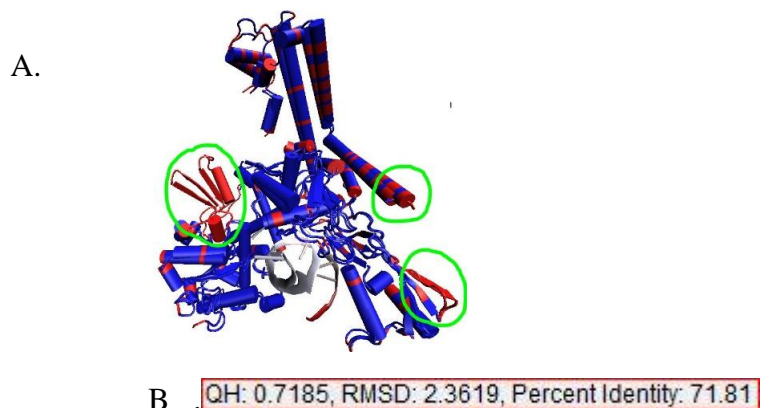
Gambar 4. Multiple alignment residu Gly⁴⁷⁸, Asp⁴⁷⁹, Arg⁵⁰³ antara topoisomerase tipe 2 A dan 2B

Q02880-2	TOP2B_HUMAN	753	NDKREVKVAQLAGSVAEMSA ^Y HHG ^E QALMMTIVNLAQN ^F VGSNNINLLQPIGQFGTRLHG
Q02880	TOP2B_HUMAN	758	NDKREVKVAQLAGSVAEMSA ^Y HHG ^E QALMMTIVNLAQN ^F VGSNNINLLQPIGQFGTRLHG
B4DKD0	B4DKD0_HUMAN	677	NDKREVKVAQLAGSVAEMSA ^Y HHG ^E QALMMTIVNLAQN ^F VGSNNINLLQPIGQFGTRLHG
Q71UH4	Q71UH4_HUMAN	730	NDKREVKVAQLAGSVAEMSA ^Y HHG ^E QALMMTIVNLAQN ^F VGSNNINLLQPIGQFGTRLHG
E9PCY5	E9PCY5_HUMAN	753	NDKREVKVAQLAGSVAEMSA ^Y HHG ^E QALMMTIVNLAQN ^F VGSNNINLLQPIGQFGTRLHG
P11388-4	TOP2A_HUMAN	818	NDKREVKVAQLAGSVAEMSS ^Y HHG ^E MSLMMTIIINLAQN ^F VGSNNINLLQPIGQFGTRLHG
P11388-3	TOP2A_HUMAN	773	NDKREVKVAQLAGSVAEMSS ^Y HHG ^E MSLMMTIIINLAQN ^F VGSNNINLLQPIGQFGTRLHG
P11388-2	TOP2A_HUMAN	763	NDKREVKVAQLAGSVAEMSS ^Y HHG ^E MSLMMTIIINLAQN ^F VGSNNINLLQPIGQFGTRLHG
P11388	TOP2A_HUMAN	737	NDKREVKVAQLAGSVAEMSS ^Y HHG ^E MSLMMTIIINLAQN ^F VGSNNINLLQPIGQFGTRLHG

Gambar 5. Multiple alignment residu Met⁷⁸², dan Gln⁷⁷⁸ antara topoisomerase tipe 2A dan 2B

Tabel 2. Hasil Pencarian Struktur 3D X-Ray Kristal Top2A dan Top2B.

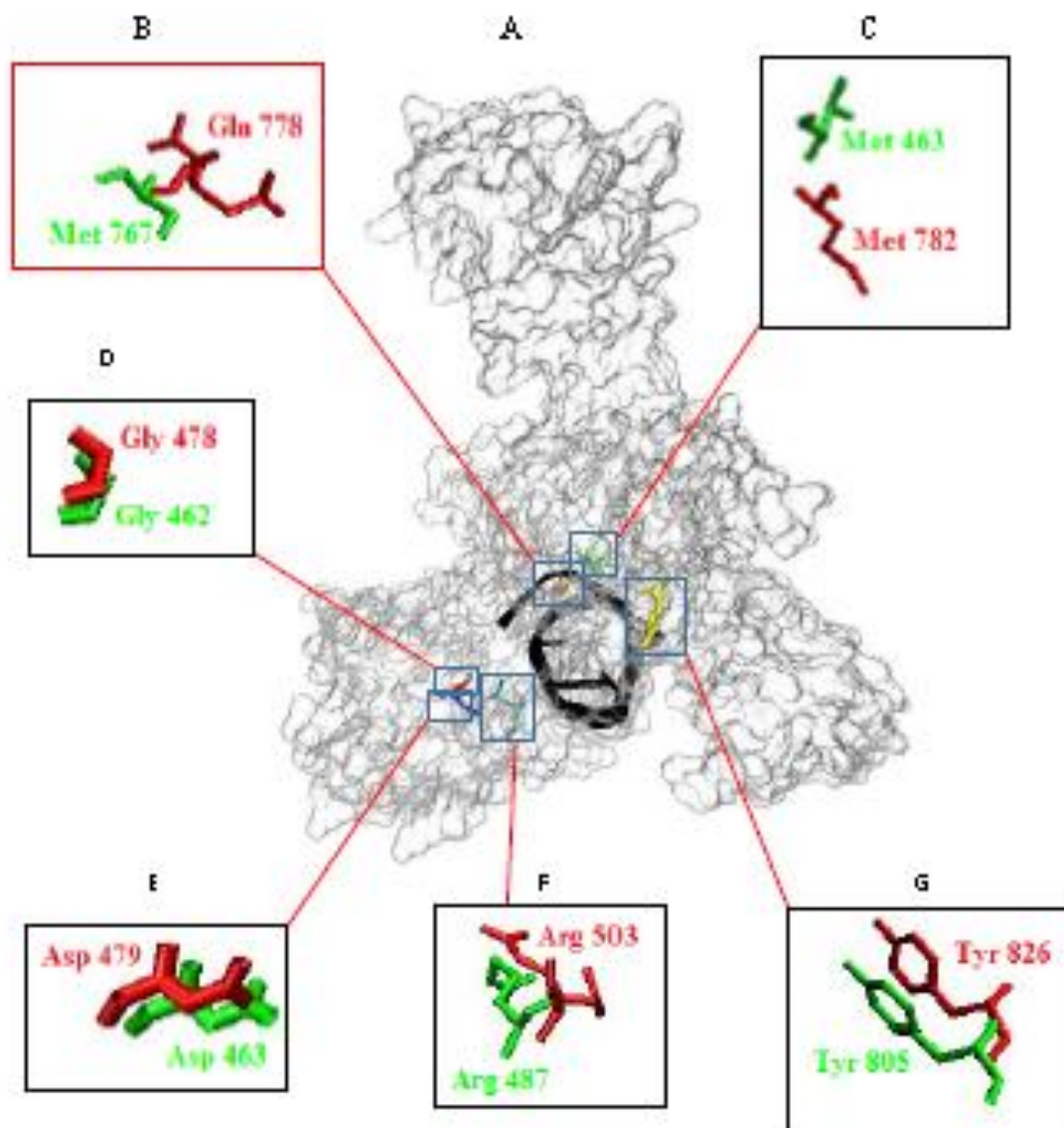
Enzim	Query	PDB	Nomor residu	Kompleks	
				DNA	Ligand
Topoisomerase II A	P11388-4	4RIF	29-428	-	ADP & SO ₄
	P11388-3	1ZXM	29-428	-	AMP-PNP
	P11388-2	1ZXN	29-428	-	ADP
	P11388	4FM9	431-1193	YA	Gliserol
Topoisomerase II B	Q02880	3QX3	459-1206	YA	Etoposite
	Q02880-2	4G0U	450-1212	YA	Amsacrin
	E9PCY5	-	450-1212	YA	Mitosantron
	Q71UH4	-	450-1212	YA	Ametantron



Gambar 6. A) superimpose struktur 3D Top2A dengan *template* Top2B, warna biru (kesamaan residu) dan warna merah (perbedaan residu), B). indeks *alignment* dari *tools* multi sekuen menggunakan VMD 1.8.1. dan lingkaran hijau menandakan perbedaan struktur yang sangat nyata.

Tabel 3. Perbandingan Komposisi Asam Amino Pada 3qx3 (Top2B) Dengan 4fm9 (Top2A).

No	Asam amino	Simbol	Singkatan	Jumlah		Klasifikasi	Persentase (%)	
				3qx3	4fm9		3qx3	4fm9
1	Alanin	Ala	A	49	31			
2	Valin	Val	V	41	37			
3	Leusinsin	Leu	L	76	81	Asam amino		
4	Isoleusin	Ile	I	49	49	dengan		
5	Prolin	Pro	P	30	32	Gugus -R	38.605	38.0079
6	Fenilalanin	Phe	F	33	29	tak mengkutub		
7	Triptofan	Trp	W	12	11			
8	Metionin	Met	M	20	20			
9	Glisin	Gly	G	50	44			
10	Serin	Ser	S	48	44	Asam amino		
11	Treonin	Thr	T	39	43	dengan		
12	Sistein	Cys	C	5	6	Gugus -R	30.012	30.2752
13	Tirosin	Tyr	Y	27	28	mengkutub		
14	Aspargarin	Asn	N	39	40	tak bermuatan		
15	Glutamin	Gln	Q	33	26			
16	Asam aspartat	Asp	D	55	47	Asam amino	14.446	15.3342
17	Asam glutamat	Glu	E	61	70	R Negatif		
18	Lisin	Lys	K	72	74	Asam amino		
19	Arginin	Arg	R	35	36	Basa	16.936	16.3827
20	Histidin	His	H	29	15			
Total Asam amino				803	763			



Gambar 7. A) *superimpose* Top2A dan B (subunit A), B) Met⁷⁸², C) Gln⁷⁷⁸, D) Gly⁴⁷⁸, E) Asp⁴⁷⁹, F) Arg⁵⁰³ dan G) Tyr⁸²⁶.

Selain sisi aktif untuk pengikatan etoposite, enzim Top2 juga memiliki daerah aktif yang berfungsi memotong ikatan fosfodiester utas DNA yang dilakukan oleh residu Tyr⁸²⁶ (Wu *et al.* 2011) pada top2B, dan dari hasil *multiple alignment sequence, conserve region* serta visualisasi, Top2A juga memiliki residu Tyr⁸⁰⁵ yang *conserve* terhadap

residu Tyr⁸²⁶ pada Top2B (Gambar 3) dengan posisi yang sama (Gambar7). Dari penelitian ini maka dapat dikatakan bahwa sisi aktif pengikatan etoposite pada enzim Top2B yaitu Gly⁴⁷⁸, Asp⁴⁷⁹, Arg⁵⁰³, Met⁷⁸² dan Gln⁷⁷⁸ diprediksikan memiliki fungsi yang sama dengan residu Gly⁴⁶², Asp⁴⁶³, Arg⁴⁸⁷, Met⁷⁶³ dan Met⁷⁶⁷ dari Top2A. Sehingga

etoposite juga dapat menghambat kerja enzim Top2A pada residu yang sama.

4. UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kepada kepala laboratorium Mikrobiologi PSSP (pusat studi satwa primata), seluruh staf pengajar Departemen Biokimia MIPA IPB dan komunitas online *Research gate* yang telah memberikan solusi pada forum tanya jawabnya.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Nitis JL, Beck WT. 1996, "Antitopoisomerase drug action and resistance", *Eur J Cancer*. 10: 68-75.
- [2] Fry AM, Chresta CM, Davies SM. 1991, "Relationship between topoisomerase II level and chemosensitivity in human tumor cell lines", *Cancer Res*. 51: 6592-6595.
- [3] Bauman ME, Holden JA, Brown KA, Harker WG, Perkins SR. 1997, "Differential immunohistochemical staining for DNA topoisomerase IIA and B in human tissue and for DNA topoisomerase IIB in non Hodgkin lymphoma", *Mod Pathol*. 10: 168-175.
- [4] Baird CL, Gordon MS, Andrenyak DM, Marecek JF, Lindsley JE. 2001, "The ATPase reaction cycle of yeast DNA topoisomerase II: slow rates of ATP resynthesis and Pi release", *J Biol Chem*. 276: 27893-27898.
- [5] Robinson HM, Bratlie-Thoresen S, Brown R, Gillespie DA. 2007, "Chk1 is required for G2/M check-point response induced by the catalytic topoisomerase II inhibitor ICRF-193", *Cell Cycle*. 6: 1265-1267.
- [6] Chow KC, Macdonald TL, Ross WE. 1998, "DNA binding by epipodophylotoxins and N-acyl antracyclines: Implications for mechanism of topoisomerase inhibition", *Mol. Pharmacol*. 34: 467-473.
- [7] Osheroff N. 1989, "Effect of antineoplastic agent on the DNA cleavage/religation equilibrium of eukaryotic topoisomerase II: inhibition of DNA religation by etoposide", *Biochemistry*. 28: 6157-6160.
- [8] Beck LS, Deguzman L, Lee WP, Xu Y, Siegel MW, Amento EP. 1993, "One systemic administration of transforming growth factor-beta 1 reverses age or glucocorticoid impaired wound healing", *J Clin Invest*. 92: 2841-2849.
- [9] Wu CC, Li TK, Far HL, Lin LY, Lin TS, YU YJ, Ten TJ, Chiang CW, Chan NL. 2011, "Structural basis of type II topoisomerase inhibition by the anticancer drug etoposide", *J science*. 333: 459-462.
- [10] Kaplan E, Gunduz U. 2011, "Expression analysis of TOP2A, MSH2 and MLH1 genes in MCF7 cells at different levels of etoposide resistance", *Eur J Pharm*. 66: 29-35.
- [11] Nelson D, Cox M. 2008. *Principle of Biochemistry (5th Edn.)*. W.H. freeman and company, USA. ISBN-13: 978-0-7176-7108-1.
- [12] Mount DW. 2004. *Bioinformatics sequences and genome analysis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- [13] Baxevanis AD, Ouellette BF. 2001. *Bioinformatics A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins Second Edition*. 1-457.
- [14] Golovin A, Dimitropoulos D, Oldfield T, Rachedi A, Henrick K. 2005. MSDsite: a data base search and retrieval system for the analysis and viewing of bound ligands and active site. *Protein*. 58: 190-199.

- [15] AbuHammad S, Zihlif M. 2012, "Gene expression alteration in doxorubicin resistant MCF-7 breast cancer cell line", *Genomic*. 101: 213-220.
- [16] Thompson JD. 1994, "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice", *Nucleic Acids Res*. 22: 4673-4680.
- [17] Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettingan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. 2007, clustal w and clustal x version 2.0. *Bioinformatic*. 23: 2947-2948.
- [18] Russell RB, Breed J, Barton GJ. 1992, "Conservation analysis and secondary structure prediction of the sh2 family of phosphotyrosine binding domains", *Proteins: Struct., Funct., Genet*. 304, 15-20.