

Konstruksi Protein *Transcription Activator-Like Effector* (TALE) 1 dan 2 dengan Target Sekuen DNA strain HPV Tipe 16 dan 18

Agatha Mia Puspitasari¹⁾, Widodo²⁾

^{1), 2)} Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya. 2015.

Email : agathamia93@gmail.com¹⁾, widodo@ub.ac.id²⁾

ABSTRAK

Kanker serviks dapat disebabkan oleh infeksi virus HPV tipe 16 dan 18 namun dapat dihindari dengan melakukan deteksi awal atau *screening* pada wanita. Penelitian ini bertujuan untuk mendesain protein *Transcription Activator-Like Effector* (TALE) sebagai detektor dari HPV 16 dan 18 dengan cara mencari sekuen target DNA HPV 16 dan 18 beserta konstruksi protein TALE tersebut. Metode yang dilakukan adalah analisa sekuen target HPV 16 dan 18 dengan *software* MEGA, konstruksi protein TALE pada plasmid pSB1C3, PCR, *Golden Gate Cloning*, dan elektroforesis. TALE yang dikonstruksi adalah 2 macam protein TALE, yaitu TALE 1 dan TALE 2, yang memiliki susunan basa DNA yang berbeda. Konstruksi TALE dilakukan dengan *Golden Gate Cloning* menggunakan *GATE Assembly Kit*. Sekuen target DNA diperoleh dari hasil *alignment software* MEGA yang terdiri dari 14 bp pada masing-masing TALE dengan Timin (T) pada ujung-ujung sekuen. Kemudian konstruksi TALE diperoleh dari tim Freiburg yang memiliki 6 bagian yang dapat mengkode protein TALE. Hasil yang didapatkan dari konstruksi adalah pita DNA sebesar 3kbp pada gel agarosa melalui elektroforesis.

Kata kunci: HPV 16, HPV 18, kloning, TALE 1, TALE 2

ABSTRACT

Cervical cancer is caused by infection of HPV types 16 and 18. However, it could be prevent by screening and early detection. This research was aimed to design a Transcription Activator-Like Effector (TALE) protein as a detector for HPV 16 and 18 by screened for specific DNA target sequences. DNA target of HPV types 16 and 18 was analyzed by MEGA 5.1 software, pSB1C3 plasmid was used for TALE constructing protein followed by PCR analysis, Golden Gate Cloning using GATE Assembly Kit, and agarose gel electrophoresis. Constructed two TALE protein were TALE 1 & TALE 2 which contained different spesific target sequences. DNA target sequences of HPV types 16 and 18 were obtained by DNA alignment using MEGA 5.1 software resulting 14 bp for each TALEs contained timine (T) in each target sequences. Then the TALE construction were acquired from Freiburg team that had 6 parts, coding sequences for building the TALE protein. The result from TALE protein construction was showed by several bands emerged in electrophoresis gel agarose in 3 kbp.

Key words: Cloning, HPV 16, HPV 18, TALE 1, TALE 2

PENDAHULUAN

Kanker serviks menduduki peringkat 2 sebagai penyakit kanker yang paling sering terjadi pada wanita di Indonesia, khususnya kisaran umur 15 sampai 44 tahun [1]. Kanker serviks dapat dihindari dengan melakukan deteksi awal atau *screening* pada wanita yang belum mengalami gejala awal terbentuknya sel

kanker serviks. Proses deteksi *Pap smear* menghabiskan biaya yang cukup mahal dan tidak nyaman pada pasien karena dapat terjadi pendarahan saat pengambilan sel di mulut rahim [2].

Oleh karena itu diperlukan satu teknik yang praktis, nyaman, dan memiliki akurasi tinggi, yaitu teknik pengenalan spesifik sekuens DNA strain HPV tipe 16 dan 18 untuk

mendeteksi kanker serviks. Kemampuan suatu protein efektor agar dapat menarget secara spesifik pada sekuen DNA tertentu merupakan suatu permasalahan yang harus diteliti lebih lanjut [3]. TALE atau *Transcription Activator-Like Effectors* merupakan protein efektor bakteri *Xanthomonas sp.* untuk modulasi transkripsi gen pada tumbuhan inang untuk membantu kolonisasi dari bakteri [4]. Daerah sentral atau tengah pada protein terdiri dari 34 pasang sekuen asam amino yang dibutuhkan untuk mengenali DNA tertentu dan kemudian berikatan [5]. Sekuens DNA HPV tipe 16 dan 18 dapat digunakan sebagai DNA target yang dapat berikatan dengan TALE. Menurut Gau [6], TALE dapat digunakan sebagai salah satu alat bioteknologi untuk berikatan dengan sekuen DNA target tertentu. Berdasarkan beberapa teori dasar diatas, dapat disimpulkan bahwa diperlukan suatu deteksi dini untuk kanker serviks dengan penggunaan protein TALE dimana protein ini dapat berikatan secara spesifik pada sekuen target DNA pada HPV tipe 16 dan 18. Hal ini menunjukkan pentingnya konstruksi atau pembuatan TALE yang selanjutnya dapat menjadi referensi untuk alat deteksi kanker serviks dengan cara sintetik biologi.

METODE PENELITIAN

Sekuen target DNA dari strain HPV 16 dan 18. Sekuen target yang digunakan adalah sekuen DNA dari strain HPV tipe 16 dan 18. Sekuen yang dipilih adalah *whole genome* dari kedua tipe tersebut. Kemudian dilakukan *alignment* pada kedua sekuen tersebut. Setelah itu dilakukan analisis dimana dicari 14 basa yang sama yang terdapat pada kedua sekuen HPV 16 dan 18. Ketentuan dari 14 basa ini adalah harus memiliki timin atau T di ujung – ujung basanya. Kemudian 14 basa pertama yang ditemukan akan disebut sebagai TALE 1 dan 14 basa selanjutnya adalah TALE 2.

Desain TALE 1 dan TALE 2 dari Biobrick part dan GATE Assembly Kit. Setelah mendapatkan 2 target sekuen yang disebut TALE 1 dan TALE 2, dilakukan konstruksi plasmid yang dapat berikatan dengan kedua sekuen target tersebut. Pada 14 basa yang telah ditentukan, akan dicari kode *Biobrick part* yang diperoleh dari DNA *Distribution kit* dengan 96-well, iGEM. Pada 14 basa tersebut akan dibagi menjadi 6 pos atau 6 bagian.

Setelah itu dicari enzim restriksi yang akan digunakan untuk pembuatan TALE 1 dan TALE 2. *Part* ini berbentuk plasmid dan *coding sequence*, sehingga perlu dipotong dengan *EcoRI* atau *XbaI* dan *SpeI* atau *PstI* sebelum digunakan untuk rekonstruksi plasmid TALE 1 dan TALE 2. Selain itu, *part-part* tersebut juga dapat diperoleh dari *GATE Assembly Kit* yang memiliki 96-well plate berisi plasmid-plasmid yang mengkode dua basa sekuen target DNA HPV 16 dan 18. Metode yang digunakan pada konstruksi TALE ini adalah *Golden Gate Cloning*.

Golden Gate Cloning. *Part - part* yang terdapat pada *GATE Assembly Kit* dikloning dengan metode *one single restriction-digestion (Golden Gate Cloning)* menggunakan PCR. Pada PCR tube dimasukkan keenam plasmid masing-masing 1 µl, *expression vector* atau *plasmid backbone*, yaitu pSB1C3 sebanyak 1 µl, T4 ligase buffer (10x) 2 µl, T4 ligase (60 U) 1 µl, enzim *EcoRI* 1,5 µl, dan dH₂O sebanyak 8,5 µl sehingga total larutan yang terdapat pada PCR tube mencapai 20 µl. Program siklus PCR adalah sebagai berikut:

Tabel 1. Program PCR

Siklus	Temperatur, Waktu
1-13	37 ⁰ C, 5 menit 20 ⁰ C, 5 menit
14	50 ⁰ C, 10 menit
15	80 ⁰ C, 10 menit

Transformasi. Sel bakteri *Eschericia coli* strain DH5α diambil dan diletakkan pada es 4⁰C, kemudian diambil 50 µl dan ditambahkan 1 µl plasmid, di mix gentle. Kemudian diletakkan dalam es selama 5-10 menit. Setelah itu dimasukkan waterbath 42⁰C selama 2 menit. Disimpan dalam es selama 1 menit kemudian diletakkan pada suhu ruang 2-3 menit. Ditambah media SOC cair 200 µl, lalu diaklimatisasi (heat & shaker) pada suhu 37⁰C, 250 rpm selama 24 jam.

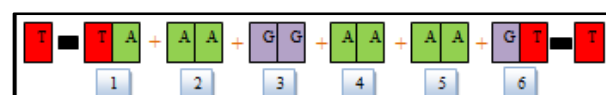
HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisa Sekuen Target DNA HPV 16 dan 18. Pencarian sekuen target HPV ini dipilih dari *whole genome* yang sudah dilakukan *alignment* dengan software MEGA 5.1. Sekuen yang telah *dialignment* kemudian dicari 14 basa yang sama dengan basa Timin

atau T pada kedua ujungnya. Terdapat 2 letak sekuen target yaitu di bagian kiri dan kanan yang disebut sebagai TALE 1 dan TALE 2 berturut-turut. TALE 1 ditemukan pada hasil *alignment* basa ke 7106 hingga 7119, sedangkan TALE 2 dari basa ke 7851 hingga 7864. TALE 1 memiliki urutan target sekuen sebagai berikut: TTAAAGGAAAAGTT. Sedangkan TALE 2 memiliki urutan target sekuen sebagai berikut: TTAGGCACATATTT. Pemilihan target sekuen didasarkan pada daerah *conserve* dimana sekuen tersebut dimiliki oleh *whole genome strain* HPV tipe 16 dan 18.

Penggabungan monomer dari domain ikatan DNA dapat disisipkan ke dalam vektor kloning dari faktor transkripsi TALE (TAL-TF) atau TAL efektor nuklease (TALEN) dalam konstruksi protein TALE. Efisiensi dari faktor transkripsi TAL (TAL-TF) dan TAL efektor nuklease (TALEN) tetap dalam keadaan yang konstan apabila sekuen target terdiri dari 13 dan 20 bp [7]. Hal ini menunjukkan bahwa untuk mengkonstruksi suatu TALE dibutuhkan sekitar 13 hingga 20 bp pada sekuen targetnya.

Desain Rekombinan Protein TALE 1 dan TALE 2 dengan Plasmid pSB1C3. Pada prinsipnya, 14 basa sekuen target yang sudah ditemukan kemudian dibagi menjadi 6 pos tanpa mencakup ujung-ujung timin. Sehingga pada TALE 1 akan didapatkan desain seperti dibawah ini:



Gambar 1. Desain TALE 1

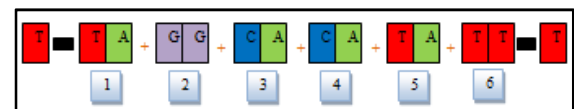
Pada gambar diatas terlihat nomor 1 hingga nomor 6 yang merupakan pos-pos dimana pada setiap nomor akan dibentuk oleh satu part yang spesifik. Jadi singkatnya, setiap dua kode basa pada tiap-tiap pos akan diikat oleh protein yang terdapat pada satu *part* yang spesifik. Part-part ini sudah didesain spesifik untuk mengikat dua basa pada sekuen target. Setiap dua basa pada sekuen target akan dikode oleh *part direpeat* tertentu yang spesifik. Setiap sekuen target yang telah diperoleh memiliki 6 pos yang berisi 2 basa pada setiap posnya. Setiap pos akan dikode dengan satu macam *direpeat* yang spesifik. Pada penelitian ini digunakan dua sumber

direpeat, yaitu *GATE Assembly Kit* dari tim Freiburg dan *DNA Distribution Kit* dari iGEM. Berikut adalah daftar part yang digunakan untuk konstruksi protein TALE 1:

Tabel 2. Kode *part* yang digunakan dalam konstruksi TALE 1

Pos ke-	Kode <i>Biobricks</i>	Letak di DNA <i>Distribution Kit</i>	Letak di GATE <i>Assembly Kit</i>
1	BBa_K747012	4I	1E
2	BBa_K747016	6A	3A
3	BBa_K747042	12E	6G
4	BBa_K747048	14A	7A
5	BBa_K747064	18A	9A
6	BBa_K747091	24G	12H

Keenam part yang terletak di *GATE Assembly Kit* diatas kemudian akan digabung pada satu vektor atau *plasmid backbone*, yaitu pSB1C3 dengan metode *Golden Gate Cloning*. Pada penelitian ini digunakan dua sumber yang berbeda karena dari *DNA Distribution Kit* ditujukan untuk analisa ukuran *coding sequence* yang digunakan untuk konstruksi protein TALE. Sedangkan *part* dari *GATE Assembly Kit* digunakan untuk konstruksi protein TALE 1 dan TALE 2. Sedangkan berikut adalah desain dari TALE 2:



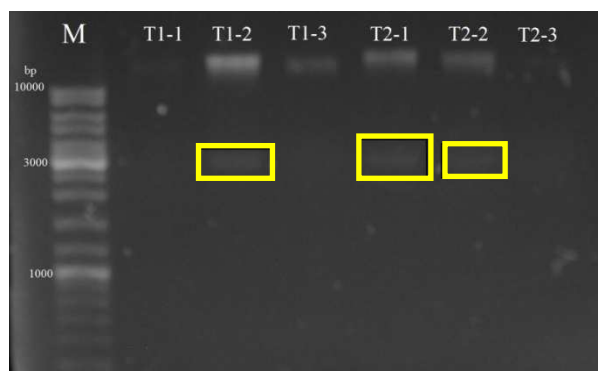
Gambar 2. Desain TALE 2

Tabel 3. Kode *part* yang digunakan dalam konstruksi TALE 2

Pos ke-	Kode <i>Biobricks</i>	Letak di DNA <i>Distribution Kit</i>	Letak di GATE <i>Assembly Kit</i>
1	BBa_K747012	4I	1E
2	BBa_K747026	8E	4G
3	BBa_K747036	10I	6A
4	BBa_K747052	14I	8A
5	BBa_K747076	20I	9E
6	BBa_K747095	9	11H

Hasil Konstruksi TALE 1 dan TALE 2. Pada masing-masing TALE akan dikonstruksi dengan keenam jenis *part* yang sudah ditentukan sebelumnya, *EcoRI*, dan pSB1C3

sebagai *plasmid backbone*. Berikut adalah hasil dari konstruksi TALE 1 dan TALE 2:



Gambar 3. Hasil konstruksi TALE 1 (T1-1; T1-2; T1-3) dan TALE 2 (T2-1; T2-2; T2-3) dengan masing-masing 3 perulangan

Berdasarkan teori, jumlah total ukuran masing-masing part yang memiliki satu *coding sequence* adalah sekitar 2070 bp. Sedangkan TALE memiliki 6 *coding sequence* dimana masing-masing *coding sequence* tersebut berukuran 220 bp. Sehingga apabila dijumlahkan, TALE memiliki kurang lebih 3000 bp dimana pada gambar 16 terlihat adanya pita pada T1-2; T2-1; dan T2-2 pada marker 3000 bp. Hal ini menunjukkan keberhasilan konstruksi dari TALE 1 dan TALE 2 meskipun hanya terlihat pita tipis pada marker 3 kbp.

Konstruksi TALE menggunakan metode *assembly* dari *Golden Gate Cloning* dimana pada metodenya terdapat tahapan pemotongan dan penggabungan atau ligasi secara langsung dalam satu PCR. *Golden Gate Cloning* merupakan suatu metode *one single restriction-ligation reaction* yang dapat menggabungkan banyak *fragment-fragment* sekuen dalam satu *vector* atau *plasmid backbone* dengan efisiensi yang tinggi dan hanya dalam satu reaksi [8].

KESIMPULAN

Konstruksi dari protein TALE 1 dan 2 dapat diperoleh dari penggabungan 6 *part* pada masing-masing TALE menggunakan *GATE Assembly Kit* dengan metode *Golden Gate Cloning*. Hasil dari konstruksi TALE 1 dan 2 adalah adanya pita DNA sebesar 3kbp pada gel agarosa melalui elektroforesis.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini didukung oleh tim iGEM 2014 dan Bpk. Widodo, S.Si., M.Si., Ph.D.Med.Sc. selaku dosen pembimbing.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Sherris, Jacqueline, Cristina Herdman, dan Christopher Elias. 2001. Beyond Our Borders: Cervical Cancer in the developing world. *West J Med* 175:231-233.
- [2] Singh S, Badaya S .2012. Factors Influencing uptake of Cervical Cancer Screening among Women in India: A Hospital based Pilot Study. *J Community Med Health Educ* 2:157.
- [3] Scott, James N. F., Adam P. Kupinski, dan Joan Boyes. 2014. Targeted genome regulation and modification using transcription activator-like effectors. *FEBS Journal* 281: 4583-4597.
- [4] Boch J., Bonas U. 2010. Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu Rev Phytopathol*; 48:419-436.
- [5] Kay S, Hahn S, Marois E, Wieduwild R, Bonas U. 2009. Detailed analysis of the DNA recognition motifs of the Xanthomonas type III effectors AvrBs3 and AvrBs3Deltarep16. *Plant J*. 59:859-871.
- [6] Gau J, Wolf A, Reschke M, Bonas U, Posch S, et al. 2013. Computational Predictions Provide Insights into the Biology of TAL Effector Target Sites. *PloS Comput Biol* 9(3): e1002962.
- [7] Boch J., Heidi Scholze, Sebastian Scchornack, Angelika Landgaf, Simone Hahn, Sabine Kay, Thomas Lahaye, Anja Nickstadt, Ulla Bonas. 2009. Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science* 326, 1509.
- [8] Werner Stefan, Carola Engler, Ernst Weber, Ramona Guetzner & Sylvestre Marillonnet. 2012. Fast track assembly of multigene constructs using Golden Gate cloning and the MoClo system, *Bioengineered*, 3:1, 38-43.