

## **Analisis Bioinformatika Terhadap Gen TP53 (Tumor Protein 53) Tumor Suppressor pada Kanker Payudara**

**Ida Susanti**

PTA - Deputi Teknologi Agroindustri dan Biomedika, BPPT

### **Abstrak**

Penyakit kanker payudara merupakan penyakit kanker yang prevalensinya cukup tinggi di dunia, bahkan di Indonesia jumlah penderita kanker payudara meningkat setiap tahunnya. Penyakit kanker disebabkan oleh multifaktor, salah satunya yaitu karena kegagalan fungsi TP53 yang berperan sebagai tumor suppressor sehingga menyebabkan proliferasi sel-sel yang tidak terkontrol. Sebagian besar kasus penyakit kanker pada manusia disebabkan oleh mutasi pada gen TP53. Menurut American Cancer Society, sekitar 25% dari kasus baru penyakit kanker yang terdiagnosa di dunia, merupakan penyakit kanker payudara. Sebanyak 25 - 50% kasus penyakit kanker payudara disebabkan oleh mutasi pada gen TP53. Dalam artikel ini dilakukan analisis bioinformatika gen TP53 pada manusia serta mutasinya yaitu TP53 Pro151Ser yang menyebabkan penyakit kanker payudara. Analisis yang dilakukan meliputi analisis komposisi, struktur sekunder, analisis 3D dan topologi protein TP53 pada gen asli dan mutannya. Hasil analisis menunjukkan bahwa mutasi SNP terjadi pada bagian coil, pada permukaan protein. Mutasi SNP rs28934874 Pro151Ser mengubah sebagian sifat umum protein, tetapi tidak mengubah topologi protein. Mutasi sedikit mengubah struktur protein mutan, namun tidak mengubah struktur 3D protein p53. Varian Pro151Ser (rs28934874) berasosiasi dengan resiko terjadinya penyakit kanker payudara, serta berperan penting dalam etiologi dan patofisiologi penyakit tersebut. Proses mutasi mengganggu proses signaling sehingga menghilangkan aktivitas p53.

**Kata kunci:** gen TP53, kanker payudara, bioinformatika, SNP, tumor suppressor

## **Bioinformatic Analysis of TP53 (Tumor Protein 53) Gene, a Tumor Suppressor in Breast Cancer**

### **Abstract**

Breast cancer has a high prevalence in the world, even in Indonesia the number of breast cancer patient increases every year. Cancer are caused by multifactors, one of which is the failure of TP53 which function as a tumor suppressor that causes uncontrolled proliferation of cells. Most of cancer in humans are caused by mutations in the TP53 gene. According to the American Cancer Society, about 25 % of new cases of cancer diagnosed in the world are breast cancer. As many as 25-50% of of breast cancer are caused by mutations in TP53 gene. In this article, bioinformatics analysis of the TP53 gene and the mutant TP53 Pro151Ser which causes breast cancer, was carried out, The analysis carried out included composition analysis, secondary structure, 3D analysis and TP53 protein topology on native genes and mutants. The results of the analysis show that SNP mutations occurred in the coil section, on the surface of the protein. SNP mutations rs28934874 Pro151Ser changes some of the general properties of proteins, but does not alter the protein topology. Mutations slightly change the structure of mutant proteins, but do not change the 3D structure of p53 proteins. The Pro151Ser variant (rs28934874) is associated with the risk of breast cancer, and plays an important role in the etiology and pathophysiology of the disease. Mutation had interfere the signaling process thereby eliminating p53 activity.

**Keywords:** gene TP53, breast cancer, bioinformatic, SNP, tumor suppressor

IS: Penulis Koresponden; E-mail: [bessa27@yahoo.com](mailto:bessa27@yahoo.com)

## Pendahuluan

Kanker payudara merupakan penyebab kematian terbanyak pada pasien kanker di negara berkembang. Insidensinya masih lebih rendah dibanding negara barat, namun memiliki tingkat kematian yang lebih tinggi karena keterlambatan diagnosis serta sulitnya akses terhadap pengobatan.<sup>1</sup> Kanker payudara merupakan salah satu jenis penyakit kanker utama di Indonesia, dan prevalensinya meningkat setiap tahun.<sup>2</sup> Menurut American Cancer Society (ACS), sekitar 25% dari seluruh pasien kanker baru pada wanita di dunia, terdiagnosis sebagai kanker payudara. Pada tahun 2012, hampir 1,7 juta kasus baru penyakit kanker payudara ditemukan di seluruh dunia.<sup>1</sup>

Menurut WHO, dari total mortalitas sebanyak 1 551 000 orang pada tahun 2014 di Indonesia, sekitar 12,59% disebabkan oleh penyakit kanker dengan jumlah kematian sebanyak 103 100 orang pria dan 92.200 orang wanita. Mayoritas penyakit kanker yang menimbulkan kematian pada pria adalah kanker paru-paru (21,8%), sedangkan pada perempuan adalah kanker payudara (21,4%).<sup>3</sup> Penyebab kanker payudara belum diketahui secara pasti, namun beberapa faktor risiko seperti usia, faktor genetik, riwayat penyakit kanker payudara dalam keluarga dan paparan estrogen, diketahui berpengaruh terhadap perkembangan kanker payudara.<sup>4</sup>

Sekitar 25 – 50% kasus kanker payudara sporadis pada manusia, termasuk *pre-invasive tumor* fase dini disebabkan mutasi gen p53.<sup>5</sup> Selain itu, dalam kasus langka pada wanita dengan sindrom Li-Fraumeni (mengidap berbagai jenis penyakit kanker sebagian besar karena mutasi pada gen p53 yang diturunkan), kanker payudara merupakan jenis tumor yang paling umum berkembang saat memasuki usia dewasa. Dari paparan tersebut dapat disimpulkan bahwa gen p53 berperan besar dalam

inisiasi atau progresi kanker payudara dan bisa dikatakan p53 merupakan gen kanker payudara yang “sesungguhnya.”<sup>5</sup>

p53 (dikenal juga sebagai protein 53 atau tumor protein 53/TP 53) merupakan faktor transkripsi yang mengaktivasi ekspresi berbagai gen di hilir dalam menanggapi kerusakan DNA.<sup>4</sup> p53 juga berperan sebagai tumor suppressor protein yang pada manusia disandi oleh gen TP53. p53 sangat penting untuk organisme multiselular karena berperan dalam mengatur siklus sel sehingga berfungsi sebagai tumor suppressor yang dapat mencegah penyakit kanker. Fungsi utama protein ini dalam menekan tumor yaitu dalam *cell cycle arrest*, apoptosis, perbaikan DNA dan anti angiogenesis. Apoptosis khususnya, sangat penting untuk menekan tumor yang berkaitan dengan p53, karena p53 mengaktifkan gen target termasuk Bax, Noxa, Puma, Apaf-1 dan p53AIP1 dalam menanggapi kerusakan DNA oleh radiasi, UV dan stress oksidatif.<sup>4</sup> Oleh karena itu p53 sering juga disebut sebagai “*guardian of the genome*” merujuk pada peranannya dalam menjaga kestabilan dengan mencegah mutasi pada genome.<sup>6,7</sup> Tujuan utama dari tulisan ini yaitu untuk menelusuri dan mengkaji secara bioinformatika gen **TP53** manusia (*Homo sapiens*) dan mutasinya yaitu **TP53 Pro151Ser** dalam hubungannya dengan risiko terjadinya kanker payudara.

## Bahan dan Cara

### Bahan

Analisis untuk memperoleh informasi awal mengenai protein TP53 diperoleh dari situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.<sup>8</sup> Diawali dengan pencarian *reference sequence* protein Tumor Protein p53 (**TP53**) manusia (*Homo sapiens*) dengan *accession number* **NP\_001119584.1** (protein); dan *gen ID*: **7157** dengan *accession number* **NG 017013.1**. Adapun lokasi gen tersebut ada pada lengan pendek kromosom 17 (lokus 17p13.1).

## Cara

Analisis bioinformatika pada gen TP53 dilakukan dengan menggunakan beberapa program *open source* dari situs berikut ini:

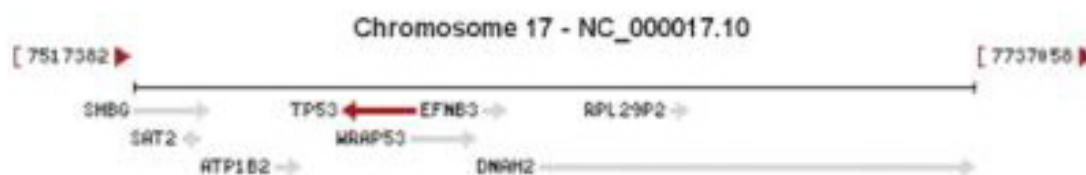
1. Pencarian informasi protein (fungsi, panjang, berat, tipe dsb) dan gen **TP53** (struktur, panjang, lokasi dsb) menggunakan database bioinformatika dari situs NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>,<sup>8</sup> menu **Gene**, **Nucleotide** dan **Protein**, dan situs <http://www.uniprot.org><sup>9</sup>
2. Analisis mutasi **TP53 Pro151Ser** pada **SNP rs28934874** menggunakan situs OMIM <http://www.omim.org><sup>10</sup> dan situs NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov><sup>8</sup> dengan menu SNP
3. Analisis sekuens homolog, ortholog dan paralog menggunakan situs NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov><sup>8</sup> (dengan melakukan BLAST)
4. Analisis sekuens protein **p53** serta analisa komparatif dengan sekuens mutan (Struktur sekunder, Prediksi exposure residu, Prediksi daerah transmembran, Domain Protein, dsb) menggunakan database PSIPRED v 3.3 di situs <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>,<sup>11</sup> TMHMM di situs <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>,<sup>12</sup> Expasy-PROSITE di situs <http://prosite.expasy.org><sup>13</sup> dan situs ExpASy - ProtScale <http://web.expasy.org/protscale>
5. Analisis struktur 3D protein p53 serta analisa komparatif dengan protein mutan, menggunakan situs Protein Data Bank di <http://www.rcsb.org/pdb/>,<sup>14</sup> program

Swiss Model dengan software PyMOL di situs <http://swissmodel.expasy.org><sup>15</sup>

6. Desain primer menggunakan situs Primer3 di situs <http://frodo.wit.mit.edu><sup>16</sup> dan PerlPrimer di situs <http://perlprimer.sourceforge.net><sup>17</sup>
7. Analisis enzim restriksi, menggunakan software NebCutter V 2.0 di situs <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/><sup>18</sup>

## Hasil dan Diskusi Informasi Struktur Gen dan Protein TP53

Informasi tentang gen TP53 diperoleh dari situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov><sup>8</sup> menu gene dengan menggunakan *reference sequence* menyandi dengan *accession number* **NG\_017013.1** dan **gen ID: 7157**. Lokasi **gen TP53** yang mengkode tumor protein p53 terletak pada lengan pendek kromosom 17 (**lokus 17p13.1**). Gen TP53 terdiri atas **11 ekson** (ekson pertama tidak mengkode sekuens protein), serta 2 promotor.<sup>18,19</sup> Promotor pertama terletak diantara 100–250 bp pada bagian hulu dari *non coding* ekson pertama, dan promotor kedua yang sifatnya lebih kuat terletak di dalam intron pertama. Gen TP53 menyandi tumor protein p53, suatu faktor transkripsi yang memberikan respons terhadap berbagai stress selular untuk mengatur gen target yang menginduksi berhentinya siklus sel, apoptosis, penuaan, DNA *repair* atau perubahan dalam proses metabolisme. Selain itu p53 juga menginduksi apoptosis melalui proses non transkripsional dalam sitoplasma.



**Gambar 1.** Lokasi gen TP53 Homo sapiens pada kromosom 17.p13.1

Protein p53 yang diakses dari situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov><sup>8</sup> yaitu tumor protein p53 isoform a pada manusia (*Homo sapiens*) dengan *accession number* NP\_001119584.1 (berdasar refseq NM\_001126112.1) tersusun atas 393 asam amino, berbentuk linear dengan massa 43,7 kDa berdasarkan asam aminonya (53 kDa pada SDS-PAGE, adanya perbedaan massa disebabkan oleh banyaknya residu prolin pada p53 yang memperlambat pergerakannya dalam SDS-PAGE). Daerah pusat (daerah asam amino dari 100 – 300) berupa DNA *binding domain*,<sup>20</sup> mengandung domain aktivasi transkripsi, DNA binding dan oligomerisasi. DNA *binding* protein yang resisten terhadap proteolisis ini didukung oleh *C-terminal end* yang memperantarai oligomerisasi dan *N-terminal end* yang berisi sinyal aktivasi transkripsi yang kuat.

Melalui situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov><sup>8</sup> dengan menu BLAST-protein BLAST dapat ditelusuri kemiripan (homologi) sekuen protein TP53 *Homo sapiens* dengan spesies lain (*ortholog*) atau dengan sekuen lain (*paralog*) pada spesies yang sama. Hal tersebut berdasarkan nilai identifikasi (*query coverage*) mendekati 100 %. Dari hasil penelusuran diketahui bahwa protein selular tumor antigen p53 *Macaca mulata* (NP\_000537.3) merupakan **ortholog** dari tumor protein **p53** manusia (nilai *query coverage*, *identities* = 96 %, *E* = 0). Sedangkan **paralognya** yaitu tumor protein **p73 isoform e** (*Homo sapiens* dengan nomor *accession* NP\_001191118.1). Panjang sekuen protein, baik pada cellular tumor antigen p53 *Homo sapiens* (*query*) maupun pada *ortholog* cellular tumor antigen p53 *Macaca mulata* sama-sama memiliki 393 asam amino. Namun *paralog* tumor protein p73 isoform e (*Homo sapiens*) memiliki panjang sekuen 636 asam amino.

### Mekanisme dan Fungsi Gen TP53

Gen TP53 seringkali mengalami mutasi

atau ada dalam keadaan inaktif pada hampir 60 % penyakit kanker. Manifestasi klinis terkait mutasi pada TP53 diantaranya adalah penyakit-penyakit kanker seperti *adrenal cortical carcinoma*, kanker payudara, kanker paru-paru, kanker usus, kanker hati, kanker tulang, kanker pankreas.

Analisis bioinformatika mengenai fungsi protein TP53 diperoleh melalui situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov><sup>8</sup> menu OMIM atau dari situs <http://www.uniprot.org><sup>9</sup> menu UniProtKB. Fungsi tumor suppressor p53 pada berbagai tipe tumor yaitu menginduksi terhentinya pertumbuhan atau menginduksi apoptosis bergantung pada kondisi fisiologis dan tipe sel, menginduksi berhentinya siklus sel (*cell cycle arrest*), penuaan, DNA *repair* atau perubahan dalam proses metabolisme. Peran p53 dalam regulasi siklus sel yaitu sebagai trans-activator yang mengatur pembelahan sel secara negatif dengan cara mengontrol gen-gen yang terlibat didalamnya. Salah satu gen yang teraktivasi yaitu inhibitor dari *cyclin-dependent kinase*. Induksi apoptosis tampaknya diperantarai baik oleh stimulasi BAX dan ekspresi FAS antigen, maupun dengan menekan ekspresi Bcl-2. Selain itu p53 juga terlibat dalam *signaling cross over* Notch.

p53 akan berikatan dengan *p53-binding sites* dan mengaktivasi gen-gen di daerah hilir yang akan menghambat pertumbuhan atau invasi, oleh karena itu berfungsi sebagai tumor suppressor. Mutasi pada p53 yang sering dijumpai dalam berbagai tipe penyakit kanker pada manusia menyebabkannya gagal untuk berikatan dengan konsensus *DNA-binding site* sehingga aktivitas tumor suppressornya menjadi hilang. Hilangnya aktivitas p53 pada penyakit kanker bisa terjadi karena mutasi atau karena hilangnya/terganggunya proses *signaling* yang mengatur peran p53.<sup>21,22,23</sup> Pada sel normal protein p53 terekspresi pada kadar yang rendah namun sel yang bertransformasi ditemukan pada kadar yang tinggi, dimana

dipercaya bahwa p53 terlibat dalam proses transformasi dan malignansi.<sup>8</sup>

### Varian Genetik TP53 : TP53 Pro151Ser

Variasi genetik pada p53 sering juga disebut sebagai SNP (*single nucleotide polymorphism*) merupakan variasi genetik yang umum ditemukan pada manusia. Setiap SNP menggambarkan adanya satu nukleotida yang berbeda susunan DNA, sehingga bisa menjadi penanda biologis untuk suatu penyakit. Dari situs NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov><sup>8</sup> dengan menu SNP dan situs OMIM <http://www.omim.org><sup>10</sup> diperoleh SNP yang terkait dengan kanker payudara dbSNP : rs28934874. Implikasi klinis terjadi karena mutasi mRNA pada posisi 648, 645 dan 333 dengan perubahan **CCC** ⇒ **ACC** dan **CCC** ⇒ **TCC**. Mutasi menyebabkan perbedaan level ekspresi protein, asam amino ke 151 dan 19 berubah dari **P**

[Pro] ⇒ **T** [Thr] dan **P** [Pro] ⇒ **S** [Ser] serta perbedaan *splicing*. Keberadaan SNP mengakibatkan p53 tidak dapat berfungsi sebagai tumor suppressor sebagaimana mestinya. Transisi nukleotida tersebut berakibat pada kesalahan penerjemahan/translasi asam amino yang menimbulkan kanker payudara.

Dari database SNP di situs NCBI, untuk mutasi TP53 diperoleh informasi sebagai berikut :

- Posisi mutasi pada genom (NG\_017013.1) : basa ke 17385 (alel C), posisi mutasi pada mRNA (NM\_001126112.1) : basa ke 645, kodon CCC P TCC 601 aactggccaa gacctgcct gtcagctgt gggttgattc cacacccccg cccggcacc. Posisi mutasi pada protein (NP\_001119584.1) : asam amino ke 151 (prolin serine) 141 CPVQLWVDSTSPPGTRVRAMAIYKQSQ HMT E V V R R C P H H E R C S D S D G L A P P QHLIRVEGNLRVEYLDDRN.

RefSeqGene Mapping							
RefSeqGene	Gene (ID)	SNP to RefSeqGene	Position	Allele			
<a href="#">NG_017013.1</a>	<a href="#">TP53 (7157)</a>	+	<a href="#">17385</a>	C			

Gene Model(s)							
Function	mRNA				Protein		
	SNP to mRNA	Accession	Position	Allele change	Accession	Position	Residue change
missense	+	<a href="#">NM_000546.4</a>	<a href="#">648</a>	CCC ⇒ ACC CCC ⇒ TCC	<a href="#">NP_000537.3</a>	<a href="#">151</a>	P [Pro] ⇒ T [Thr] P [Pro] ⇒ S [Ser]
missense	+	<a href="#">NM_001126112.1</a>	<a href="#">645</a>	CCC ⇒ ACC CCC ⇒ TCC	<a href="#">NP_001119584.1</a>	<a href="#">151</a>	P [Pro] ⇒ T [Thr] P [Pro] ⇒ S [Ser]
missense	+	<a href="#">NM_001126113.1</a>	<a href="#">648</a>	CCC ⇒ ACC CCC ⇒ TCC	<a href="#">NP_001119585.1</a>	<a href="#">151</a>	P [Pro] ⇒ T [Thr] P [Pro] ⇒ S [Ser]
missense	+	<a href="#">NM_001126114.1</a>	<a href="#">648</a>	CCC ⇒ ACC CCC ⇒ TCC	<a href="#">NP_001119586.1</a>	<a href="#">151</a>	P [Pro] ⇒ T [Thr] P [Pro] ⇒ S [Ser]
missense	+	<a href="#">NM_001126115.1</a>	<a href="#">333</a>	CCC ⇒ ACC CCC ⇒ TCC	<a href="#">NP_001119587.1</a>	<a href="#">19</a>	P [Pro] ⇒ T [Thr] P [Pro] ⇒ S [Ser]

**Gambar 2.** Posisi mutasi pada gen TP53 yang menyebabkan kanker payudara karena mutasi mRNA posisi pada 645, 648 dan 333

Gen TP53 atau p53 mempunyai *alternative splicing* pada intron ke - 2 serta antara ekson 9 dan 10.<sup>24</sup> Gen tersebut terdiri atas 11 ekson, serta mempunyai dua situs awal transkripsi pada ekson 1. Selain itu gen TP53 mempunyai promotor internal dan situs inisiasi transkripsi pada intron ke 4. Gen TP53 mempunyai delapan variasi

transkripsi/isoform yang terdiri atas isoform a – g dan isoform a terdiri dari dua varian, yaitu varian 1 dan 2. Salah satu isoform yang dipilih yaitu isoform a varian 2. Isoform a memiliki *alternate splice site* pada 5' UTR menyebabkan hilangnya 3 nts jika dibandingkan dengan varian 1. Varian 1 dan 2 sama-sama mengkode isoform a.



## Analisis Komparatif Protein TP 53 dan mutan TP53 Pro151Ser

Untuk mengetahui komposisi protein TP53 digunakan situs <http://www.expasy.org> menu ProtParam. Dari hasil penelusuran diketahui terdapat beberapa perbedaan antara TP53 normal dan mutan TP53 Pro151Ser, antara lain susunan asam amino, berat molekul, komposisi atom, formula, jumlah atom, indeks instabilitas, dan GRAVY (Tabel 1). Tidak terdapat perbedaan pada jumlah asam amino, nilai pI teoritis, estimasi

waktu paruh dan indeks aliphatic. Adanya SNP pada p53 menyebabkan perubahan asam amino pada posisi **151** dari **Proline** menjadi **Serine**. Dilihat dari scoring matrixnya (score = -1), maka perubahan dari **P** ke **S** merupakan perubahan asam amino yang signifikan dan dapat merubah komposisi/sifat protein yang signifikan pula karena perubahannya menimbulkan implikasi klinis berupa kanker payudara. Adapun hasil analisis komparatif antara protein normal dan mutan p53 dapat dilihat sebagai berikut:

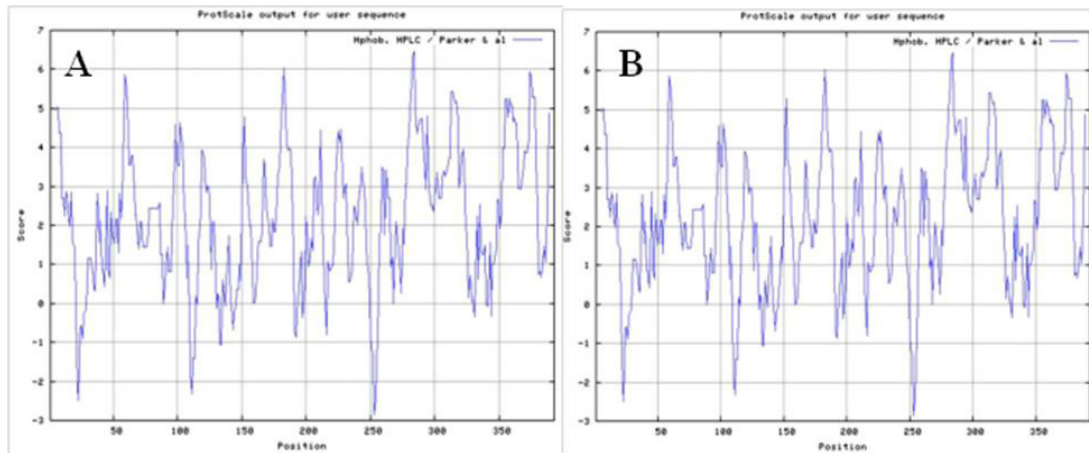
**Tabel 1. Analisis Fisiko-Kimia Protein TP53 dan TP53 Pro151Ser**

Parameter	Protein TP53			Protein TP53 Pro151Ser		
<b>Jumlah Asam Amino</b>	393			393		
<b>Urutan Asam Amino Ke 151</b>	<b>Proline (P)</b>			<b>Serine (S)</b>		
<b>Berat Molekul</b>	<b>43.653,1</b>			<b>43643,1</b>		
<b>Nilai pI Teoritis</b>	6,33			6,33		
<b>Komposisi Atom</b>	<b>Carbon</b>	<b>C</b>	<b>1898</b>	<b>Carbon</b>	<b>C</b>	<b>1896</b>
	<b>Hydrogen</b>	<b>H</b>	<b>2980</b>	<b>Hydrogen</b>	<b>H</b>	<b>2978</b>
	Nitrogen	N	548	Nitrogen	N	548
	<b>Oxygen</b>	<b>O</b>	<b>592</b>	<b>Oxygen</b>	<b>O</b>	<b>593</b>
	Sulfur	S	22	Sulfur	S	22
<b>Formula</b>	<b>C<sub>1898</sub>H<sub>2980</sub>N<sub>548</sub>O<sub>592</sub>S<sub>22</sub></b>			<b>C<sub>1896</sub>H<sub>2978</sub>N<sub>548</sub>O<sub>593</sub>S<sub>22</sub></b>		
<b>Jumlah Atom</b>	<b>6040</b>			<b>6037</b>		
<b>Estimasi Waktu Paruh</b>	30 jam pada mamalia			30 jam pada mamalia		
<b>Indeks Instabilitas</b>	<b>73,59</b>			<b>74,22</b>		
<b>Indeks Aliphatic</b>	59,08			59,08		
<b>Grand average of hydrophaticity (gravy)</b>	<b>- 0,756</b>			<b>- 0,754</b>		

\*) Nilai parameter yang berbeda dicetak tebal

Hasil penelusuran lebih lanjut dengan menggunakan situs <http://www.expasy.org><sup>14</sup> menu ProtScale, untuk parameter polaritas dan nilai hidrofobik tidak terdapat perbedaan antara TP53 maupun pada TP53Pro151Ser. Analisis prediksi terhadap hidrofobitas antara protein TP53 dan TP53Pro151Ser menggunakan skala Hphob. HPLC/Parker (Gambar 3). Prediksi *eksposure* residu pada

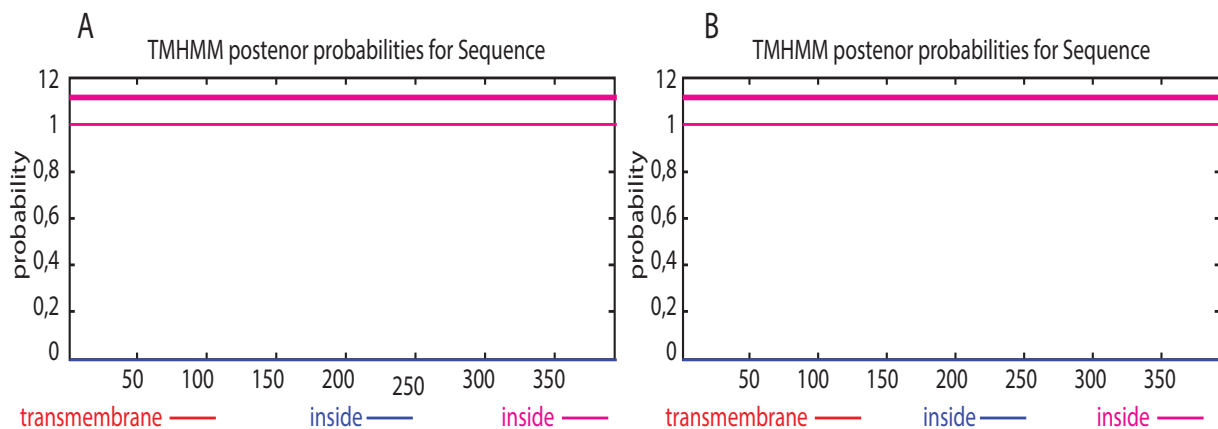
TP53 (A) maupun TP53 Pro151Ser (B) untuk residu: -3 - ~7, menandakan bahwa sebagian kecil residu bersifat hidrofobik (di bawah garis 0) dan sebagian lagi/mayoritas bersifat hidrofilik atau berada pada permukaan protein. Hasil menunjukkan bahwa mutasi yang terjadi tidak merubah *eksposure* residu (asam amino).



**Gambar 3.** Topologi protein TP53 normal (A) dan TP53 Pro151Ser (B) berdasarkan sifat hidrofobisitas menggunakan skala Hphob. HPLC/Parker.

Prediksi adanya daerah transmembran pada TP53 maupun pada TP53Pro151Ser menggunakan program *predicting transmembrane protein topology with a Hidden Markov Model* (TMHMM) dari situs <http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/>.<sup>12</sup>

Hasil menunjukkan bahwa protein TP53 baik pada protein normal maupun mutan TP53Pro151Ser berada di luar permukaan sel, artinya merupakan protein transmembran (Gambar 4). Dalam hal ini adanya SNP tidak berpengaruh terhadap topologi protein.



**Gambar 4.** Prediksi daerah transmembran pada protein TP53 (A) dan TP53 Pro151Ser (B) menggunakan program TMHMM. Hasil menunjukkan bahwa pada keduanya tidak terdapat transmembran protein. Posisi protein normal maupun mutan berada di luar permukaan.

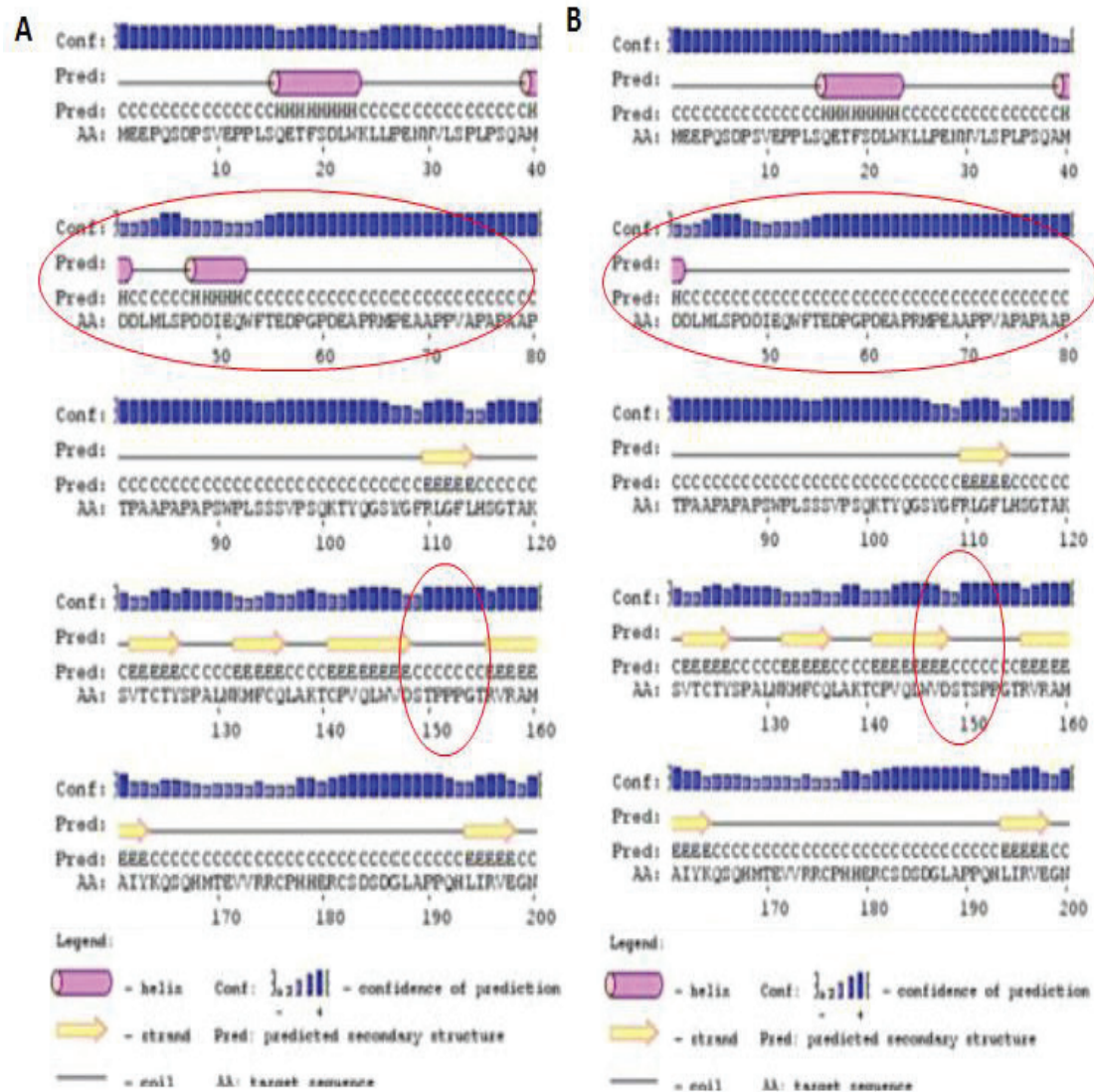
### Analisis Struktur Sekunder pada protein TP53 normal dan mutan TP53 Pro151Ser

Prediksi struktur sekunder TP53 dan TP53 Pro151Ser diperoleh dari situs <http://bioinf.ucl.ac.uk><sup>11</sup> menu PSIPRED. Struktur sekunder protein pada TP53 maupun TP53

Pro151Ser tersusun atas bentuk heliks, strand dan coil (Gambar 5). Posisi mutasi pada residu (asam amino) ke 151, strukturnya berupa coil. Pada TP53, residu ke 151 adalah Prolin (P), sedangkan pada TP53 Pro151Ser, posisi mutasi (SNP) pada residu ke 151 yaitu Serin (S). Pada posisi ini (residu ke 151), SNP

tidak mengubah struktur sekunder. Namun terdapat perbedaan struktur sekunder pada residu 47–52 yang strukturnya berupa *coil*

pada mutan TP53 Pro151Ser, sementara pada TP53 terdapat dua struktur berupa helix (residu 40 – 80).



**Gambar 5.** Struktur sekunder protein TP53 normal (A) dan TP53 Pro151Ser mutan (B). Posisi mutasi ada pada residu ke 151, struktur berupa coil. SNP sedikit merubah struktur sekunder pada residu 47–52, dimana pada protein normal struktur berupa helix, namun pada mutan, struktur berupa coil sementara pada protein normal berupa helix.

### Disain Primer

Untuk melihat mutasi, maka perlu dilakukan desain primer dengan menggunakan data sekuens mRNA yang diperoleh dari NCBI. Desain primer menggunakan program

“Primer 3” dari situs <http://frodo.wi.mit.edu/>.<sup>16</sup> Karena posisi mutasi ada pada urutan basa ke 645, maka primer yang didesain harus memuat basa ke 645 tersebut. Adapun urutan basa pada sekuen mRNA p53 adalah terletak pada exon 570 ... 753 seperti berikut:



```

541 t actccccctgc cctcaacaag atgttttgcc
601 aactggccaa gacctgacct gtgcagctgt gggttgattc cacaccccgc cccggcaccc
661 gcgtccgcgc catggccatc tacaagcagt cacagcacat gacggaggtt gtgaggcgct
721 gccccacca tgagcgctgc tcagatagcg atg

```

titik mutasi (645)

**Gambar 6.** Refseq mRNA (NM\_001126112.1) TP53 manusia (*Homo sapiens*), dengan titik mutasi pada basa ke 645 yang mengubah kodon CCC menjadi TCC

Pemilihan pasangan Primer ditentukan oleh panjang basa yang sebaiknya sama, nilai Tm (suhu *melting*) sebaiknya sama atau berdekatan, banyaknya kandungan GC dan konsentrasi primer. Dengan memasukkan

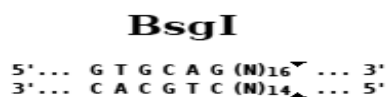
sekuen Fasta mRNA NM\_001126112.1 di atas pada situs “Primer 3” diperoleh beberapa pasang primer, namun berdasarkan kriteria pemilihan primer di atas, maka desain primer terpilih yaitu seperti tercantum pada Tabel 2.

**Tabel 2. Hasil Disain Primer TP53 dari Fasta mRNA (NM\_001126112.1)**

Forward Primer	Reverse Primer
3' CATTCTGGACAGCCAAGTC	5' TCATGTGCTGTGACTGCTTG
Panjang 20 bp; Tm 60,66; GC 55	Panjang 20 bp; Tm 59,60; GC 50

Enzim restriksi yang digunakan untuk memotong daerah mutasi dapat dicari dengan menggunakan software Nebcutter. Dengan memasukkan data FASTA mRNA (NM\_001126112.1) dengan letak mutasi pada posisi 645 yang mengubah kodon CCC menjadi TCC (Gambar 6) ke dalam software, maka diperoleh enzim restriksi untuk mutasi TP53 Pro151Ser. Enzim

restriksi yang diperoleh dari software adalah **BsgI**. Proses mutasi yang terjadi mengubah translasi protein pada posisi 645 dari **Prolin** menjadi **Serin**. Mutasi TP53 Pro151Ser dapat dideteksi dengan metoda RFLP (*Restriction Fragem Length Polymorphism*) menggunakan enzim restriksi **BsgI** (Gambar 7).<sup>25</sup>

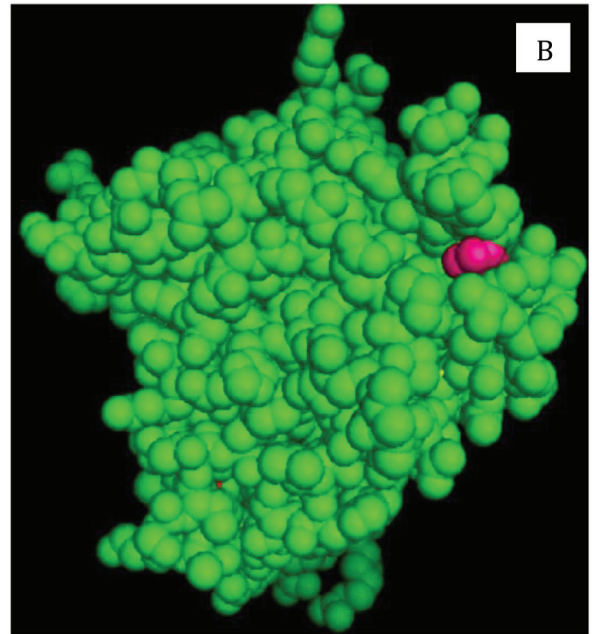
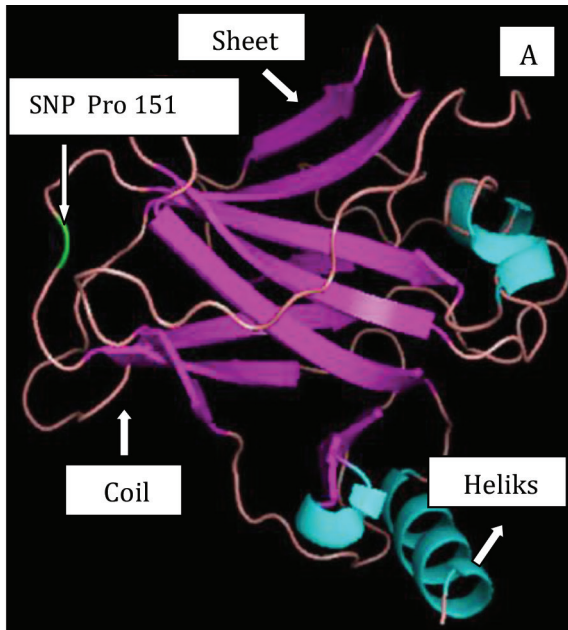


**Gambar 7.** Enzim restriksi **BsgI**. Yang memotong ikatan basa G pada ujung 3' dengan pola menggantung pada ujung 3'.

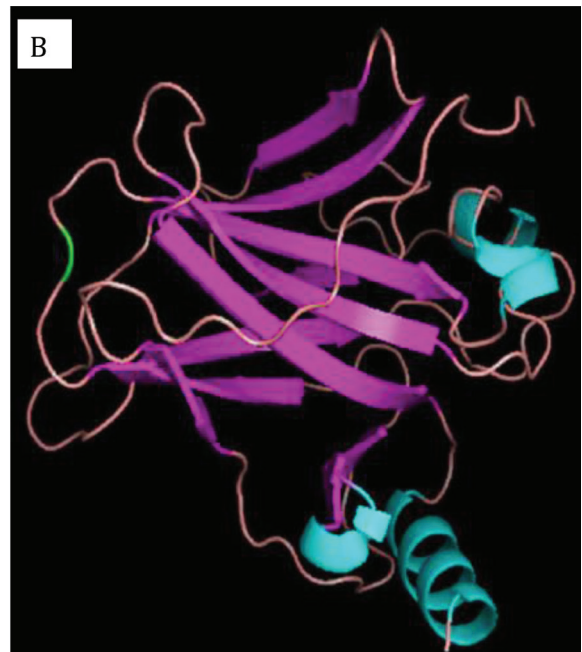
### Analisis Struktur Protein

Pembuatan 3D dari struktur p53 normal dimulai dengan memasukkan data FASTA protein p53 dalam situs [www.expasy.com](http://www.expasy.com)<sup>26</sup> pada menu Swiss Model sub menu Automated mode dimana hasil analisa/modelling akan dikirimkan via email. Visualisasi protein mutan TP53 Pro151Ser

dilakukan dengan cara memasukkan FASTA protein mutan dimana salah satu asam amino yang bermutasi (SNP) dirubah sesuai dengan mutasi yang terjadi. Dalam artikel ini mutasi yang terjadi yaitu pada asam amino ke 151 yakni Proline berubah menjadi Serine (data RefSNP/dbSNP 28934874). Struktur 3D mutan dapat dilihat pada Gambar 8.



**Gambar 8.** Struktur 3D mutan TP53 Pro151Ser. Warna hijau pada gambar (A) menunjukkan posisi mutasi SNP Pro151Ser terjadi di bagian coil, sedangkan warna pink pada gambar (B) menunjukkan bahwa letak mutasi terjadi pada permukaan protein.



**Gambar 9.** Struktur 3D protein p53 normal (A) dengan mutan (B), tampak tidak ada perbedaan yang nyata seperti terlihat pada gambar di atas. Namun demikian SNP pada posisi asam amino ke 151 diasosiasikan dengan penyakit kanker payudara dalam data base OMIM.

Hasil modelling di atas merupakan hasil Swiss Model dan tidak seluruh *sequence* asam amino (393 asam amino) termodelkan secara utuh. Ada empat model yang dihasilkan dan ternyata sebagian *sequence* asam amino hilang. Model 3 D di atas mengambil salah satu model yang mempunyai *sequence* asam amino yang paling lengkap diantara ke 4 model tersebut.

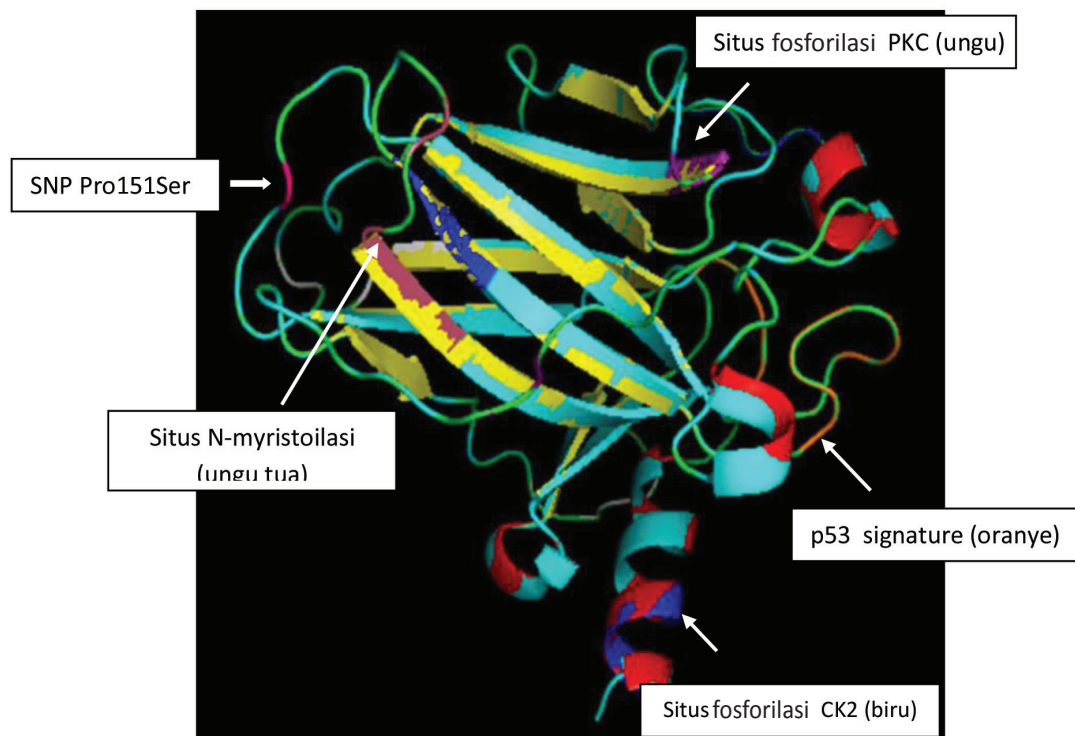
### Analisis Fungsi terhadap Struktur 3D Protein Mutan

Protein TP53 merupakan fosfoprotein yang terdiri dari 390 asam amino yang terbagi dalam empat domain yaitu wilayah yang bermuatan sangat asam, terdiri atas 75–80 asam amino; domain hidrofobik kaya proline (posisi asam amino 80–150); wilayah pusat (asam amino 150–300); wilayah C-terminal yang sangat basa. TP53 termasuk kedalam keluarga protein yang termasuk didalamnya adalah p51 (p63 atau

Ket), suatu aktivator transkripsi dan p73, suatu aktivator transkripsi yang terlibat dalam apoptosis sebagai respons terhadap kerusakan DNA (Gambar 9).

Pada p53 terdapat region *family signature pattern* yang terdiri dari 13 asam amino yaitu pada residu ke 237- 249. Wilayah ini dikenal sebagai domain IV yang bertanggung jawab untuk berikatan dengan antigen T dari SV40. Pada manusia wilayah tersebut menjadi fokus *point mutation* yang terkait dengan berbagai jenis penyakit kanker.

Untuk melakukan analisis fungsi protein mutan, kita harus mengetahui situs aktif dari protein p53 melalui situs [www.expasy.com](http://www.expasy.com)<sup>26</sup> menu Prosite. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa protein p53 *Homo sapiens* mempunyai tujuh situs aktif yaitu situs kaya proline (*Proline-rich region*); situs p53 *family signature*; situs fosforilasi CK2; situs fosforilasi PKC; situs N-myristoilasi; situs N-glycosilasi dan situs fosforilasi Tyrosine kinase (Gambar 10).



**Gambar 10.** Hasil visualisasi superimposed protein p53 normal terhadap mutan Pro151Ser dengan menggunakan software PYMOL

SNP terjadi di bagian *coil* pada permukaan protein dan tidak terlihat perbedaan yang nyata, namun SNP ini berkaitan dengan penyakit kanker payudara.

## Kesimpulan

Protein TP53 atau p53 merupakan faktor transkripsi yang mengaktifasi ekspresi berbagai gen di hilir dalam menanggapi kerusakan DNA. p53 juga berperan sebagai tumor suppressor protein yang pada manusia dikode oleh gen TP53. Gen TP53 terletak pada kromosom 17p13.1. Gen tersebut sangat penting karena peran dalam mengatur siklus sel sehingga berfungsi sebagai tumor suppressor yang dapat mencegah penyakit kanker. Fungsi utama protein tersebut dalam menekan tumor yaitu dalam *cell cycle arrest*, apoptosis, perbaikan DNA dan anti angiogenesis.

Mutasi SNP pada posisi 151 menyebabkan ada kesalahan translasi sehingga asam amino Proline menjadi serine. Mutasi terjadi pada bagian *coil*, pada permukaan protein. Mutasi SNP rs28934874 Pro151Ser mengubah sebagian sifat umum protein, tetapi tidak mengubah topologi protein. Mutasi sedikit mengubah struktur protein mutan, namun tidak mengubah struktur 3D protein p53. Varian Pro151Ser (rs28934874) berasosiasi dengan resiko terjadinya penyakit kanker payudara, serta berperan penting dalam etiologi dan patofisiologi penyakit tersebut. Proses mutasi yang terjadi mengganggu proses *signaling* yang sehingga menghilangkan aktivitas p53 sebagai tumor suppressor.

## Daftar Pustaka

1. Berry J. Worldwide statistics on breast cancer. Breast cancer: Prevalence, statistics and risk factor. Medical News Today 2017. Diunduh dari <http://www.medicalnewstoday.com/articles/31735.php>, 13 Februari 2019.
2. Susanti I. Efek  $\beta$ -Glukan dari jamur tiram (*Pleurotus ostreatus* Jacq P. Kum) sebagai antikanker payudara alami: Studi imunostimulasi dan anti proliferasi pada tikus. Jakarta: KUI, 2015. Disertasi.
3. WHO. World Health Organization – Cancer Country Profile. Indonesia. 2014.
4. Gaowa S, Futamura M, Tsuneki M, Kamino H, Tajima JY, Mori R, *et al.* Possible role of p53/Miap-regulated mitochondrial quality control as a tumor suppressor in human breast cancer. *Cancer Sci.* 2018; 10: 3910 – 20.
5. Polyak K. Is p53 a breast cancer gene? *Cancer Biol Ther* 2002; 1: 37-38,
6. Vousden KH, Prives C. Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell.* 2009; 137(3): 413 - 31
7. Millicević Z, Bajić V, Zivković L, Kasapović J, Anđelković U, Potparević S, Identification of p53 and its isoforms in human breast carcinoma cells. *The Sci World:* 2014. Article ID: 61868.
8. Situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
9. Situs <http://www.uniprot.org>
10. Situs <http://www.omim.org>
11. Situs <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>
12. Situs <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>
13. Situs <http://prosite.expasy.org>
14. Situs <http://www.rcsb.org/pdb/>
15. Situs <http://swissmodel.expasy.org>
16. Situs <http://frodo.wit.mit.edu>
17. Situs <http://perlprimer.sourceforge.net>
18. Situs <http://nc2.neb.com/NEBcutter2>
19. Reisman D, Greenberg M, Rotter V. Human p53 oncogene contains one promoter upstream of exon 1 and a second, stronger promoter within intron 1. *Proc Nat Acad Sci.* 1988; 85: 5146-50
20. Vogelstein B, Kinzler KW. X-rays strike p53 again. *Nature.* 1994; m370: 174 –5.
21. Toledo F, Wahl GM, Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6: 909- 23.
22. Bourdon J. C. p53 and its isoforms in cancer. *Brit. J. Cancer* 2007; 97: 277- 82.
23. Vousden KH and Lane D, p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8; 275 –83.
24. Bourdon J-C, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP, Saville MK, Lane DP. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev.* 2005; 19: 2122- 37.
25. Poerwanto E. Kajian Bioinformatika terhadap *Transient receptor potential vanilloid 1* (TRPV1) pada Risiko Osteoarthritis Sendi Lutut. *Maj Kedok UKI* 2018;34:(1): 9 – 25.
26. Situs <http://www.expasy.org>