

MODEL TERATOPROTEOMIK

Penerapan Teknik Analisis Protein
Dalam Penelitian Bidang
Toksikologi Perkembangan

Aceng Ruyani

Pengantar
Prof. Dr. Sri Sudarwati

UNIB PRESS

**Model Teratoproteomik, Penerapan Teknik Analisis Protein
dalam Penelitian Bidang Toksikologi Perkembangan**

Hak Cipta © 2010 pada penulis

*Penulis : Aceng Ruyani
Layout : Bustanuddin Lubis
Desain Sampul : Elektroforesis 2-D Protein Ekstrak S. Typhi
oleh Aceng Ruyani dan Muktiningsih*

Hak cipta dilindungi undang-undang

Dilarang memperbanyak atau memindahkan sebagian atau seluruh isi buku ini dalam bentuk apapun, baik secara elektrinis maupun mekanis, termasuk memfotokopi, merekam, atau dengan sistem penyimpanan lainnya, tanpa izin tertulis dari Penulis

Penerbit:

UNIB Press
Kampus Universitas Bengkulu
Jln. WR Supratman Kandang Limun Bengkulu

Cetakan I Februari 2010

Cetakan II Juni 2010

Perpustakaan Nasional RI: Katalog dalam Terbitan (KDT)

***Model Teratoproteomik, Penerapan Teknik Analisis Protein
dalam Penelitian Bidang Toksikologi Perkembangan***

UNIB Press, 2010

xiv, 122 hlm. ; 14,8 x 21 cm

ISBN 978-979-9431-45-5

PENGANTAR

PROF. DR. SRI SUDARWARTI

Berbagai industri cat, tinta, dan pewarna tekstil menggunakan secara luas 2-metoksietanol (2-ME) sebagai pelarut. Penelitian pada mencit membuktikan, bahwa senyawa tersebut bersifat teratogenik dan embriotoksik. Penyebabnya adalah asam metoksiasetat (MAA) yang merupakan turunan dari 2-ME.

Berbagai penelitian yang telah kami lakukan membuktikan, bahwa MAA bila diberikan kepada mencit bunting umur kebuntingan 11 hari dengan dosis 10 mmol/kg berat badan dapat menginduksi lebih dari 95% kejadian cacat reduksi jari pada fetusnya. Penelitian secara histologis membuktikan terjadi kematian sel yang intensif di mesoderm keping anggota yang akan menimbulkan cacat jari. Selain itu juga terjadi degenerasi "apical ectodermal ridge" (AER).

Analisis seluler menyimpulkan, bahwa bakal anggota tubuh yang cacat berusaha melakukan pemulihan yang tampak pada peningkatan jumlah total sel. Karena laju proliferasi sel dan kematian sel tidak mencapai keseimbangan, muncul anggota tubuh yang abnormal.

Penelitian secara morfologis, histologis, dan seluler belum membuktikan apa sebenarnya pemicu terjadinya kelainan anggota tubuh. Oleh karena itu selanjutnya penelitian mekanisme terbentuknya cacat anggota tubuh secara subseluler perlu dilakukan. Diduga ada protein-protein tertentu yang berperan dalam menimbulkan cacat tersebut. Pendekatan dapat dilakukan dengan teknik proteomik untuk mempelajari keberadaan protein-protein tertentu secara kualitatif dan kuantitatif.

DAFTAR ISI

Ucapan Terima Kasih	v
Prakata	viii
Pengantar Prof. Dr. Sri Sudarwati	ix
Daftar Isi	x
Daftar Gambar	xii
Daftar Tabel	xv
BAB I Pendahuluan	1
BAB II Perubahan Profil Protein Tunas Anggota Tubuh Depan Mencit (<i>Mus Musculus</i>) Swiss Webster Akibat Perlakuan dengan Asam Metoksiasetat (MAA)	7
BAB III Protein yang Terkait Teratogenesis Anggota Tubuh Depan Mencit Swiss Webster Akibat Perlakuan dengan Asam Metoksiasetat (MAA)	22
BAB IV The Laminin Binding Protein P40 Is Involved In Inducing Limb Abnormality of The Mouse Fetuses As The Effects of Methoxyacetic Acid (MAA) Treatment	35
BAB V A Teratoproteomics Analysis: Heat Shock Protein 70 Is Up-Regulated in Mouse Forelimb Bud By Methoxyacetic Acid Treatment	51
BAB VI Penutup	67

BAB I

PENDAHULUAN

TEKNIK PROTEOMIK

Proteomik (dari kata proteome, PROTEin complement to genOME) adalah teknik yang digunakan untuk memahami mekanisme fisiologi dan biokimia dengan membandingkan keberadaan protein-protein tertentu secara kualitatif dan kuantitatif yang berasal dari sel atau jaringan pada kondisi yang berbeda (<http://www.expasy.ch>, Maret 2002). Protein adalah produk gen yang fungsional, sehingga keberadaan protein akan lebih mencerminkan kondisi sebenarnya dari sel atau jaringan yang diisolasi (Sarto *et al.*, 1999). Oleh karena hasil transkripsi gen (mRNA) organisme eukariot tidak langsung ditranslasikan menjadi protein (Turner *et al.*, 1997), maka kondisi patologis atau toksisitas tertentu lebih efektif dipelajari melalui perbedaan penampakan protein (Anderson *et al.*, 2000) daripada mRNA (mRNA differential display; Syed dan Hecht, 1998).

Akhir-akhir ini teknik proteomik berkembang pesat sejalan dengan penyempurnaan dua teknik utama, yaitu elektroforesis dua dimensi (2-DE), dan spektrometri massa (MS). Teknik 2-DE diperlukan untuk memisahkan serta memurnikan ekstrak kasar protein, sedangkan teknik MS dibutuhkan untuk mengkarakterisasi dan mengidentifikasi protein hasil pemurnian (<http://www.wita-proteomics.com>, Maret 2002). Teknik proteomik telah digunakan dalam penelitian bidang biologi dasar dan terapan seperti medis dan

toksikologi, namun belum menjadi kegiatan rutin (Anderson *et al.*, 2000).

Teknik SDS-PAGE 2-D (two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) dapat memisahkan dan memurnikan ekstrak kasar protein dari jaringan atau sel (Sarto *et al.*, 1999; Gygi *et al.*, 2000). Teknik ini mampu memisahkan sekaligus ratusan polipeptida dari ekstrak kasar protein berdasarkan pI (point of isoelectrofocusing) dan Mr (Massa relatif; Dunbar *et al.*, 1990; Gestern, 1996) yang menggambarkan satu jenis protein tertentu (Fichmann, 1998). Bercak protein hasil SDS-PAGE 2-D kemudian dibandingkan lebih dulu dengan peta acuan PAGE 2-D untuk jaringan tertentu (<http://www.genbio.com>, Maret 2002). Bila peta acuan PAGE 2-D belum tersedia atau identitas bercak protein belum diketahui, selanjutnya harus dilakukan karakterisasi dan identifikasi antara lain dengan teknik MS (Takayama dan Tsugita, 2000).

Untuk dapat dikarakterisasi, bercak protein harus didegradasi dengan enzim pada posisi asam amino (AA) tertentu menjadi sejumlah fragmen peptida, kemudian masing-masing fragmen ditentukan massanya menggunakan MALDI TOF-MS (matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry) yang mampu menganalisis sampel protein lebih rendah dari 5 pmol (Fernandez *et al.*, 1998). Telah tersedia pusat data massa peptida dengan informasi urutan AA yang dapat diakses secara langsung melalui internet (Henikoff *et al.*, 2000) antara lain dengan perangkat lunak ProFound (<http://www.prowl.rockefeller.edu>, Maret 2002), sehingga identitas bercak protein hasil SDS-PAGE 2-D dapat ditentukan.

Berdasarkan uraian tersebut di atas didapat beberapa keuntungan dalam penggunaan teknik proteomik, antara lain

(a) bekerja pada tingkat protein fungsional yang mencerminkan fungsi sebenarnya di dalam sel atau jaringan, dan (b) analisis dapat dilakukan dengan kuantitas sampel protein yang rendah (<5 pmol). Oleh karena itu teknik proteomik dapat dimanfaatkan untuk mengungkapkan berbagai mekanisme biologis dalam bidang biologi dasar dan terapan.

TERATOGENISITAS ASAM METOKSIASETAT

Toksikologi perkembangan atau teratologi adalah ilmu yang mempelajari sebab-sebab terjadinya cacat lahir atau kelainan kongenital berupa struktural, perilaku, faal, dan metabolik. Kelainan kongenital itu dapat disebabkan oleh berbagai teratogen seperti hormon, infeksi, fisik, dan kimia. Dalam berbagai industri, seperti cat, tinta, tekstil (Syed dan Hecht, 1998), dan semikonduktor (Hays *et al.*, 2000), 2-metoksietanol (2-ME) telah lama dikenal sebagai bahan pelarut. Senyawa itu terbukti teratogenik serta embriotoksik (Hays *et al.*, 2000) setelah masuk ke dalam tubuh melalui mulut, kulit atau pernafasan. Sampai sekarang 2-ME secara intensif menjadi bahan kajian, baik di laboratorium (Ambroso *et al.*, 1999; Hays *et al.*, 2000; Cheever *et al.*, 2001) maupun di lapangan (Shih *et al.*, 1999; Shih *et al.*, 2001). Di dalam tubuh, 2-ME akan diubah menjadi asam metoksiasetat (MAA) dengan bantuan alkohol dehidrogenase (ADH) dan aldehida dehidrogenase (ALDH; Ritter *et al.*, 1985; Cheever *et al.*, 2001), dan menurut O'Flaherty *et al.* (1995) MAA adalah teratogen terakhir.

MAA pada mencit terbukti paling banyak memunculkan kelainan autopodium, terutama cacat reduksi jari (Rasjad *et al.*, 1991a; Sudarwati *et al.*, 1993; Suropto *et al.*, 1996). Dosis tunggal MAA 10 mmol/kg berat badan (bb) yang diberikan secara

Model Teratoproteomik

gavage pada umur kebuntingan (uk) 11 hari mencit Jcl:ICR memunculkan 96 % abnormalitas anggota tubuh depan (Rasjad *et al.*, 1991b). Sudarwati *et al.* (1993) melaporkan terjadinya 94 % abnormalitas anggota tubuh akibat perlakuan dengan dosis tunggal MAA 10 mmol/kg bb yang diberikan secara *gavage* pada uk 11 hari mencit A/J. Mencit Swiss Webster (SW) uk 11 hari yang diberi MAA 10 mmol/kg bb secara *gavage* memunculkan 96 % abnormalitas anggota tubuh (Suripto *et al.*, 1996). Dari hasil penelitian-penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa uk 11 hari, dosis tunggal MAA 10 mmol/kg bb, dan pemberian secara *gavage* pada berbagai galur mencit menyebabkan tingkat kemunculan abnormalitas anggota tubuh sangat tinggi.

Sudarwati *et al.* (1995) telah mempelajari secara morfologi dan histologi pengaruh MAA terhadap perkembangan anggota tubuh depan mencit A/J. Dosis tunggal MAA 10 mmol/kg bb yang diberikan secara *gavage* pada uk 11 hari, 6 jam setelah perlakuan terdapat kematian sel mesoderm di wilayah preaksial keping anggota, yang belum tampak pada kontrol. Kematian sel terjadi juga pada AER (Apical Ectodermal Ridge), sehingga AER menyusut lebih cepat pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kontrol. Pada 12 jam setelah perlakuan, kematian sel bertambah dan menyebar di seluruh mesenkim keping anggota. Juga mulai terlihat adanya kelainan bentuk keping anggota dengan kematian sel yang terutama terlokalisasi di bagian postaksial. Jenis kelainan jari sudah dapat diprediksi mulai 48 jam setelah perlakuan, atas dasar pola kematian sel dan pola kondensasi rigi jari. Pada 72 jam setelah perlakuan, kelainan jari sudah definitif dan kematian sel sudah berkurang dibandingkan dengan pada 48 jam setelah perlakuan. Dari hasil penelitian itu Sudarwati *et al.* (1995) menyimpulkan,

bahwa kelainan perkembangan jari akibat perlakuan dengan MAA pada mencit A/J terutama disebabkan oleh kematian sel yang intensif di wilayah tertentu mesenkim keping anggota dan degenerasi AER yang lebih cepat.

Dosis tunggal MAA 10 mmol/kg bb yang diberikan secara *gavage* pada mencit SW uk 11 hari nyata menurunkan berat anggota tubuh embrio, sehingga dapat diartikan telah terjadi retardasi perkembangan anggota tubuh (Martgrita *et al.*, 2000). Martgrita *et al.* (2000) menganalisis pengaruh MAA terhadap perkembangan anggota tubuh mencit dengan menggunakan tiga petanda biokimia (biochemical marker; Slotkin *et al.*, 1991) antara lain indeks jumlah total sel (μg DNA/organ). Fluktuasi jumlah total sel yang terjadi pada 2, 4, 6, dan 12 jam setelah perlakuan MAA nyata lebih rendah dibandingkan dengan kontrol. Keadaan tersebut mencerminkan adanya perubahan keseimbangan antara laju proliferasi dan kematian sel dalam keping anggota tubuh. Antara 24 jam dan 48 jam setelah perlakuan jumlah total sel meningkat secara nyata dari kontrol, yang merupakan usaha pemulihan perkembangan anggota tubuh yang mengalami kelainan bentuk akibat pemberian MAA. Meskipun demikian, antara 48 jam sampai 60 jam setelah perlakuan jumlah total sel kembali nyata menurun dibandingkan dengan kontrol. Usaha pemulihan antara 24 jam dan 48 jam setelah perlakuan itu ternyata kemudian tidak berhasil, sehingga pada 72 jam setelah perlakuan anggota tubuh tetap abnormal. Dapat disimpulkan, bahwa abnormalitas muncul karena tidak tercapai keseimbangan antara laju proliferasi dan kematian sel dalam keping anggota tubuh (Martgrita *et al.*, 2000).

Penelitian yang dilakukan oleh Sudarwati *et al.* (1995) dan Martgrita *et al.* (2000) tampak belum mengungkap pengaruh MAA pada tingkat subseluler perkembangan awal

Model Teratoproteomik

anggota tubuh depan menciit. Perubahan subseluler tersebut mungkin merupakan peristiwa penentu dalam memunculkan abnormalitas anggota tubuh.

HIPOTESIS

MAA yang diberikan pada tahap awal perkembangan anggota tubuh depan menciit SW mengubah kandungan sejumlah protein tertentu dalam memunculkan abnormalitas anggota tubuh depan.

TUJUAN

Menganalisis pengaruh MAA terhadap perubahan kandungan protein-protein tertentu yang mungkin akan memunculkan abnormalitas anggota tubuh depan menciit SW.

BAB VI

PENUTUP

Metoksietanol (2-ME) digunakan secara luas sebagai pelarut dalam berbagai industri, seperti cat, tinta, pewarna tekstil, dan semikonduktor. Senyawa itu, setelah masuk ke dalam tubuh melalui mulut, kulit atau pernafasan, terbukti bersifat teratogenik serta embriotoksik. 2-ME akan diubah menjadi asam metoksiasetat (MAA) dengan bantuan alkohol dehidrogenase dan aldehida dehidrogenase. MAA, bila diberikan secara *gavage* pada mencit Swiss Webster (SW) umur kebuntingan (uk) 11 hari dengan dosis tunggal MAA 10 mmol/kg berat badan (bb), menginduksi lebih dari 95 % kejadian cacat reduksi jari fetus. Cacat yang diinduksi MAA ini terutama disebabkan oleh kematian sel yang intensif pada wilayah tertentu mesoderm keping anggota dan degenerasi AER. Keping anggota abnormal pertamakali dapat dideteksi pada 12 jam setelah perlakuan MAA. Informasi tentang perubahan pada tingkat subseluler akibat pengaruh MAA selama perkembangan awal anggota tubuh depan, yang diduga berperan dalam menginduksi abnormalitas, belum tersedia. Oleh karena itu percobaan ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh MAA terhadap perubahan kandungan protein-protein tertentu yang mungkin akan memunculkan abnormalitas anggota tubuh depan mencit SW.

Dosis tunggal MAA 10 mmol/kg bb diberikan secara *gavage* pada uk 11 hari mencit SW, sedangkan mencit kelompok kontrol hanya diberi akuabides steril dengan volume yang sama. Selanjutnya penelitian ini dilakukan melalui empat tahap berurutan:

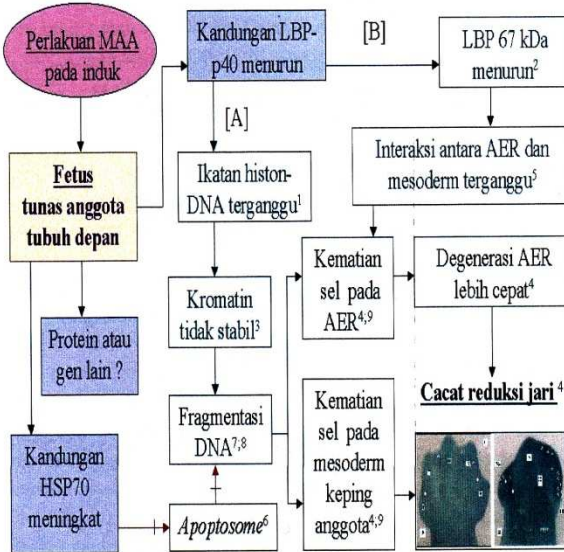
1. Penentuan umur kebuntingan paling awal yang responsif terhadap perlakuan MAA. Induk mencit dibunuh (diskolasi leher) pada 2, 4, 6, 8, 10 dan 12 jam setelah perlakuan MAA. Tunas anggota tubuh depan fetus diisolasi, ditimbang, dibuat ekstrak kasar (F-0) untuk menentukan kadar protein total setiap tunas dan analisis protein dengan teknik SDS-PAGE 1-D. Didapat bahwa pola berat tunas dan kadar protein total setiap tunas mulai berubah pada uk 11 hari + 4 jam, sedang PAGE 1-D memperlihatkan profil protein dengan rentangan massa relatif (Mr) 29-45 kDa yang nyata berbeda dari kontrol. Dengan adanya perbedaan-perbedaan tersebut, maka ditentukan bahwa uk 11 hari + 4 jam adalah umur kebuntingan paling awal yang responsif terhadap perlakuan MAA dan selanjutnya protein dianalisis dengan teknik proteomik.
2. Pemurnian protein. Ekstrak kasar (F-0) dimurnikan dengan cara fraksinasi dengan berbagai kejenuhan amonium sulfat (AS), lalu didialisis dan dianalisis dengan SDS-PAGE 1-D dan 2-D. Hasil PAGE 1-D memperlihatkan bahwa kadar protein fraksi AS 20-40 % (F-II) dan 40-60 % (F-III) pada rentangan Mr 29-66 kDa lebih tinggi dari fraksi lainnya, sehingga F-II dan F-III ditetapkan untuk dianalisis lebih lanjut. PAGE 2-D menunjukkan bahwa pada kelompok perlakuan F-II terdeteksi bercak protein dengan Mr 35,1 kDa dan pI (point of isoelectrofocusing) 6,2 (protein X) yang tidak terdapat pada kontrol. Pada kelompok kontrol F-III didapat bercak protein dengan Mr 41,6 kDa dan pI 6,4 (protein Y) yang tidak terdeteksi pada kelompok perlakuan, sedangkan pada kelompok perlakuan terdeteksi bercak protein dengan Mr 81,7 kDa dan pI 7,3 (protein Z) yang intensitas warnanya sangat

rendah pada kontrol. Selanjutnya protein Y dan Z dikarakterisasi dan diidentifikasi.

3. Karakterisasi dan identifikasi protein. Bercak protein Y hasil PAGE 2-D didegradasi dengan tripsin lalu diekstraksi. 10 % ekstrak protein ini digunakan untuk dianalisis dengan spektrometri massa, sedangkan sisanya 90% digunakan untuk pemurnian ulang. Karakterisasi protein Y dengan teknik MALDI TOF-MS (PDTC; Rockefeller Univ.) menghasilkan 27 fragmen peptida dengan massa berbeda yang digunakan untuk identifikasi tentatif dengan perangkat lunak ProFound. Sembilan dari 27 fragmen peptida memiliki urutan asam amino (AA) yang cocok dengan 4 kandidat protein (P40-8, ribosomal protein RS.40 K, protein p40, dan 37 kDa oncofetal antigen) dan setiap kandidat protein tersusun atas 295 residu AA. Untuk mendapatkan identitas definitif, protein Y dimurnikan ulang dengan teknik HPLC, kemudian satu fragmen peptida ditentukan urutan AA-nya menggunakan mikrosekuenser Edman (PDTC; Rockefeller Univ.) dan dihasilkan urutan AA internal XXDXIYIINLKR. Identifikasi definitif urutan AA internal tersebut dengan perangkat lunak BLAST memperlihatkan bahwa protein Y adalah ribosomal protein RS.40K (reseptor laminin; A29395, NCBI) yang tersusun atas 295 residu AA dan memiliki kemiripan 99,3 % dengan Laminin Binding Protein 34/67 kDa (LBP 34/67 kDa; P14206, SwissProt) yang dikode oleh gen *p40* (MG1:105381).
4. Bercak protein Z dikarakterisasi, dan diidentifikasi dengan cara yang sama seperti yang dilakukan untuk bercak protein Y. Sembilan dari 17 fragmen peptida protein Z memiliki urutan AA yang cocok dengan 3

Model Teratoproteomik

- kandidat protein (dnaK-type molecular chaperone hsc73, heat shock 73 protein, dan heat shock cognate protein 70) dan setiap kandidat protein tersusun atas 646 residu AA. Analisis ulang protein Z menghasilkan urutan AA internal ITITNDKGR. Identifikasi definitif urutan AA tersebut dengan perangkat lunak ScanProsite menunjukkan bahwa protein Z adalah Heat Shock Protein 70 (HSP70; P08109, SwissProt) yang tersusun atas 646 residu AA dan memiliki kemiripan 100 % dengan Heat Shock Cognate Protein 70 (HSCP70; AAH06722, NCBI) yang dikode oleh gen *Hsc70* (MGI: 105384).
5. *Western blotting* (Wb). Untuk memastikan identitas dan keberadaan protein Y dan Z dilakukan teknik Wb dengan antibodi monoklonal LBP 34/67 kDa (LBP-p40) dan HSP70 pada F-0 tunas anggota tubuh depan mencit. Hasil memperlihatkan bahwa protein Y adalah LBP-p40 yang kandungannya menurun, sedangkan protein Z adalah HSP70 yang kandungannya meningkat setelah perlakuan MAA.



Gb. 6.1 Teratogenisitas MAA pada tunas anggota tubuh depan fetus mencit. Empat jam setelah perlakuan MAA (uk 11 hari + 4 jam) kandungan LBP-p40 menurun di nukleus [A] menyebabkan fragmentasi DNA sehingga terjadi kematian sel pada mesoderm keping anggota dan AER. Di permukaan sel [B], perubahan interaksi antara AER dan mesoderm menyebabkan kematian sel pada AER. Peningkatan kandungan HSP70 menghambat kematian sel apoptotik dengan memblok *apoptosome* sehingga tidak berfungsi.

Model Teratoproteomik

LBP-p40 dan HSP70 bekerja secara antagonis dalam memunculkan cacat reduksi jari (¹Sato *et al.*, 1996; ²Wang *et al.*, 1992; ³Kinoshita *et al.*, 1998; ⁴Sudarwati *et al.*, 1995; ⁵Hara *et al.*, 1997; ⁶Ravagnan *et al.*, 2001; ⁷Quairrie *et al.*, 1995; ⁸Kaneda *et al.*, 1998; ⁹Surjono dan Haryono, 2002). l→: menghambat

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada 4 jam setelah perlakuan MAA, LBP-p40 dan HSP70 diperkirakan bekerja secara antagonis dalam mengendalikan laju kematian sel sehingga mengganggu keseimbangan laju kematian dan proliferasi sel tunas anggota tubuh depan mencit. Karena keseimbangan ini tidak tercapai, maka jari menjadi abnormal sebagai efek MAA (Gb 6.1). Dengan demikian dapat dinyatakan bahwa MAA pada perkembangan awal anggota tubuh depan mencit SW terutama menyebabkan perubahan kandungan tiga macam protein yang selanjutnya menimbulkan cacat reduksi jari. Dua protein, yaitu LBP-p40 dan HSP70, telah dikarakterisasi dan diidentifikasi pada penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Aharoni, D., Dantes, A., Oren, M., & Amsterdam, A. 1995. cAMP-mediated signals as determinants for apoptosis in primary granulosa cells. *Exp. Cell Res.*, **218**: 271-282.
- Aigaki, T., Seong, K.H. and Matsuo. (2002), Longevity determination genes in *Drosophila melanogaster*. *Mech. Ageing Dev.*, **123** (12), 1531-41.
- Arcangelis, A., Mark, M., Kreidberg, J., Sorokin, L. and Georges-Labouese, E. (1999), Synergistic activities of $\alpha 3$ and $\alpha 6$ integrins are required during apical ectodermal ridge formation and organogenesis in the mouse. *Development*, **127**: 5133-5144.
- Ambroso, J.F., Stedman, D.B., Elswick, B.A. and Welsch, F. (1999), Characterization of cell death induced by 2-methoxyethanol in CD-1 mouse embryos on gestation day 8. *Teratology*, **58**, 231-240.
- Anderson, N.L., Matheson, A.D. and Steiner, S. (2000), Proteomics: applications in basic and applied biology. *Curr. Opin. Biotech.*, **11**, 408-412.
- Auth, D. and Brawerman, G. (1992), A 33-kD polypeptide with homology to the laminin receptor: component of translation machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 4368-4372.
- Beere, H.M., Wolf, B.B., Cain, K., Mosser, D.D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Taylor, P., Marimoto, R.I, Cohen, G. and Green, D.R. (2000), Heat shock protein 70 inhibits

apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Cell Biol.*, **2**, 469-475.

- Bohring, C. and Kause, W. (1999), The characterisation of human spermatozoa membrane proteins: Surface antigens and immunological infertility. *Electrophoresis*, **20**: 1-5.
- Bollag, D.M. and Edelman, S.J. (1991), *Protein methods*. Wiley Liss. New York, 79-81.
- Buto, S., Taglianue, E., Ardini, E., Magnifico, A., Ghirelli, C., Brule, F.V.D., Castronovo, V., Colnaghi, M.I., Sobel, M.E. and Menard, S. (1998), Formation of the 67-kDa laminin receptor by acylation of the precursor. *J. Cell. Biochem.*, **69**, 244-251.
- Cheever, K.L., Swearengen, T.F., Edwards, R.M., Nelson, B.K., Werren, D.W., Conover, D.L and DeBord, D.G. (2001), 2-Methoxyethanol metabolism, embryonic distribution, and macromolecular adduct formation in the rat: the effect of radiofrequency radiation-induced hyperthermia. *Toxicol. Lett.*, **10**, 1-15.
- Darmanto, W., Sudarwati, S. and Sutasurya, L.A. 1994. Effects of methoxyacetic acid on prenatal development of mice. *Environ. Med.*, **38** (1): 25-28.
- Davis, L.G., Kuehl, W.M. and Battey, J.F. (1994), *Basic methods in molecular biology*. Appleton and Lange. Connecticut, 680-690.
- Dunbar, B.S., Kimura, H. and Timmons, T.M. (1990), Protein analysis using high- resolution two dimensional

- polyacrylamide gel electrophoresis. In: *Guide to protein purification*. Deutscher, M.P (ed). Academic Press Inc. San Diego, 441-459.
- Dydbukt, J.M., Ankarcrona, M., Burkitt, M., Sjöholm, A., Strom, K., Orrenius, S. and Nicotera, P. (1994), Different prooxidant levels stimulate cell growth, activate apoptosis, or produce necrosis in insulin-secreting RINm5F cells. *J. Biol. Chem.*, **269**: 30553-60.
- Ellis, R.E., Yuan, J. and Horvitz, H.R. 1991. Mechanisms of functions of cell death. *Annu.Rev.Cell Biol.* **7** : 663-693.
- Evan, G. and Littlewood, T. (1998), A matter of life and cell death. *Science*, **281**, 1317-1322.
- Fernandez, J., Gharahdaghi, F. and Mische, S.M. (1998), Routine identification of protein from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gels or polyvinyl difluoride membranes using matrix assisted laser desorption/ ionization-time of flight-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *Electrophoresis*, **19**, 1036-1045.
- Fichmann, J. (1998), *Two-dimensional electrophoresis: The basic separation method in proteome analysis*. Application Note, Amesham Pharmacia Biotech., 8-10.
- Garfin, D.F. 1990. One-dimensional gel electrophoresis. In: *Methods in enzymology, guide to protein purification*. Deutscher, M.P (ed). Academic Press Inc. San Diego. pp.425-441.

Model Teratoproteomik

- Garza, K.M., Chan, S.M., Suri, R., Nguyen, L.T., Odermatt, B., Schoenberger, S.P. and Ohashi, P.S. (2000), Role of antigen-presenting cells in mediating tolerance and autoimmunity. *J. Exp. Med.*, **191**(11), 2021-7.
- Gestern, D.M. (1996), *Gel electrophoresis protein*. John Wiley and Sons. Toronto, 1-111.
- Gloe, T., Riedmayr, S., Sohn, H.Y. and Pohl, U. (1999), The 67-kDa laminin-binding protein is involved in shear stress-dependent endothelial nitric-oxide synthase expression. *J. Biol. Chem.*, **274**, 15996-16002.
- Goering, P.L., Fisher, B. and Kish, C.L. (1993), Stress protein synthesis induced in rat liver by cadmium precedes hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **122**, 139-148.
- Gygi, S.P., Corthals, G.L., Zhang, Y., Rochon, Y. and Aebersold, R. (2000), Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteomic technology. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**, 9390-9395.
- Hames, B.D., Hooper, N.M. and Haughton, J.D. (1998), *Instant notes in biochemistry*. Bios Scientific Publishers. Liverpool, 182-189.
- Hara, K., Satoh, K. and Ide, H. (1997), Apical ectodermal ridge-dependent expression of the chick 67 kDa laminin binding protein gene (cLbp) in developing limb bud. *Zool. Sci.*, **14**, 969-978.
- Hays, S.M., Elswick, B.A., Blumental, G.M., Welsch, F., Conolly, R.B. and Gargas, M.L. (2000), Development of physiologically based pharmacokinetic model of 2-

- methoxyethanol and 2-methoxyacetic acid disposition in pregnant rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **163**, 67-74.
- Henikoff, J.G., Pietrokovski, S., McCallum, C.M. and Henikoff, S. (2000), Blocks-based methods for detecting protein homology. *Electrophoresis*, **21**, 1700-1706.
- Kaneda, Y., Kinoshita, K., Sato, M., Saeki, R.Y., Wataya-Kaneda, M. and Tanaka, K. (1998), The induction of apoptosis in HeLa cells by the loss of LBP-p40. *Cell Death Differ.*, **5**, 20-28.
- Khera, K.S. (1993), Mouse placenta: hemodynamics in the main maternal vessel and histopathologic changes induced by 2-methoxyethanol and 2-methoxyacetic acid following maternal dosing. *Teratology*, **47**, 299-310.
- Kiang, J.G. and Tsokos, G.C. (1998), Heat shock protein 70 kDa: Molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol. Ther.*, **80**, 183-201.
- Kim, D.J., Chung, J.H., Lee, J.S., Moon, Y.I., Seo, J.S. and Chung, H.K. (2000), Production and characterization of a monoclonal antibody specific to the human 70-kDa heat shock protein. *Hybridoma*, **19**, 369-374.
- Kinoshita, K., Kaneda, Y., Sato, M., Saeki, Y., Wataya-Kaneda, M. and Hoffman, A. (1998), LBP-p40 binds DNA tightly through associations with histones H2A, H2B, and H4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **253**, 277-282.
- Klein, E. (2001), Laminin binding protein /p40: Identifizierung und charakterisierung als neues IRS-1 bindendes

Model Teratoproteomik

protein. Mathematisch Naturwissenschaftliche
Fakultät der Universität zu Köln.

- Klotz, I.M. (1989), Ligand-protein binding affinities. In: *Protein function, a practical approach*. T.E. Creighton (ed). IRL Press. Oxford, 25-35.
- Ku, W.W., Wine, R.N., Chae, B.Y., Ghanayem, B.I. and Chapin, R.E. (1995), Spermatoct toxicity of 2-methoxyethanol (ME) in rats and guinea pigs: Evidence for the induction of apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **134**: 100-110.
- Landowski, T.H., Dratz, E.A. and Starkey, J.R. (1995), Studies of the structure of metastasis-associated 67 kDa laminin binding protein: fatty acid acylation and evidence supporting dimerization of the 32 kDa gene product to form the mature protein. *Biochemistry*, **34**, 11276-11287.
- Li, C.Y., Lee, J.S., Ko, Y.G., Kim, J.I. and Seo, J.S. (2000), Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J. Biol. Chem.*, **18**, 25665-25671.
- Li, L.H., Wine, R.N., Miller, D.S., Reece, J.M., Smith, M. and Chapin, R.E. (1997), Protection against methoxyacetic acid induced spermatoctye apoptosis with calcium channel blockers in cultured rat seminiferus tubules: possible mecahnisms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **144**: 105-119.
- Lisminingsih, R.D. (1996), *Pengaruh asam metoksiasetat yang diberikan pada periode awal pembentukan anggota tubuh*

Aceng Ruyani

terhadap perkembangan embrio mencit (Mus musculus) albino Swiss Webster. Tesis Magister Program Studi Biologi. Institut Teknologi Bandung.

- Martgrita, M.M., Surjono, T.W. dan Sudarwati, S. (2000), *Asam metoksiasetat mempengaruhi perkembangan seluler anggota badan embrio mencit Swiss Webster: efek terhadap kandungan DNA dan protein dalam jaringan anggota badan*. Seminar Perhimpunan Ahli Anatomi Indonesia, Denpasar, 28-29 Juli 2000.
- Martin, G.R. (1998), The role of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes Dev.*, **12**: 1571-1586.
- Mebus, C.A. and Welsch, F. 1989. The possible role of one-carbon moieties in 2-methoxyethanol and 2-methoxyacetic acid induced developmental toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **99** : 98-109.
- Millar, D.G., Garza, K.M., Odermatt, B., Elford, A.R., Ono, L., Li, Z. and Ohashi, P.S. (2003), Hsp70 promotes antigen-presenting cell and converts T-cell tolerance to autoimmunity *in vivo*. *Nat. Med.*, **12**, 1469-76.
- Merril, C.R. (1990), Gel-staining techniques In: *Guide to protein purification*. Deutscher, M.P (ed). Academic Press Inc. San Diego. pp.477-488.
- Milligan, C.E. and Schwartz, L.M. (1996), Programmed cell death during development of animals. In: *Cellular aging and cell death*. N.J.Holbrook, G.R.Martin & R.A.Lochshin (ed). Wiley Liss. New York. pp.181-208.

- Moreau, N., Prudhomme, C. and Angelier, N. (1998), Cell-cycle-dependent nuclear translocation of HSP70 in amphibian embryonic cells. *Int. Dev. Biol.*, **42**, 633-636.
- Narumi, K., Inoue, A., Tanaka, M., Isemura, M., Shimo-Oka, T., Abe, T., Nukiwa, T and Satoh, K. (1999), Inhibition of experimental metastasis of human fibrosarcoma cells by anti-recombinant 37-kDa laminin binding protein antibody. *Jpn J. Cancer Res.*, **90**(4), 425-431.
- O'Flaherty, E.J., Nau, I.L., McCandless, D., Beliles, R.P., Schreiner, C.M. and Scott, W.J. (1995), Physiologically based pharmacokinetics of methoxyacetic acid: dose-effect considerations in C57BL/6 mice. *Teratology*, **52**, 78-89.
- Pieper, A.A., Verma, A., Zhang, J. And Snyder, S.H. (1999), Poly(ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *TIPS*, **20**: 171-181.
- Peterson, G.I. (1977), A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Analyt. Biochem.*, **83**, 343-356.
- Quarrie, L.H., Addey, C.V.P. and Wilde, C.J. (1995), Apoptosis in lactating and involuting mouse mammary tissue demonstrated by nick-end DNA labelling. *Cell Tissue Res.*, **281**, 413-419.
- Rasjad, C., Yamashita, K., Datu, A.R. and Yasuda, M. (1991a). Pattern of limb malformation in mice induced by methoxyacetic acid. *Hiroshima J. Med. Sci.*, **40** (3), 93-99.

- Rasjad, C., Yamashita, K., Datu, A.R. and Yasuda, M. (1991b), Pathogenesis of limb malformation in mice induced by methoxyacetic acid. *Hiroshima J. Med. Sci.*, **40**(3), 101-107.
- Ravagnan, L., Gurbuxani, S.O, Susin, S.A., Maise, C., Daugas, E., Zamzami, N., Mak, T., Jaattela, M., Penninger, J.M., Garrido, C. and Kroemer, G. (2001), Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat. Cell Biol.*, **3**(9), 839-843.
- Ritter, E.J., Scott, W.J., Randall, J.L. and Ritter, J.M. (1985), Teratogenicity of dimethoxyethylphthalate and its metabolites methoxyethanol and methoxyacetic acid in the rat. *Teratology*, **32**, 25-31.
- Ruyani, A., Sudarwati, S., Sutasurya, L.A. dan Sumarsono, S.H. (2001a), Perubahan profil protein tunas anggota tubuh depan mencit (*Mus musculus*) akibat perlakuan dengan asam metoksiasetat (MAA). *Medika*, **27**, 363-367.
- Ruyani, A., Sudarwati, S., Sutasurya, L.A. dan Sumarsono, S.H. (2001b), Protein terkait dengan teratogenisitas anggota tubuh mencit Swiss Webster akibat perlakuan dengan asam metoksiasetat (MAA). *Proc.ITB*, **33**, 81-85.
- Ruyani, A., Sudarwati, S., Sutasurya, L.A., Sumarsono, S.H. and Gloe, T. (2003), The laminin binding protein p40 is involved in inducing limb abnormality of mouse fetuses as the effects of methoxyacetic acid treatment. *Toxicol. Sci.*, **75** (1), 148-153.

Model Teratoproteomik

- Ruyani, A., Muktiningsih dan Barlian, A. (2004), Penggunaan teknik proteomik dalam penelitian bidang ilmu dasar dan terapan. *Medika*, **30**, 179-184.
- Sarto, C., Binz, P.A. and Morcarelli, P. (2000), Heat shock protein in human cancer. *Electrophoresis*, **21**, 1218-1226.
- Sarto, C., Frutiger, S., Cappellano, F., Sanchez, J.C., Doro, G., Catanzaro, F., Hughes, G.J., Hochstrasser, D. F. and Mocarelli, P. (1999), Modified expression of plasma glutathione peroxidase and manganese superoxidase dismutase in human renal cell carcinoma. *Electrophoresis*, **20**, 3458-3466.
- Sato, M., Kinoshita, K., Kaneda, Y., Saeki, Y., Iwamatsu, A. and Tanaka, Y. (1996), Analysis of nuclear localization of laminin binding protein precursor p40 (LBP/p40). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **299**, 896-901.
- Satoh, K., Narumi, K., Abe, T., Sakai, T., Kikuchi, T., Tanaka, M., Shimo-Oka, T., Uchida, M., Tezuka, F., Isemura, M. and Nukiwa, T. (1999), Diminution of 37-kDa laminin binding protein expression reduces tumour formation of murine lung cancer cells. *Br.J.Cancer*, **80**, 1115-1122.
- Sconzo, G., Palla, F., Agueli, C., Spinelli, G., Giudice, G., Cascino, D. and Geraci, F. (1999), Constitutive hsp70 is essential to mitosis during early cleavage of *Paracentrotus lividus* embryos: the blockage of constitutive hsp70 impairs mitosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **260**, 143-149.

- Scott, W.J. (1979), Physiological cell death in normal and abnormal rodent limb development. In: *Abnormal embryogenesis: Cellular and molecular aspects*. T.V.N. Persaud (ed). University Park Press. pp.135-142.
- Shah, G.M., Shah, R.G. and Poireir, G.G. (1999). Different cleavage pattern for poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis and necrosis in HL-60 cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **229**: 838-844.
- Sjoberg, P., Lindqvist, N.G. & Ploen, L. 1986. Age-dependent response of the rat testes to di(2-ethylhexyl) phtalate. *Environ.Health Perspect.*, **65**: 237-242.
- Sleet, R.B., Welsch, F., Myers, C.B. and Marr, M.C. (1996), Developmental phase specificity and dose-response effects of 2-methoxyethanol in rats. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **29**, 131-139.
- Slotkin, T.A., Seidler, F.J., Kavlock, R.J. and Bartolome, J.V. (1991), Fetal dexamethasone exposure impairs cellular development in neonatal rat heart and kidney: effect on DNA and protein in whole tissues. *Teratology*, **43**, 301-306.
- Sorokin, A.V., Mikhailov, A.M., Kachko, A.V., Protopopova, E.V., Konovalova, S.N., Andrianova, M.E., Netesov, S.V., Kornev, A.N. and Loktev, V.B. (2000), Human recombinant laminin-binding protein: isolation, purification, crystalization. *Biochemistry (Mosc)*, **65**(5): 546-53.
- Subjeck, J. & Shyy, T.T. (1986), Stress protein systems of mammalian cells. *Amer. J. Physiol.*, **250**: 1-17.

Model Teratoproteomik

- Sudarwati, S., Surjono, T.W. dan Yusuf, A.T. (1993), Efek "methoxyacetic acid" (MAA) terhadap perkembangan anggota mencit (*Mus musculus*) galur A/J. *JMS*, 1, 11-19.
- Sudarwati, S., Surjono, T.W. dan Yusuf, A.T. (1995), Kelainan perkembangan awal anggota depan mencit A/J yang diinduksi asam metoksiasetat (MAA). *JMS*, Supplement H, 60-70.
- Suripto, Sjamrizal, Surjono, T.W. dan Kamal, A. (1996), *Pengaruh asam metoksiasetat terhadap kandungan DNA pada anggota badan embrio mencit (Mus musculus) Swiss Webster*. Laporan Penelitian OPF-ITB No.1676096 1995/1996.
- Surjono, T.W. and Haryono, A. (2002), *Cellular pathogenesis of methoxyacetic acid-induced digit malformation in Swiss Webster mice*. The Asahi Glass Foundation. Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Department of Biology, Institute of Technology Bandung, 18-22.
- Surrjono, T.W., Martgrita, M.M. and Sudarwati, S. (1999), Effect of methoxyacetic acid on DNA and protein contents, and protein profile in the limbs of Swiss Webster mouse embryos. *JMS*, 4(2), 119-129.
- Syed, V and Hecht, N.B. (1998), Rat pachytene spermatocytes down-regulate a polo-like kinase and up-regulate a thiol-specific antioxidant protein, whereas sertoli cells down-regulate a phosphodiesterase and up-regulate an oxidative stress protein after exposure to methoxyethanol and methoxyacetic acid. *Endocrinology*, 139, 3503-3511.

- Takagi, A., Yamada, T., Hayasi, K., Nakade, Y., Kojima, T., Takamatsu, J., Shibata, E., Ichihira, G., Takeuchi, Y. and Murate, T. (2002). Involvement of caspase 3 mediated apoptosis in hematopoietic cytotoxicity of metabolites of ethylene glycol monomethyl ether. *Ind Health*, **40**(4): 371-4.
- Takayama, M. and Tsugita, A. (2000), Sequence information of peptides and proteins with in-source decay in matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis*, **21**, 1670-1677.
- Tanaka, M., Narumi, K., Isemura, M., Abe, M., Sato, Y., Abe, T., Saijo, Y., Nukiwa, Y. and Satoh, K. (2000), Diminution of 37 kDa laminin binding protein expression reduces tumour formation of murine lung cancer cells. *Br. J. Cancer*, **80**, 1115-1122.
- Thorsteinsdottir, S., Roelen, B.A.J., Freud, E., Gaspar, A.C., Sonnenberg, A., Mummery, C.L. (1995), Expression pattern of laminin receptor splice variants $\alpha 6\beta 1$ and $\alpha 6\beta 1$ suggest different roles in mouse development. *Dev. Dynamics*, **204**: 240-258.
- Terry, K.K., Elswick, B.A., Welsch, F. and Conolly, R.B. (1996), A physiologically based pharmacokinetic model describing 2-methoxyacetic acid disposition in the pregnant mouse. *Occup. Hyg.*, **2**, 57-65.
- Tevares, A.T., Tsukui, T. and Belmonte, J.C.I. (2000), Evidence that members of the Cut/Cux/CDP family may be involved in AER positioning and polarising activity during chick limb development. *Development.*, **127**: 5133-5144.

Model Teratoproteomik

- Turner, P.C., McLennan, A.G., Bates, A.D. and White, M.R.H. (1997), *Instant notes in molecular biology*. Bios Scientific Publisher. Liverpool, 235-260.
- Umansky, S.R. 1996. Apoptosis: molecular and cellular mechanisms (a review). *Mol.Biol.*, **30** : 285-295.
- Verlaet, M., Deregowski, V., Denis, G., Humblet, C., Stalmans, M.T., Bours, V., Castronova, V., Boniver, J. and Defresne, M.P. (2001), Genetic imbalances in preleukemic thymuses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **283**, 12-18.
- Wang, K.S., Kuhn, R.J., Strauss, E.G., Ou, S. and Strauss, J.H. (1992), High-affinity laminin receptor is a receptor for Sindbis virus in mammalian cells. *J. Virol.*, **66**, 4992-5001.
- Welsch, F., Terry, K.K., Stedman, D.B. and Elswick, B.A. (1996), Linking embryo dosimetry and teratogenic responses to 2-methoxyethanol at different stages of gestation. *Occup. Hyg.*, **2**, 121-130.
- Zakeri, Z.F and Ahuja, H.S. 1994. Apoptotic cell death in the limb and its relationship to pattern formation. *Biochem. Cell Biol.*, **72** : 603-613.

MODEL TERATOPROTEOMIK

Proteomik (dari kata proteome, PROTEin complement to genOME) adalah teknik yang digunakan untuk memahami mekanisme fisiologi dan biokimia dengan membandingkan keberadaan protein-protein tertentu secara kualitatif dan kuantitatif yang berasal dari sel atau jaringan pada kondisi yang berbeda. Protein adalah produk gen yang fungsional, sehingga keberadaan protein akan lebih mencerminkan kondisi sebenarnya dari sel atau jaringan yang diisolasi. Oleh karena hasil transkripsi gen (mRNA) organisme eukariot tidak langsung ditranslasikan menjadi protein, maka kondisi patologis atau toksisitas tertentu lebih efektif dipelajari melalui perbedaan penampakan protein daripada mRNA (mRNA differential display).

Akhir-akhir ini teknik proteomik berkembang pesat sejalan dengan penyempurnaan dua teknik utama, yaitu elektroforesis dua dimensi (2-DE), dan spektrometri massa (MS). Teknik 2-DE diperlukan untuk memisahkan serta memurnikan ekstrak kasar protein, sedangkan teknik MS dibutuhkan untuk mengkarakterisasi dan mengidentifikasi protein hasil pemurnian. Teknik proteomik telah digunakan dalam penelitian bidang biologi dasar dan terapan seperti medis dan toksikologi perkembangan (teratologi), namun belum menjadi kegiatan rutin. Buku ini menyajikan upaya rintisan penerapan analisis protein dalam penelitian bidang teratologi, kemudian disebut teratoproteomik.

UNIB PRESS
UNIVERSITAS BENGKULU
Jln. W.R. Supratman, Bengkulu

ISBN : 978-979-9431-45-5

