

Analisis Struktur dan Karakteristik Met-Sitoglobin Reduktase yang dipurifikasi dari Hati Sapi dibandingkan dengan NADH-Diaforase Darah Sapi dan NADH-Sitokrom B5 Reduktase Rekombinan Manusia = Comparative studies on structure and characteristic of met-cytoglobin reductase purified from bovine liver, NADH-diaphorase bovine blood and human recombinant NADH-cytochrome b5 reductase

Gissi Novientri, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=20514892&lokasi=lokal>

Abstrak

Transpor oksigen dalam tubuh membutuhkan protein yang memiliki gugus hem. Hemoglobin (Hb), mioglobin (Mb), dan sitoglobin (Cygb) merupakan beberapa hemoprotein yang diketahui berfungsi sebagai transporter oksigen dalam darah, otot, dan jaringan. Oksigen terikat secara kovalen koordinasi pada atom Fe yang berada di gugus hem. Oksidasi pada atom Fe yang terjadi secara spontan, berdampak pada hilangnya fungsi pengikatan oksigen. Enzim metHb reduktase (NADH-diaforase) dan metMb reduktase (NADH-sitokrom b5 reduktase/CYB5R3) telah dikonfirmasi keberadaannya. Namun, sistem redoks Cygb hingga saat ini belum diketahui secara pasti. Enzim metCygb reduktase dari hati sapi diisolasi menggunakan dapar pelisis yang dilanjutkan dengan purifikasi kromatografi afinitas menggunakan matriks Cibacron-blue. Matriks tersebut dapat memurnikan protein yang memiliki lipatan nukleotida untuk mengikat NADH atau NADPH. Hasil isolasi dan purifikasi enzim metCygb reduktase dari hati sapi (60,30 kDa) menunjukkan kinetik reduksi metCygb menjadi deoksiCygb yang lebih baik ($R^2=0,8771$) dibandingkan diaforase (30,09 kDa) dari darah sapi ($R^2=0,1606$) dan CYB5R3 rekombinan manusia ($R^2=0,4013$). Analisis perbandingan karakteristik ketiga enzim menggunakan SDS-PAGE, western blot dan sidik peptida dua dimensi menunjukkan metCygb reduktase merupakan enzim yang berbeda dari kedua reduktase lainnya namun diduga memiliki bagian struktur yang serupa dengan diaforase dan CYB5R3. Analisis struktur dengan MALDI-TOF/TOF dan pensejajaran sekuen menunjukkan metCygb reduktase dari hati sapi tidak homolog dengan kedua reduktase lainnya. Pemodelan molekuler menunjukkan bahwa metCygb reduktase memiliki lipatan heme-dependent catalase. Docking enzim dengan hem dan sumber elektron NADH serta NADPH memiliki energi Gibbs bernilai negatif yang mengindikasikan kestabilan kompleks yang baik dan pengikatan ligan secara spontan. Disimpulkan bahwa metCygb reduktase merupakan enzim baru yang tentatif disebut sebagai NADPH-metCygb oksidoreduktase.

.....Oxygen transport in the body requires proteins that have hem groups. Hemoglobin (Hb), myoglobin (Mb), and cytoglobin (Cygb) are hemoproteins that known as oxygen transporters in blood, muscles, and tissues. Oxygen is coordination-covalently bonded to the Fe atom in the hem group. Oxidation of the Fe atom has an impact on the loss of the oxygen binding function. MetHb reductase (NADH-diaphorase) and metMb reductase (NADH-cytochrome b5 reductase/ CYB5R3) have been confirmed. However, the Cygb redox system is not yet known with certainty. MetCygb reductase from bovine liver was isolated using a lysis buffer followed by affinity chromatography purification using the Cibacron-blue matrix. The matrix can purify proteins that have nucleotide folds to bind NADH or NADPH. The results of the isolation and purification of the metCygb reductase enzyme from bovine liver (MW=60.30 kDa) showed better reduction kinetic metCygb to deoxyCygb ($R^2=0.8771$) than diaphorase (MW=30.09 kDa) from bovine blood

($R^2=0.1606$) and human recombinant CYB5R3 ($R^2=0.4013$). Comparative analysis of the reductase characteristics using SDS-PAGE, western blot and 2D peptide fingerprinting shows that metCygb reductase is an enzyme that is different from the other two reductases but is thought to have a similar structure to diaphorase and CYB5R3. Structural analysis with MALDI-TOF/TOF and sequences alignment showed that metCygb reductase from bovine liver was not homologous with the other two reductases. Molecular modeling shows that metCygb reductase has a heme-dependent catalase fold. Docking enzymes with heme groups and electron sources (NADH and NADPH) have negative Gibbs energy which indicates good complex stability and spontaneous ligand binding. It was concluded that metCygb reductase is a new enzyme tentatively referred to as NADPH-metCygb oxidoreductase.