

ABSTRAK

PERAN *SPACER* DAN *LINKER* PEPTIDA DALAM SEKRESI PROINSULIN ASPART PADA *Pichia pastoris* DAN KARAKTERISASI PROINSULIN ASPART

Oleh
Popi Asri Kurniatin
NIM: 30514009
(Program Studi Doktor Kimia)

Insulin adalah suatu hormon peptida yang digunakan untuk terapi diabetes. Insulin terdiri atas dua rantai peptida (A dan B) yang dihubungkan dengan dua ikatan disulfida antar rantai dan satu ikatan disulfida dalam rantai A. Insulin telah banyak dimodifikasi menjadi insulin analog untuk mendapatkan efek yang sesuai kebutuhan terapi. Salah satu insulin analog yang banyak digunakan untuk terapi diabetes di Indonesia adalah insulin Aspart. Insulin Aspart adalah insulin analog kerja cepat yang diperoleh dengan mensubstitusi asam amino prolin pada B28 menjadi asam aspartat. Modifikasi ini meningkatkan gaya tolak menolak antar rantai insulin sehingga menghambat pembentukan dimer dan akan mempercepat absorpsi insulin.

Insulin utamanya diproduksi dalam bentuk proinsulin, yaitu rantai B dihubungkan dengan suatu *linker* peptida dengan rantai A. Keberhasilan produksi proinsulin ekstraseluler di *Pichia pastoris* dipengaruhi oleh banyak faktor, yaitu: efisiensi sekresi yang ditentukan oleh signal peptida, desain proinsulin yang melibatkan penggunaan *linker*, kondisi produksi, dan variasi galur *P. pastoris*.

Signal peptida α -MF yang berasal dari *Saccharomyces cerevisiae* adalah signal peptida yang banyak digunakan untuk mensekresikan proinsulin pada *P. pastoris*. Signal peptida ini memiliki *spacer* EAEA yang menghubungkan signal peptida dengan proinsulin. Namun, sekresi proinsulin menggunakan signal peptida α -MF memiliki kelemahan, yaitu tidak sepenuhnya pemotongan *spacer* EAEA sehingga dihasilkan campuran proinsulin dengan penambahan asam amino pada ujung-N. Sementara itu, delesi *spacer* ini menyebabkan penurunan ekspresi hingga 54%. Penggunaan *spacer* EEAEAEAEPK menggantikan *spacer* EAEA dapat meningkatkan produksi proinsulin di *P. pastoris*. Akan tetapi, *spacer* EEAEAEAEPK didegradasi sebagian oleh *yeast aspartyl protease 3* menghasilkan campuran proinsulin dengan massa molekul yang bervariasi.

Selanjutnya, pemilihan *linker* dalam desain proinsulin dapat mempengaruhi tingkat ekspresi proinsulin. *Linker* yang paling banyak digunakan dalam desain proinsulin adalah AAK dan RWR. Faktor-faktor produksi seperti konsentrasi metanol untuk induksi, kerapatan sel, dan aerasi; penting untuk ditentukan agar diperoleh kondisi

optimum untuk memproduksi proinsulin. Selain itu, variasi galur *P. pastoris* dengan fenotipe yang berbeda dapat menghasilkan proinsulin dengan tingkat produksi yang berlainan.

Tujuan penelitian ini adalah mempelajari pengaruh signal peptida α -MF tanpa *spacer* dan dengan *spacer* EEAEAEAEPK terhadap tingkat sekresi proinsulin Aspart dengan *linker* RWR dan AAK; menentukan kondisi optimum produksi dan variasi galur untuk menghasilkan proinsulin terbaik; serta mengkarakterisasi proinsulin. Penelitian dibagi menjadi tiga tahap, tahap pertama, mempelajari tingkat sekresi proinsulin dengan dua variasi *linker* AAK dan RWR pada *P. pastoris* menggunakan signal peptida α -MF tanpa *spacer* dan dengan *spacer* EEAEAEAEPK. Tahap kedua adalah mengkaji faktor-faktor yang mempengaruhi produksi proinsulin Aspart yang meliputi konsentrasi metanol, aerasi, kerapatan sel, dan variasi galur. Tahap ketiga adalah mengkarakterisasi proinsulin Aspart, meliputi bobot molekul, bentuk terglisosilasi, dan ikatan disulfida. Karakterisasi dilakukan dengan metode RP-HPLC, LC-MS/MS, dan ESI-MS.

Proinsulin Aspart dengan *linker* RWR berhasil disekresikan menggunakan signal peptida α -MF tanpa *spacer*. Sementara itu, penggunaan signal peptida α -MF dengan *spacer* EEAEAEAEPK dan *linker* AAK tidak meningkatkan hasil sekresi. Analisis *Western Blot* dan ESI-MS menunjukkan adanya satu jenis proinsulin Aspart berukuran 6,3 kDa pada ekstrasel dan tidak ditemukan di intrasel. Hasil ini mengindikasikan bahwa pemotongan signal peptida dari proinsulin tidak dipengaruhi oleh keberadaan *spacer*. Oleh karena itu, *spacer* tidak memiliki peran yang signifikan pada sekresi proinsulin Aspart pada *P. pastoris*.

Proinsulin Aspart dengan *linker* RWR dapat diekspresikan paling baik menggunakan signal peptida α -MF tanpa *spacer* pada *P. pastoris* galur KM71. Kondisi produksi optimal untuk menghasilkan proinsulin Aspart adalah pada kondisi aerasi (rasio volume kultur terhadap ukuran labu Erlenmeyer) 1:25, kerapatan sel kultur (OD_{600}) ~60, dan induksi metanol dengan konsentrasi akhir 2% (v/v) selama dua hari. Proinsulin Aspart yang dihasilkan mempunyai ukuran molekul 6,3 kDa, kemungkinan sudah membentuk jembatan disulfida, dan tidak ditemukan dalam bentuk terglisosilasi.

Penggunaan signal peptida α -MF tanpa *spacer* untuk sekresi proinsulin sangat menguntungkan karena hanya menghasilkan satu jenis proinsulin dengan bobot molekul 6,3 kDa, sesuai dengan ukuran teoritis molekul proinsulin Aspart. Penggunaan *linker* RWR pada desain proinsulin Aspart dapat meningkatkan tingkat ekspresi. Produksi proinsulin pada *P. pastoris* umumnya menggunakan galur GS115 dan X33. Pada penelitian ini, ekspresi proinsulin Aspart menunjukkan hasil terbaik pada galur KM71. Kelebihan galur KM71 adalah membutuhkan induksi metanol dengan jumlah yang lebih rendah daripada galur GS115 dan X33.

Kata kunci: *spacer* peptida, *linker*, proinsulin Aspart, *Pichia pastoris*, sekresi protein.

ABSTRACT

THE ROLE OF SPACER AND LINKER PEPTIDES IN PROINSULIN ASPART SECRETION IN *Pichia Pastoris* AND CHARACTERIZATION OF PROINSULIN ASPART

By

Popi Asri Kurniatin

NIM: 30514009

(Doctoral Program in Chemistry)

Insulin is a peptide hormone used in diabetes therapy. It comprises of two polypeptide chains, connected by two interchain disulfide bonds and one intrachain disulfide bond. Insulin has been modified to insulin analog to meet the therapeutic requirement. One of the insulin analog that is widely used in Indonesia is insulin Aspart. Insulin Aspart is a fast-acting insulin analog where amino acid of B28 has been substituted from proline to aspartic acid, resulting in the increase of repulsive force between chains. Hence, the dimer formation of insulin is inhibited, leading to a rapid absorption of insulin.

*Insulin is mainly produced as a proinsulin in which the B chain is connected to the A chain by a peptide linker. Successful production of extracellular proinsulin in *P. pastoris* is determined by many factors, i.e. specific signal peptide for efficient secretion, the design involving the use of proinsulin linker, the strain of *P. pastoris*, and production conditions.*

*The α -MF signal peptide originating from *Saccharomyces cerevisiae* is widely used for proinsulin secretion in *Pichia pastoris*. The signal peptide consists of a spacer EAEA connecting it to the proinsulin. However, the disadvantage of proinsulin secretion using α -MF signal peptide is the incomplete cleavage of the EAEA spacer resulting in mixture forms of proinsulins with the addition of amino acids at the N-terminal protein. Meanwhile, deletion of this spacer decreases expression level to 54%. The addition of spacer peptide EEAEAEAEPK, instead of EAEA, successfully enhances the production of proinsulins in *P. pastoris*. Unfortunately, the extended spacer peptide is partially degraded by yeast aspartyl protease 3, producing mixture forms of proinsulins with various molecular weight. Furthermore, the selection of linker in the design of proinsulins influences the expression level of proinsulins. The most widely used linkers in proinsulins are AAK and RWR. The factors that can be optimized to obtain high level production of proinsulin are methanol induction, cell density, and oxygen supply. In addition, proinsulin production in various *P. pastoris* strains show different yields.*

*The purposes of this research are to study the effect of spacer and linker peptides in the secretion of proinsulin Aspart in *P. pastoris*, the optimum conditions of*

proinsulin Aspart production, the types of P. pastoris strains for proinsulin Aspart production, and to characterize the proinsulin Aspart. The research was divided into three main studies, the first one is to study the secretion of proinsulin Aspart with linker variety of RWR and AAK using α -MF signal peptide without spacer and α -MF signal peptide with the EEAEAEAEPK spacer. The second stage is to examine the factors that influence the production of proinsulin Aspart including methanol concentration for induction, aeration, cell density, and variety of strains. Finally, the characterization of the proinsulin Aspart; molecular weight, glycosylated forms of proinsulin Aspart, and disulfide bond. Characterization was carried out by the methods of RP-HPLC, LCMS/MS, ESI-MS.

Proinsulin Aspart with the linker RWR is successfully secreted using α -MF signal peptide without spacer. Meanwhile, α -MF signal peptide with spacer EEAEAEAEPK did not increase the expression level of proinsulin Aspart. The Western Blot analysis and ESI-MS show an extracellular proinsulin Aspart with a size of 6.3 kDa. Whereas the respective molecule was not found in the intracellular fluid. This finding suggests that the cleavage of signal peptide is not determined by spacer peptides. Therefore, the spacer peptide is not essential for proinsulin Aspart secretion in P. pastoris.

Proinsulin Aspart constituting of linker RWR is optimally expressed in P. pastoris KM71 using α -MF signal peptide without spacer. The proinsulin Aspart is optimally produced by 2% (v/v) of methanol induction for two days at initial OD_{600} of ~60, and aeration (ratio of culture volume to flask volume) of 1:25. The molecular weight of proinsulin Aspart is 6.3 kDa, presumably containing three disulfide bonds, and the glycosylated form of proinsulin Aspart is not observed.

The use of α -MF signal peptide without a spacer for the secretion of proinsulins is very beneficial because it only produces one type of proinsulin Aspart with a molecular weight of 6.3 kDa. The use of RWR linker in the design of Aspart proinsulins is able to increase expression levels. The production of proinsulins in P. pastoris generally uses GS115 and X33 strains. In this study, the expression of the proinsulin Aspart shows the best results in P. pastoris KM71 strain. The advantage of the KM71 strain is that it requires lower amounts of methanol induction than GS115 and X33 strains.

Key words: spacer peptide, linker, proinsulin Aspart, Pichia pastoris, protein secretion.