

**Karakterisasi Profil Zona Pelusida Manusia (*Homo sapiens*)
Menggunakan Analisis *in Silico***

***Characterization of Human (Homo sapiens) Zonna Pellucida Profile
Using in-Silico Analysis***

Nurul Jadid Mubarakati^{1*)}, Saimul Laili,^{2 **)}

¹²Jurusan Biologi FMIPA UNISMA, Indonesia

ABSTRAK

Tahapan awal yang paling penting dalam fertilisasi mamalia adalah ikatan antara sel telur dan sperm yang dilanjutkan terbentuknya zigot dan terjadi perkembangan individu baru. Pada mamalia, zona pelusida merupakan lapisan ekstraseluler sel telur. Lapisan ini sangat penting dalam proses pengenalan secara langsung yang dimediasi oleh interaksi gamet. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui profil zona pelusida manusia (*Homo sapiens*) secara *in silico*, untuk mengetahui posisi *O-linked* dan *N-linked* pada sekuen ZP manusia serta memprediksi interaksi antara ZP dengan ADAM 2. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah menggunakan analisis *in silico*. Profil Protein Zona pelusida dilakukan dengan cara *data mining* di database UNIPROT. Eksplorasi profil dilakukan pada pencarian fungsi utama protein, lokasi protein, tempat ekspresi, struktur protein, dan juga protein yang berinteraksi dengan zona pelusida. Informasi dasar tersebut kemudian dibandingkan agar diketahui peranan protein yang paling krusial. Penentuan sisi potensial *O-linked* dan *N-linked* pada sekuen ZP manusia dianalisis menggunakan *O* dan *N-Glycosylationsites prediction*. Interaksi ZP dengan ADAM 2 menggunakan *molecular docking*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa profil zona pelusida (ZP) secara *in silico* diperoleh bahwa ZP3 berperan sebagai reseptor primer yang berperan dalam ikatan dengan spermatozoa pada oosit dan menginduksi reaksi akrosom. ZP memiliki sisi potensial pada N-glikosilasi maupun O-glikosilasi, namun memiliki jumlah yang berbeda.

Kata kunci: Zona Pelusida manusia, N-glikosilasi, O-glikosilasi, *in silico*

ABSTRACT

Most important in mammalian fertilization were egg binding sperm, whose fusion generates a zygote that will develop into a new individual. In mammals, zona pellucida (ZP) is a specialized extracellular matrix of the egg. The matrix is important for this process by directly mediating species-restricted recognition between gametes. The aims of this study was to analyze the profile of human (Homo sapiens) zonna pellucida (hZP) using *in silico* method, position of *O-linked* and *N-linked* glycosilation units on human ZP amino acid sequence and to predict interaction between ZP and ADAM 2. The method of research was using *in silico* analysis. ZP protein profile was using *data mining* in UNIPROT database. Profile exploration searched primery funtion of protein, location, expression place, protein structure and ZP-interaction protein. The Primer data was compared each other. Determining *O-linked* and *N-linked* glycosilation units in hZP amino acid sequence was analyzed using *O* and *N-Glycosylation sites prediction*. The results showed that *in silico* analysis conducted that profile of ZP3 identified as a primary receptor sites for spermatozoa and induced acrosome reaction. Amino acid sequence in ZP have potential site in *N-Linked* and *O-linked* glycosilation units, but have quantity different.

Keywords : human zonna pellucida, *N- Glycosylation*, *O- Glycosylation*, *in silico*

^{*)} Dr. Nurul Jadid Mubarakati, S.Si., M.Si. Jurusan Biologi FMIPA UNISMA, Jl. MT.Hariyono 193, Malang 65144., Telp 085791322022 dan E-mail: ulul_wakkadoo@yahoo.co.id

^{**)} Ir. H. Saimul Laili, M.Si. Jurusan Biologi FMIPA UNISMA, Jl. MT.Hariyono 193, Malang 65144., Telp 085259377845 dan E-mail: saimul_unisma@yahoo.com

Diterima Tanggal 7 September 2016 – Disetujui Tanggal 14 September 2016

Pendahuluan

Zona pelusida merupakan salah satu lapisan pelindung oosit yang tersusun atas glikoprotein dan polipeptida. Glikoprotein zona pelusida manusia (*Homo sapiens*) terdiri dari tiga jenis yaitu ZP1, ZP2 dan ZP3 masing-masing memiliki dengan berat molekul 90-110 kD, 64-78 kD dan 57-73 kD. Glikoprotein ZP1 merupakan komponen terbanyak. Masing-masing glikoprotein memiliki fungsi tertentu, ZP3 diketahui yang memiliki aktivitas reseptor sperma. ZP3 merupakan reseptor primer yang berperan dalam ikatan dengan spermatozoa pada oosit dan menginduksi reaksi akrosom [1]. Bagian ZP3 yang bertanggung jawab terhadap aktivitas reseptor sperma adalah rantai sakarida sedangkan bagian polipeptidanya terlibat dalam fungsi induksi akrosom glikoprotein ini. Reseptor kedua setelah ZP3 adalah ZP2. ZP2 berperan penting dalam pencegahan polispermi. ZP1 diketahui sebagai penghubung antara ZP2 dan ZP3 sehingga keberadaannya dibutuhkan dalam menjaga keutuhan struktur zona pelusida untuk meminimalisasi berkurangnya fekunditas. Diantara ketiga komponen glikoprotein tersebut, ZP3 berperan penting dalam fertilisasi [2].

Tahap awal interaksi gamet ketika oosit kehilangan sel kumulus adalah ikatan sperma dengan zona pelusida oosit. Perlekatan (adhesi) terhadap zona pelusida didasarkan pada proses ikatan karbohidrat-protein melalui ikatan *O-linked* oligosakarida dari ZP3 dengan reseptor sperma. Stimulasi ZP3 mentrigger reaksi akrosom pada sperma yang berikatan dengan ZP. Adhesi rantai oligosakarida berkonjugasi dengan ZP3 yang berikatan silang dengan β -1,4-galactosyltransferase, suatu protein yang berhubungan dengan interaksi gamet menyebabkan induksi reaksi akrosom [3].

Diketahui ADAM 2 merupakan protein reseptor pada sperma manusia yang memiliki peran penting dalam mengenali dan berikatan dengan zona pelusida manusia [4]. Berbagai penelitian telah menguji hambatan interaksi ZP dengan sperma secara *in vitro* ataupun *in vivo*, namun, seluruh proses ini biasanya membutuhkan waktu yang sangat lama. Analisis secara bioinformatik (*in silico*) merupakan salah satu pendekatan yang dapat dilakukan, dimana peneliti dapat memprediksi interaksi ligan-reseptor suatu protein dan untuk membantu memahami mekanisme tersebut serta dapat menganalisis profil genomik zona pelusida sebagai sarana informasi desain vaksin. Tujuan dalam penelitian ini adalah : mendapatkan profil zona pelusida manusia secara *in silico* dan mengetahui posisi *O-linked* dan *N-linked* oligosakarida pada sekuen protein ZP manusia.

Material dan Metode

Bahan dan Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari : perangkat lunak (Laptop/komputer), jaringan internet, software komputer seperti BioEdit versi 7, pymol, hex.

Metode

Metode penelitian ini terdiri dari dua tahap, yaitu analisis profil protein zona pelusida dan penentuan N-glikosilasi dan O-glikosilasi pada ZP manusia.

Analisis Profil Protein

Profil Protein Zona pelusida dilakukan dengan cara *data mining* di database UNIPROT (www.uniprot.org). Informasi protein zona pelusida 1 diakses dengan kode P60852, Zona pelusida 2 (Q05996), ZonaPelusida 3 (P21754), dan zona pelusida 4 (Q12836). Eksplorasi profil dilakukan pada pencarian fungsi utama protein, lokasi protein, tempat ekspresi, struktur protein, dan juga protein yang berinteraksi dengan zona pelusida. Informasi dasar tersebut kemudian dikomparasi agar diketahui peranan protein yang paling krusial.

Analisis N-Glikosilasi

Sekuen asam amino protein zona pelusida 1 (P60852), Zona pelusida 2 (Q05996), Zona pelusida 3 (P21754), dan zona pelusida 4 (Q12836) didapatkan dari database UNIPROT kemudian

dilakukan analisis *N-Glycosylationsites prediction* (NetNGlyc v.1.0). Hasil analisis ditunjukkan dengan potensi sisi glikosilasi yang terdapat diatas *threshold* standar N glikosilasi pada protein human. Selain itu potensi glikosilasi ditandai dengan kuantifikasi (+), semakin banyak indikator (+) maka semakin akurat prediksi N-glikosilasi.

Analisis O-Glikosilasi

Keempat protein zona pelusida yang telah didapatkan sekuen asam aminonya kemudian dianalisis lebih lanjut untuk menentukan posisi *O-linked* glikosilasi. Proses analisis dilakukan menggunakan *O-GlcNAc Prediction Server*. Hasilnya ditunjukkan dengan derajat keakuratan (+), yang berarti semakin banyak tanda (+) maka semakin tinggi potensi glikosilasi.

Hasil dan Diskusi

Hasil Penelitian

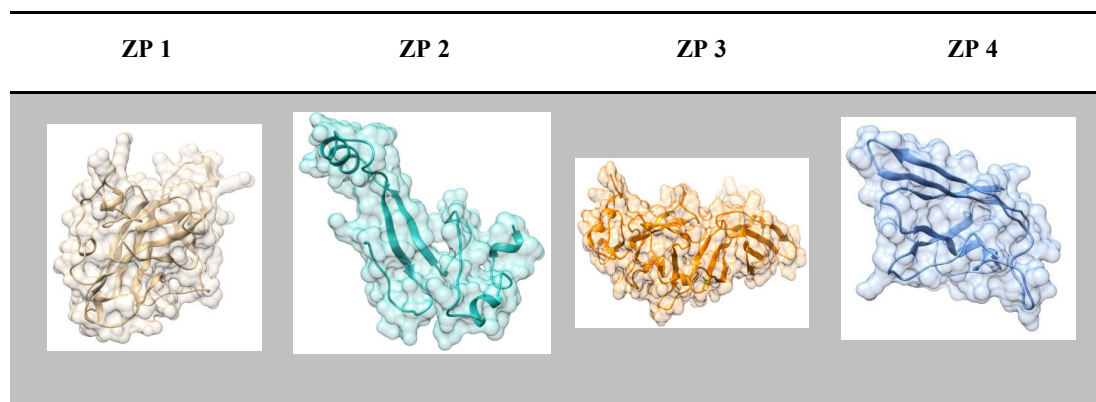
Tabel 1. Profil Zona Pelusida (ZP) secara *in Silico* Berdasarkan UNIPROT Database

Nama Protein	Fungsi	Lokasi Protein	Ekspresi	Interaksi
P60852 (ZP1_HUMAN)	ZP2 merupakan zona pelucida yang memediasi penempelan dan pengikatan sperma, induksi reaksi akrosom dan mencegah post fertilisasi dari polispermia. Terdapat tiga hingga empat glikoprotein. ZP1 memiliki peran penting sebagai penentu integritas struktur dari zona pelusida	• Disekresikan: ekstraselular matrix • Membran sel; tipe 1 membran protein • ekstraselular 26-601; Heliks 602-622; daerah sitoplasmik 623-638	Di ekspresikan di jaringan oosit	Berinteraksi sebagai penghubung polimer ZP2 dan ZP3 yang membentuk filament panjang
Q05996 (ZP2_HUMAN)	ZP2 merupakan zona pelucida yang memediasi penempelan dan pengikatan sperma, induksi reaksi akrosom dan mencegah post fertilisasi dari polispermia.. ZP2 memiliki peran penting sebagai reseptor kedua sperma	• Disekresikan: ekstraselular matrix • Membran sel; tipe 1 membran protein • ekstraselular 39-716; Heliks 717-736; daerah sitoplasmik 737-745	-	Dapat membentuk homopolimer berbentuk fiber panjang. Polimer ZP2 dan ZP3 bergabung dan membentuk filamen panjang yang di <i>crosslink</i> kan oleh ZP1 homodimer
P21754 (ZP3_HUMAN)	ZP3 merupakan zona pelucida pada mamalia yang berperan untuk memediasi penempelan dan pengikatan sperma, induksi reaksi akrosom dan mencegah post fertilisasi dari polispermia. ZP3 berperan penting dalam pengikatan sperma dan pembentukan zona matriks.	• Disekresikan: ekstraselular matrix • Membran sel; tipe 1 membran protein • Ekstraselular 23-387; Heliks 388-408; daerah sitoplasmik 409-424	Di ekspresikan di jaringan oosit	Membentuk polimer dengan ZP2 dan ZP3, menjadi filamen panjang yang di <i>crosslink</i> kan dengan homodimer ZP1
Q12836 (ZP4_HUMAN)	ZP4 merupakan zona pelucida yang memediasi penempelan dan pengikatan sperma, induksi reaksi akrosom dan mencegah post fertilisasi dari polispermia.	• Disekresikan: ekstraselular matrix • Membran sel; tipe 1 membran protein • Ekstraselular 19-505; Heliks 506-526; daerah sitoplasmik 527-540	Di ekspresikan di jaringan oosit	Berinteraksi dengan akrosin

Profil Protein Zona pelusida dilakukan dengan mengeksplorasi informasi sebanyak-banyaknya data di database UNIPROT dengan alamat www.uniprot.org. Eksplorasi profil tersebut terdiri dari fungsi utama protein, lokasi protein, tempat ekspresi, struktur protein dan juga protein yang berinteraksi dengan zona pelusida. Data-data tersebut disajikan dalam bentuk Tabel 1.

Zona pelusida manusia terdiri dari empat glikoprotein yaitu ZP1, ZP2, ZP3 dan ZP4. Glikoprotein zona pelusida memiliki peran yang berbeda. ZP1 berperan sebagai penentu integritas struktur dari zona pelusida, ZP2 berperan sebagai reseptor kedua sperma, ZP3 berperan penting dalam pengikatan sperma dan pembentukan zona matriks. Beberapa penelitian menyebutkan ZP3 berperan sebagai reseptor primer spermatozoa sedangkan ZP4 yang memediasi penempelan dan pengikatan sperma, induksi reaksi akrosom dan mencegah post fertilisasi dari polispermia. Jadi dapat disimpulkan, keempat glikoprotein tersebut yang berfungsi dalam interaksi dengan spermatozoa adalah ZP3. Berikut adalah Tabel 2 struktur tiga dimensi ZP.

Tabel 2. Visualisasi struktur 3 Dimensi Zona Pelusida Berdasarkan *UNIPROT Database*



Tabel 3. *Potensial siteO-linked (Ser/Thr) dan N-linked (Asn-X-Ser/Thr) glycosylation* pada sekuen Asam amino Zona Pelusida Berdasarkan *in silico*

No	Glikoprotein	Jumlah <i>N-linked</i> yang potensial	Posisi asam amino	Jumlah <i>O-linked</i> yang potensial	Posisi asam amino
1	ZP1	4	76, 379, 561, 596	6	168 S, 313 S, 320 T, 395 S, 543 S, 557 S
2	ZP2	6	87, 105, 122, 223, 269, 400	8	21 S, 34 T, 146 T, 267 T, 576 T, 602 S, 633 T, 637 S
3	ZP3	4	125, 147, 226, 272	5	149 S, 248 S, 417 S, 421 S, 423 S
4	ZP4	7	69, 202, 219, 267, 426, 470, 474	5	29 S, 284 S, 373 T, 452 T, 476 T

Tujuan dilakukan analisis N-glikosilasi dan O-glikosilasi pada ZP manusia adalah bahwa interaksi antara sperma dengan sel telur dimediasi oleh adanya *glycosylation units* pada ZP. Berikut adalah Tabel 3 yang menunjukkan adanya *Potensial siteO-linked (Ser/Thr)* dan *N-linked (Asn-X-*

Ser/Thr) *glycosylation* pada sekuenAsam amino Zona PelusidaPotensial siteO-linked (Ser/Thr) dan N-linked (Asn-X-Ser/Thr) *glycosylation* pada sekuenAsam amino Zona Pelusida

Pembahasan

Profil Zona pelusida (ZP) Secara *In Silico*

Zona pelusida (ZP) merupakan matriks ekstraseluler yang melindungi sel telur (oosit) [5]. Beberapa model penelitian terkait dengan interaksi gamet, zona pelusida memegang peran penting dalam kontak langsung dengan spermatozoa dan menginduksi reaksi akrosom. Pengikatan ZP ini bersifat *highly selective* dan mencegah polispermi. Seluruh sel telur mamalia pasti terselubungi oleh ZP, dengan ketebalan sekitar 1-25 μm dan mengandung protein sebesar (~1-10ng). ZP manusia terdiri dari empat glikoprotein yaitu ZP1, ZP2, ZP3 dan ZP4 [6]. Masing-masing memiliki fungsi yang berbeda namun melengkapi satu dengan yang lain yang ditampilkan dalam bentuk Tabel 1.

Berdasarkan Tabel 1 dan 2 menunjukkan bahwa keempat ZP manusia masing-masing memiliki fungsi yang berbeda. Satu diantaranya berperan penting dalam *Sperm Binding* yaitu ZP3. Diketahui bahwa pengikatan sperma yang terkapasitasi dengan matrik ZP mengaktifkan sinyal transmembran dan menginduksi *cascade* seluler sehingga terjadi reaksi akrosom. Suatu penelitian menggunakan ZP dari sel telur mencit yang diinkubasi dengan membran spema mencit dapat meningkatkan aktifitas *GTPase*, hal ini menunjukkan bahwa jalur reseptor melalui Gi terlibat proses reaksi akrosom akibat induksi ZP. ZP tersebut dapat mengaktifkan sub tipe Gi yaitu Gi1 dan Gi2 pada membran sperma. Gi berperan sebagai sinyal transduksi interaksi reseptor dengan ZP3 yang menyebabkan perubahan *cascade* dan sistem beberapa *second messenger* mengaktifkan keluarnya komponen akrosomal. *Adenyl cyclase* merupakan *second messenger* yang mengaktifkan *protein kinase A* (PKA), kemudian terjadi fosforilasi pada protein spesifik yang terlibat dalam proses eksositosis akrosomal. Gi yang teraktifkan juga akan mengaktifkan PLC γ 1 yang kemudian meningkatkan aktifitas *1,2-diacylglycerol* (DAG) and *inositol 1,4,5-triphosphate* (IP3). DAG juga akan menstimulasi fosforilasi protein melalui PKC. PKC maupun IP3 akan mengaktifkan pengeluaran kalsium intraseluler. Studi mengenai ZP mencit terlarut dengan asam disagregat menunjukkan bahwa reaksi akrosom yang diinduksi dengan ZP menyebabkan peningkatan ion kalsium intraseluler yang dimediasi dengan adanya channel *Voltage-Operated Calcium Channels* (VOCC). VOCC yang teraktifkan akan menyebabkan influx kalsium yang berasal dari tempat penyimpanan kalsium (*store operated channel*). Peningkatan konsentrasi kalsium intraseluler akan menyebabkan fusi membran dan terjadi eksositosis akrosom [2].

Penentuan sisi potensial pada O-linked (Ser/Thr) dan N-linked (Asn-X-Ser/Thr) *glycosylation* Pada Sekuen Asam Amino ZP manusia

ZP pada manusia mengandung empat glikoprotein yang bersifat *highly glycosylated* yaitu pada O-linked (Ser/Thr) dan N-linked (Asn-X-Ser/Thr). Penentuan sisi potensial pada Oligosakarida tersebut sangat penting dilakukan, karena oligosakarida tersebut berada pada keempat glikoprotein ZP yang sangat berpengaruh dalam proses *sperm binding* sehingga fertilisasi akan terjadi. Berdasarkan Tabel 3 masing-masing ZP memiliki N-glikosilasi maupun O-glikosilasi, namun memiliki jumlah yang berbeda. Dari keempat glikoprotein tersebut protein ZP3 lah yang berperan sebagai reseptor primer pengenalan spermatozoa dan berkontribusi dalam inisiasi interaksi antara sel spermatozoa dan sel telur, untuk selanjutnya menghasilkan fertilisasi [5].

Beberapa penelitian menyebutkan bahwa N-residu *acetylglucosamine* (GlcNAc) terminal pada O-linked oligosakarida dari ZP3 akan diikat oleh molekul reseptor spermatozoa yang berperan dalam interaksi zona pelusida. Salah satu molekul yang penting adalah ADAM (*A disintegrin and metalloproteinase*).

ADAM 2 termasuk dari famili protein transmembran yang berperan dalam maturasi spermatozoa. ADAM2 berperan penting dalam pengikatan dengan ZP [7]. Mencit jantan yang *knockout* ADAM2 menunjukkan supresi yang kuat *Zona binding* dan mengalami kesulitan pergerakan

melalui saluran reproduksi betina [8]. Mencit jantan *knockout* ADAM 1 mengalami fertil, namun menunjukkan penurunan tingkat ADAM3 pada permukaan sperma [9]. Berdasarkan tabel 1, ZP3 merupakan reseptor primer yang berperan dalam ikatan dengan spermatozoa pada oosit dan menginduksi reaksi akrosom maka analisis selanjutnya dilakukan docking interaksi antara ZP3 dengan ADAM 2. Maka penelitian selanjutnya perlu dilakukan uji interaksi antara ZP3 dengan molekul reseptor spermatozoa secara *molecular docking*.

Kesimpulan

Profil Zona pelusida (ZP) secara *in silico* didapat ZP3 berperan sebagai reseptor primer yang berperan dalam ikatan dengan spermatozoa pada oosit dan menginduksi reaksi akrosom. ZP memiliki sisi potensial pada N-glikosilasi maupun O-glikosilasi, namun memiliki jumlah yang berbeda. *Glycans site* yang berada di ZP akan diikat oleh molekul reseptor spermatozoa. Maka penelitian selanjutnya perlu dilakukan analisis *molecular docking* terkait interaksi antara ZP3 dengan molekul reseptor spermatozoa.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih di sampaikan kepada Direktorat Pendidikan Tinggi yang telah mempercayakan dana Penelitian Dosen Pemula tahun anggaran 2015; kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM) Universitas Islam Malang.

Daftar Pustaka

- [1] Topper, E., L. Kruijt, J. Calvete, K. Mann, E. Topfer-Petersen and H. Woelders. 1997. Identification of bovine zona pellucida glycoproteins. *Mol Reprod Dev* **46**:344–350.
- [2] Gupta, S.K and B. Bhandari. 2011. Acrosome reaction: relevance of zona pellucida glycoproteins: Review. *Asian Journal of Andrology* **13**:97–105.
- [3] Miller, D.J., X. Shi and H. Burkin. 2002. *Molecular Basis of Mammalian Gamete Binding. The Endocrine Society*. Department of Animal Sciences University of Illinois at Urbana-Champaign. Urbana. Illinois.
- [4] Naz, R.K. 2009. Development of genetically engineered human sperm immunocontraceptives. *Journal of Reproductive Immunology* **83**:145–150.
- [5] Wassarman, P.M dan Litscher, E.S. 2008. Mammalian Fertilization : Egg's Multifunctional Zona Pellucida. *The International Journal Of Developmental Biology* **52**:665-676.
- [6] Lefièvre L., Conner S.J., Salpekar A., Olufowobi O., Ashton P., Pavlovic B., Lenton W., Afnan M., Brewis I.A., Monk M., et al. 2004. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum. Reprod.* **19**:1580–1586.
- [7] Kim, E., H. Nishimura, S. Iwase, K. Yamagata, S. Kashiwabara, T. Baba, 2004. Synthesis, processing, and subcellular localization of mouse ADAM3 during spermatogenesis and epididymal sperm transport." *J Reprod Dev* **50**(5): 5715780916-8818.
- [8] Nishimura, H., D. G. Myles, P. Primakoff, 2007. Identification of an ADAM2-ADAM3 complex on the surface of mouse testicular germ cells and cauda epididymal sperm. *J Biol Chem* **282**(24): 17900179070021-9258.
- [9] Yamaguchi, R., Y. Muro, A. Isotani, K. Tokuhira, K. Takumi, I. Adham, M. Ikawa, M. Okabe, 2009. Disruption of ADAM3 impairs the migration of sperm into oviduct in mouse. *Biol Reprod* **81**(1): 1421460006-3363.