



## EKSPRESI FLG-2 PADA EKSTRAK EPIDERMIS MANUSIA DENGAN METODE WESTERN BLOT

**Ade Yonata**

*Program Studi Pendidikan Dokter Universitas Lampung  
Jl. Prof. Sumantri Brojonegoro No. 1 Bandar Lampung 35145  
email: [ade\\_iv@yahoo.com](mailto:ade_iv@yahoo.com)*

### ABSTRAK

Filaggrin-2 (Flg-2) is a novel profilaggrin-like gene which is expressed in the epidermal granular layer of mouse skin. Here we study the expression of Flg-2 in normal human epidermal extract using western blot technique. Probing with anti-human Flg-2 repeat showed some bands extending from middle to bottom, suggesting that human profilaggrin-2 is processed to yield smaller intermediates protein. Probing with anti-human Flg-2 B-domain resulted in bands of 45 kDa, 28 kDa and 25 kDa, indicating some steps of Flg-2 processing where profilaggrin-2 undergoes proteolytic processing to yield some smaller fragments containing B-domain. These results showed that Flg-2 expression in human epidermal is similar to Flg-2 expression in mouse as well as Flg-1 expression in human and mouse.

**Keywords:** Filaggrin-2, Western blot

### 1. PENDAHULUAN

#### 1.1 FILAGGRIN/ FILAGGRIN-1`

“Filaggrin merupakan protein penting yang berperan dalam pembentukan filamen keratin pada epidermis mamalia ” (Rothnagel, 1987). Prekursor poliprotein Filaggrin, profilaggrin, memiliki berat molekul besar hingga 300 kDa. Poliprotein ini nantinya akan dipotong dan didefosforilasi menghasilkan peptida filaggrin, dengan berat molekul 35 kDa pada manusia dan 27 kDa pada (Presland and Dale, 2000).

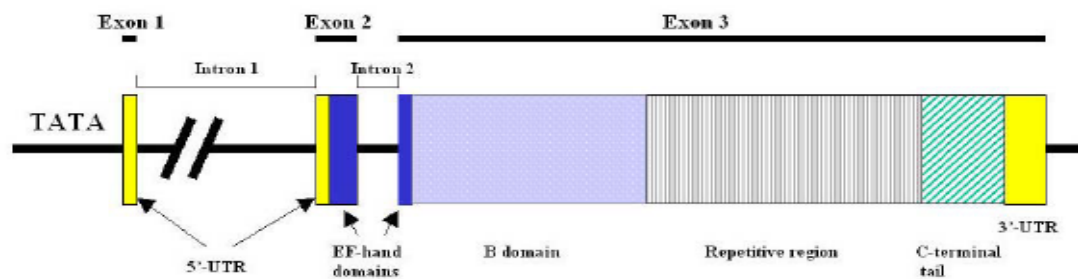
Penelitian terbaru menunjukkan bahwa mutasi filaggrin menyebabkan Ichthiosis Vulgaris (IV), merupakan penyakit gangguan keratinisasi tersering pada manusia, dengan gejala kulit kering dan bersisik (Smith et al, 2006). Mutasi filaggrin juga merupakan predisposisi kuat bagi dermatitis atopik dan memiliki hubungan signifikan dengan terjadinya asma pada pasien dermatitis atopik (Palmer et al, 2006).

#### 1.2 FILAGGRIN-2

Filaggrin-2 (Flg-2) merupakan gen baru yang mirip dengan profilaggrin yang berekspresi pada lapisan granuler epidermis kulit tikus (Listwan et al 2003). Gene Flg-2 terletak pada kromosom manusia 1q21 dan kromosom 3 pada tikus, berdekatan dengan lokasi gen Filaggrin. Gen Flg-2 tikus mengkode protein dengan BM 251 kDa dan 2362 asam amino.

## Struktur Flg-2 Tikus

Gen Flg-2 terdiri dari 3 ekson dan 2 intron dengan ukuran masing-masing 2.9 and 0.5 kbp (Gbr. 1; Listwan et al, 2003). Ekson 2 (dimana ORF dimulai) mengandung 2 domain tangan EF, dengan kemampuan mengikat kalsium yang mirip dengan domain S100, pada terminal N-nya. Daerah pengikat kalsium Flg-2 memiliki konservasi yang tinggi dengan profilaggrin manusia dan tikus, dan protein S100 lainnya. Intron pertama menginterupsi daerah yang tidak ditranslasi sementara intron kedua memisahkan dua tangan EF. Ekson ketiga yang terbesar mengandung domain B, diikuti 13 unit pengulangan pada tikus. Setiap unit pengulangan memiliki ukuran antara 74 hingga 80 residu. Sebuah domain C-terminal terdiri 338 residu terletak setelah sekuen unit-unit pengulangan Flg-2.



**Gambar 1.** Struktur gen Flg-2 tikus. Gen Flg-2 terdiri dari 3 ekson dan 2 intron. Domain tangan EF dipisahkan oleh intron 2. Ekson ketiga yang terbesar mengkode 2316 asam amino dan mengandung domain B, 13 unit pengulangan dan ujung terminal C. Kotak kuning menunjukkan daerah yang tidak ditranslasikan. (Listwan et al, 2003).

## Ekspresi Flg-2

Listwan (2003) menunjukkan bahwa gen Flg-2 menghasilkan satu mRNA Flg-2 dengan ukuran >12 kb pada analisa northern blot, yang terekspresi pada epidermis namun tidak pada lidah dan jaringan epitel lainnya. Temuan ini menunjukkan Flg-2 memiliki pola ekspresi yang lebih terbatas dibandingkan profilaggrin. Dengan menggunakan antibodi poliklonal Flg-2 terhadap peptide sintesis dari daerah unit pengulangan, imunofluoresensi menunjukkan bahwa Flg-2 berekspresi terutama pada lapisan granuler dan lapisan kornifikasum dari epidermis. Penelitian tersebut juga menunjukkan bahwa Flg-2 berlokasi di granul keratohyalin kecil yang dapat dibedakan dari profilaggrin pada granul besar.

## Fungsi Flg-2

Fungsi Flg-2 masih belum dipahami sepenuhnya. Persentase asam amino basa yang tinggi pada pengulangan Flg-2 mengindikasikan kemampuan untuk mengikat dan mengagregasi protein. Setelah protein rekombinan yang mengandung pengulangan Flg-2 dicampur dengan



ekstrak keratin, Flg-2 mengubah filamen keratin menjadi bundel yang hampir paralel, mirip yang dihasilkan oleh filaggrin (Dale B A et al, 1985). Semua penelitian ini menunjukkan bahwa Flg-2 homolog secara struktural dan fungsional dengan filaggrin.

### 1.3 Teknik Western Blot

Western blot merupakan metode untuk mendeteksi protein spesifik dalam suatu sampel ekstrak jaringan. Metode ini menggunakan elektroforesis gel untuk memisahkan protein sesuai dengan panjang polipeptidanya. Protein kemudian ditransfer ke suatu membran (biasanya nitroselulosa atau PVDF), dimana protein tersebut dideteksi menggunakan spesifik antibodi terhadap protein target (Licor-Bioscience, 2007)

## 2. METODE PENELITIAN

### 2.1 Antibodi

Antibodi yang digunakan adalah antibody poliklonal kelinci yang bereaksi dengan peptida Flg-2 manusia. Peptida ini mewakili daerah pengulangan Flg-2 manusia, yaitu H-SSWSEGEHHGYSSGS-NH<sub>2</sub> yang digunakan dalam produksi antibodi. Suatu antibodi poliklonal yang bereaksi dengan peptide daerah B-domain juga digunakan. Antibodi poliklonal terhadap hnRNP A2 digunakan sebagai kontrol.

### 2.2 Sampel

Sampel ekstrak epidermis manusia dipersiapkan dari epidermis manusia normal sesuai dengan metode Sellami (2004) oleh Dr. Nicholaus A. Sander (PA Hospital). Ekstrak protein epidermis manusia disimpan dalam buffer Tris-Mercaptoethol-SDS dan disimpan pada suhu -20 °C. Sebelum dipipet ke dalam SDS gel, sampel dipanaskan pada suhu 90°C selama 5 menit.

### 2.3 SDS PAGE

Pemisahan protein dalam sampel ekstrak epidermis manusia dilakukan dengan menggunakan 5-10% SDS PAGE Gel (Lammler, 1970). *Precision Plus Protein All Blue* (Biorad) digunakan sebagai penanda berat molekul (2 ul). Sampel ekstrak epidermis manusia dipipet ke SDS gel sebanyak 10 ul. Gel dijalankan pada voltase 130 selama 2 jam pada temperatur ruangan.

### 2.4 Analisa Western Blot

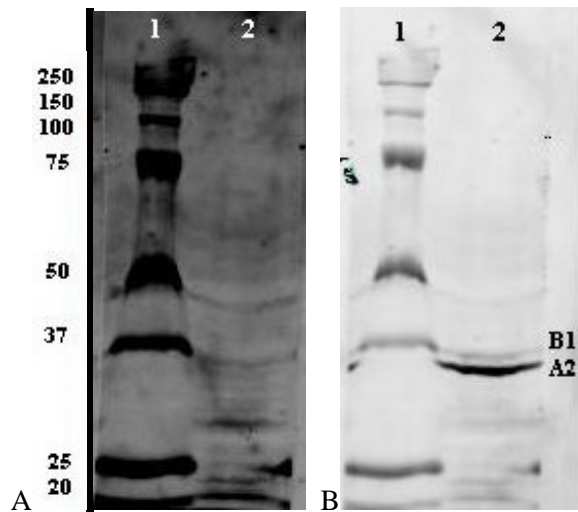
Transfer protein dari gel ke membran pvdf (immobilon) dilakukan dengan voltase 30 selama semalam pada suhu 4° C.

Blot di persiapkan sebagai berikut: membran pvdf diblok dengan 3% *Fish Skin Gelatin* (FSG) selama 1 jam, kemudian diinkubasi dengan antibodi terhadap daerah pengulangan Flg-2 manusia dan antibodi terhadap daerah domain B Flg-2 manusia dengan konsentrasi 1:100 dalam 3% FSG + 0.1 % Tween selama 1 jam, kemudian dicuci 3X5 menit dengan 0.1% Tween dalam

PBS. Blot kemudian diinkubasi dengan antibodi sekunder 1:20.000 yang terkonjugasi dengan IRDye fluorophores (Biorad) dalam 3% FSG + 0.1% Tween + 0.01% SDS, kemudian dicuci 3X5 menit dengan 0.1% Tween dalam PBS. Blot kemudian dipindai dengan menggunakan Scanner Odyssey. Sebagai kontrol, blot yang sama diinkubasi dengan antibodi terhadap hnRNP A2, suatu protein yang banyak dalam jaringan, dengan konsentrasi 1:10.000.

### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 3.1 Analisa western dengan antibodi terhadap daerah pengulangan Flg-2



**Gambar 2.** A. Analisa western menunjukkan pita Flg-2 pada sampel ekstrak epidermis manusia dengan penggunaan antibodi terhadap pengulangan Flg-2 manusia; B. Analisa western pada blot yang sama dengan anti-hnRNP A menunjukkan pita A2. Baris 1: Penanda BM, baris 2: 10 ul sampel epidermis

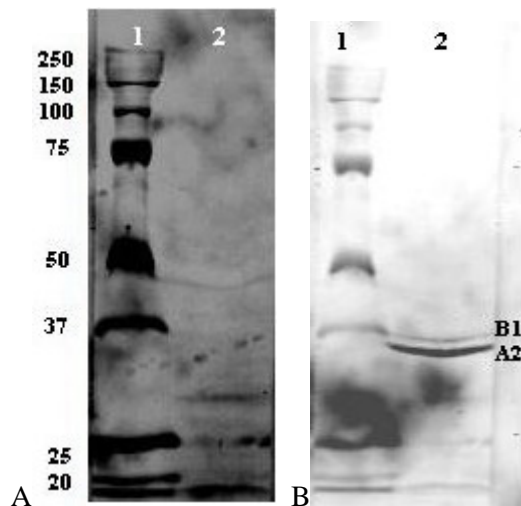
Pendeteksian ekspresi Flg-2 protein pada sampel ekstrak epidermis manusia dengan menggunakan anti-daerah pengulangan Flg-2 menunjukkan beberapa pita mulai dari tengah hingga bawah dengan beberapa pita yang jelas seperti pita 44 kDa, 35 kDa, 28 kDa, dan 23 kDa (Gambar 2. A). Pita-pita ini nampaknya merupakan fragmen-fragmen profilaggrin yang mengandung daerah pengulangan Flg-2.

Pola western blot ini sama dengan pola analisa western blot Flg-2 pada tikus seperti yang ditemukan Listwan (2003) yang menunjukkan pita-pita memanjang dari atas ke bawah. Markova et al (1993) menunjukkan bahwa filaggrin-1 manusia juga memberikan pola western blot yang sama dengan flg-1 tikus, yaitu menunjukkan pita-pita dari atas ke bawah yang merupakan molekul profilaggrin 400 kDa, filaggrin 37 kDa serta produk-produk antara dari proses pemotongan profilaggrin.

Hasil penelitian western blot Flg-2 pada sampel epidermis manusia ini menegaskan bahwa profilaggrin-2 manusia yang merupakan prekursor filaggrin-2 juga mengalami proses

pemotongan yang sama akan halnya dengan profilaggrin-1 manusia/tikus serta profilaggrin-2 tikus, dan dengan menghasilkan protein-protein antara yang lebih kecil. Pengetesan dengan anti-hnRNP A2 (Gambar 2. B) juga menunjukkan pita A2 and B1 pada blot yang sama mengindikasikan protein tertransfer dengan baik ke membran.

### 3.2 Analisa western dengan antibodi terhadap domain B Flg-2



**Gambar 3.** A. Analisa western menunjukkan pita Flg-2 pada sampel ekstrak epidermis manusia dengan penggunaan antibodi terhadap domain B Flg-2 manusia; B. Analisa western pada blot yang sama dengan anti-hnRNP A menunjukkan pita A2. Baris 1: Penanda BM, baris 2: 10 ul sampel epidermis

Deteksi dengan anti-domain B Flg-2 menunjukkan pita-pita 45 kDa, 28 kDa, dan 25 kDa (Gambar 3.A). Pita-pita ini menunjukkan proses proteolitik menghasilkan fragmen-fragmen yang lebih kecil B-domain. Presland et al (1993) menunjukkan bahwa ekstrak epidermis manusia yang dianalisa dengan antibodi terhadap domain-B filaggrin-1 menghasilkan pita-pita 32 kDa dan 20 kDa, yang mengindikasikan bahwa profilaggrin-1 mengalami proses proteolisis beberapa kali. Sekuen potensial pengenalan bagi suatu *proprotein convertase* atau *furin-like protease* suatu enzim proteolitik, terdapat pada ujung domain B Flg-2 mengindikasikan proses yang sama dengan profilaggrin-1 (Listwan et al, 2003). Hasil ini mengindikasikan beberapa tahap proses Flg-2 dimana profilaggrin-2 mengalami proses proteolitik menghasilkan beberapa fragmen yang lebih kecil yang mengandung domain B.

## 4. KESIMPULAN

Ekspresi Flg-2 protein pada sampel ekstrak epidermis manusia dengan menggunakan anti-daerah pengulangan Flg-2 menunjukkan beberapa pita memanjang dari tengah ke bawah, yang merupakan fragmen-fragmen profilaggrin-2 yang mengandung daerah pengulangan Flg-2.



Hasil penelitian western ini menegaskan bahwa profilaggrin-2 manusia yang merupakan prekursor filaggrin-2 juga mengalami proses pemotongan/ proteolitik yang sama dengan profilaggrin-1 manusia dan tikus serta profilaggrin-2 tikus sehingga menghasilkan protein-protein antara yang lebih kecil.

Deteksi dengan anti-domain B Flg-2 menunjukkan pita-pita 45 kDa, 28 kDa, dan 25 kDa. Hasil penelitian mengindikasikan beberapa tahap proses Flg-2 dimana profilaggrin-2 mengalami proses proteolitik menghasilkan beberapa fragmen yang lebih kecil yang mengandung domain B.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi Flg-2 pada ekstrak epidermal manusia mirip dengan pola ekspresi Flg-2 pada tikus, juga mirip dengan pola ekspresi Flg-1 pada manusia dan tikus. Penelitian ini merupakan penelitian yang pertama kali mengenai ekspresi Flg-2 pada epidermis manusia. Riset di masa depan dapat dilakukan untuk mencoba mengulang penelitian menggunakan antibodi baru yang baik sehingga dapat menghasilkan pita fragmen Flg-2 yang lebih jelas. Fungsi Flg-2 hingga saat ini masih belum jelas. Kemungkinan peranan Flg-2 sebagai komponen *Cornified Envelope (CE)*; sebagai komponen *natural moisturizing factor (NMF)* perlu dilakukan. Mutasi Flg-1 sudah diketahui terlibat dalam penyakit Ichthiosis Vulgaris, dermatitis atopik dan asma. Eksplorasi mutasi Flg-2 yang juga mungkin mengarah pada hubungan Flg-2 dengan suatu penyakit perlu dilakukan dimasa mendatang.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Assoc. Prof. Joe Rothnagel (University of Queensland) atas bimbingannya dalam penelitian ini. Terima kasih juga kepada DR. Pavel Listwan dan DR Lexie Friend (University of Queensland) atas bimbingan dan bantuannya dalam penyediaan antibodi serta Dr. Niccholaus A. Sander (PA Hospital) atas bantuannya dalam penyediaan ekstrak epidermis manusia.

## DAFTAR PUSTAKA

- Dale BA, Resing KA, Lonsdale-Eccles JD 1985, 'Filaggrin: a keratin filament associated protein', *Ann NY Acad Sci*, vol.455, pp.330-342.
- Laemmli, UK 1970, 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature*, vol.227, pp.680-685
- Licor-Biosciences 2007, 'Western blot analysis', *odyssey application protocol*, viewed 2 March 2008 < [http://biosupport.licor.com/docs/whatsnew/Western\\_Proto\\_09288.pdf](http://biosupport.licor.com/docs/whatsnew/Western_Proto_09288.pdf)>



- Listwan, P 2003, Characterization of Flg-2, a novel protein that is abundantly expressed in mammalian epidermis and functionally related to filaggrin, PhD Thesis, University of Queensland, Brisbane
- Markova NG, Marekov LN, Chipev CC, Gan SQ, Idler WW, Steinert PM 1993, 'Profilaggrin is a major epidermal calcium-binding protein', *Mol Cell Biol*, vol.13, pp.613-625.
- Palmer CN, Irvine AD, Kwiatkowski AT et al 2006, 'Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis', *Nat. Genet*, vol.38, pp.441-446
- Presland, RB et al 2000, 'Loss of Normal Profilaggrin and Filaggrin in Flaky Tail (ft/ft) Mice: an Animal Model for the Filaggrin-Deficient Skin Disease Ichthyosis Vulgaris', *J Invest Dermatol* vol. 115, pp.1072-1081
- Rothnagel JA, Mehrel T, Idler WW, Roop DR, Steinert PM 1987, 'The gene for mouse epidermal filaggrin precursor. Its partial characterization, expression, and sequence of a pengulanganing filaggrin unit', *J Biol Chem*, vol.262, pp.15643-5648.
- Sellami MK et al 2004, 'Anti-desmoglein 1 antibodies in Tunisian healthy subjects: arguments for the role of environmental factors in the occurrence of Tunisian pemphigus foliaceus', *Clin Exp Immunol*, vol.137, pp.195-200
- 1.1.
- Smith, F.J et al 2006, 'Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris', *Nat. Genet*, vol.38, pp.337-342.