

Analisis Molekuler Gen NS1 Virus Avian Influenza H5N1 yang Diisolasi dari Unggas Asal Purworejo Jawa Tengah dan Bantul Daerah Istimewa Yogyakarta

Shofyatul Y. Triyana¹, Widya Asmara², Tri Wibawa³

¹Fakultas Kedokteran Universitas Islam

²Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada

³Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada

Correspondence to : dr. Shofyatul Yumna Triyana, MSc, MClInSc(Hons)
Departemen Mikrobiologi dan Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia
Email : shofyatul@uii.ac.id

ABSTRACT

Pathogenesis of infection of H5N1 virus involves hyperinduction of pro inflammatory cytokines which causes the cytokine storm. Although multigenic, NS1 gene can contribute to the level of virulence and or cytokine resistance. In this study, the NS1 gene fragment of H5N1 isolated from chicken and muscovy duck in Central Java and Yogyakarta, respectively, were analyzed. Phylogenetic analyses were performed in comparison to sequence data of H5N1 viruses from 29 bird isolates and 32 human isolates which were accessed from gene bank in the period of 1997 to 2007. Molecular characterization of amino acid sequences (64-173) revealed a common characteristic of highly pathogenic avian influenza namely, 5 codon deletion (80-84 position). The D92E mutation was not found in these isolates. Phylogenetic analysis demonstrated that the two genetic sequences from A/Chicken/Purworejo/2005 and A/Muscovyduck/Bantul/2005 have the closest relationship with level of confidence bootstrap value (1000 replicates) as 97.9%. Moreover, the two isolates have closer genetic relationship with isolates from Indonesia than from outside of Indonesia. There is no significant difference between NS1 gene fragment sequence motif between birds and human isolates. Three dimensional structure analyses displayed that deletion 80-84 is able to change protein structure of NS1.

Keywords: H5N1 virus, deletion, NS1 protein structure

Pendahuluan

Virus avian influenza subtype yang sangat patogenik yakni H5N1 telah menyebabkan wabah pada populasi ternak di berbagai wilayah di dunia. Selain pada unggas, virus H5N1 dapat menyerang mamalia, termasuk manusia (Kumar *et al.*, 2006; WHO, 2006).

Ditinjau dari karakteristik gen NS1, strain H5N1 yang bersifat letal mempunyai mutasi D92E dan atau delesi 80-84 (berdasarkan sistem penomoran H3) atau pada posisi 88-92 jika berpedoman pada sistem penomoran H5 (Lipatov, *et al.*, 2005; Seo, *et al.*, 2004; Viseshakul *et al.*, 2004). Kedua jenis mutasi tersebut berhubungan dengan peningkatan virulensi virus atau resistensi terhadap sitokin atau keduanya (Lipatov, *et al.*, 2005; Seo, *et al.*, 2004).

Peran NS1 sebagai antagonis interferon dipengaruhi oleh jenis asam amino pada posisi tertentu yakni posisi 92 dan 149 karena mutasi pada posisi tersebut dapat meningkatkan virulensi virus (Li *et al.*, 2006; Min & Krug,

2006; Quinlivan *et al.*, 2005). Mekanisme penghambatan produksi IFN, dilakukan melalui berbagai jalur seperti jalur protein kinase R (PKR *pathway*) dan aktivasi banyak faktor transkripsi. Meskipun bersifat *multigenic*, gen NS1 berperan dalam menentukan tingkat virulensi dan atau resistensi sitokin. Oleh karena itu, perlu diteliti susunan gen NS1 untuk mengetahui adanya mutasi dan dianalisis struktur protein NS1 untuk mengetahui dasar molekuler peningkatan virulensi akibat mutasi tersebut.

Pada penelitian ini gen NS1 virus H5N1 yang diisolasi dari ayam kampung Purworejo dan entog dari Bantul diteliti urutan sekuen nukleotida dan asam aminonya untuk mengetahui adanya mutasi pada posisi 92 dan 80-84 serta menganalisis perubahan struktur 3 dimensi protein NS1 akibat mutasi. Analisis filogenetik juga dilakukan dengan data sekuen dari 61 isolat yang diakses melalui bank gen.

Metode

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat virus H5N1 yang diisolasi dengan cara melakukan usap (*swab*) kloaka entog asal Sorogenen, Bantul Yogyakarta, dengan kode isolat nomor 140106, selanjutnya diberi nama A/Muscovy Duck/Bantul/2005 dan ayam kampung asal Purworejo, Jawa Tengah dengan kode isolat Pw K R 311205, yang selanjutnya diberi nama A/Chicken/Purworejo/2005. Usap kloaka tersebut dilakukan pada tahun 2005 ketika terjadi KLB (kejadian luar biasa) avian influenza pada unggas dan kemudian dipropagasi di dalam telur SPF (*specific pathogen free*) berembrio atau telur berembrio yang steril oleh Tim Flu Burung Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

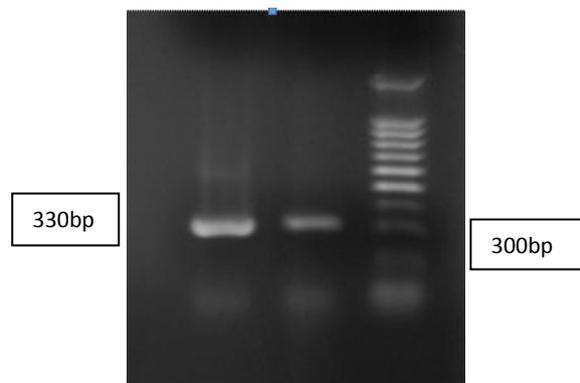
Tahap yang dilakukan dalam penelitian ini adalah ekstraksi RNA dari isolat virus, amplifikasi gen NS1 dengan teknik RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*) kemudian dilanjutkan dengan elektroforesis sebelum dilakukan sekuensing. Ekstraksi RNA dilakukan dengan menggunakan prosedur PureLink™ Micro-to-Midi Total RNA Purification System produk Invitrogen™. Primer spesifik yang digunakan untuk mengamplifikasi gen NS-1 pada posisi 206-519 bp (*base pair*) yaitu *forward primer* (E0423B11) dengan sekuen 5' – TAG TGG AGC GGA TTC TGG AGG – 3' (Invitrogen) dengan konsentrasi 45,8 nmol/μl dan *reverse primer* (E0423B12) dengan sekuen 5' – ATC CTC ACC AGT ATG TCC TGG – 3' (Invitrogen) dengan konsentrasi 65,8 nmol/μl. Reaksi RT-PCR dilakukan dengan menggunakan mesin PCR Airstream GeneAmp PCR System 2400 merk Applied Biosystems. Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan agarose gel 1%. Diharapkan dari elektroforesis dapat dilihat pita fragmen gen NS1 virus H5N1 sepanjang 313 bp.

Gen target yang telah diamplifikasi melalui reaksi RT-PCR kemudian dilakukan proses sekuensing. Sebelum dilakukan sekuensing, produk PCR yang dihasilkan dimurnikan atau dilakukan purifikasi terlebih dahulu. Selanjutnya sekuensing dilakukan dengan menggunakan alat *sequencer ABI Prism 3100-avant genetic analyzer (4 capillaries)* produk dari *Applied Biosystems USA*. Metode yang dipakai adalah *fluorescent-dye terminator cycle sequencing*. Seluruh proses purifikasi dan sekuensing dikerjakan di Laboratorium

Bioteknologi, *Research and Development Centre*, P.T. Charoen Pokphand Indonesia di Jakarta.

Hasil dan Pembahasan

Identifikasi fragmen gen NS1 dengan metode elektroforesis terbentuk pita (*band*) sepanjang 313 bp yang dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil elektroforesis produk RT PCR fragmen gen NS1 pada agarose gel 1% dengan pewarnaan *ethidium bromide*. Tanda panah menunjukkan pita hasil ampikon gen NS1 sepanjang kurang lebih 330 bp. Lajur 1 : DNA ladder 100 bp; lajur 2 : sampel dari entog (A/Muscovy Duck/Bantul/2005); lajur 3: sampel dari ayam kampung (A/Chicken/Purworejo/2005).

Panjang ampikon fragmen gen NS1 sepanjang 313 bp baik yang diperoleh dari sampel asal entog (A/Muscovy Duck/Bantul/2005) maupun ayam (A/Chicken/Purworejo/2005) kemudian ditentukan urutan nukleotidanya melalui proses *sequencing* dengan menggunakan metode *fluorescent-dye terminator cycle sequencing*.

Urutan nukleotida fragmen gen NS1 yang diisolasi dari entog (A/Muscovy Duck/Bantul/2005) berhasil dibaca pada posisi nukleotida ke-190 (nt 190) sampai nt 519 namun terdapat delesi nukleotida pada posisi 238 sampai dengan 252. Urutan nukleotida fragmen gen NS1 dari isolat A/Muscovy Duck/Bantul/2005 adalah sebagai berikut :

¹⁹⁰TTAGTGGAGCGGATTCTGGAGGAGGAGTCTGAT
GAAACACTT

AAAATG²³⁷XXXXXXXXXXXXXXXX²⁵³CCGGCTTCACGCTAC
CTAACTGACATGACTCTCGAAGAAATGTCAAGGGA
CTGGTCCATGCTCATGCCCAAGCAGAAAGTGGCAG
GTTCCCTTTGCATCAAAATGGACCAGGCAATAATG
GATAAAACCGTCATATTGAAAGCAAACCTTCAGTGT
GATTTTTGACCGGCTGGAAACCCTAATACTACTTA
GAGCTTTCACAGAAGAAGGAGCAATCGTAGGAGA
AATCTCCCCATTACCTTCTCTCCAGGACATACTGG
TGAGGAT⁵¹⁹

Hasil sekuensing produk RT-PCR dari isolat asal ayam juga berhasil dibaca pada posisi nt 190 sampai dengan nt 519 dan terjadi delesi nukleotida pada posisi 238 sampai dengan 252. Urutan nukleotida fragmen gen NS1 dari isolat A/Chicken/Purworejo/2005 adalah sebagai berikut :

¹⁹⁰TTAGTGGAGCGGATTCTGGAGGAGGAGTCTGAT
GAGACACTTA
AAATG²³⁷XXXXXXXXXXXXXXXX²⁵³CCGGCTTCACGCTACC
TAACTGACATGACTCTCGAAGAAATGTCAAGGGAC
TGGTCCATGATCATGCCCAAGCAGAAAGTGGCAGG
TTCCTTTGCATCAAAATGGACCAGGCAATAATGG
ATAAAACCGTCATATTGAAAGCAAACCTTCAGTGTG
ATTTTTGACCGGCTGGAAACCCTAATACTACTTAG
AGCTTTCACAGAAGAAGGAGCAATCGTAGGAGAA
ATCTCACCATTACCTTCTCTCCAGGACATACTGGT
GAGGAT⁵¹⁹

Dari hasil identifikasi fragmen gen NS1 dari kedua isolat yang diteliti menunjukkan bahwa keduanya menunjukkan gambaran yang hampir sama yakni terdapat delesi 15 nukleotida pada posisi 238 sampai dengan 252. Selanjutnya dilakukan *alignment* sekuen antar kedua isolat uji maupun antara kedua isolat uji dan isolat asal unggas dan asal manusia dari bank gen.

Perbandingan antara isolat A/Muscovy Duck/Bantul/2005 dan A/Chicken/Purworejo/2005. Sekuen nukleotida dan asam amino fragmen gen NS1 dari kedua isolat yang diteliti dibandingkan dengan fragmen gen NS1 dari isolat H5N1 asal ayam dari Hongkong yang diisolasi pada tahun 1997 dan diakses melalui bank gen dengan kode akses AF098569. Perbandingan tersebut dilakukan dengan tujuan untuk menentukan posisi asam amino yang tepat. Dalam hal ini penomoran posisi basa nukleotida dan asam amino menggunakan rujukan sistem penomoran H3 (*H3 numbering system*).

Urutan nukleotida fragmen gen NS1 isolat asal entog dan ayam dibandingkan pada posisi 190 sampai dengan 519 menunjukkan bahwa antara isolat A/Chicken/Purworejo/2005 dan A/Muscovyduck/Bantul/2005 mempunyai

tingkat homologi baik di level nukleotida maupun asam amino sebesar 99,05%.

Perbandingan antara isolat uji dan isolat asal unggas lainnya. Sekuen nukleotida dan asam amino isolat uji A/Chicken/Purworejo/2005 dan A/Muscovyduck/Bantul/2005 dibandingkan dengan sekuen 29 isolat yang berasal dari beberapa daerah di Indonesia, dari Hongkong, Cina, Thailand, Vietnam, Korea, Jepang, India, Mesir, Sudan, Rusia, dan Afganistan yang diakses melalui bank gen. Secara keseluruhan pada perbandingan antarisolat unggas, ditemukan sebanyak 4 isolat tidak mengalami delesi pada posisi 80–84, namun mempunyai residu “TIASV”. Isolat tersebut diisolasi pada tahun 1997 di Hongkong (sebanyak 3 isolat) dan di Cina (sebanyak 1 isolat). Delesi 5 residu asam amino diamati terjadi pada 25 isolat asal unggas yang diisolasi antara tahun 2001 sampai tahun 2007 (lihat Gambar 2). Berdasarkan penelitian analisis sekuen genom virus H5N1 yang berasal dari wabah di Thailand, oleh Viseshakul *et al.* (2004), gen NS virus H5N1 dikelompokkan menjadi 2 kelompok yakni kelompok virus yang diisolasi pada tahun 1997 dan kelompok virus yang diisolasi pada akhir tahun 2000 sampai sekarang. Kelompok virus yang diisolasi pada tahun 1997 tidak mengalami delesi 5 residu asam amino pada posisi 80-84, sedangkan yang diisolasi pada akhir tahun 2000 sampai sekarang menunjukkan adanya delesi pada posisi 80-84. Delesi asam amino posisi 80-84 juga ditemukan pada isolat yang diisolasi dari wabah peternakan di Cina pada tahun 2003-2004 dan di Thailand pada tahun 2004 (Wan, *et al.*, 2005; Buranathai, *et al.*, 2004). Sedangkan mutasi D92E dijumpai pada ketiga isolat Hongkong yang tidak mengalami delesi tersebut. Secara keseluruhan perbandingan sekuen antara kedua isolat uji dan isolat unggas lainnya dapat dilihat pada Gambar 2.

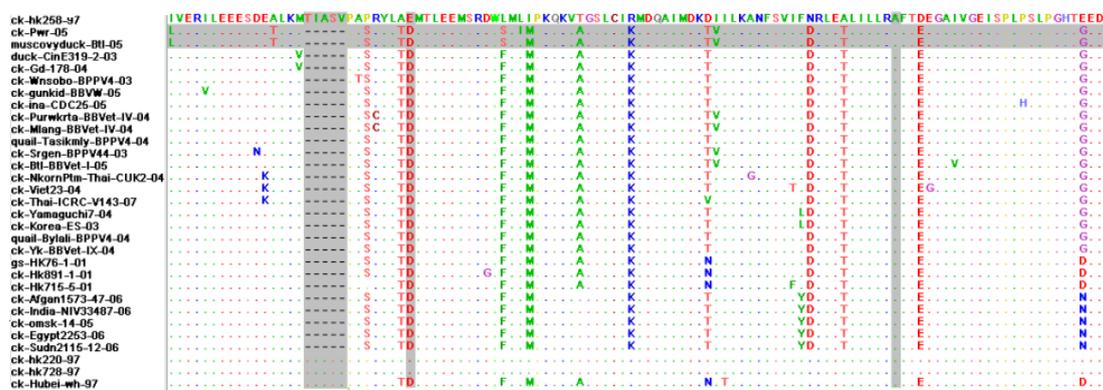
Perbandingan antara isolat uji dan isolat asal manusia. Kedua isolat uji juga dibandingkan dengan isolat asal manusia yang diakses dari bank gen sebanyak 32 isolat yakni dari Indonesia (14 isolat), Thailand (3 isolat), Vietnam (6 isolat), Cina (4 isolat), dan Hongkong (5 isolat).

Terkait dengan faktor patogenisitas virus, semua isolat manusia dari Indonesia tersebut dan isolat manusia dari Thailand, Vietnam, Cina dan beberapa isolat Hongkong

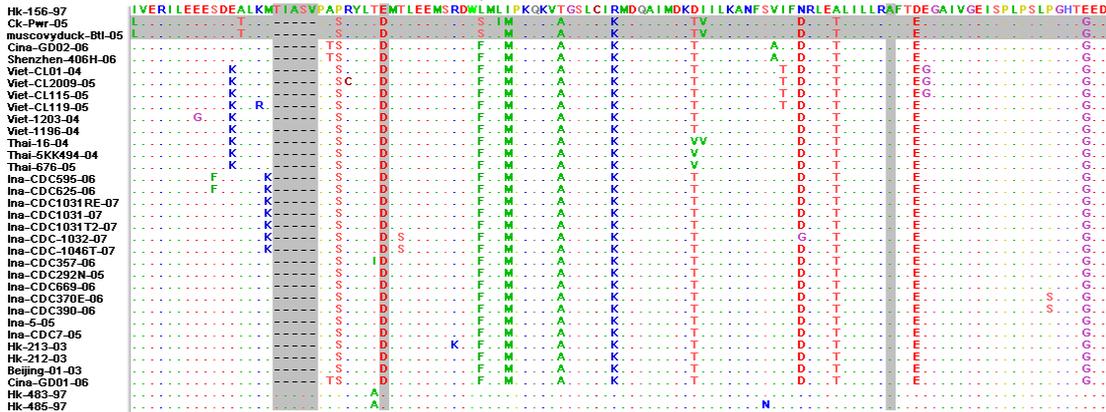
mempunyai karakteristik yang sama dengan kedua isolat uji yakni tidak terjadi mutasi pada posisi D92E namun mengalami delesi 5 asam amino pada posisi 80-84. Dari perbandingan dengan isolat manusia sebanyak 3 isolat asal manusia tidak mengalami delesi pada posisi 80 – 84, namun mempunyai residu “TIASV”. Keempat isolat tersebut diisolasi pada tahun 1997 di Hongkong. Delesi 5 residu asam amino diamati terjadi pada 29 isolat yang semuanya diisolasi antara tahun 2001 sampai tahun 2007 (Gambar 3). Fenomena ini sesuai dengan hasil penelitian analisis sekuen genom virus H5N1 yang berasal dari wabah di Thailand, oleh Viseshakul *et al.* (2004), gen NS virus H5N1 dikelompokkan menjadi 2 kelompok yakni kelompok virus yang diisolasi pada tahun 1997 dan kelompok virus yang diisolasi pada akhir tahun 2000 sampai sekarang. Kelompok virus yang diisolasi pada tahun 1997 tidak mengalami delesi 5 residu asam amino pada posisi 80-84, sedangkan yang diisolasi pada akhir tahun 2000 sampai sekarang menunjukkan adanya delesi pada posisi 80-84. Mutasi titik pada posisi 92 dari D (asam aspartat) menjadi E (asam

glutamat) terjadi pada ketiga isolat Hongkong yang tidak mengalami delesi pada kelima residu posisi 80-84 tersebut. Secara keseluruhan perbandingan sekuen antara kedua isolat uji dan isolat manusia dapat dilihat pada Gambar 3.

Analisis homologi dan rekonstruksi filogeni dilakukan terhadap fragmen gen NS1 sepanjang 313 bp yakni pada nt190 sampai dengan nt519. Sekuen nukleotida digunakan untuk melakukan analisis filogenetik karena akan memberikan resolusi gambar pohon yang lebih baik dibandingkan ketika menggunakan data hasil sekuen asam amino (Michu, 2007). Metode yang digunakan untuk membuat pohon filogeni dalam penelitian ini adalah metode NJ (*neighbor-joining*) dan divisualisasikan dengan NJPlot. Metode NJ tersebut berdasarkan pada *distance-matrix based method* atau *clustering method* atau *algorithmic method* yakni berdasarkan prosentase perbedaan antara *pairwise combination* semua sekuen yang diteliti. Meskipun metode NJ ini sederhana namun cepat dilakukan dan sesuai untuk sekuen-sekuen yang berdekatan atau tidak terlalu divergen (Michu, 2007).



Gambar 2. Hasil *alignment* sekuen fragmen gen NS1 virus H5N1 yang diisolasi dari ayam (A/Chicken/Purworejo/2005) dan entog (A/Muscovyduck/Bantul/2005), ditunjukkan dengan blok horisontal warna abu-abu, yang disejajarkan dengan 29 isolat unggas dari bank gen. Blok vertikal warna abu-abu menunjukkan posisi-posisi tertentu yang berperan dalam patogenisitas virus dengan acuan sistem penomoran H3

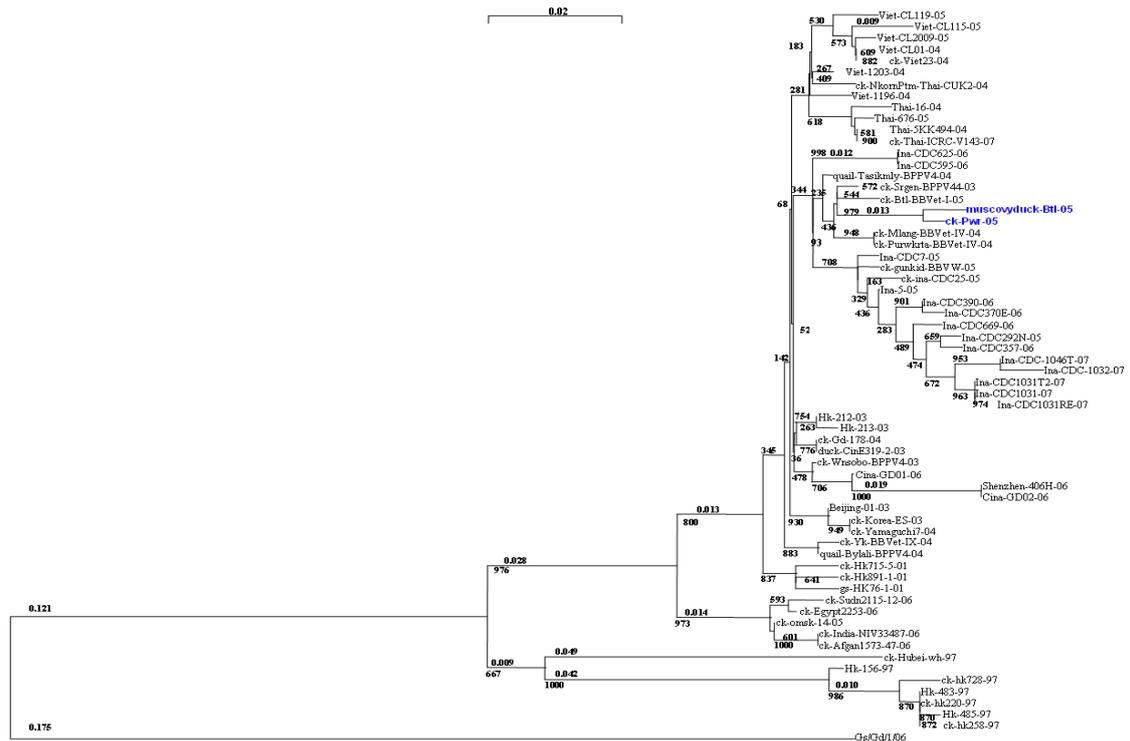


Gambar 3. Hasil *alignment* sekuen fragmen gen NS1 virus H5N1 yang diisolasi dari ayam (A/Chicken/Purworejo/2005) dan entog (A/Muscovyduck/Bantul/2005), ditunjukkan dengan blok horisontal warna abu-abu, yang disejajarkan dengan 32 isolat manusia dari bank gen. Blok vertikal warna abu-abu menunjukkan posisi-posisi tertentu yang berperan dalam patogenisitas virus dengan acuan sistem penomoran H3

Sebanyak 61 isolat yang terdiri atas 32 isolat asal manusia dan 29 isolat asal unggas dilakukan analisis filogenetik secara *rooted tree*. Berbeda dari *unrooted tree*, pada *rooted tree* dapat ditentukan hubungan evolusi dengan *outgroup*. *Outgroup* sebaiknya dipilih dari spesies di luar yang sedang diteliti atau dapat muncul ketika proses *alignment* yang menunjukkan skor *sequence identity* yang amat rendah. *Outgroup (root)* merupakan *common ancestor* (Harrison & Langdale, 2006). Oleh karena itu dengan visualisasi pohon filogenetik secara *rooted tree* dapat diketahui hubungan evolusi antara masing-masing isolat dengan isolat yang bertindak sebagai *outgroup (root)* sedangkan pada *unrooted tree* hanya dapat diketahui hubungan antar isolat yang dibandingkan tanpa mengetahui jalur evolusi masing-masing isolat tersebut. Pada analisis filogenetik ini menggunakan isolat Goose/Guangdong/1/2006 (kode akses AF144307) sebagai *outgroup* karena merupakan isolat yang pertama kali diisolasi pada tahun 2006.

Berdasar pohon filogenetik tampak bahwa kedua isolat uji mempunyai hubungan

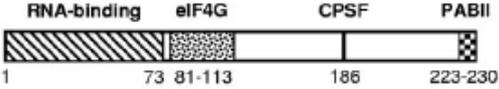
kekerabatan yang amat dekat dengan *level of confidence* dari analisis bootstrap (1000 replikasi) sebesar 97,9%. Dibandingkan antara isolat unggas maupun manusia, kedua isolat uji menunjukkan kisaran tingkat homologi yang sama yakni berkisar antara 83,7% sampai 99% di level nukleotida ketika dibandingkan dengan isolat manusia maupun unggas. Ketika dibandingkan dengan 24 isolat dari Indonesia, terdapat 3 isolat yang terletak pada kelompok cabang yang berbeda dari kedua isolat uji (lihat Gambar 4); yakni isolat Ck/Wnsobo/BPPV4/03, Ck/Yk/BBVet/IX/04, dan uail/Bylali/BPPV4/04. Fenomena ini menunjukkan bahwa kemungkinan 3 isolat tersebut berasal dari kelompok *ancestor* virus yang berbeda dari kedua isolat uji atau dengan kata lain berasal dari introduksi virus yang berbeda. Selain itu baik kedua isolat uji dan isolat dari Indonesia menunjukkan jarak genetik yang sangat jauh terhadap isolat Goose/Guangdong/1/2006 sehingga kemungkinan isolat tersebut bukan merupakan *ancestor* dari kedua isolat uji dan isolat dari Indonesia.



Gambar 4. Hubungan filogenetik di antara fragmen gen NS1 Virus H5N1 yang terdiri atas 61 isolat dari berbagai negara di kawasan Asia dan Afrika. Analisis dilakukan dengan bootstrap replikasi 1000 menggunakan *ClustalX 1.81* yang divisualisasikan menggunakan *NJPlot*. *Outgroup* menggunakan isolat Goose/Guangdong/1/2006. Garis skala menunjukkan jumlah perubahan nukleotida per 0,01 panjang dari cabang horizontal

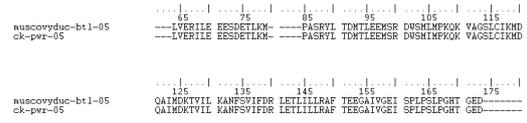
Analisis Struktur Tiga Dimensi Protein NS1. Selain analisis filogenetik, pada penelitian ini juga dilakukan analisis mutasi gen NS1 yang kemudian dihubungkan dengan struktur tiga dimensi protein NS1. Perubahan struktur protein dapat menjelaskan dasar molekuler perubahan tingkat virulensi virus.

Protein NS1 merupakan protein internal virus H5N1 yang dikode oleh segmen 8 RNA virus. Protein NS1 yang mempunyai berat molekul 26-kDa, terdiri atas 230 asam amino, dengan 73 asam amino pertama merupakan bagian untuk mengikat RNA atau *RNA-binding domain* (RBD) atau NS1A(1-73) domain, sedangkan asam amino 74 sampai 230 merupakan bagian yang disebut sebagai *effector domain* (Kochs, *et al.*, 2007; Li, *et al.*, 2007).



Gambar 5. Skema yang menunjukkan bagian-bagian genom protein NS1A. Gambar diambil dari Kochs, *et al.* (2007)

Berdasarkan hasil sekuensing dan *alignment*, gen NS1 kedua isolat uji yakni A/Muscovyduck/Bantul/2005 dan A/Ck/Pwr/2005 menunjukkan motif asam amino seperti pada Gambar 6.

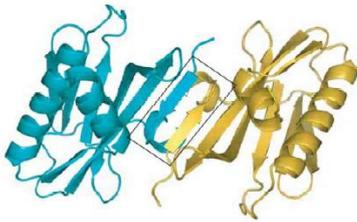


Gambar 6. Motif asam amino kedua isolat uji

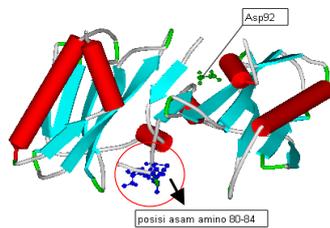
Berdasar sekuen asam amino seperti terlihat pada Gambar 6, tampak bahwa sebagian besar motif asam amino tersebut masuk ke dalam bagian *effector domain*. Posisi mutasi yang diamati pada penelitian ini terletak pada posisi 80-84 dan 92 terletak pada fragmen *effector domain*. Fragmen gen yang diamplifikasi dari isolat yang diteliti tercakup dalam fragmen *effector domain* tersebut.

Seperti struktur RBD, struktur *effector domain* juga membentuk dimer. Sisi pertemuan (*dimeric interface*) dua monomer dari *effector domain* dibentuk oleh ujung N pita β dari tiap

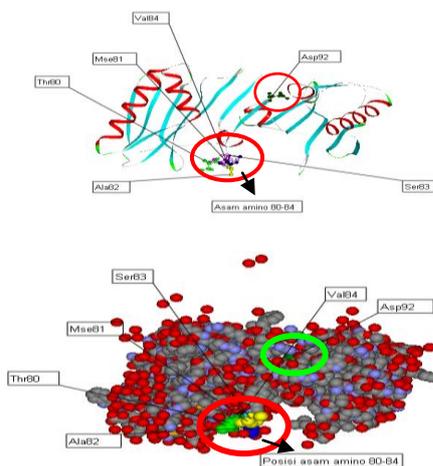
monomer. Tiap pita β berjalan anti paralel terhadap pita lainya sepanjang sisi pertemuan, seperti yang digambarkan pada Gambar 7.



Gambar 7. Model dimer *effector domain* protein NS1 menurut Bronholdt *et al.* (2006). Warna biru dan kuning menunjukkan masing-masing monomer. Tampak sisi pertemuan (*dimeric interface*) *effector domain* diberi tanda kotak hitam

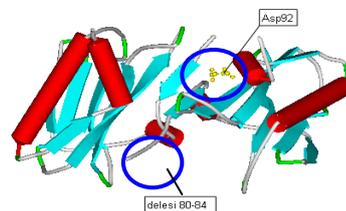
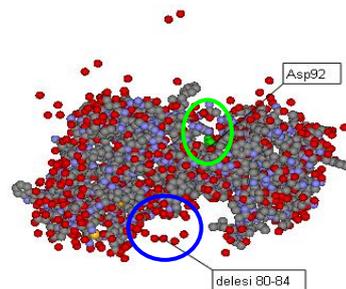


Gambar 8. Diagram pita fragmen *effector domain* protein NS1. Pada gambar ditunjukkan posisi asam amino yang berperan dalam virulensi. Ilustrasi dibuat dengan menggunakan *D.S. Visualizer 1.7*. dengan *template* dari *RCSB Protein Database Bank* (*PDB entry 2GX9*)



Gambar 9. Gambar struktur atom dan diagram pita fragmen *effector domain* gen NS1. Ilustrasi dibuat dengan menggunakan *D.S. Visualizer 1.7*. dengan *template* dari *RCSB Protein Database Bank* (*PDB entry 2GX9*).

Oleh karena struktur 3 dimensi protein NS1 virus H5N1 tidak ada, maka struktur protein dibuat dengan metode komputasi. Metode membuat model homologi ini digunakan untuk memprediksi struktur 3 dimensi protein karena struktur definitif hasil eksperimen tidak tersedia (Li & Wang, 2007). Untuk membuat model struktur protein, dilakukan *alignment* sekuen asam amino isolat dengan *template*. Model struktur akan masuk akal jika tingkat homologi sekuen asam amino antara isolat dan *template* di atas 25% (Li & Wang, 2007). *Template* menggunakan struktur sinar X protein NS1 virus influenza A non H5N1 yang diambil dari *RCSB Protein Database Bank* (*PDB entry 2GX9*). Sekuen kedua isolat dilakukan *alignment* terhadap sekuen *template* tersebut dengan menggunakan *software ClustalX 1.81*.



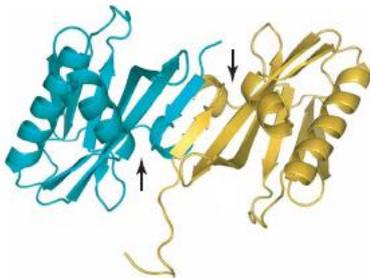
Gambar 10. Struktur atom dan gambar diagram pita fragmen gen *effector domain* protein NS1 virus H5N1 isolat A/Chicken/Purworejo/2005 yang menunjukkan jenis asam amino pada posisi 92 yang tidak mengalami mutasi dan terdapat delesi pada posisi 80-84.

Gambar 10 memperlihatkan prediksi struktur fragmen *effector domain* protein NS1 virus H5N1 dari isolat A/Chicken/Purworejo/2005. Pada gambar tersebut nampak asam amino yang tidak mengalami mutasi D92E. Namun menarik untuk diperhatikan karena ternyata ditemukan delesi 5 asam amino pada posisi 80-84. Oleh karena kelima asam amino tersebut merupakan bagian dari *flexible linker* antara RBD dan *effector*

domain, maka delesi tersebut dapat mengubah orientasi RBD atau stabilitas RBD atau keduanya. Delesi tersebut juga dapat menyebabkan protein NS1 lebih *compact* sehingga RBD lebih stabil, yang memungkinkan afinitas pengikatan dsRNA oleh RBD meningkat.

Penelitian yang dilakukan oleh Seo *et al.* (2002) dan Lipatov *et al.* (2005) menunjukkan bahwa delesi 5 asam amino pada gen NS1 berimplikasi terhadap resistensi sitokin namun tidak berpengaruh terhadap virulensi.

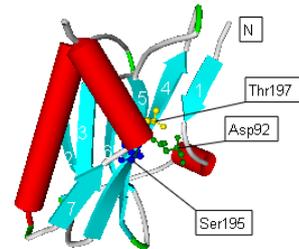
Berdasarkan hasil sekuensing isolat A/Chicken/Purworejo/2005 dan A/Muscovyduck/Bantul/2005, diketahui bahwa kedua isolat tersebut tidak mengalami mutasi D92E namun mengalami delesi pada posisi 80 - 84. Namun jenis asam amino pada posisi 92 ini perlu mendapat perhatian karena mutasi titik D92E menentukan sifat resistensi virus terhadap sitokin. Asp92 terletak di dasar struktur *dynamic cleft* dan terlibat dalam interaksi dengan Ser195 dan Thr197 secara kuat melalui ikatan hidrogen (Lin, *et al.*, 2007; Bornholdt & Prasad, 2006)



Gambar 11. Diagram pita *dimer effector domain* protein NS1. Panah hitam menunjukkan cleft yang dibentuk oleh Asp92, Ser195 dan Thr197. Gambar diambil dari Bornholdt & Prasad (2006)

Ser195 dan Thr197 merupakan dua asam amino yang penting untuk tempat fosforilasi (phosphorylation sites) (Li & Wang, 2007). Dua asam amino tersebut mempunyai konformasi yang berbeda pada tiap monomer *effector domain*. Seperti nampak pada Gambar 11, pada subunit yang berwarna biru, konformasi *cleft* tertutup sehingga akses terhadap Ser195 dan Thr197 terbatas. Sedangkan pada monomer yang lain, yang pada Gambar 11 ditunjukkan sebagai subunit yang berwarna kuning, *cleft* terbuka sehingga kedua residu terbuka dan akses terhadap kedua asam amino tersebut lebih leluasa.

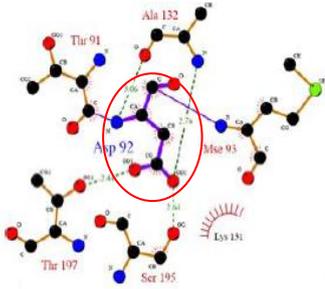
Fosforilasi kedua residu, Ser195 dan Thr197, dapat menyebabkan destabilisasi NS1 yang akan menginduksi apoptosis. Selanjutnya, akan terjadi ekspor vRNP (*viral ribonucleoprotein*) dari nukleus yang diperlukan untuk menyelesaikan siklus hidup virus (Bornholdt & Prasad, 2006). Jadi fosforilasi protein NS1 merupakan peristiwa yang penting selama proses amplifikasi gen virus.



Gambar 12. Diagram pita monomer effector domain. Nampak posisi 3 asam amino yang membentuk *cleft* dan topologi β strand dengan urutan nomornya. Visualisasi dibuat menggunakan *D.S. Visualizer 1.7*.

Dengan adanya mutasi D92E akan dapat menyebabkan 'lepasnya' Ser195 dan Thr197 sehingga kedua asam amino tersebut berikatan lebih kuat dengan sel hospes menyebabkan fosforilasi lebih cepat sehingga virus lebih cepat bereplikasi. Hal ini disebabkan oleh karena ikatan asam glutamat (E) dengan residu sekelilingnya, termasuk Ser195 dan Thr197 lebih lemah dibandingkan dengan ikatan asam aspartat (D) dengan residu sekelilingnya (Li & Wang, 2007; Lin, *et al.*, 2007)

Gambar 12 memberikan ilustrasi bahwa Asp92 terikat secara kuat dengan residu-residu Ala132, Ser195 dan Thr197 melalui ikatan hidrogen serta terjadi ikatan hidrofobik dengan Lys131. Sebaliknya ketika terjadi mutasi D92E, asam glutamat hanya mempunyai ikatan hidrogen dengan Ala132 serta interaksi hidrofobik dengan Thr191, Met93, Lys131, Ser195 dan Thr197. Akibat mutasi tersebut dapat menyebabkan destabilisasi struktur protein di regio sekitar glutamat sehingga menyebabkan 'lepasnya' Ser195 dan Thr197.



Gambar 13. Skema yang menunjukkan interaksi residu Asp92 dan Glu92 dengan residu-residu di sekelilingnya pada NS1 non H5N1. Gambar diambil dari Li & Wang (2007)

Oleh karena letak asam aspartat pada posisi 92 (Asp92) dekat dengan *dimeric interface*, maka jika terjadi mutasi pada posisi tersebut akan mengubah stabilitas atau orientasi RBD sehingga mempengaruhi kemampuan mengikat dsRNA. Mutasi D92E dapat menurunkan efisiensi fosforilasi NS1. Fosforilasi NS1 diperlukan untuk induksi proses apoptosis yang memungkinkan ribonukleoprotein virus (vRNP) dikeluarkan (diekspor) dari inti sel hospes. Pada akhirnya, mutasi D92E menentukan virulensi virus karena dapat memperpanjang siklus hidup virus (Lin, *et al.*, 2007).

Simpulan

Berdasarkan hasil analisis molekuler terhadap sekuen nukleotida dan asam amino pada fragmen gen NS1 virus H5N1 yang berasal dari isolat A/Muscovyduck/Bantul/2005 dan A / Chicken/Purworejo/2005 maka ditemukan bahwa tidak terdapat mutasi D92E, terdapat delesi 5 asam amino di posisi 80 – 84, adanya mutasi D92E dan atau delesi asam amino posisi 80-84 diduga berhubungan dengan peningkatan virulensi virus H5N1, sedangkan hasil *alignment* antarsekuen kedua isolat uji serta antara sekuen kedua isolat uji dan sekuen isolat asal unggas maupun manusia yang diakses melalui bank gen didapat gambaran bahwa antara isolat A / Muscovyduck/Bantul/2005 dan A/Chicken/Purworejo/2005 mempunyai tingkat homologi sebesar 99,05 % baik di level nukleotida maupun level asam amino dan menunjukkan hubungan kekerabatan yang paling dekat dengan *level of confidence* analisis *bootstrap* (1000 replikasi) mencapai 97,9 %.

Saran

Peran gen NS1 sebagai penentu faktor virulensi virus H5N1 perlu dikaji dan teliti lebih dalam lagi melalui eksperimen di laboratorium untuk membuktikan peran mutasi posisi-posisi tertentu terhadap perubahan sifat virulensi virus H5N1. Selain itu, analisis struktur protein NS1 virus H5N1 perlu dilakukan lebih mendalam lagi dengan menggunakan teknik yang lebih akurat untuk membuktikan dasar molekuler peran mutasi terhadap perubahan struktur protein NS1 yang pada akhirnya mengubah sifat virulensi virus. Kajian mendalam tentang struktur protein NS1 virus H5N1 dapat membantu pengembangan obat antivirus yang baru maupun pengembangan vaksin yang berbasis pada protein internal virus.

Persantunan

Terima kasih diucapkan kepada Tim Flu Burung Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada yang telah menyediakan isolat untuk keperluan penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Bronholdt, Z.A, Prasad, B.V.V. 2006. X-ray Structure of Influenza Virus NS1 Effector Domain. *Nature Structural & Molecular Biology*;13:559-560.
- Buranathai,C, Chaisingh,A, Nuansrichay,B, Damrongwattanapokin,S, Limlathong,Y, Amonsin,A, Payungporn,S, Chutinimitkul,S, Keawcharoen,J, Theamboonlers,A, Phakdeewirot,P, Oraveerakul,K, Viseshakul,N, Thanawongnuwech,R, Suradhat,S, Poovorawan,Y. 2004. Molecular Characteristic of H5N1 Avian Influenza A Virus in Thailand, 2004.http://www.apairesearch.net/document_file/document_20070711100713-1.pdf. Didownload pada tanggal 2 Januari 2008.
- Kochs,G., Garcia-Sastre,A., Martinez-Sobrido,L. 2007. Multiple Anti-Interferon Actions of the Influenza A Virus NS1 Protein. *J Virol*;13:7011-7021.
- Kumar,R, Halder,P, Poddar,R. 2006. Adaptive Molecular Evolution of Virulence Genes of Avian Influenza-A Virus Subtype H5N1: An Analysis of Host Radiation. *Bioinformation* ; 8 : 321-326.

- Li, Minyong, Wang, B. 2007. Homology Modelling and Examination of the Effect of the D92E Mutation on the H5N1 Nonstructural Protein NS1 Effector Domain. *J Mol Model* ; 13 : 1237 – 1244.
- Li, Zejun, Jiang, Y, Jiao, P, Wang, A, Zhao, F, Tian, G, Wang, X, Yu, K, Bu, Z, Chen, H. 2006. The NS1 Gene Contributes to the Virulence of H5N1 Avian Influenza Viruses. *J. Virol* ; 22 : 11115 – 11123.
- Lin, Dongzi, Lan, Jingfang, Zhang, Zhizhen. 2007. Structure and Function of the NS1 Protein of Influenza A Virus. *Acta Biochim Biophys Sin*; 39 : 155-162.
- Lipatov AS, Andreansky S, Webby RJ, Hulse DJ, Rehg, JE, Krauss S, Perez DR, Doherty PC, Webster RG, Sangster MY. 2005. Pathogenesis of Hongkong H5N1 Influenza Virus NS Gene Reassortants in Mice: The Role of Cytokines and B- and T- Cell Responses. *J Gen Virol*; 86 : 1121-1130.
- Michu, E. 2007. A Short Guide to Phylogeny Reconstruction. *Plant Soil Environ* ; 53 : 442-446.
- Min, J.Y., Krug, R.M. 2006. The Primary Function of RNA Binding by the Influenza A Virus NS1 Protein in Infected Cell : Inhibiting the 2' – 5' Oligo (A) Synthetase/Rnase L Pathway. *PNAS* ; 103 : 7100 – 7105.
- Quinlivan, M., D. Zamarin, A. Garcia-Sastre, A. Cullinane, T. Chambers and P. Palese. 2005. Attenuation of Equine Influenza Viruses through Truncations of the NS1 Protein. *J. Virol.* ; 79 : 8431 – 8439.
- Seo, S.H, Hoffmann, E, Webster, R.G. 2002. Lethal H5N1 Influenza Viruses Escape Host Antiviral Cytokine Responses. *Nat. Med* ; 8 : 950 – 954.
- Seo, S.H, Hoffmann, E, Webster, R.G. 2004. The NS1 Gene of H5N1.
- Influenza Viruses Circumvents the Host Anti-Viral Cytokines Responses. *Virus Res* ; 103 : 107 – 113.
- Viseshakul, N, Thanawongnuwech, R, Amonsin, A, Suradhat, S, Payungporn, S, Keawchareon, J, Oraveerakul, K, Wongyanin, P, Plitkul, S, Theamboonlers, A, Poovorawan, Y. 2004. The Genome Sequence Analysis of H5N1 Avian Influenza A Virus Isolated from the Outbreak Among Poultry Populations in Thailand. *Virology* ; 328 : 169-176.
- Wan, X.F., Ren, T., Luo, K.J., Liao, M., Zhang, G.H., Chen, J.D., Cao, W.S., Li, Y., Jin, N.Y., Xu, D., Xin, C.A. 2005. Genetic Characterization of H5N1 Avian Influenza Viruses Isolated in Southern China During the 2003-2004 Avian Influenza Outbreaks. *Arch Virol*; 6:1257-1266.
- World Health Organization. 2006. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A/(H5N1) reported to WHO. 29 May (www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2006_05_29/en/index.html). Didownload pada tanggal 17 Februari 2007.

