

Variasi Genetik pada Protein Internal Matrix (M1) dan Nonstruktural (NS1) Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 Asal Indonesia

N.L.P. INDI DHARMAYANTI

Balai Besar Penelitian Veteriner Jl. RE Martadinata No. 30, Bogor 16114

(Diterima dewan redaksi 11 Februari 2011)

ABSTRACT

DHARMAYANTI, N.L.P.I. 2011. Genetic variation on internal protein matrix (M1) and non structural protein (NS1) of Indonesian avian influenza virus H5N1 subtype. *JITV* 16(1): 71-81.

The mutation and genetic variation of avian influenza virus usually associated with Hemagglutinin (HA) and Neuraminidase (NA). The HA and NA protein are surface glycoproteins which have role for receptor binding site of the virus, determine virus subtype and genetic variation occurred in those proteins. On the other site, the virus have the internal protein that posses function for virus replication. This study analyzed the mutation on the the internal protein virus especially the Matrix (M1) and non structural (NS1) protein and its three dimensioanal structure of proteins. The methods used in this study were virus propagation, (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) RT-PCR sequencing of M1 and NS1 and using DS Modeller dan DS Standalone from Discovery Studio for Modeling and Simulation to predict the three dimensional structure of the proteins. The result of this study showed that Indonesian AI H5N1 subtype had genetic variation internal protein and have no change on conserved of condition such as *putative zinc finger* and *nuclear localization signal* (NLS). Genetic variation that occurred on PDZ motif of NS1 especially have human origin motif that might be correlated with virus adaptation on human.

Key Words: Avian Influenza, Matrix (M1), Non Structural (NS1), Genetic Variation

ABSTRAK

DHARMAYANTI, N.L.P.I. 2011. Variasi Genetik pada protein internal matrix (M1) dan non struktural (NS1) virus avian influenza subtipe H5N1 asal Indonesia. *JITV* 16(1): 71-81.

Mutasi dan variasi genetik yang terjadi pada virus avian influenza (AI) umumnya dihubungkan dengan Hemagglutinin (HA) dan Neuraminidase (NA) tersebut. Protein HA dan NA adalah dua glikoprotein virus AI yang terletak pada permukaan virion dan berperan dalam perlekatan reseptor virus, penentuan subtipe virus dan variasi genetik umumnya terjadi pada kedua protein ini. Selain kedua glikoprotein permukaan ini, virus AI mempunyai protein internal virus yaitu M1 dan NS1 yang berperan penting dalam replikasi virus. Pada penelitian ini dilakukan analisis pada dua protein internal virus yaitu M1 dan NS1 dan menganalisis perubahan seperti mutasi yang terjadi pada kedua protein internal virus tersebut sampai pada struktur tiga dimensinya, sehingga dapat diketahui apakah mutasi terjadi pada kedua protein ini, khususnya pada virus AI subtipe H5N1 asal Indonesia. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah propagasi virus dilanjutkan dengan *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) dan sekuensing gen M1 dan NS1 serta memprediksi struktur protein tiga dimensinya dengan menggunakan *DS Modeller* dan *DS Standalone* dari *Discovery Studio for Modeling and Simulation*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa variasi genetik terjadi pada protein internal M1 virus AI subtipe H5N1 asal Indonesia dan kondisi *conserved* seperti motif *putative zinc finger* dan *nuclear localization signal* (NLS) masih tetap dipertahankan. Variasi genetik terjadi pada motif PDZ protein NS1 yaitu dua virus mempunyai motif human origin, yang kemungkinan berhubungan dengan usaha adaptasi virus pada manusia.

Kata Kunci: Avian influenza, Matrix (M1), NonStruktural (NS1), Variasi Genetik

PENDAHULUAN

Analisis genetika virus AI pada umumnya secara ekstensif dilakukan pada gen yang menjadi glikoprotein permukaan yaitu HA dan NA. Protein HA berperan sebagai binding reseptor, epitop dan bertanggung jawab terhadap patogenisitas virus, sedangkan protein NA berperan dalam lepasnya anakan virus dari sel terinfeksi. Mutasi yang terjadi pada virus AI umumnya dihubungkan dengan kedua glikoprotein tersebut. Selain protein HA dan NA, dua protein internal virus yaitu M1

dan NS1 yang berperan penting dalam replikasi virus. Pada penelitian ini dilakukan analisis pada dua protein internal virus yaitu M1 dan NS1 dan menganalisis perubahan seperti mutasi yang terjadi pada kedua protein internal virus tersebut. Sehingga dapat diketahui apakah mutasi terjadi pada kedua protein ini, khususnya pada virus AI subtipe H5N1 asal Indonesia.

Protein matrix virus influenza (M1) adalah partikel protein virus yang paling berlimpah, berperan penting dalam beberapa aspek dari replikasi virus dari mulai masuknya virus dan *uncoating* sampai penyusunan dan

budding dari pertikel virus (LAMB dan KRUG, 2001; NAYAK dan HUI, 2002). Beberapa domain spesifik pada protein M1 adalah domain *lipid-binding*, domain *RNA-binding*, domain *transcription inhibition*, *nuclear localization signal* (NLS) dan sebuah motif *putative zinc finger-binding* (Wakefield dan Brownlee, 1989). Motif *putative zinc finger-binding* motif M1 (¹⁴⁸CATCEQIADSQHRSH¹⁶²) (WAKEFIELD dan BROWNLEE, 1989) terletak pada C terminus helik 9 (H9) dan diperpanjang sampai loop 9 (L9) (SHA dan LUO, 1997; ARZT *et al.*, 2001; HARRIS *et al.*, 2001). Sekuen asam amino yang terlibat dalam *zinc binding* adalah yang merepresentasikan motif CCHH *zinc finger* yang khas adalah (CX₂₋₄CX₂₋₁₅HX₂₋₆H dan X adalah residu asam amino apa saja) (IUCHI, 2001). Protein CCHH *zinc finger* terdiri dari bermacam-macam famili protein atau *RNA binding* dan berfungsi untuk regulasi transkripsi (TAKATSUJI, 1998; IUCHI, 2001).

Dilain pihak, untuk membatasi penyebaran virus, sel yang terinfeksi oleh virus biasanya mempunyai mekanisme yang kuat dan respon antivirus yang luas (RANDALL dan GOODBOURN, 2008). Oleh karena itu, untuk bertahan hidup di alam, virus influenza mengembangkan beberapa mekanisme untuk mengelak terhadap pertahanan yang telah dibuat inang. Beberapa strategi yang strain-spesifik, seperti misalnya dengan peningkatan kecepatan replikasi (GRIMM *et al.*, 2007; KUROKAWA *et al.*, 1999), atau penurunan sensitivitas efektor antivirus sel inang (DITTMANN *et al.*, 2008). Protein NS1 pada semua influenza A adalah sebagai antagonis respon imun inang (EGOROV *et al.*, 1998; GARCIA-SASTRE *et al.*, 1998; KOCHS *et al.*, 2007).

Protein NS1 virus influenza A adalah komponen bukan struktural dari virion, tetapi protein ini diekspresikan pada level yang sangat tinggi pada sel terinfeksi (KRUG dan ETKIND, 1973; PALESE dan SHAW, 2007). Protein NS1 dikode oleh *collinear* mRNA yang berasal dari segmen 8 vRNA, sebagai hasil *splicing* pada sintesis *nuclear export protein* mRNA (NEP, sebelumnya diistilahkan NS2) (INGLIS *et al.*, 1979; LAMB dan CHOPPIN, 1979).

Protein NS1 virus AI berfungsi mengatasi respon IFN inang dan dapat melakukan replikasi secara efisien dalam keberadaan sitokin, mekanisme lain yang dapat mempengaruhi virulensi NS1 adalah dengan *binding* dan berinteraksi dengan protein sinyal selular. C-terminal dari protein NS1 virus avian influenza memiliki sekuen konsensus dari *PDZ domain ligand* (PL) (OBENAUER *et al.*, 2006). PDZ domain adalah *protein-protein recognition* yang termasuk dalam protein-protein yang mengatur berbagai penyusunan sinyal sel yang luas. Mereka secara khusus mengenali dan mengikat motif peptida pendek C-terminal yang terdiri dari 4-5 asam amino, yang disebut PL. PL dari

protein NS1 virus influenza unggas terdiri dari residu 227-230, dengan sekuen ESEV atau EPEV. Sekuen PL pada unggas tidak teramati pada protein NS1 virus influenza bukan unggas, dan untuk sejumlah besar protein NS1 virus influenza pada manusia diperpanjang dengan tujuh asam amino pada C-terminal.

OBENAUER *et al.* (2006) menunjukkan bahwa protein NS1 influenza unggas dari virus 1918 mampu untuk mengikat ke hingga 30 protein PDZ *domain* manusia, sedangkan virus pada manusia tidak dapat melakukan hal tersebut. Efek dari sekuen PL NS1 virus unggas pada virulensi virus influenza manusia yang telah dilaporkan oleh JACKSON *et al.* (2008). Protein NS1, ketika berada dalam sel manusia, dapat berinteraksi dengan protein yang mengandung domain PDZ untuk mengganggu jalur selular dan meningkatkan virulensi.

Pada penelitian ini dilakukan karakterisasi molekuler pada protein M1 dan NS1 untuk mengetahui variasi genetik pada protein internal (M1 dan NS1) virus AI H5N1 asal Indonesia sepanjang tahun 2003-2008 dan memprediksi mutasi pada protein pada level struktur tiga dimensinya.

MATERI DAN METODE

Sampel penelitian

Pada penelitian ini digunakan dua puluh virus AI subtipe H5N1 telah diidentifikasi pada penelitian sebelumnya (2003-2008) yang berasal dari latar belakang yang berbeda (Tabel 1). Virus yang diisolasi dari peternakan ayam yang melakukan vaksinasi AI selanjutnya disebut dengan virus pav-AI. Virus-virus tersebut diperbanyak pada telur embrio bertunas *specific pathogen free* (SPF) umur 9-11 hari (WHO, 2002). Cairan alantois yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk ekstraksi RNA virus.

Amplifikasi gen M1 dan NS1

Cairan alantois yang diperoleh digunakan sebagai bahan ekstraksi RNA virus. Ekstraksi RNA virus dari cairan alantois dilakukan dengan menggunakan *QIAmp viral RNA mini kit* (Qiagen). *Ribonucleic acid* (RNA) yang diperoleh digunakan sebagai cetakan reaksi RT-PCR untuk mengamplifikasi gen lengkap NS dan M dengan menggunakan kit *Superscript III One Step RT-PCR system* (Invitrogen). Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen M dan NS sesuai dengan HOFFMAN *et al.* (2001). Mesin sekuensing yang digunakan adalah *Genetix Analyzer* dari Applied Biosystem 3130.

Analisis sekuen

Hasil sekuensing berupa data elektroferogram dibandingkan dengan data sekuen nukleotida gen virus referensi dari NCBI sesuai dengan gen target yang tersedia. Analisis hasil sekuensing dilakukan dengan menggunakan *software* ABI *Sequence Analysis*, Finch TV (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>) serta BioEdit versi 7 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Pembuatan *multiple alignment* dengan menggunakan BioEdit versi 7.

Prediksi dan visualisasi struktur tiga dimensi protein

Visualisasi prediksi protein 3D dilakukan dengan menggunakan sekuen hasil translasi asam amino pada protein M1 dan NS1 dari virus tahun 2003 sebagai representasi virus yang belum bermutasi dan virus tahun 2007-2008 sebagai representasi virus baru yang bermutasi. Cetakan dengan homologi tertinggi diperoleh dengan menggunakan BLAST *search* (DS *server*). Penjejeran sekuen dengan cetakan dibuat model

Tabel 1. Virus AI subtipe H5N1 yang digunakan pada penelitian ini

Nama virus	Asal kasus	Diisolasi/diidentifikasi/tahun
A/Ck/East Java/BL-IPA/2003	Wabah unggas	DHARMAYANTI <i>et al.</i> 2003
A/Ck/West Java/1074/2003	Wabah unggas	INDRIANI <i>et al.</i> 2003;DHARMAYANTI <i>et al.</i> 2003
A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit/2004	Wabah unggas	DHARMAYANTI <i>et al.</i> 2004
A/Duck/Banten/Pdgl-Kas/2004	Wabah unggas	DHARMAYANTI <i>et al.</i> 2004
A/Ck/Jakarta/DKI31/2005	Wabah unggas	DHARMAYANTI <i>et al.</i> 2005
A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005	Wabah unggas	DHARMAYANTI <i>et al.</i> 2005
A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005	Wabah unggas	DHARMAYANTI <i>et al.</i> 2005
A/Muscovyduck/Jakarta/Sum106/2006	Wabah unggas, sekitar kasus H5N1	DHARMAYANTI <i>et al.</i> 2006
A/Duck/Jakarta/ SImt306/2006	Wabah unggas, sekitar kasus H5N1	DHARMAYANTI <i>et al.</i> 2006
A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007	Wabah unggas, sekitar kasus H5N1	DHARMAYANTI <i>et al.</i> 2007
A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007	Wabah unggas pada flock vaksinasi AI	DHARMAYANTI <i>et al.</i> 2007
A/Ck/West Java/Smi-Sud1/2007	Wabah unggas pada flock vaksinasi AI	DHARMAYANTI <i>et al.</i> 2007
A/Muscovyduck/West Java/Bks3/2007	Wabah unggas, sekitar kasus H5N1 H5	DHARMAYANTI <i>et al.</i> 2007
A/Ck/Pessel/BPPVR II/2007	Wabah unggas, sekitar kasus H5N1	BPPVR-II/2007; DHARMAYANTI <i>et al.</i> 2007
A/Ck/Inhu/BPPVR II/2007	Wabah unggas, sekitar kasus H5N1	BPPVR-II/2007; DHARMAYANTI <i>et al.</i> 2007
A/Ck/West Java/Smi-Acl/2008	Wabah unggas	DHARMAYANTI <i>et al.</i> 2008
A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008	Wabah unggas	DHARMAYANTI <i>et al.</i> 2008
A/Ck/West Java/Smi-M1/2008	Wabah unggas pada flock vaksinasi AI	DHARMAYANTI <i>et al.</i> 2008
A/Ck/West Java/Smi-M6/2008	Wabah unggas pada flock vaksinasi AI	DHARMAYANTI <i>et al.</i> 2008
A/Ck/West Java/Smi-Biot/2008	Wabah unggas pada flock vaksinasi AI	DHARMAYANTI <i>et al.</i> 2008

3D dengan menggunakan *DS Modeller* dan *DS Standalone* dari *Discovery Studio for Modeling and Simulation* (Accelrys Discovery Studio versi 2.1) (DHARMAYANTI, 2009).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis protein Matrix 1 (M1)

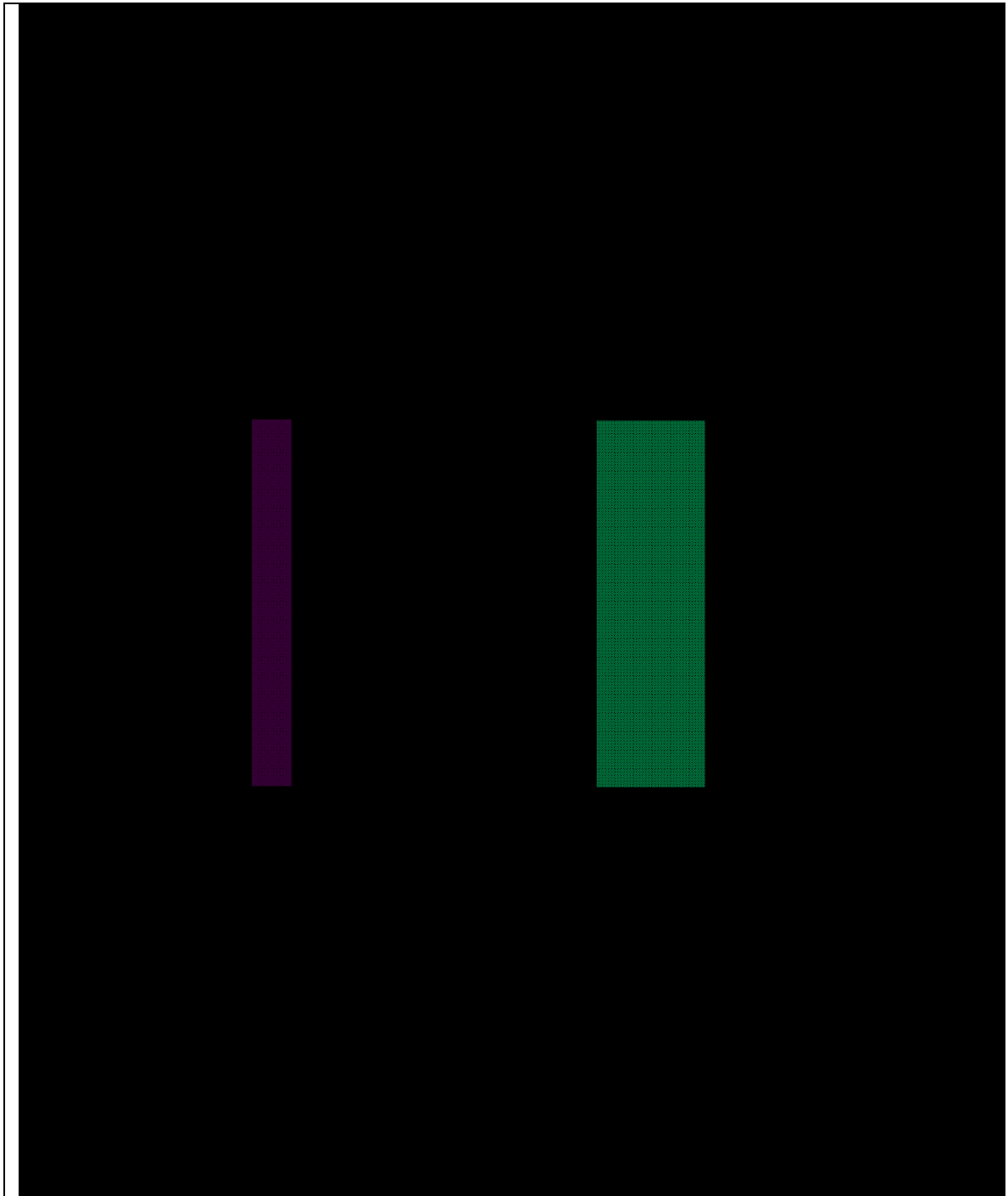
Persentase mutasi tertinggi pada protein M1 terjadi pada virus A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007 yaitu sebesar 7,825% dan virus A/Muscovy duck/Jakarta/DKI-Sum106/2006 sebesar 4,94%. Kedua virus ini berasal dari unggas yang terinfeksi di sekitar kasus manusia H5N1. Visualisasi mutasi dengan menggunakan struktur tiga dimensi protein M1 diperoleh bahwa cetakan model tiga dimensi yang yang diperoleh dari *protein Data Bank* (PDB) *file* untuk protein M1 adalah asam amino urutan 1-158, sehingga mutasi yang terjadi setelah posisi 158 tidak dapat divisualisasikan, dikarenakan mutasi terjadi pada posisi 167 (Gambar 2).

Dua domain dalam M1 disebutkan mempengaruhi asosiasi dengan RNA (YE *et al.*, 1999; YE *et al.*, 1987). Domain pertama adalah *RNA binding domain* yang mengandung sebuah motif *zinc finger* (C-148C ---HH162 (ELSTER *et al.*, 1997; NASSER *et al.*, 1996). Domain yang lain yaitu mempunyai palindrom asam amino basa yaitu (101-RKLKR-105), yang diketahui berikatan dengan RNA virus (ELSTER *et al.*, 1997; WAKEFIELD dan BROWNLEE, 1989; YE *et al.*, 1987). Domain ini juga berfungsi sebagai sinyal inti lokalisasi (*nuclear localization signal*, NLS) untuk M1 (YE *et al.*, 1989; YE *et al.*, 1995).

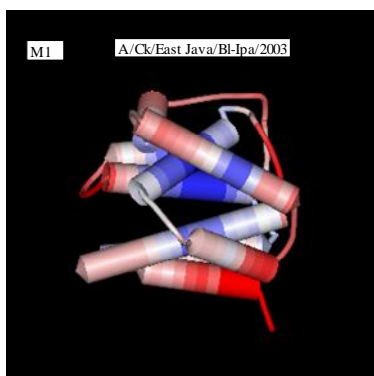
Pada penelitian ini 20 isolat yang digunakan menunjukkan motif *zinc finger* yaitu 148CATCEQI ADSQHRSH162 kecuali satu virus yaitu virus Jakarta/Sum106/06 mempunyai motif 148CSTCEQ IADSQHRSH162 (Gambar 1). Semua asam amino pada posisi 101 sampai dengan 105 diisi oleh KKLKR sebagai NLS yang dimiliki oleh semua isolat kecuali virus DKI-Nurs/07 mempunyai V menggantikan L sehingga memiliki motif KKVKR (Gambar 2).

Tabel 2. Jumlah mutasi dan persentase asam amino pada protein M1 virus influenza H5N1 asal Indonesia dibandingkan dengan virus AI H5N1 yang diisolasi pada tahun 2003

Isolat virus influenza H5N1	Jumlah asam amino yang mengalami mutasi	Persentase asam amino yang mengalami mutasi
A/Ck/Eastt Java/BI-IPA/2003	0	0,00
A/Ck/West Java/1074/2003	0	0,00
A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit/2004	3	1,23
A/Duck/Banten/Pdgl-Kas/2004	1	0,41
A/Ck/Jakarta/DKI31/2005	0	0,00
A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005	1	0,41
A/Indonesia/5/2005	1	0,41
A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005	5	2,30
A/Indonesia/6/2005	4	1,65
A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Sum106/2006	12	4,94
A/Duck/Jakarta/DKI-Slmt306/2006	9	3,70
A/Muscovyduck/West Java/Bks3/2007	4	1,65
A/Ck/Pessel/BPPVR1I/2007	4	1,65
A/Ck/Inhu/BPPVR1I/2007	6	2,47
A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007	19	7,82
A/Indonesia/CDC1031/2007	4	1,65
A/Indonesia/CDC1047/2007	4	1,65
A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007	8	3,29
A/Ck/West Java/Smi-Sud1/2007	5	2,06
A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008	4	1,65
A/Ck/West Java/Smi-Acul/2008	4	1,65
A/Ck/West Java/SMI-M1/2008	9	3,70
A/Ck/West Java/SMI-M6/2008	8	3,29
A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008	7	2,88



Gambar 1. Penjejeran prediksi sekuen asam amino protein M1 dua puluh virus yang digunakan dalam penelitian ini. NLS ditandai dengan kotak warna hijau muda, *zinc finger* motif ditunjukkan dengan kotak tertutup warna ungu. Penomoran asam amino sesuai dengan virus CDC835/06



Gambar 2. Visualisasi tiga dimensi protein M1 virus BL-IPA/03

Analisis pada protein Nonstruktural (NS)

Pada Tabel 3, virus AI asal Indonesia termasuk virus pav-AI relatif mempunyai rentang persentase mutasi protein NS1 0,9 – 4,61%. Virus AI sub tipe H5N1 pada manusia, virus Srg-Fadh/08 dan WJ/Smi-Acul/08 serta lima virus pav-AI (WJ/Smi-Hj18/07, WJ/Smi-Sud1/07, SMI-M1/08, SMI-M6/08; SMI-Biot/08) mempunyai persentase mutasi yang lebih besar dibandingkan dengan virus lainnya, serta virus A/Ck/Pessel/BPPVR II/2007 mempunyai persentase mutasi tertinggi pada level gen NS1.

Pada protein NS1, empat dari lima virus pav-AI (2007-2008) mempunyai tiga substitusi asam amino

Tabel 3. Jumlah mutasi dan persentase asam amino pada protein NS1 virus influenza H5N1 asal Indonesia dibandingkan dengan virus AI H5N1 yang diisolasi pada tahun 2003

Isolat virus influenza H5N1	Jumlah asam amino yang mengalami mutasi	Persentase asam amino yang mengalami mutasi
A/Ck/East Java/BI-Ipa/2003	217	100,00
A/Ck/West Java/1074/2003	7	3,23
A/Duck/Banten/Pdgl-Kas/2004	8	3,69
A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Uwit/2004	11	5,07
A/Ck/Jakarta/DKI31/2005	7	3,23
A/Muscovyduck/Bgr-Cw/2005	8	3,69
A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005	5	2,30
A/Indonesia/5/2005	4	1,84
A/Indonesia/6/2005	4	1,84
A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Sum106/2006	7	3,23
A/Duck/Jakarta/DKI-Slmt306/2006	5	2,30
A/Muscovyduck/West Java/Bks3/2007	11	5,07
A/Ck/Pessel/BPPVR II/2007	32	14,75
A/Ck/Inhu/BPPVR II/2007	10	4,61
A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007	7	3,23
A/Indonesia/CDC1031/2007	7	3,23
A/Indonesia/CDC1047/2007	8	3,69
A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007	8	3,69
A/Ck/West Java/Smi-Sud1/2007	7	3,23
A/Ck/West Java/Smi-Acul/2008	7	3,23
A/Ck/Banten/Srg-Fadh/2008	8	3,69
A/Ck/West Java/SMI-M1/2008	8	3,69
A/Ck/West Java/SMI-M6/2008	9	4,15
A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008	10	4,61

yaitu V136L dan L212P dan T197A. Satu virus lainnya yaitu WJ/SMI-M1/08 tidak memiliki substitusi pada posisi T197A. Protein NS1 virus pav-AI 2008 memiliki substitusi yang hanya eksklusif dimiliki oleh virus tersebut yaitu pada substitusi asam amino F22L (Gambar 3). Cetakan model 3 dimensi yang yang diperoleh dan digunakan untuk protein NS1 adalah asam amino urutan 74-200, sehingga substitusi F22L dan 212 tidak dapat diperlihatkan pada model 3 dimensi (Gambar 4).

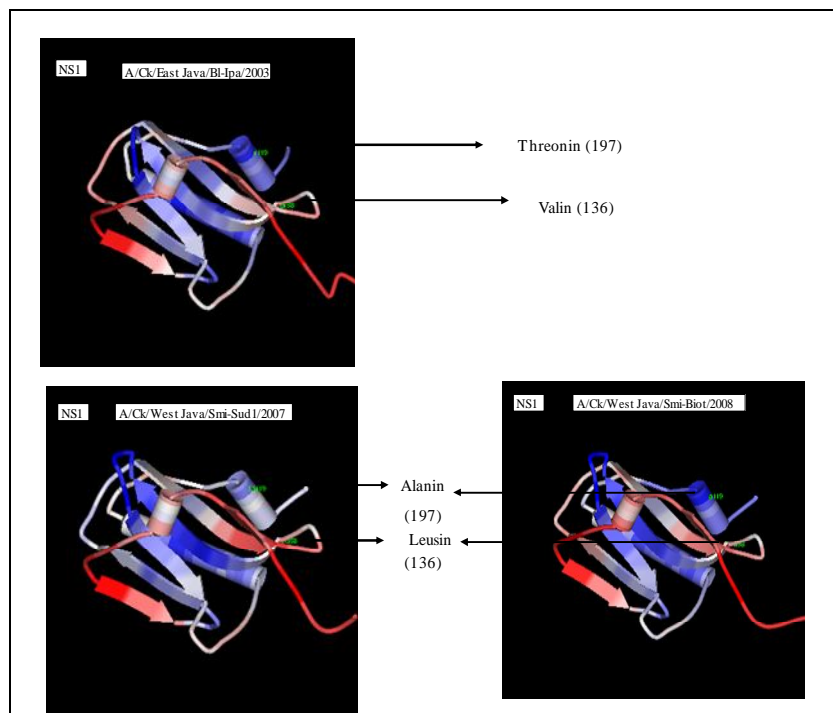
Delapan belas virus yang digunakan pada analisis ini menunjukkan motif ESEV yang menunjukkan bahwa virus berasal dari unggas (*avian origin*), kecuali virus BL-IPA/03, virus ini mengalami sedikit modifikasi PDZ *ligand binding motif* yaitu mempunyai motif ETEI, dua virus lainnya mempunyai motif yang berbeda yaitu virus Inhu/BPPVR11/07 menunjukkan motif KSEV, motif ini seperti motif PDZ-binding pada virus H1N1 tahun 1918, yang bukan golongan dari motif PDZ-binding pada unggas. Virus Pessel/BPPVR11/07 juga mempunyai motif virus influenza manusia, yaitu RSEV (Gambar 4). Delesi pada posisi 80-84 ditemukan pada seluruh virus yang digunakan, kecuali virus Pessel/BPPVR11/07. Semua virus yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai asam aspartat pada posisi 92 bukan asam glutamat pada

molekul NS1. Mutasi D92E merupakan salah satu marker resistensi terhadap sitokin.

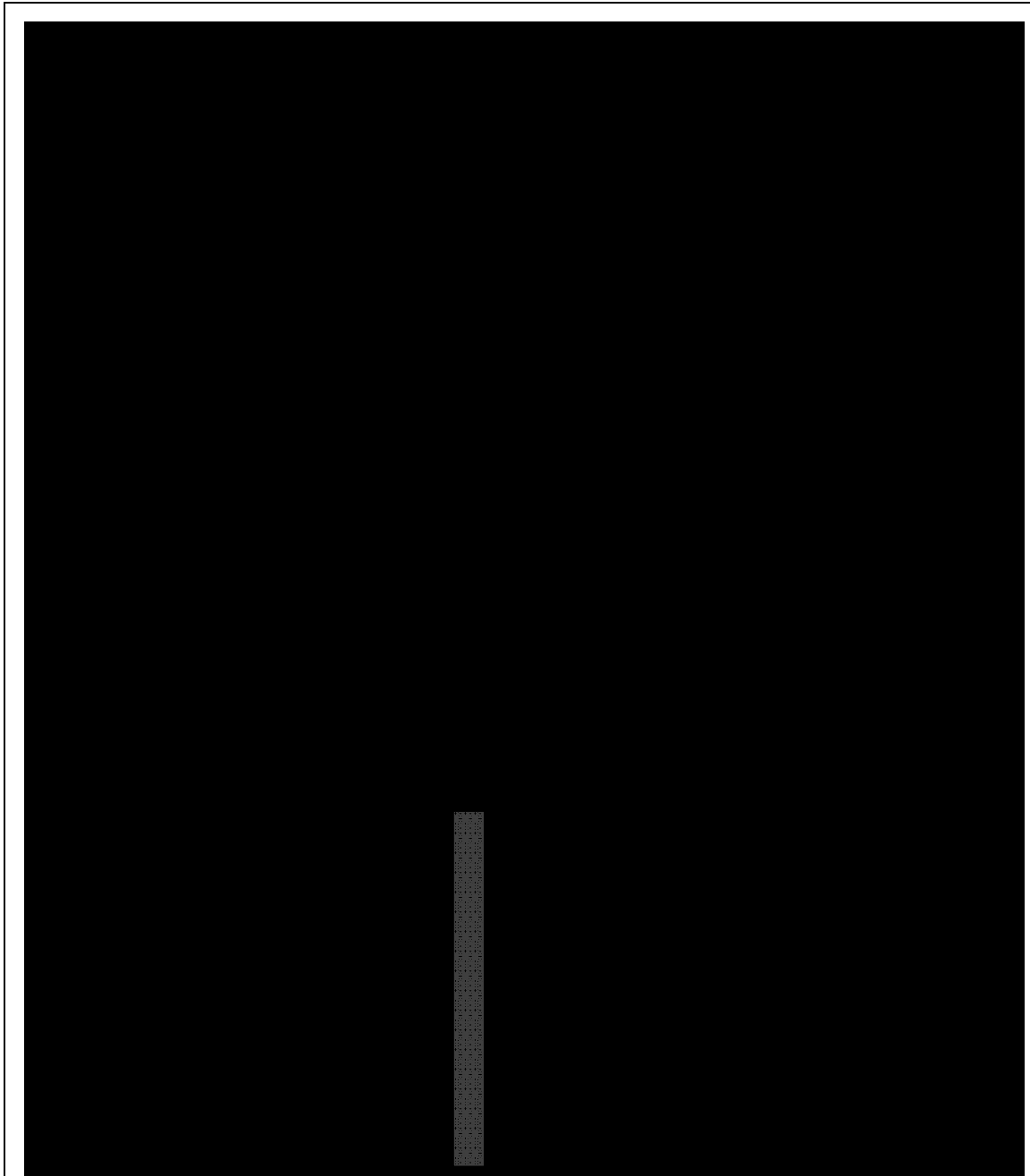
PEMBAHASAN

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa variasi genetik pada protein M1 lebih terlihat pada virus A/Ck/West Java/Smi-Hay/2005, A/Muscovyduck/Jakarta/DKI-Sum106/2006, A/Duck/Jakarta/DKI-Slmt306/2006, A/Ck/Jakarta/DKI-Nurs/2007, A/Ck/West Java/Smi-Hj18/2007, A/Ck/West Java/SMI-M1/2008, A/Ck/West Java/SMI-M6/2008, A/Ck/West Java/SMI-Biot/2008.

Pada protein M1, interaksi M1 dengan RNP telah dipelajari secara ekstensif (BAUDIN *et al.*, 1980; RUIGROK dan BAUDIN, 1995; SCHULZE, 1972; YE *et al.*, 1999). Dua domain dalam M1 disebutkan mempengaruhi asosiasi dengan RNA (YE *et al.*, 1999; YE *et al.*, 1987). Domain pertama adalah RNA *binding domain* yang mengandung sebuah motif *zinc finger* (C-148C ---- HH162), yang berasosiasi dengan ion *zinc* (ELSTER *et al.*, 1997) dan menghalangi replikasi virus (NASSER *et al.*, 1996). Pada penelitian dari 20 isolat virus yang digunakan 19 isolat menunjukkan motif *zinc finger* yaitu 148CATCEQIADSQHRSH162 dan satu



Gambar 3. Visualisasi tiga dimensi protein NS1. Tanda panah menunjukkan lokasi substitusi asam amino pada protein NS1



Gambar 4. Penjejeran prediksi sekuen asam amino protein NS1. PDZ ligand motif ditandai dengan kotak warna abu-abu. Tanda panah menunjukkan substitusi yang terjadi pada virus pav-AI tahun 2007-2008. Penomoran asam amino sesuai dengan A/Hk/483/97

virus yaitu Jakarta/Sum106/06 mempunyai motif 148CSTCEQIADSQHRSH162 (Gambar 1). Substitusi yang terjadi pada daerah ini belum diketahui apakah akan mempengaruhi replikasi virus.

Prediksi berdasarkan studi X-ray kristalografi (SHA dan LUO, 1997) memperlihatkan domain yang lain yaitu domain palindrom asam amino basa (101-RKLKR-105). Domain tersebut diketahui berikatan dengan RNA virus (ELSTER *et al.*, 1997; WAKEFIELD dan BROWNLEE,

1989; YE *et al.*, 1987). Domain ini juga berfungsi sebagai *nuclear localization signal* (NLS) untuk M1 (YE *et al.*, 1989; YE *et al.*, 1995), meskipun perannya dalam replikasi virus masih belum begitu jelas. Pada penelitian ini asam amino pada posisi 101 sampai dengan 105 adalah KKLKR sebagai NLS yang dimiliki oleh semua isolat kecuali virus DKI-Nurs/07 mempunyai V menggantikan L sehingga memiliki motif KKVKR (Gambar 1). Belum diketahui apakah terdapat

pengaruh dari substitusi Leusin (L) menjadi Valin (V). Delesi RKLKR atau substitusi Lisin (K) dengan Asparagin (N) dalam RKLKR merupakan mutasi yang letal. LIU dan YE (2002) menunjukkan yaitu delesi RKLKR dengan SNLNS dan substitusi pada posisi 102 (K102N) atau posisi 104 (K104N) akan menghasilkan virus mutasi yang letal. LIU dan YE (2002) juga menyebutkan bahwa mutasi asam amino pada posisi 101 atau 105 dari RKLKR atau di dalam *zinc finger motif* tidak mempengaruhi ekspor nuklear RNP, hal ini dikarenakan tidak ada satupun mutasi R101S, R105S dan C148S menghasilkan mutasi yang letal.

Pada struktur tiga dimensi menunjukkan bahwa mutasi yang terjadi pada protein NS1 pada virus pav-AI menunjukkan Thr197Ala di daerah heliks dan Val136Leu di daerah *strand*. Hal ini menunjukkan bahwa mutasi terjadi pada domain *C-terminal effector* pada protein NS1. Studi kristalografi menunjukkan bahwa domain *C-terminal effector* pada protein NS1 virus influenza manusia dan unggas (residu 74-230) dapat melakukan homodimerisasi secara independen, dengan masing-masing monomer yang terdiri dari tujuh β -strands dan tiga α -helik (BORNHOLDT dan PRASAD, 2006; HALE *et al.*, 2008a). *C-terminal effector domain* secara predominan memediasi interaksi protein sel dengan inang.

Domain PDZ pada protein NS1 adalah protein-protein yang mengenal modul dalam beberapa protein yang terlibat dalam pengaturan dan penyusunan sinyal sel. Pada analisis protein NS1, PDZ mengenal dan menempel pada peptida pendek pada C-terminal dengan motif 4-5 asam amino yaitu X-S/T-X-V pada posisi 227-230 (OBENAUER *et al.*, 2006). PDZ *ligand binding motif* dengan sekuen ESEV atau EPEV ditemukan pada NS1 dari virus HPAI H5N1, H9N2 dan H7N7 (HALE *et al.*, 2008b). Virus influenza manusia mempunyai motif yang berbeda yaitu RSKV atau RSEV.

Virus Inhu/BPPVR/07 menunjukkan motif KSEV seperti halnya motif PDZ dari virus influenza 1918. Suatu hal yang tidak diduga sebelumnya bahwa virus di Indonesia mempunyai motif PDZ yang bukan merupakan motif dari spesies unggas. Motif KSEV adalah motif yang jarang ditemukan di alam, pada tahun 2005 tercatat dua virus H5N1 Indonesia mempunyai motif tersebut adalah virus A/Ck/Indonesia/CDC24/2005 (Nomor akses *GenBank* CY014196) dan A/Ck/Indonesia/CDC25/2005 (Nomor akses CY 014189) dan virus H5N1 2007 yang diisolasi di Arab (MONNE *et al.*, 2008). Virus lainnya yang mempunyai motif PDZ seperti motif virus influenza manusia adalah virus Pessel/BPPVR/07, virus ini mempunyai motif RSEV. Virus Pessel/BPPVR/07 dan Inhu/BPPVR/07 diisolasi dari ayam di sekitar kasus infeksi virus AI H5N1 pada manusia ternyata mempunyai karakter genetik pada NS1 yang menarik yang mungkin berkorelasi dengan adaptasi dari virus pada manusia.

Belum diketahui apakah motif pada virus Pessel/BPPVR/07 dan Inhu/BPPVR/07 berakibat pada virulensi atau adaptasi virus pada manusia sehingga diperlukan studi lebih lanjut. Namun jika dihubungkan dengan fungsi dari protein NS1 yang hanya ditemukan dalam sel terinfeksi dan mengatur berbagai fungsi sel selama infeksi (KRUG *et al.*, 2003) dan motif yang dapat terikat ke PDZ mengandung protein yang terlibat dalam jalur sinyal selular inang (JACKSON *et al.*, 2008) maka mutasi pada protein NS1 diduga akan mengganggu jalur yang melibatkan beberapa jenis protein yang berinteraksi dengannya.

Delesi pada posisi 80-84 ditemukan pada seluruh virus yang digunakan, kecuali virus Pessel/BPPVR/07. Delesi residu lima asam amino pada posisi tersebut berkontribusi untuk meningkatkan virulensi (LONG *et al.*, 2008). Beberapa studi juga melaporkan bahwa protein NS1 protein juga berkaitan dengan virulensi dan rentang inang berbagai virus influenza pada hewan model yang berbeda (LI *et al.*, 2006; QUINLIVAN *et al.*, 2005; SEO *et al.*, 2002; SOLORZANO *et al.*, 2005). Virus Pessel/BPPVR/07 adalah virus tanpa delesi pada protein NS1 dan seperti virus Indonesia H5N1 lainnya, tidak mengalami mutasi pada posisi 92. Virus influenza H5N1 yang ditransmisikan pada manusia di Hong Kong tahun 1997 memiliki asam glutamat pada posisi 92 yang merupakan faktor penting dalam virulensi dan resistensi terhadap sitokin pada babi (SEO *et al.*, 2002). Namun, virus H5N1 dengan amino residu ini tidak lagi beredar di alam dan asam glutamat tidak ditemukan pada protein NS1 virus influenza tipe A.

Variasi genetik yang terjadi akibat adanya mutasi pada virus AI subtipe H5N1 asal Indonesia telah dilaporkan oleh DHARMAYANTI (2009). Mutasi ekstensif terjadi terutama pada protein hemagglutinin yang merupakan glikoprotein permukaan dari virus AI. Virus yang mengalami mutasi ekstensif adalah virus yang diisolasi dari peternakan ayam yang melakukan vaksinasi AI (DHARMAYANTI dan DARMINTO, 2009; DHARMAYANTI, 2009). Pada penelitian ini membuktikan bahwa mutasi yang terjadi pada protein M1 dan NS1 dapat diamati pada virus-virus yang diisolasi dari peternakan ayam yang melakukan vaksinasi AI meskipun beberapa virus lainnya juga menunjukkan mutasi yang cukup signifikan. Mutasi yang terjadi pada protein HA sangat signifikan terjadi pada virus yang diisolasi dari peternakan ayam yang melakukan vaksinasi AI dibandingkan dengan virus AI pada umumnya (DHARMAYANTI, 2009). Pada penelitian ini mutasi yang terjadi pada dua protein internal yaitu M1 dan NS1 terjadi tidak spesifik pada virus-virus tertentu namun lebih mempunyai variasi yang cukup luas, meskipun virus yang diisolasi dari peternakan ayam yang melakukan vaksinasi AI tetap memiliki

substitusi asam amino yang khas jika dibandingkan dengan virus lainnya.

KESIMPULAN

Variasi genetik terjadi pada protein internal M1 virus AI subtipe H5N1 asal Indonesia dan kondisi *conserved* seperti motif *putative zinc finger* dan *nuclear localization signal* (NLS) masih tetap dipertahankan. Variasi genetik terjadi pada motif PDZ protein NS1 yaitu dua virus mempunyai motif human origin, yang kemungkinan berhubungan dengan usaha adaptasi virus pada manusia.

DAFTAR PUSTAKA

- ARZT, S., F. BAUDIN, A. BARGE, P. TIMMINS, W.P. BURMEISTER and R.W.H. RUIGROK. 2001. Combined results from solution studies on intact influenza virus M1 protein and from a new crystal form of its N-terminal domain show that M1 is an elongated monomer. *Virology* 279: 439-446.
- BAUDIN, F., I. PETIT, W. WEISSENHORN and R.W.H. RUIGROK. 2001. *In vitro* dissection of the membrane and RNP binding activities of influenza virus M1 protein. *Virology* 281: 102-108.
- BORNHOLDT, Z.A. and B.V. PRASAD. 2006. X-ray structure of influenza virus NS1 effector domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13: 559-560.
- DHARMAYANTI, N.L.P.I. 2009. Perubahan Genom dan Karakter Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 pada Unggas di Indonesia. *Disertasi*. Program Doktor Ilmu Biomedik. Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta.
- DHARMAYANTI, N.L.P.I. and DARMINTO. 2009. Mutasi virus AI di Indonesia: Antigen Drift Protein Hemagglutinin (HA) virus influenza H5N1 tahun 2003-2006. *Media Kedok. Hewan* 25: 1-7.
- DITTMANN, J., D. STERTZ, D. GRIMM, J. STEEL, A. GARCIA-SASTRE, O. HALLER and G. KOCHS. 2008. Influenza A virus strains differ in sensitivity to the antiviral action of Mx-GTPase. *J. Virol.* 82: 3624-3631.
- EGOROV, A., S. BRANDT, S. SEREINIG, J. ROMANOVA, B. FERKO, D. KATINGER, A. GRASSAUER, G. ALEXANDROVA, H. KATINGER and T. MUSTER. 1998. Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells. *J. Virol.* 72: 6437-6441.
- ELSTER, C., K. LARSEN, J. GAGNON, R.W.H. RUIGROK and F. BAUDIN. 1997. Influenza virus M1 protein binds to RNA through its nuclear localization signal. *J. Gen. Virol.* 78: 1589-1596.
- GARCIA-SASTRE, A., A. EGOROV, D. MATASSOV, S. BRANDT, D.E. LEVY, J.E. DURBIN, P. PALESE and T. MUSTER. 1998. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* 252: 324-330.
- GRIMM, D., P. STAEHEL, M. HUFBAUER, I. KOERNER, L. MARTINEZ-SOBRIDO, A. SOLORZANO, A. GARCIA-SASTRE, O. HALLER and G. KOCHS. 2007. Replication fitness determines high virulence of influenza A virus in mice carrying functional Mx1 resistance gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 6806-6811.
- HALE, B.G., W.S. BARCLAY, R.E. RANDALL and R.J. RUSSELL. 2008a. Structure of an avian influenza A virus NS1 protein effector domain. *Virology* 378: 1-5.
- HALE, B.G., R.E. RANDALL, J. ORTIN and D. JACKSON. 2008b. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* 89: 2359-2376.
- HOFFMANN, E., J. STECH, Y. GUAN, R.G. WEBSTER and D.R. PEREZ. 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch. Virol.* 146: 2275-2289.
- INGLIS, S.C., T. BARRETT, C.M. BROWN and J.W. ALMOND. 1979. The smallest genome RNA segment of influenza virus contains two genes that may overlap. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 3790-3794.
- IUCHI, S. 2001. Three classes of C2H2 zinc finger proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 625-635.
- JACKSON, D., M.J. HOSSAIN, D. HICKMAN, D.R. PEREZ and R.A. LAMB. 2008. A new influenza virus virulence determinant: The NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105: 4381-4386.
- KOCHS, G., I. KOERNER., L. THIEL, S. KOTHLOW, B. KASPERS, N. RUGGLI, A. SUMMERFIELD, J. PAVLOVIC, J. STECH and P. STAEHEL. 2007. Properties of H7N7 influenza A virus strain SC35M lacking interferon antagonist NS1 in mice and chickens. *J. Gen. Virol.* 88: 1403-1409.
- KRUG, R.M. and P.R. ETKIND. 1973. Cytoplasmic and nuclear virus-specific proteins in influenza virus-infected MDCK cells. *Virology* 56: 334-338.
- KRUG, R.M., W. YUAN, D.L. NOAH and A.G. LATHAM. 2003. Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein. *Virology* 309: 181-189.
- KUROKAWA, M., A.H. KOYAMA, S. YASUOKA and A. ADACHI. 1999. Influenza virus overcomes apoptosis by rapid multiplication. *Int. J. Mol. Med.* 3: 527-530.
- LAMB, R.A. and R.M. KRUG. 2001. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: *Fields Virology*. KNIPE, D.M. and P.M. HOWLEY (Eds). Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. pp. 725-769.
- LAMB, R.A., C.J. LAI and P.W. CHOPPIN. 1981. Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: Coliner and intereupted mRNA code for overlapping proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 4170-4174.

- LIU, T. and Z. YE. 2002. Restriction of Viral Replication by Mutation of the Influenza Virus Matrix Protein. *J. Virol.* 76: 13055-13061.
- LONG, J.X., D.C. PENG, Y.L. LIU, Y.T. WU and X.F. LIU. 2008. Virulence of H5N1 avian influenza virus enhanced by a 15-nucleotide deletion in the viral nonstructural gene. *Virus Genes.* 36: 471-478.
- MONNE, I., A. FUSARO, M.H. AL-BODOWI, M.M. ISMAIL, O.A. KHAN, G. DAUPHIN, A. TRIPODI, A. SALVIATO, S. MARANGON, I. CAPUA and G. CATTOLI. 2008. Co-circulation of two sub-lineages of HPAI H5N1 virus in the Kingdom of Saudi Arabia with unique molecular signatures suggesting separate introductions into the commercial poultry and falconry sectors. *J. Gen. Virol.* 89: 2691-2697.
- NASSER, E.H., A.K. JUDD, A. SANCHEZ, D. ANASTASIOU and D.J. BUCHER. 1996. Antiviral activity of influenza virus M1 zinc finger peptides. *J. Virol.* 70: 8639-8644.
- NAYAK, D.P. and E.K.W. HUI. 2002. Assembly and morphogenesis of influenza viruses. *Recent Res. Dev. Virol.* 4: 35-54.
- OBENAUER, J.C., J. DENSON, P.K. MEHTA, X. SU, S. MUKATIRA, D.B. FINKELSTEIN, X. XU, J. WANG, J. MA, Y. FAN, K.M. RAKESTRAW, R.G. WEBSTER, E. HOFFMANN, S. KRAUSS, J. ZHENG, Z. ZHANG and C.W. NAEVE. 2006. Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. *Science* 311: 1576-1580.
- PALESE, P. and M.L. SHAW. 2007. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. In: *Fields Virology*, 5th. ed. by. KNIPE D.M and. HOWLEY P.M (Eds.). Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia: pp.1647-1689.
- 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.
- RANDALL, R.E. and S. GOODBOURN. 2008. Interferons and viruses: An interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* 89: 1-47.
- RUIGROK, R.W.H. and F. BAUDIN. 1995. Structure of influenza virus ribonucleoprotein particles. II. Purified RNA-free influenza virus ribonucleoprotein forms structures that are indistinguishable from the intact influenza virus ribonucleoprotein particles. *J. Gen. Virol.* 76: 1009-1014.
- SCHULZE, I.T. 1972. The structure of influenza virus. II. A model based on the morphology and composition of subviral particles. *Virology* 47: 181-196.
- SEO, S.H., E. HOFFMANN and R.G. WEBSTER. 2002. Lethal H5N1 influenza viruses escape hosts anti-viral cytokine responses. *Nat. Med.* 8: 950-954.
- SHA, B. and M. LUO. 1997. Structure of a bifunctional membrane-RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1. *Nat. Struct. Biol.* 4: 239-244.
- SOLORZANO, A., R.J. WEBBY, K.M. LAGER, B.H. JANKE, A. GARCIA-SASTRE and J. RICHT. 2005. Mutations in the NS1 protein of swine influenza virus impair anti-interferon activity and confer attenuation in pigs. *J. Virol.* 79: 7535-7543.
- TAKATSUJI, H. 1998. Zinc finger transcription factors in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* 54: 582-596.
- WAKEFIELD, L. and G.G. BROWNLEE. 1989. RNA-binding properties of influenza A virus matrix protein M1. *Nucleic. Acids Res.* 17: 8569-8580.
- YE, Z., T. LIU, D.P. OFFRINGA, J. MCINNIS and R.A. LEVANDOWSKI. 1999. Association of influenza virus matrix protein with ribonucleoproteins. *J. Virol.* 73: 7467-7473
- YE, Z., R. PAL, J.W. FOX and R.R. WAGNER. 1987. Functional and antigenic domains of the matrix (M1) protein of influenza virus. *J. Virol.* 61: 239-246.
- YE, Z., D. ROBINSON and R.R. WAGNER. 1995. Nucleus-targeting domain of the matrix protein (M1) of influenza virus. *J. Virol.* 69: 1964-1970.