

DETEKSI PENANDA PENINGKATAN VIRULENSI NON STRUKTURAL PROTEIN (NSI) VIRUS AVIAN INFLUENZA H5N1 ASAL INDONESIA

Arief Mulyono✉

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit Salatiga

Email: arief.munich@gmail.com

DETECTION OF MARKERS OF INCREASED VIRULENCE NON STRUCTURAL PROTEIN (NSI) AVIAN INFLUENZA VIRUS H5N1 FROM INDONESIA

Abstrak

Protein NSI adalah protein multifungsi yang memainkan peran kunci dalam patogenesis dan virulensi virus avian influenza H5N1. Substitusi asam amino P42S, D92E, F103I, M106I, dan delesi 5 asam amino di posisi 80 - 84 dilaporkan meningkatkan virulensi virus avian influenza H5N1. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa virus avian influenza di Indonesia mengalami perubahan dinamis. Studi ini akan menganalisis motif asam amino yang menjadi penanda peningkatan virulensi pada sekuen protein NSI virus avian influenza H5N1 asal Indonesia. Data sekuen asam amino protein NSI diperoleh dari database GeneBank dan Gisaid. Analisis data menggunakan Bioedit software. Hasil analisis menunjukkan substitusi asam amino dari prolin ke serin di posisi 42 (P42S) dan delesi 5 asam amino di posisi 80 – 84 telah ditemukan pada virus avian influenza asal Indonesia, akan tetapi tidak ditemukan substitusi asam amino aspartat ke glutamat diposisi no 92 (D92E) dan tidak ada yang mengalami 2 substitusi asam amino sekaligus diposisi 103 dan 106.

Kata kunci: H5N1, NSI, Indonesia

Abstract

NSI protein is a multifunction protein that plays key role of pathogenesis and virulence of avians influenza virus H5N1. The amino acid substitution at the position P42S, D92E, F103I, M106I and 5 amino acid deletion at the position 80 to 84 in NSI protein reported increasing virulence of avians influenza virus H5N1. Several studies showed avians influenza virus H5N1 in Indonesia has dynamic changed. This study aimed to analyze the markers of virulence of NSI protein sequences of all H5N1 virus isolates from Indonesia. The source of NSI protein sequence data gene obtained from GeneBank and Gisaid. Data were analyzed using Bioedit software. The Results showed the isolates from Indonesia had substitutions P42S and 5 amino acids deletions at positions 80-84 resulting in the potential for increased virulence of the virus. However, amino acid substitution at the position D92E, F103L and M106I substitution were not found.

Keywords: H5N1, NSI, Indonesia

Submitted: 14 Februari 2014, Review 1: 7 Maret 2014, Review 2: 6 April 2014, Eligible article: 23 Mei 2014

PENDAHULUAN

Avian influenza adalah suatu penyakit menular yang disebabkan oleh virus influenza tipe A dan ditularkan oleh unggas. Sampai bulan April 2014 di Indonesia tercatat 195 kasus positif terinfeksi virus avian influenza dan 163 orang diantaranya meninggal dunia (WHO, 2014). Hospes alami virus H5N1 adalah unggas, akan

tetapi pada kenyataannya dapat menyerang manusia dan menimbulkan kematian (Kumar *et al.*, 2006). Kombinasi seluruh fragmen gen (*genetic makeup*) virus H5N1 tampaknya secara bersama-sama menentukan apakah suatu galur dapat menginfeksi manusia atau mamalia. Secara umum rentang inang dan patogenesis virus H5N1 bersifat poligenik, yaitu faktor determinan untuk rentang

inang dan patogenesis terdapat pada semua fragmen gen (Wright & Webster, 2001). Gen-gen tersebut antara lain gen hemagglutinin (HA), gen-gen polimerase yaitu polimerase basik-1 (PB1), polimerase basik-2 (PB2) dan polimerase asidik (PA), gen neuraminidase (NA), dan gen non struktural (NS1 dan NS2) (Wright & Webster, 2001).

Protein NS1 adalah protein multifungsi yang memainkan peran kunci dalam patogenesis dan virulensi virus Avian Influenza (Ma *et al.*, 2010). Protein NS1 berfungsi untuk menangkalkan respon antivirus hospes. Protein ini akan berperan terhadap antagonis IFN (interferon) yang poten pada sel epitel melalui *N-terminal double-stranded RNA-binding domain* yang mencegah induksi sintesis IFN-1 (interferon tipe I) selama proses infeksi. Peran NS1 sebagai antagonis interferon dipengaruhi oleh residu asam amino pada posisi 42, 92, 103 dan 106. Substitusi asam amino P42S, D92E, F103L, M106I, dan delesi lima asam amino (5 aa) pada posisi 80-84 merupakan penanda peningkatan virulensi virus (Jiao *et al.*, 2008; Dankar *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010).

Virus H5N1 diperkirakan terus bermutasi dan berpotensi meningkatkan kapasitas untuk melompati rintangan spesies, sehingga dapat menular secara mudah antar manusia (Mahardika *et al.*, 2008). Beberapa penelitian menunjukkan virus H5N1 yang beredar di Indonesia mengalami perubahan genetik yang sangat dinamis. Perubahan genetik virus H5N1 berpotensi memunculkan virus AI baru yang lebih ganas dan akan menimbulkan pandemi. Oleh karena itu, adanya mutasi genetik virus H5N1 perlu diwaspadai dalam rangka menciptakan sistem kewaspadaan dini untuk mengantisipasi terjadinya pandemi sejak dini. Tulisan ini membahas motif asam amino pada protein NS1 yang menjadi penanda peningkatan virulensi virus avian influenza H5N1 asal Indonesia yang telah teregistrasi pada *GeneBank data base* dan *Gisaid*.

BAHAN DAN METODE

Sampel penelitian adalah sekuen gen NS1 virus Avian Influenza H5N1 asal manusia, mamalia dan unggas di Indonesia tahun 2005 - 2014 dari *GeneBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database>, akses tanggal 05 April 2014) dan *Gisaid*. (<http://platform.gisaid.org/epi3/frontend#13feb>, akses tanggal 07 April 2014). Jumlah sekuen yang terkumpul sebanyak 177 yang terdiri dari 38 sekuen mamalia, 89 sekuen manusia, dan 49 sekuen unggas. Analisis hasil dilakukan secara deskriptif. Urutan asam amino gen NS1 H5N1 diposisikan (*aligned*) menggunakan perangkat lunak *BioEdit 5.0.6*.

HASIL

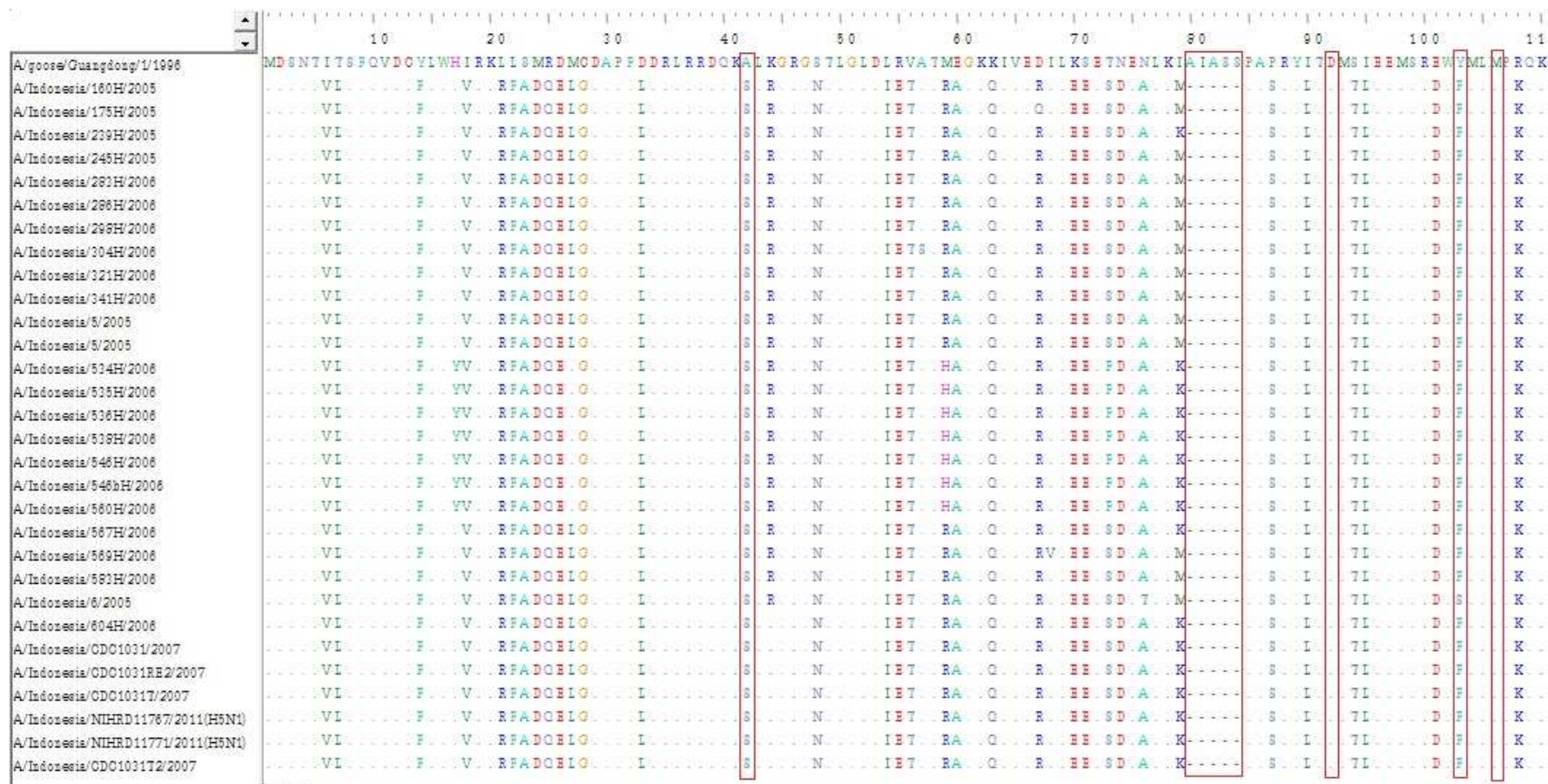
Hasil pensejajaran runutan asam amino isolat virus avian influenza H5N1 asal manusia, unggas, dan mamalia ditampilkan pada gambar 1, 2, dan 3.

PEMBAHASAN

Hasil pensejajaran isolat virus avian influenza H5N1 asal manusia menunjukkan bahwa pada posisi asam amino penting yang berhubungan dengan peningkatan derajat virulensi virus, asam amino pada posisi 42(S), 92(D), dan 106(M) mempunyai motif yang sama. Posisi asam amino 103 semua isolat asal manusia mempunyai residu asam amino F kecuali isolat A/Indonesia/6/2005 yang beresidu S. Semua isolat manusia asal Indonesia juga mengalami delesi pada posisi 80 - 85 (gambar 1). Isolat unggas pada asam amino nomer 42 semuanya beresidu S, posisi 92 semua isolat beresidu D, asam amino 103 sebagian isolat beresidu F dan S. Posisi 106 semua beresidu M kecuali isolat A/chicken/Pessel/BPPVR/2007 yang mempunyai residu (I), semua isolat juga mengalami delesi 5 asam amino pada posisi 80 - 85 kecuali isolat A/chicken/Pessel/BPPVR/2007 beresidu (TMSV) (gambar 2). Hasil sekuensing isolat asal mamalia, pada posisi asam amino penting yang berhubungan dengan peningkatan derajat virulensi virus, semua isolat mempunyai motif asam amino yang sama yaitu, 42(S), 92(D), dan 106(M). Posisi asam amino 103 mayoritas isolat mempunyai residu F dan beberapa beresidu S. Semua isolat asal mamalia mengalami delesi pada posisi 80 - 85 (gambar 3).

Posisi asam amino no 42 semua isolat asal Indonesia mengalami substitusi dari prolin (P) ke serin (S). Substitusi prolin menjadi serin (P42S) menyebabkan peningkatan virulensi virus melalui mekanisme penghambatan respon IFN inang, termasuk jalur NF- κ B dan IRB-3 (Hale, 2008; Jiao *et al.*, 2008). Asam amino serin pada posisi 42 terletak pada RNA binding domain (RBD) (gambar 4). RBD merupakan simetrikal homodimer, setiap monomer terdiri atas 3 α heliks. Asam amino serin pada posisi 42 (S42) terletak pada heliks 2. Heliks 2 berfungsi mengikat dsRNA dengan membentuk *trek* antiparalel dikedua sisi *cleft* (Liu *et al.*, 1997).

Delesi 5 asam amino pada posisi 80 – 84 ditemukan pada hampir semua isolat asal Indonesia kecuali isolat A/chicken/Pessel/BPPVR/2007 yang beresidu (TMSV). Delesi 5 asam amino pada posisi 80 – 84 ini ditemukan pada virus yang diisolasi mulai akhir tahun 2000 sampai sekarang. Fenomena ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Visesakul *et al.*, (2004). Berdasarkan gen NS1 virus avian influenza H5N1 dikelompokkan menjadi 2 yakni kelompok virus



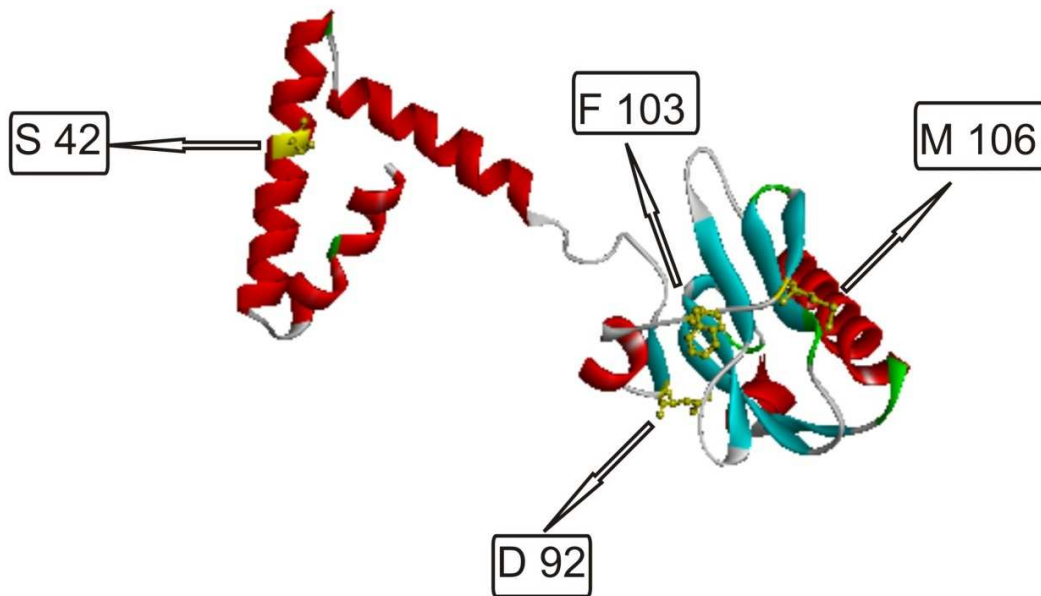
Gambar 1. Hasil *multiple alignment* sekuen asam amino virus avian influenza H5N1 asal manusia dari Indonesia. Posisi asam amino menggunakan penomoran H3.



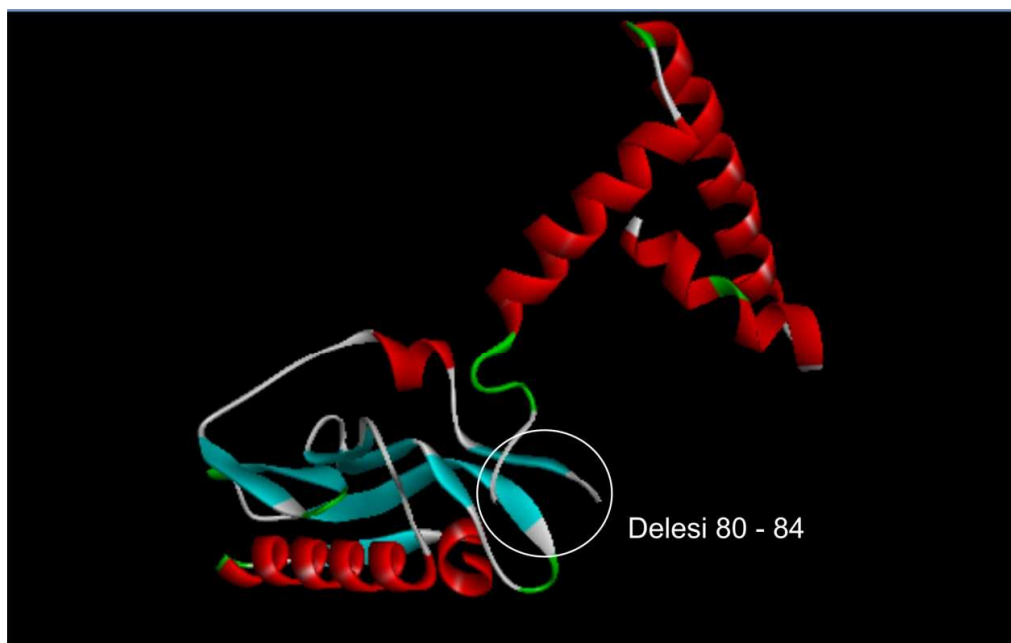
Gambar 2. Hasil *multiple alignment* sekuen asam amino virus avian influenza H5N1 asal unggas dari Indonesia. Posisi asam amino menggunakan penomoran H3.



Gambar 3. Hasil *multiple alignment* sekuen asam amino virus avian influenza H5N1 asal mamalia dari Indonesia. Posisi asam amino menggunakan penomoran H3.



Gambar 4. Gambar diagram skematik monomer NS1. *Struktur scaled ball and stick* menunjukkan posisi asam amino yang menjadi penanda peningkatan virulensi. Ilustrasi dibuat dengan Esyspred3D.



Gambar 5. Gambar diagram skematik monomer NS1. Daerah yang dilingkari menunjukkan delesi 5 asam amino pada posisi 80 – 84. Ilustrasi dibuat dengan Esyspred3D.

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 asam amino pada posisi 80 – 84, sedangkan virus yang diisolasi pada akhir tahun 2000 sampai sekarang menunjukkan adanya delesi pada posisi 80 – 84.

Delesi 5 asam amino pada posisi tersebut berkontribusi pada peningkatan virulensi virus H5N1 (Long *et al.*, 2008). Bila dilihat dari struktur 3 dimensi delesi 5 asam amino pada posisi 80 – 84 menyebabkan penghubung yang menghubungkan RNA *binding domain* dengan *effector domain* menjadi lebih pendek. Pemendekan ini mengubah orientasi dan stabilitas RBD,

dan atau keduanya (gambar 5). Pengubahan orientasi dan stabilitas RBD memberikan kontribusi terhadap peningkatan virulensi virus baik dengan memodulasi peningkatan pengikatan dsRNA oleh RBD maupun interaksi dengan protein inang (Bornholdt & Prasad 2008).

Posisi asam amino 92 semua isolat asal Indonesia masih terbaca aspartat (D) tidak mengalami mutasi menjadi asam glutamat (E). Substitusi aspartate (D) menjadi glutamat (E) menentukan virulensi virus karena dapat memperpanjang siklus hidup virus (Lin, *et al.*, 2007). Asam aspartate pada posisi 92 (Asp92) terletak pada *effector domain*, karena letaknya 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). 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).

Pada posisi 103 dan 106 mayoritas isolat beresidu F beberapa isolat dari unggas dan mamalia beresidu S. Substitusi asam amino fenil alanin (F) menjadi serin (S) pada posisi 103 belum diketahui efeknya terhadap patogenitas maupun replikasi virus. Pada posisi 106 satu isolat dari unggas A/chicken/Pessel/BPPVR/2007 mengalami substitusi asam amino metionin (M) menjadi Isoleusin (I) sedangkan semua isolat Indonesia yang lain masih tetap beresidu (M). Menurut Dankar *et al.*, (2011) mutasi 2 asam amino dari F menjadi L (F103L) dan M menjadi I (M106I) menjadikan virus lebih adaptif dan virulen pada mamalia. Semua isolat virus dari Indonesia tidak ada yang mengalami mutasi di 2 posisi itu sekaligus.

KESIMPULAN

Substitusi asam amino dari prolin ke serin di posisi 42 (P42S) dan delesi 5 asam amino di posisi 80 – 84 telah ditemukan pada virus avian influenza asal Indonesia, akan tetapi tidak ditemukan substitusi asam amino aspartat ke glutamat diposisi no 92 (D92E) dan tidak ada yang mengalami 2 substitusi asam amino sekaligus diposisi 103 dan 106.

SARAN

Surveilans molekuler terhadap penanda peningkatan virulensi virus avian influenza H5N1 di Indonesia harus selalu dilakukan untuk meningkatkan sistem peringatan dini terjadinya pandemi.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kami ucapkan kepada *GeneBank* dan *Gisaid* atas materi sekuen protein NS1 virus avian influenza H5N1 asal Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Bornholdt, Z.A. & Prasad, B.V., 2008. X-ray Structure of NS1 From a Highly Pathogenic H5N1 Influenza. *Nature* 456(7224): 985–988.
- Dankar, S.K., Shuai, W., Jihui, P., Nicole, E.F., Liya, K., Yishan, L., and Earl, G.B., Influenza A virus NS1 gene mutations F103L and M106I Increase Replication and Virulence. 2011. *Virology Journal* 8:13.
- Hale, B.G., Randall, R.E., Ortis, J., and Jackson, D., 2008. The Multifunctional NS1 Protein of Influenza A Viruses. *J Gen Virol* 89, 2359-2376.
- Jiao, P., Tian, G., Li, Y., Deng, G., Jiang, Y., 2008. A Single-Amino-Acid Substitution In The NS1 Protein Changes The Pathogenicity of H5N1 Avian Influenza Viruses In Mice. *J Virol* 82: 1146–1154.
- 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, W., Wang, G., Zhang, H., Xin, G., Zhang, D., Zeng, J., Chen, X., Xu, Y., Cui, Y. and Li, K., 2010. Effects of NS1 Variants of H5N1 Influenza Virus on Interferon Induction, TNF α Response And P53 Activity. *Cellular & Molecular Immunology* 7, 235-242
- Lin, D., Lan, J., Zhang, Z., 2007. Structure and Function of The NS1 Protein of Influenza A Virus. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*; 39: 155-62.
- Liu, J., Lynch, P. A., Chien, C. Y., Montelione, G. T., Krug, R. M. & Berman, H. M., 1997. Crystal Structure of The Unique RNA-Binding Domain of The Influenza Virus NS1 Protein. *Nat Struct Biol* 4, 896–899.
- Long, J. X., Peng, D. X., Liu, Y. L., Wu, Y. T., Liu, X. F., 2008. Virulence of H5N1 Avian Influenza Virus Enhanced By A 15-Nucleotide Deletion In The Viral Nonstructural Gene. *Virus Genes* 36: 471–478.

- Ma, W., Brenner, D., Wang, Z., Dauber, B., Ehrhardt, C., Hogner, K., Herold, S., Ludwig, S., Wolff, T., Yu, K., Richt, J.A., Planz, O., Pleschka, S., 2010. The NS Segment of an H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (HPAIV) Is Sufficient To Alter Replication Efficiency, Cell Tropism, and Host Range of an H7N1 HPAIV. *J Virol* 84(4): 2122–2133.
- Mahardika, I.G.N., Suartha, I.N., Suartini, I.G.A.A., Antara, I.M.S., Sukada, I.M., 2008. Model Penanggulangan Flu Burung Berbasis Hasil Penelitian Yang Berkelanjutan. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Denpasar
- 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.
- Viseshakul, N., Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Suradhat, S., Payungporn, S., Keawchareon, J., Oraveerakul, K., Wongyanin, P., Plitkul, S., 2004. The Genome Sequence Analysis of H5N1 Avian Influenza A Virus Isolated From The Outbreak Among Poultry Populations In Thailand. *Virology* 328, 169–176.
- WHO, 2014. A Summary of Human H5N1 Cases in 2014. Available from: URL <http://www.flutrackers.com/forum/showthread.php>. (Download 25 April 2014)
- Wright, P.F. & Webster, R.G. 2001. Orthomyxoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*, 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 1533-79.