

Analisis Struktur Protein Selubung Virus Dengue Serotipe 3 Pada Genotipe Yang Sama Dengan *Clade* Berbeda

Reni Herman^{1*}, Dwi Hilda Putri²

Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Penelitian dan Pengembangan kesehatan,
Kementerian Kesehatan, Indonesia
FMIPA Universitas Negeri Padang, Sumatera Barat, Indonesia
Email : *reni_herman@litbang.depkes.go.id

Abstract

Dengue viruses (DENV) consist of 4 serotypes and each of serotype is divided in several genotypes based on the envelope gene. To find the different in protein structure of DENV-3 circulated in Surabaya, we conduct analysis of two sequences of DENV-3 genotype 1 in different clade. Information of nucleotide and amino acid were searched from the GeneBank, homology were analysed using BLAST in NCBI. The different of amino acid of 2 sequences and protein structure were analysed using software Bioedit vs 7.2.5 and PyMol respectively. We found six amino acid residu that are different in these sequences. Three of amino acids of the different sequences have significant different similarities. These amino acid residu are 140, 340 and 362. Based on physic-chemistry properties, these amino acids are more hydrophobic in sequence of clade 2. 3D prediction of protein structure show that residu 140, 340, 362 and 386 have different surface protein. Physic-chemistry properties and charge of amino acid causing different 3D structure of DENV-3 envelope protein.

Key words: *Dengue virus, Envelope Gene, Protein Structure*

Abstrak

Virus dengue (DENV) terdiri dari 4 serotipe. Masing-masing serotipe masih dibagi lagi menjadi beberapa genotipe berdasarkan gen selubung virus, karena variasi genetik terbanyak ada pada gen ini. Analisis ini membandingkan dua runutan nukleotida dan asam amino DENV-3 dengan genotipe sama namun pada *clade* yang berbeda, yang bersirkulasi di Surabaya. Informasi sekuen gen maupun protein diperoleh melalui situs GenBank (NCBI), analisis homologi menggunakan situs yang sama. Perbedaan residu asam amino diidentifikasi menggunakan *software* Bioedit vs 7.2.5, sifat variasi asam amino diprediksi menggunakan program pada situs ExPASy. Kemiripan asam amino dinilai dengan menggunakan *scoring* Blossum dan prediksi struktur permukaan protein selubung ditentukan menggunakan perangkat lunak PyMOL. Perbedaan susunan asam amino kedua sekuen yang dianalisis terdapat pada 6 residu dengan posisi sekuen pada *clade* 1 dan 2 berturut-turut sebagai berikut, S140I, V141I, E340G, P362L, K386R, dan I412L. Tiga dari residu ini memiliki perbedaan yang cukup bermakna, yaitu pada 140, 340 dan 362. Sekuen pada *clade* 2 ketiga residu ini lebih bersifat non polar dan hidrofobik dibandingkan pada sekuen *clade* 1. Sementara prediksi 3D memperlihatkan adanya perbedaan struktur permukaan pada residu 140, 340, 362 dan 386. Perbedaan sifat maupun muatan asam amino memberikan perbedaan struktur 3D protein selubung DENV-3.

Kata sandi: DENV-3, Protein Selubung, Struktur Protein

Pendahuluan

Virus dengue (DENV) termasuk dalam genus *flavivirus*, family *flaviviridae*. Berdasarkan sifat antigen dan sekuen genetik terdapat 4 variasi serotipe virus dengue yaitu DENV-1 hingga DENV-4. Kekebalan spesifik terhadap 1 serotipe tidak dapat menghambat infeksi terhadap serotipe yang lain. Masing-masing serotipe dibagi lagi menjadi beberapa genotipe berdasarkan sekuen gen *envelope* (selubung) virus dan variasi paling banyak pada gen ini.¹

Berdasarkan struktur kristal, protein selubung DENV terdiri atas 3 domain, yaitu domain I (DI) berperan pada perubahan konformasi pada proses endositosis, domain II (DII) berperan pada proses fusi dengan membran sel dan domain III (DIII) berperan pada proses penempelan pada membran sel.² Pada semua serotipe DENV, sekitar 123 residu asam amino bersifat lestari, dua per tiga dari residu ini terdapat pada protein selubung DENV. Diperkirakan residu ini menentukan spesifisitas reseptor, preferensi vektor, sebaran pejamu maupun tropisme DENV.³ Sementara itu, 56 residu bersifat tidak lestari, terutama pada DIII. Perubahan genetik pada DIII tentunya akan menimbulkan perbedaan susunan residu dari masing-masing genotipe virus.^{2,4}

Genotipe DENV yang beredar di Indonesia sudah banyak dilaporkan. Suatu studi melaporkan DENV-3 genotipe I yang beredar di Surabaya berada pada dua *clade*. *Strain* dari kedua *clade* ini diduga telah bersirkulasi secara terus menerus dan berpotensi menimbulkan ledakan kasus infeksi dengue⁵ karena dengan variasi intragenetik dapat menyebabkan antibodi tidak dapat menetralkan secara efisien.⁶ Analisis bioinformatik ini bertujuan untuk menganalisis perbedaan struktur protein selubung dari 2 sekuen genetik *strain* DENV-3 tersebut.

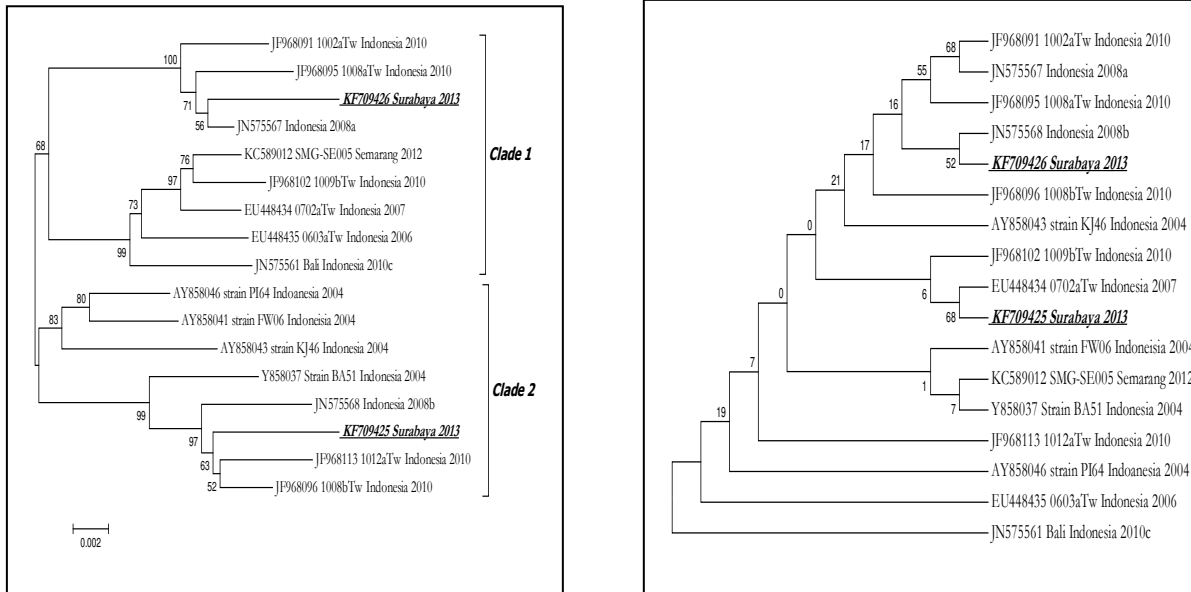
Metode

Informasi sekuen gen diperoleh melalui situs GeneBank (NCBI) dengan *accession no* KF709425 dan KF709426, maupun sekuen DENV-3 lain dari Indonesia. Melalui situs yang sama diperoleh informasi sekuen protein kedua *strain*, berturut-turut *accession no* AIE42670 dan AIE42671. Kedua *strain* tersebut juga dibandingkan dengan sekuen gen dan protein lain di GeneBank yang berasal dari Indonesia.

Pohon filogenetik dibuat menggunakan perangkat lunak MEGA 6 untuk menentukan posisi kedua sekuen terhadap sekuen DENV-3 Indonesia yang lain.⁷ Homologi sekuen ditentukan melalui situs NCBI, perbedaan residu asam amino ditentukan dengan menggunakan *software* Bioedit vs 7.2.5. Sifat variasi asam amino diprediksi dengan menggunakan program pada situs ExPASy, kemiripan asam amino dinilai dengan menggunakan *scoring* Blossum. Berikutnya prediksi struktur permukaan protein selubung ditentukan dengan menggunakan perangkat lunak PyMOL.

Hasil

Analisis filogenetik menggunakan sekuen nukleotida gen selubung DENV-3 genotipe 1 yang diisolasi di Indonesia mengelompok pada dua *clade* yang berbeda, masing-masing pada *clade* 1 dan 2. Studi homologi menggunakan analisis BLAST nukleotida untuk 2 sekuen KF709425 dan KF709426 memperlihatkan bahwa nilai identifikasi (*query coverage*) 100%, nilai E 0.0, dan kemiripan 97% dengan 49 nukleotida yang berbeda. Namun perbedaan tersebut tidak terlihat pada analisis filogenetik menggunakan sekuen asam amino. (Gambar 1).



Gambar 1. A. Pohonfilogenetik DENV-3 genotipe 1 berdasarkan nukleotida yang menggambarkan posisi 2 sekuen yang dianalisis. Kedua sekuen ditandai dengan huruf cetak miring dangaris bawah. B. Pohon filo genetik dari strain yang sama berdasarkan urutan asam amino.

Analisis lebih lanjut dilakukan terhadap 2 sekuen asam amino DENV-3 Indonesia yang diisolasi di Surabaya. Homologi asam amino dari kedua sekuen ini memiliki kemiripan sebesar 99%, terdapat perbedaan pada 6 residu asam amino. Hasil pensejajaran sekuen protein AIE45870 dan AIE45871 memperlihatkan perbedaan asam amino terdapat pada residu I140S, I141V, E340G, P362L, K386R dan I412L. (Tabel 1).

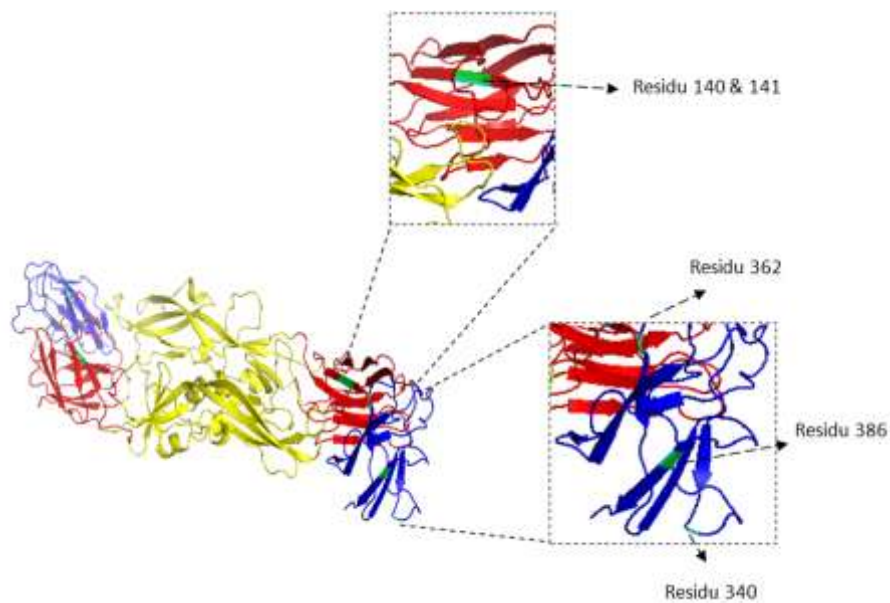
Berdasarkan penilaian sifat fisiko kimia, asam amino pada 3 residu memiliki sifat yang berbeda, yaitu residu 140, 340 dan 362. Ketiga residu tersebut bersifat hidrofobik pada sekuen AIE45870 dan lebih hidrofilik pada sekuen AIE45871. Hal ini didukung dengan sifat polaritas ketiga residu yang diidentifikasi menggunakan skala Grantham, dan AIE45870 lebih bersifat non polar (data tidak diperlihatkan).

Penilaian kemiripan asam amino dengan menggunakan *scoring blosum* menunjukkan terdapat 3 residu yaitu 141, 340 dan 362 yang memiliki perbedaan yang cukup bermakna. Posisi residu pada protein selubung DENV-3 yang dilaporkan oleh Modis Y dan kawan-kawan² terlihat bahwa perbedaan asam amino lebih banyak terdapat pada DIII. (Tabel 1).

Hasil prediksi struktur sekunder menunjukkan perbedaan struktur pada residu P362L. Residu P berbentuk *loop*, sementara residu L berbentuk β *sheet*. Residu 140, 340, 386 dan 412 yang berbeda pada kedua sekuen tidak tampak perbedaan struktur sekunder (data tidak diperlihatkan).

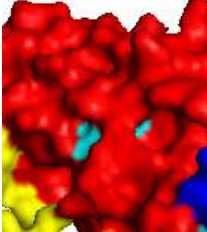
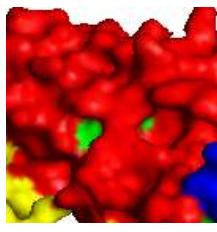
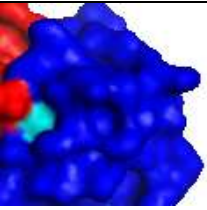
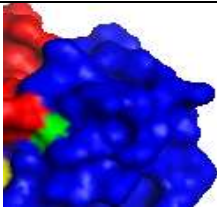
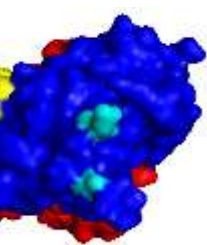
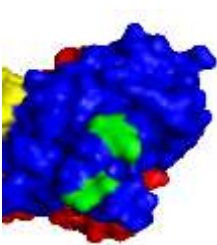
Tabel 1. Variasi Asam Amino berdasarkan sifat fisiko kimia, *scoring Blosum* dan domain protein selubung DENV

Posisi Asam Amino	AIE45870 (KF709425)		AIE45871 (KF709426)		Skor Blosum	Domain
	Asam amino	Sifat Fisiko kimia	Asam amino	Sifat Fisiko kimia		
40	I	Hidrofobik	S	Hidrofilik	-2	I
41	I	Hidrofobik	V	Hidrofobik	3	I
40	G	Hidrofobik	E	Hidrofilik	-2	III
62	L	Hidrofobik	P	Hidrofilik	-3	III
86	R	Hidrofilik	K	Hidrofilik	2	III
12	L	Hidrofobik	I	Hidrofobik	2	<i>Stem Anchor</i>



Gambar 2. Lokasi perbedaan asam amino pada protein selubung DENV-3. Domain I (DI) ditandai dengan warna merah, domain II (DII) kuning dan domain III (DIII) biru. Residu 140 dan 141 terdapat pada DI, residu 340, 362 dan 386 pada DIII. Residu dari sekuen AIE45870 ditandai dengan warna *cyan* dan AIE45871 berwarna hijau

Tabel 2. Perbedaan struktur protein permukaan DENV-3 pada AIE45870 dan AIE45871

Posisi asam amino	AIE45870 (<i>clade 1</i>)	AIE45871 (<i>clade 2</i>)
Residu 140, 141		
Residu 362		
Pada residu 340 dan 386		

Lokasi perbedaan asam amino diperlihatkan pada Gambar 2. Residu asam amino yang berbeda berada pada posisi yang sama dan tidak mengubah struktur sekunder maupun domain protein. Perbedaan struktur permukaan protein selubung DENV-3 seperti terlihat pada tabel 2. Residu 140 dan 141 pada DI tidak tampak perbedaan bermakna. Namun pada residu 340 dan 386 tampak ada perbedaan yang nyata pada struktur permukaan protein.

Pembahasan

Kotaki dan kawan-kawan⁵ melaporkan studi analisis genetik DENV-3 yang bersirkulasi di Surabaya. Dua dari 3

sampel diisolasi dari penderita dengan kondisi klinis yang berat, sementara satu sampel yang diisolasi dari penderita dengan kondisi klinis ringan, namun memiliki urutan genetik yang mirip dengan salah satu genetik dari sampel dengan klinis berat. Hal ini mengindikasikan bahwa perbedaan genetik tidak berpengaruh terhadap manifestasi klinis. Selain itu diindikasikan bahwa DENV-3 yang bersirkulasi di Surabaya ini sudah bersirkulasi di Indonesia secara terus menerus, dan memiliki potensi untuk menimbulkan peningkatan jumlah kasus.⁵ Untuk melihat gambaran filogenetik DENV-3 yang bersirkulasi di Indonesia penulis mengunduh beberapa sekuen DENV-3 Indonesia dari GeneBank dan

membuat pohon filogenetik untuk menentukan posisi sekuen gen DENV-3 dari Surabaya (Gambar 1). Hasilnya sama dengan laporan Kotaki dan kawan-kawan, bahwa dua isolat DENV-3 yang bersirkulasi di Surabaya berada pada dua *clade* yang berbeda, demikian juga dengan sampel lain dari Indonesia. Untuk melihat pengaruh perbedaan nukleotida dengan urutan asam amino dari kedua sampel terhadap struktur permukaan protein, maka dikaji perbedaan struktur protein selubung dari 2 *strain* DENV-3 tersebut.

Pohon filogenetik nukleotida dan asam amino (Gambar 1) yang berbeda pada analisis ini mengindikasikan bahwa perbedaan urutan nukleotida tidak memberikan dampak pada urutan asam amino. Perbedaan ini diduga akibat evolusi pada nukleotida yang belum berpengaruh terhadap fenotipe virus. Hasil analisis homologi memperlihatkan bahwa walaupun kedua sekuen berada pada genotipe yang sama, namun masih terdapat perbedaan susunan asam amino sebesar 1%. Sifat hidrofobik dan hidrofilik asam amino dapat digunakan untuk memprediksi struktur protein yang akan menentukan fungsi protein.⁸

Pada kedua sampel ini, 3 residu memiliki perbedaan sifat fisika kimia protein, yaitu hidrofobik pada AIE45870 (*clade* 2) namun hidrofilik pada AIE45871 (*clade* 1). Nilai kemiripan asam amino pada 3 residu dari kedua sekuen memperlihatkan bahwa pasangan asam amino dari kedua sekuen memiliki perbedaan yang cukup bermakna. Berdasarkan domain protein yang dianalisis, perbedaan sekuen terdapat pada domain I dan domain III. Hal ini sejalan dengan laporan sebelumnya, bahwa DIII terutama pada 56 residu merupakan domain yang banyak variasinya.²⁻⁴ Perbedaan ini akan memberikan konsekuensi pada antibodi netralisasi terhadap DIII,^{3,9} dan hanya antibodi spesifik yang dapat menetralsasi.²

Perubahan struktur permukaan protein selubung DENV-3 seperti terlihat pada tabel 2. Residu 140 dan 141 pada DI maupun 362 pada DIII tampak sedikit perbedaan. Dan pada residu 340 dan 386 tampak ada perbedaan struktur yang nyata permukaan protein. Perbedaan struktur protein ini diduga dapat memberikan implikasi terhadap proses infeksi.

Lokasi perbedaan residu asam amino pada protein DENV menjadi begitu penting, karena terkait dengan peran protein tersebut. Antibodi terhadap DI tidak memiliki efek netralisasi, sementara antibodi spesifik untuk serotipe pada DII dapat memberikan efek netralisasi dengan menghambat proses fusi pada membran sel,^{3,10,11} dan hanya antibodi monoklonal tertentu yang dapat menetralsasi virus.¹² Pada DIII antibodi mengenal epitop *lateral-ridge* pada serotipe tersebut. Antibodi yang tidak spesifik akan berikatan dengan afinitas yang rendah sehingga tidak mampu untuk menetralsasi, namun dapat menginfeksi sel melalui interaksi Ig G- Fc *receptor*.^{2,13}

Perbedaan sekuen DENV-3 yang dianalisis ternyata tidak memperlihatkan perbedaan manifestasi klinis. Namun tetap harus diperhatikan bahwa perubahan dapat terjadi sewaktu-waktu, dan telah banyak dilaporkan bahwa perubahan *clade*, serotipe dan genotipe berpengaruh terhadap klinis maupun lonjakan jumlah kasus.¹⁴⁻¹⁶ Sehingga perlu pemantauan untuk mengikuti kemungkinan terjadinya pengelompokan *strain* tertentu menjadi lebih virulen.

Kesimpulan

Terdapat perbedaan asam amino yang mempengaruhi struktur permukaan protein selubung virus dengue serotipe 3 pada dua *strain* yang beredar di Surabaya.

Saran

Perlu dilakukan surveilans epidemiologi secara berkesinambungan untuk memantau maupun mengevaluasi kemungkinan pergeseran *straint* atau pun terbentuknya suatu kelompok virus yang virulen di masa mendatang.

Ucapan Terima kasih

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kemenkes serta Dekan FMIPA Universitas Negeri Padang yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian ini.

Daftar Rujukan

1. Lanciotti RS, Lewis JG, Gubler DJ, Trent DW. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Viro*;1994; **75** (Pt 1): 65-75.
2. Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC.2005; Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. *J Virol* ; **79**(2): 1223-31.
3. Degreve L, Fuzo CA, Caliri A, 2012; Extensive structural change of the envelope protein of dengue virus induced by a tuned ionic strength: conformational and energetic analyses. *Journal of computer-aided molecular design* ; **26**(12): 1311-25.
4. Nayak V, Dessau M, Kucera K, Anthony K, Ledizet M, Modis Y. 2009; Crystal structure of dengue virus type 1 envelope protein in the postfusion conformation and its implications for membrane fusion. *J Virol*; **83**(9): 4338-44.
5. Kotaki T, Yamanaka A, Mulyatno KC, et al.2014; Phylogenetic Analysis of Dengue Virus Type 3 Strains Primarily Isolated in 2013 from Surabaya, Indonesia. *Japanese Journal of Infectious Diseases*; **67**(3): 227-9.
6. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S.2013; MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* ; **30**(12): 2725-9.
7. Duangchanda S, Tanaka M, Morita K, Rojanasuphot S, Igarashi A.1994; Comparative nucleotide and deduced amino acid sequence of the envelope glycoprotein gene among three dengue virus type 2 strains isolated from patients with different disease severities in Maha Sarakham, northeast Thailand. *Southeast*

8. Kyte J, Doolittle RF.1982; A simple method for displaying the hydrophatic character of a protein. *J Mol Biol* ; **157**(1): 105-32.
9. Wahala WM, Donaldson EF, de Alwis R, Accavitti-Loper MA,2010; Baric RS, de Silva AM. Natural strain variation and antibody neutralization of dengue serotype 3 viruses. *PLoS Pathog* ; **6**(3): e1000821.
10. Christian EA, Kahle KM, Mattia K, et al. 2013; Atomi-level functional model of dengue virus Envelope protein infectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* ; **110**(46): 18662-7.
11. Brien JD, Austin SK, Sukupolvi-Petty S, et al 2010;. Genotype-specific neutralization and protection by antibodies against dengue virus type 3. *J Virol* ; **84**(20): 10630-43.
12. Crill WD, Roehrig JT.2001 Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *J Virol* ; **75**(16): 7769-73.
13. Hung J-J, Hsieh M-T, Young M-J, Kao C-L, King C-C, Chang W. 2004 An External Loop Region of Domain III of Dengue Virus Type 2 Envelope Protein Is Involved in Serotype-Specific Binding to Mosquito but Not Mammalian Cells. *Journal of Virology* ; **78**(1): 378-88.
14. Yamanaka A, Mulyatno KC, Susilowati H, et al.2011 Displacement of the predominant dengue virus from type 2 to type 1 with a subsequent genotype shift from IV to I in Surabaya, Indonesia 2008-2010. *PLoS One*; **6**(11): e27322.
15. Lee K-S, Lai Y-L, Lo S, et al. 2010; Dengue Virus Surveillance for Early Warning, Singapore. *Emerging Infectious Diseases*; 2010;**16**(5): 847-9.
16. Williams M, Mayer SV, Johnson WL, et al. 2014; Lineage II of Southeast Asian/American DENV-2 is associated with a severe dengue outbreak in the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 2014; **91**(3): 611-20.

