

ANALISIS REGION TRANSMEMBRAN PROTEIN L1 HPV TIPE 52 ISOLAT INDONESIA SECARA IN-SILICO

¹Henik Anjayati

¹Institut Teknologi Bandung

¹Institut Teknologi Bisnis dan Kesehatan Muhammadiyah Tulungagung

¹Madrasah Tsanawiyah Yusuf Annur

Info Article

Submitted :

24 November 2023

Revised :

10 Desember 2023

Accepted :

1 Februari 2024

Corresponding Author :

Henik Anjayati

Email :

henik.anjayati.biotech@gmail.com

ABSTRAK

Region transmembran merupakan bagian protein yang terletak pada keseluruhan membran sel. Region transmembran ini dapat ditemukan pada protein L1, yang merupakan protein penyusun kapsid ikosahedral *Human Papillomavirus* (HPV). HPV merupakan virus yang menyebabkan banyaknya kasus kanker serviks baik di Indonesia maupun di dunia. Kanker serviks menempati urutan ketiga sebagai penyebab utama kanker wanita di dunia dan menempati urutan pertama di Indonesia. Salah satu tipe HPV yang paling banyak menyebabkan kanker serviks di Indonesia adalah HPV tipe 52, dengan prevalensi tertinggi sekitar 23.2%. Oleh karena itu, dalam penelitian ini perlu dilakukan pengembangan vaksin berbasis VLP dengan menggunakan template HPV 52 isolat Indonesia. VLP diperoleh dari hasil perakitan protein kapsid L1 yang kemungkinan besar akan menyebabkan terjadinya agregat jika masih memiliki region transmembran. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan analisis region transmembran pada protein L1 HPV tipe 52 yang sudah mengalami pemotongan beberapa basa pada bagian N-terminal dan C-terminal. Protein L1 HPV 52 yang sudah disimulasi-lligasikan pada pET32b(+), dianalisis termasuk protein fusi atau tidak. Setelah itu, dilakukan analisis region transmembrane yang dibandingkan dengan *full length* L1 HPV 52. Software yang digunakan adalah tmdas.bioinfo.se/DAS dan dikonfirmasi dengan wlab.ethz.ch/protter/#. Hasil menunjukkan bahwa protein rekombinan L1 HPV 52 yang merupakan *truncated segment* tidak memiliki region transmembran jika dibandingkan dengan protein L1 HPV 52 native.

Kata Kunci: Hidrofobik, L1 HPV 52, dan Region transmembran

Access this article



ABSTRACT

The transmembrane region is the region of a protein that is inserted into the cell and has a hydrophobic tendency. One of these regions can be found in the L1 protein, which is a protein that makes up the human papillomavirus (HPV) icosahedral capsid. HPV is a virus causing cervical cancer both nationally and globally. Cervical cancer is the third main cause of cancer in women globally and the first main cause in Indonesia. One of the most common types of HPV

causing cervical cancer in Indonesia is HPV type 52, with the highest prevalence of around 23.2%. Development of a VLP-based vaccine using L1 HPV type 52 isolated from Indonesia is needed. VLP was the result of L1 protein assembly. However, L1 protein has a transmembrane region that is mostly hydrophobic and will usually form an aggregate. It will cause the targeted protein to settle in the water. Therefore, in this study, an analysis of the transmembrane region of the L1 HPV type 52 protein was carried out which had undergone cleavage of several bases at the N-terminal and C-terminal. The simulated-ligated HPV 52 L1 protein on pET32b(+) was analyzed whether it included fusion protein or not. After that, transmembrane region analysis was performed compared to full length L1 HPV 52. The software used was tmdas.bioinfo.se/DAS and confirmed with wlab.ethz.ch/protter/#. The results showed that the recombinant L1 HPV type 52 protein, which is a truncated segment, did not have a transmembrane region when compared to the native L1 HPV type 52 protein.

Keywords: *Hydrophobic, L1 HPV 52, and Transmembrane region*

1. PENDAHULUAN

Region transmembran merupakan bagian protein yang terletak pada keseluruhan membran sel (Manor *et al.*, 2012). Region transmembran salah satunya dapat ditemukan pada protein L1. Protein L1 merupakan salah satu protein yang menyusun HPV (*Human Papillomavirus*). Protein ini dapat merakit dengan sendirinya untuk membentuk kapsid icosahedral (Zhang *et al.*, 2017). Kapsid tersebut akan mengarahkan endositosis pada virus dan menyebabkan HPV keluar dari sel yang terinfeksi dan akan menginfeksi sel yang lainnya. HPV (*Human Papillomavirus*) merupakan virus yang menyebabkan banyaknya kasus kanker serviks baik di Indonesia maupun di dunia (Hansen, 2002; Evriarti dan Yasmon, 2019).

Kanker serviks menempati urutan ketiga sebagai penyebab utama kanker wanita di dunia dan menempati urutan pertama di Indonesia. Berdasarkan estimasi tahun 2018, terdapat sekitar

569.847 kasus kanker serviks yang terdiagnosis setiap tahunnya di dunia (ICO/IARC (*HPV information center*), 2019). Sedangkan di Indonesia, kanker serviks memiliki prevalensi tertinggi yaitu 0,8‰ (sekitar 98.692 jiwa penduduk Indonesia) (Pusat Data dan Informasi Kemenkes RI, 2015).

Salah satu tipe HPV yang paling banyak menyebabkan kanker serviks di Indonesia adalah HPV tipe 52 (Vet dkk., 2008). Vet dkk. (2008) mengumpulkan spesimen tumor sebanyak 2686 sampel dari wanita Indonesia usia 15-70 tahun. Sampel tersebut diambil dari tiga wilayah di Indonesia yaitu Jakarta, Tasikmalaya, dan Bali. Hasil penelitian tersebut ditemukan bahwa DNA HPV tipe 52 memiliki prevalensi tertinggi yaitu 23.2%, dan baru diikuti oleh tipe 16 sebanyak 18%, tipe 18 sebanyak 16.1%, dan tipe 39 sebanyak 11.8%. Oleh karena itu perlu dikembangkan vaksin, salah satunya adalah vaksin berbasis VLP dengan menggunakan template HPV 52 isolat Indonesia. VLP diperoleh dari hasil

perakitan protein kapsid L1 dan hasil perakitannya memiliki struktur morfologis mirip dengan kapsid virus namun tidak memiliki materi genetik sehingga bersifat non-infeksius (Kirnbauer et al., 1992).

Namun, protein L1 ini memiliki region transmembran. Region transmembran sebagian besar memiliki sifat hidrofobik dan biasanya akan membentuk suatu agregat jika dilakukan tahap purifikasi protein. Agregat tersebut akan menyebabkan protein target mengendap dalam air (Manor et al., 2012). Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan analisis region transmembran pada protein L1 HPV tipe 52 yang sudah mengalami pemotongan beberapa basa pada bagian N-terminal dan C-terminal. Hal ini bertujuan untuk mengetahui apakah protein tersebut masih memiliki region transmembran atau tidak, yang nantinya akan memberikan dampak pada penelitian tahap selanjutnya.

2. METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan adalah gen L1 HPV 52 isolat Indonesia yang awalnya telah diinsersikan pada plasmid pPICZA oleh Hanifa (2018). Selain itu juga dibutuhkan enzim restriksi dan ligase yang sesuai, dan kit purifikasi. Gen L1 HPV 52 tersebut diperoleh dari hasil isolasi pasien penderita kanker serviks di Rumah Sakit Hasan Sadikin (RSHS) pada tahun 2011. Gen L1 tersebut direstriksi dan diligasikan pada plasmid pET3b(+) (Invitrogen) yang diperoleh dari Laboratorium GBM (Genetika dan Bioteknologi Molekuler) SITH ITB.

Gen tersebut merupakan *truncated fragment*. Oleh karena itu, sebelum dilakukan tahapan lebih lanjut, dilakukan

konversi gen L1 HPV 52 (*truncated fragment*) menjadi protein L1 HPV 52 yang kemudian disejajarkan dengan protein L1 yang masih memiliki region transmembran dan protein L1 yang sudah tidak memiliki region transmembran namun sekuens asam amino lengkap dimulai dari metionin hingga stop kodon. Pensejajaran dilakukan menggunakan EMBOSS Needle. Tahap ini digunakan untuk mengetahui apakah asam amino region transmembran merupakan bagian dari protein L1 HPV 52 dan untuk mengetahui apakah berada sebelum atau sesudah metionin protein L1 HPV 52. Selain itu, juga untuk mengetahui bahwa protein L1 HPV 52 yang digunakan dalam penelitian dimulai dan diakhiri pada asam amino keberapa.

Selain itu, protein L1 HPV 52 yang sudah disimulasi-lligasikan pada pET32b(+), akan dianalisis termasuk protein fusi atau tidak. Setelah itu, dilakukan analisis region transmembran yang dibandingkan dengan *full length* L1 HPV 52. Software yang digunakan adalah tmdas.bioinfo.se/DAS (Cserzo et al., 1997), dan dikonfirmasi dengan menggunakan wlab.ethz.ch/protter/# (Wollscheid et al., 2019).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Gen yang digunakan dalam penelitian ini bukan merupakan *full length gene* namun telah dihilangkan beberapa basa baik pada ujung N maupun ujung C, sehingga memiliki panjang sekitar 1446bp. Pada penelitian ini dilakukan analisis panjang asam amino protein L1 HPV 52 yang digunakan dalam penelitian ini dibandingkan dengan L1 HPV 52 dari NCBI dengan *accession number* JN874433.1

yang mewakili L1 HPV 52 yang masih memiliki region transmembrane dan L1 HPV 52 yang sudah dihilangkan region transmembrannya dengan *accession number* DJ438947.1. Protein L1 HPV 52 dengan *accession number* JN874433.1 memiliki panjang 529aa dan protein L1 HPV 52 dengan *accession number* DJ438947.1 memiliki panjang 503aa. Protein tersebut dilakukan analisis letak dari region transmembran menggunakan smart.embl-heidelberg.de dengan acuan PDB. Berdasarkan hasil analisis, protein L1 HPV 52 dengan *accession number* JN874433.1 terletak pada asam amino ke-26 (metionin) hingga asam amino ke-529 sedangkan region transmembran terletak pada asam amino ke-5 hingga ke-24. Dengan demikian, dapat diketahui bahwa region transmembrane berada sebelum protein L1 HPV 52 dan masih berjarak 2aa sebelum metionin L1 HPV 52. Sedangkan hasil analisis protein dengan *accession number* DJ438947.1 dinyatakan bahwa protein kapsid L1 HPV 52 terletak pada asam amino ke-1 (metionin) hingga asam amino ke-503. Pada hasil ini dapat diketahui bahwa region transmembrane yang dihilangkan tidak mengganggu urutan asam amino penyusun protein L1 HPV 52. Protein L1 HPV 52 yang digunakan dalam penelitian ini (*truncated fragment*) dimulai dari asam amino ke-8 hingga asam amino ke-488.

Salah satu tujuan dihilangkannya beberapa basa pada ujung N dan ujung C adalah untuk mempermudah proses pemurnian dan peningkatan yield protein rekombinan. Hal ini dikarenakan oleh asam amino ujung C dari protein L1 HPV memusatkan tiga sifat yaitu pengikatan DNA, pengemasan DNA, dan lokalisasi inti

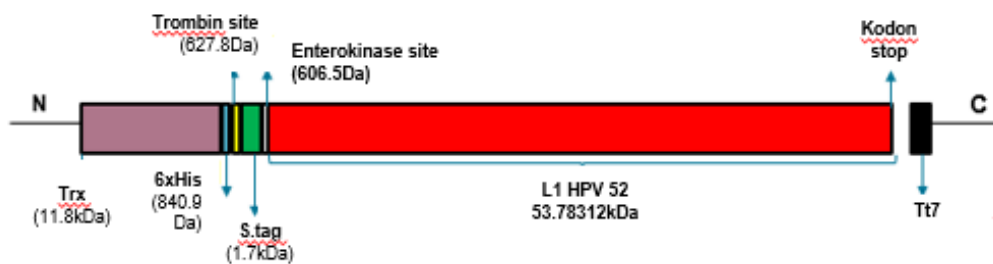
(Zhou dkk., 1991; Li dkk., 1997; Touze, 2000). Selain itu, hasil penelitian Pimienta (2018) yang juga menggunakan *truncated* L1 HPV pada ujung C menunjukkan peningkatan jumlah protein L1 HPV pada analisis densitometrik. Peningkatan tersebut sebanyak empat kali lipat dibandingkan dengan *wild-type*.

Disisi lain, pertimbangan pemotongan pada ujung N adalah untuk menghilangkan region transmembrannya. Region transmembran memiliki kecenderungan hidrofobik dan melekat pada membrane sel (Manor, 2012). Pemotongan asam amino pada ujung N tersebut diharapkan dapat menjadikan protein L1 HPV 52 memiliki kecenderungan hidrofilik dan berada pada fase terlarut. Dengan demikian, pemotongan asam amino pada ujung N dan ujung C diharapkan akan didapatkan protein L1 HPV 52 yang terlarut dalam sitoplasma dengan *yield* yang tinggi. Protein L1 HPV 52 yang sudah didelesi 7 basa pada ujung N dan didelesi 15 basa pada ujung C tersebut mempengaruhi pembentukan VLP menjadi small VLP. Chen (2000) menyatakan bahwa Small VLP tetap dapat menginduksi antibodi seperti VLP namun konformasi proteinnya tidak terlalu stabil seperti VLP. VLP akan tetap terbentuk ketika delesi <10 asam amino pada ujung N namun ketika dilakukan delesi sebanyak 10 asam amino pada ujung N maka hanya akan terbentuk small VLP. Pembentukan VLP dan small VLP hanya dapat terjadi dengan maksimal delesi 13 asam amino pada ujung N terminal. Delesi ≥ 13 asam amino menyebabkan kesalahan pelipatan protein.

Setelah dilakukan analisis letak region transmembran menggunakan smart.embl-heidelberg.de, gen L1 HPV 52 direstriksi dari gen pPICZA kemudian disimulasi-ligasikan pada pET32b(+). pET32b(+) memiliki ukuran 5899 bp dan ketika direstriksi menggunakan NcoI dan EcoRI menghasilkan pita linier berukuran 5800bp. Hasil restriksi gen L1 HPV 52 dengan ukuran 1448 bp yang diinsersikan ke dalam plasmid pET32b(+) yang sudah

linier akan menghasilkan produk berukuran 7328 bp. Protein rekombinan yang dihasilkan nantinya merupakan protein fusi.

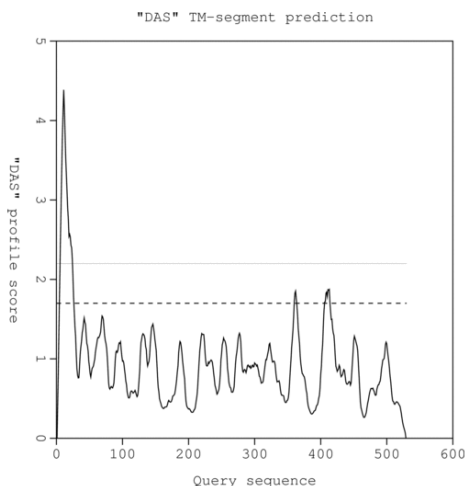
Protein yang ditranslasikan dimulai setelah adanya sekuens RBS dengan urutan sebagai berikut, Trx-tag, His-tag, trombin site enterokinase site, dan gen L1 HPV 52. Ilustrasi urutan protein yang akan diekspresikan pada protein rekombinan dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



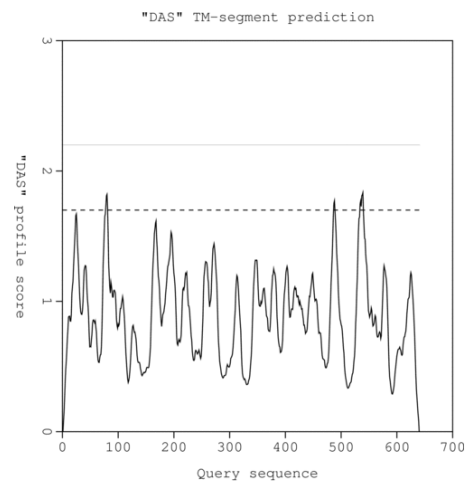
Gambar 1. Urutan protein rekombinan yang akan diekspresikan

Analisis region transmembran dilakukan dengan menggunakan tmdas.bioinfo.se/DAS yang dikonfirmasi dengan menggunakan wlab.ethz.ch/protter/#. Hasil analisis menggunakan tmdas.bioinfo.se/DAS, didapatkan hasil bahwa protein

rekombinan tidak memiliki region transmembran jika dibandingkan dengan protein L1 HPV 52 yang masih lengkap. Ini merupakan akibat dari pemotongan beberapa basa pada ujung N. Berikut merupakan hasil analisis region transmembran.



A



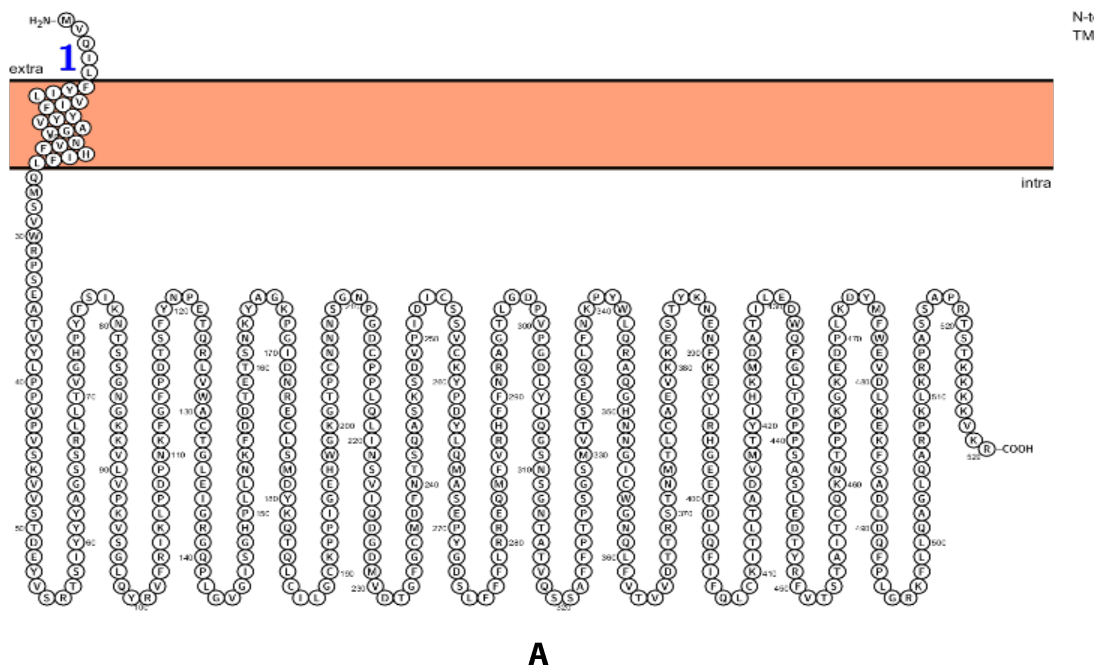
B

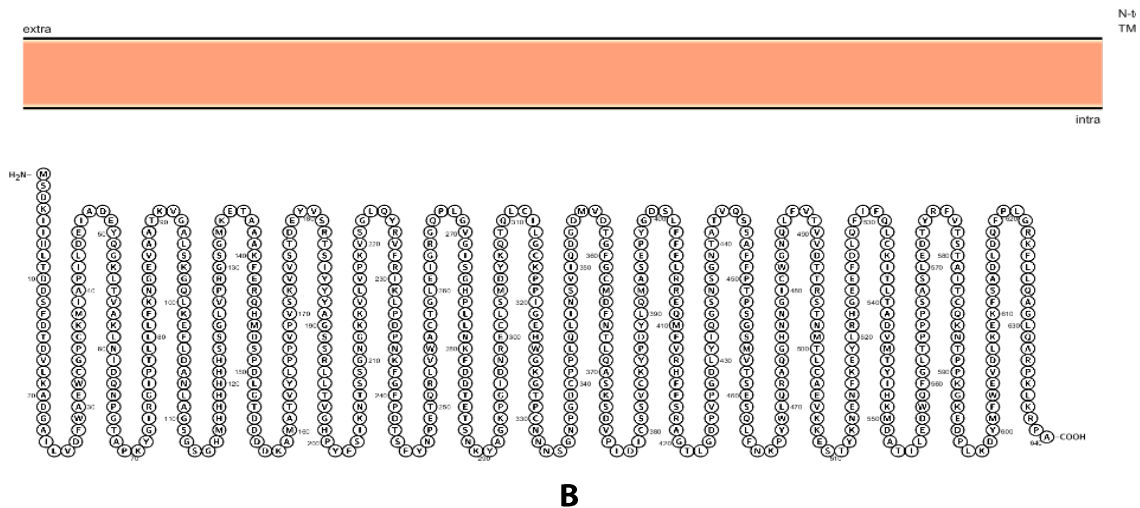
Gambar 2. Hasil analisis protein L1 HPV 52 dari NCBI yang masih memiliki region transmembran (A) dan protein rekombinan L1 HPV 52 yang akan dihasilkan pada penelitian (B). Hasil analisis transmembran menggunakan tmdas.bioinfo.se/DAS.

Hasil analisis transmembran pada protein rekombinan dengan menggunakan tmdas.bioinfo.se/DAS, tidak menunjukkan adanya *peak* di atas *streak cut-off*. Hal ini berbeda dengan native protein dengan *accession number* JN874433.1 yang masih lengkap dengan region transmembrannya. Native protein tersebut menunjukkan adanya *peak* di atas *streak cut-off*. *Peak* tersebut terletak pada asam amino ke-6 hingga asam amino ke-24. *Peak* tersebut mengindikasikan adanya region transmembran.

Keberadaan region transmembran tersebut dikonfirmasi dengan menggunakan wlab.ethz.ch/protter/#.

Hasil juga menunjukkan bahwa protein rekombinan tidak memiliki region transmembran. Semua protein terletak pada sitoplasma yang tidak terikat membran. Hal ini berbeda dengan native protein dengan *accession number* JN874433.1, yang mengindikasikan keberadaan region transmembran pada asam amino ke-6 hingga asam amino ke-25. Hasil analisis ini memastikan bahwa protein rekombinan L1 HPV 52 yang merupakan *truncated segment* sudah tidak memiliki region transmembran. Hasil konfirmasi menggunakan wlab.ethz.ch/protter/# dapat dilihat pada gambar berikut.





Gambar 3. Hasil analisis protein L1 HPV 52 dari NCBI yang masih memiliki region transmembran (A) dan protein rekombinan L1 HPV 52 yang akan dihasilkan pada penelitian (B). Hasil analisis transmembran menggunakan wlab.ethz.ch/protter/#.

4. KESIMPULAN

Protein rekombinan L1 HPV 52 yang merupakan *truncated segment* tidak memiliki region transmembran jika dibandingkan dengan protein L1 HPV 52 native dengan *accession number* JN874433.1.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kami ucapkan kepada LPDP yang sudah membiayai penelitian ini hingga selesai dan kepada SITH ITB yang sudah memfasilitasi penelitian ini baik tempat maupun materi. Serta kepada seluruh staf MTs. Yusuf Annur yang sudah memberikan segala dukungan.

DAFTAR PUSTAKA

Chen XS, Garcea RL, Goldberg I, Casini G, and Harrison SC. 2000. Structure of Small Virus-like Particles Assembled from the L1 Protein of Human Papillomavirus 16. *Molecular Cell* 5: 557–567.

Cserzo M., Wallin, E., Simon, I., von Heijne G., and Elofsson, A.. (1997): Prediction of transmembrane alpha-helices in

procariotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface method, *Prot. Eng.*, **10** (6), 673-676.

Evriarti PR, and Yasmon A. 2019. Patogenesis Human Papillomavirus (HPV) pada Kanker Serviks. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia* 8: 23-32.

B Hanif, VR. 2018. Konstruksi Gen L1 HPV 52 pada PPICZA dan PPICZa untuk Ekspresi Protein Virus-Like Particles (VLP) pada *Pichia Pastoris* Gs115. [Skripsi]. Institut Teknologi Bandung, Bandung. [Indonesian].

A

Hansen, Z.H. 2002. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*, 2: 342-350.

ICO/IARC HPV information center. 2019. Human Papillomavirus and Related Disease Report, Available at: <https://www.hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf>, accessed August 2019.

Kirnbauer, R., Booy, F., Cheng, N., Lowy, D.R., dan Schiller, J.T., (1992): Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly

- immunogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 12180–12184.
- Li M, Cripe TP, Estes PA, Lyon MK, Rose RC, and Garcea RL. 1997. Expression of the human papillomavirus type 11 L1 capsid protein in *Escherichia coli*: characterization of protein domains involved in DNA binding and capsid assembly. *J. Virol* 71: 2988-2995.
- Manor J, Feldblum ES, Zanni M, and Arkin IT. 2012. Environment Polarity in Proteins Mapped Noninvasively by FTIR Spectroscopy. *J. Phys. Chem. Lett* 3 (7): 939–944.
- Pimienta, E., Rodriguez, R., Fando, Y., Serrano, D., Ortega, A., Palenzuela, K. dan Marrero, K. (2019): Cloning and expression in *Escherichia coli* of the full-length and deletion variants of a human papillomavirus 18 L1 gene isolated from a Cuban patient, Artículo Original.
- Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI. (2015): *Stop Kanker*, INFODATIN Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI.
- Touze A, Mahe D. El Mehdaoui S, Dupuy C, Combita-Rojas A, Bousarghin L, Sizaret P, and Coursaget P. 2000. The nine C-terminal amino acids of the major capsid protein of the human papillomavirus type 16 are essential for DNA binding and gene transfer capacity. *FEMS Microbiology Letters* 189: 121-127.
- Vet, J. N. I., De Boer, M. A., Van Den Akker, B. E. W. M., Siregar, B., Lisnawati, Budiningsih, S., ... Fleuren, G. J. (2008): Prevalence of human papillomavirus in Indonesia: A population-based study in three regions. *British Journal of Cancer*, 99(1), 214–218. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604417>.
- Zhang, K., Liu, C., Li, J., Yan, J., Su, Y., Li, S., and Li, J., 2017. Analysis of human papilloma virus type 52 integration status in exfoliated cervical cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14: 5817-5824.
- Zhou J, Doorbar J, Sun XY, Crawford LV, McLean CS, and Frazer IH. 1991. Identification of the nuclear localization signal of human papillomavirus type 16 L1 protein. *Virology* 185: 625-632.



Copyright © 2024 The author(s). You are free to **Share** — copy and redistribute the material in any medium or format. **Adapt** — remix, transform, and build upon the material. Under the following terms: **Attribution** — You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use. **NonCommercial** — You may not use the material for commercial purposes. **ShareAlike** — If you remix, transform, or build upon the material, you must distribute your contributions under the same license as the original. **No additional restrictions** — You may not apply legal terms or technological measures that legally restrict others from doing anything the license permits.