

Kloning Fragmen DNA Pengkode Integrase (*int*) HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) 1 Pada *Escherichia Coli* JM109

Hotma Hutapea, Antonius Oktavian

Balai Penelitian dan Pengembangan Biomedis Papua

email: hotmahutapea@gmail.com

Abstract

Human Immunodeficiency Virus (HIV) is an RNA virus. It is a lentivirus, a retrovirus member family which causes Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). An early event in every retroviral multiplication is the integration of the viral double-stranded DNA genome into the host chromosome. The integration is facilitated by the activation of integrase.

The goal of this research is to obtain the HIV integrase encoding gene. The obtained integrase ORF was intended to be cloned into cloning vector pJETclone and to transform Escherichia coli JM109. The cDNA synthesis was conducted by reverse transcription by converting the RNA genome to DNA. The obtained cDNA was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) technique to obtain integrase encoding gene. The PCR product was inserted into the plasmid using blunt ended cloning system and was characterized using DNA gel electrophoresis and nucleotide analysis. The DNA gel electrophoresis of PCR product showed the expected band. Further characterization was conducted using nucleotide sequencing showed that the PCR product was homologue to HIV-1 integrase from Indonesia. The PCR was performed on the cloned showed DNA insert on expected size. The nucleotide analysis was conducted on the pure recombinant plasmid, the DNA was read properly.

Key words: *HIV-1,Integrase, E.coli JM109*

Abstrak

HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) adalah virus RNA, dan termasuk ke dalam lentivirus, anggota kelompok retrovirus yang menyebabkan penyakit AIDS *Acquired Immunodeficiency Syndrome*. Tahap awal multiplikasi setiap retrovirus adalah integrasi genom DNA untai ganda virus ke dalam kromosom inang. Tahap integrasi ini difasilitasi oleh aktivasi enzim integrase. Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh DNA pengkode integrase HIV. Kerangka baca terbuka atau Open Reading Frame (ORF) pengkode integrase yang diperoleh diklon ke vektor kloning pJETclone dan digunakan untuk mentransformasi *Escherichia coli* JM109. Sintesis cDNA dilakukan dengan mentranskripsi balik genom RNA menjadi DNA yang selanjutnya digunakan sebagai templat untuk amplifikasi ORF pengkode integrase dengan teknik reaksi polimerisasi berantai atau *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Produk PCR selanjutnya disisipkan kedalam plasmid menggunakan sistem kloning *blunt-ended* dan dikarakterisasi dengan elektroforesis DNA dan analisis nukleotida. Analisis dengan elektroforesis DNA menunjukkan bahwa produk PCR berukuran sesuai dengan ukuran teoritis. Karakterisasi lebih lanjut dengan teknik analisis nukleotida menunjukkan produk PCR tersebut homolog dengan integrase HIV-1 dari Indonesia. Teknik PCR juga dilakukan terhadap klon, dan adanya produk PCR berukuran sesuai dengan ukuran teoritis menunjukkan adanya DNA sisipan. Analisis nukleotida dilakukan pada plasmid rekombinan murni dan DNA terbaca dengan baik.

Keywords: *HIV-1,Integrase, E.coli JM109*

Pendahuluan

AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrom*) penurunan sistem imun didapatkan telah mencapai proporsi epidemik dan 90% penderitanya ditemukan pada negara berkembang, terutama di Indonesia secara umum dan pulau Papua secara khusus. Di Papua sendiri, pertumbuhan kasus HIV-AIDS terus meningkat. Epidemik HIV-AIDS di Provinsi Papua sudah dalam kategori populasi umum. Data kumulatif dari Dinas Kesehatan Provinsi Papua yang disebarakan oleh Komisi Penanggulangan AIDS Daerah (KPAD) Papua pada 1 Maret 2010 menginformasikan bahwa kasus HIV-AIDS di Papua telah mencapai 4745 kasus.¹

HIV adalah partikel virus yang berkaitan erat dengan penyebab AIDS. Virus ini termasuk dalam golongan retrovirus dengan materi genetiknya adalah satu pasang RNA. Infeksi HIV ini disebabkan oleh transfer cairan tubuh seperti darah, semen pada pria, cairan vagina dan air susu ibu (ASI). Virus tersebut dapat ditemukan bebas dan berada di dalam sel terinfeksi. Sejak penyakit ini ditemukan pada 1981-2006, AIDS telah membunuh 25 juta orang diantaranya adalah anak-anak. Penderita HIV yang tidak ditangani pada akhirnya berkembang menjadi AIDS. Mereka umumnya meninggal karena infeksi oportunistik yang diiringi dengan menurunnya sistem pertahanan tubuh mereka. Infeksi HIV membutuhkan waktu 10 tahun untuk berkembang menjadi AIDS.²

Pengobatan HIV selama ini dilakukan dengan cara pemberian senyawa antivirus yang digolongkan ke dalam NRTI (*Nucleoside RT Inhibitor*), NNRTI (*Non Nucleoside RT Inhibitor*), PI (*Protease Inhibitor*) yang secara umum bekerja menghambat aktivitas *Reverse Transcriptase* (RT) virus. Beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa pemberian antivirus menyebabkan resistensi virus akibat mutasi. Penelitian yang dilakukan di

Uganda menunjukkan bahwa nevirapin menimbulkan mutasi pada daerah RT HIV di posisi A98G, L100I, K103N, V106A, V108I, Y181C, Y188C, dan G190A². Penelitian lain yang serupa menunjukkan bahwa mutasi pada posisi K103N merupakan mutasi paling sering ditemukan dan menyebabkan resistensi level tinggi terhadap semua anti virus golongan NNRTI. Mutasi pada posisi tersebut muncul setelah pemberian nevirapin, dan paling sering muncul karena pemberian efavirenz. Mutasi lain yaitu Y188L lebih sering muncul pada pasien dengan terapi *favirenz*.³

Integrasi materi genetik virus ke dalam DNA sel terinfeksi merupakan proses yang sangat penting bagi replikasi HIV. Proses integrasi diperlukan agar virus dapat tereplikasi karena seluruh komponen replikasi virus terdapat pada selinangnya.^{4,5} Proses ini difasilitasi oleh aktivitas enzim integrase yang diproduksi bersama-sama protease dan reverse transcriptase.⁶ Protein integrase diperlukan virus untuk menyisipkan DNA-nya ke dalam genom sel terinfeksi, selain itu juga berperan sebagai *cofactor enzim reverse transcriptase*. Integrase HIV1 merupakan protein dengan bobot 32 KDa yang terdiri atas 3 domain fungsional. Domain tersebut adalah: domain aminoterminal (residu 1-50) yang dicirikan oleh motif HHCC *zinc finger-like*, domain central core (residu 50-212) yang mengandung residu asam yang sangat terpelihara, yaitu D64, D116, dan E152 (motif DDE) yang berperan penting dalam proses katalisis, dan domain carboxyl-terminal (residu 212-288).² Integrase HIV adalah target yang rasional untuk dihambat sebagai pengobatan infeksi HIV dan pencegahan AIDS. Selain itu, penghambatan terhadap aktivitas integrase memiliki indeks terapi yang tinggi karena sel inang tidak memiliki protein yang aktivitasnya serupa dengan integrase HIV.^{3,4} Studi ini dilakukan untuk

memperoleh klon kerangka baca terbuka gen pengkode *int* HIV galur

Metode

Ekstraksi RNA HIV-1 dari Plasma

RNA virus di ekstraksidari plasma darah menggunakan kit ekstraksi sehingga diperoleh RNA virus yang murni menggunakan Qia Amp Viral Mini Kit. Plasma darah diperoleh dari koleksi plasma darah laboratorium Biologi Molekuler Balai Penelitian dan Pengembangan Biomedis Papua.

Amplifikasi Kerangka Baca Terbuka Gen PengkodeIntegrasi HIV-1

Genom HIV-1 berupa RNA, untuk itu perlu dilakukan konversi RNA menjadi cDNA. Sintesis cDNA dilakukan menggunakan kit transkripsi balik SSIII/Plat Taq dari Invitrogen. Selanjutnya cDNA tersebut digunakan sebagai template untuk mengamplifikasi kerangka baca terbuka gen pengkode integrasi HIV-1 menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Amplifikasi dilakukan menggunakan sepasang primer Pint HIV forward 5'TTTTTAgAtg gAA Tag ATA Agg C 3', dan PintHIVreverse 5'CTA ATC CTC ATC CTg TCT ACT T – 3'. Primer didesain mengapit fragmen DNA pengkode integrasi pada nukleotida ke 3463-3485 dan 4329-4308 pada genom total HIV-1. Amplifikasi dilakukan dengan kondisi PCR transkripsi balik, 50°C selama 30 menit untuk sintesis cDNA, 95°C selama 15 menit untuk inaktivasi *Reverse Transkriptase*, 95°C selama 1 menit untuk denaturasi DNA, 35 x (95°C, 1 menit denaturasi awal; 47°C, 30 detik penempelan primer; 72°C, 1 menit elongasi), 72°C, 7 menit elongasi akhir.

Kloning Kerangka Baca Terbuka Gen Integrasi HVI-1.

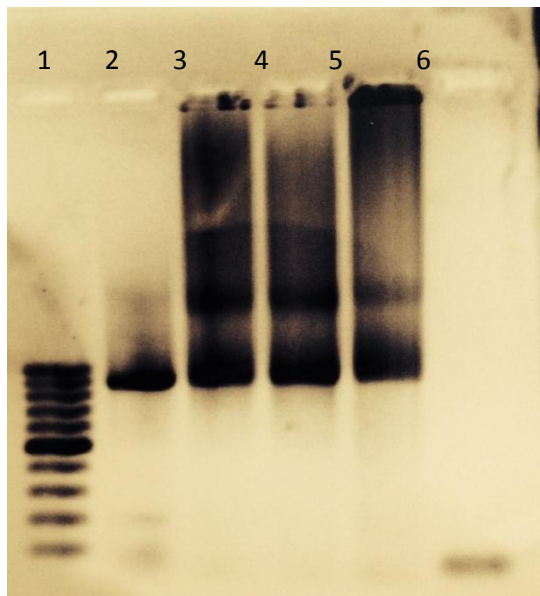
Produk PCR yang diperoleh selanjutnya dimurnikan dengan cara ekstraksi DNA dari gel. Produk PCR yang telah murni selanjutnya diligasi ke vector cloning untuk menghasilkan konstruk pJETintHIV-1. Reaksi ligasi dilakukan sesuai dengan petunjuk perusahaan penyedia. Konstruk yang diperoleh digunakan untuk mentrans formasi sel *Escherichia coli*JM109 kompeten dengan teknik *heat shock* pada 42°C selama 45 detik. Transforman diseleksi pada media LB mengandung ampisilin. Pembuatan Sel *E. coli* JM109 kompeten dilakukan menggunakan larutan CaCl₂ 0,75 M yang mengandung 15% gliserol. Transforman yang tumbuh pada media seleksi tersebut selanjutnya dikarakterisasi dengan cara mengisolasi plasmidnya. Plasmid diisolasi menggunakan teknik lisis alkali minipresipitasi Plasmid dikarakterisasi lebih lanjut dengan teknik analisis migrasi, dan penentuan urutan nukleotida dengan sekuenser. Sekuensing dilakukan menggunakan primer pJET1.2 *forward sequencing primer* dan pJET1.2 *reverse sequencing primer*.

Hasil

Teknik transkripsi balik dilakukan menggunakan *reverse transcriptase* dari virus Moloney Murine Leukimia yang secara sensitif mampu mengkonversikan RNA menjadi cDNA. cDNA yang diperoleh digunakan sebagai templat untuk amplifikasi fragmen DNA integrasi HIV dengan teknik PCR menggunakan enzim *Sso7d fusion polymerase*. Amplifikasi menggunakan enzim ini akan menghasilkan produk PCR tanpa ada kelebihan basa adenin pada kedua ujung 3' pada masing-masing untai DNA sehingga dapat diligasi langsung ke vektor kloning pJETclone.

Fragmen DNA pengkode integrasi HIV-1 telah dioptimasi dengan metode PCR pada suhu *annealing* 47°C, 48°C, 49°C, dan 50°C dan berhasil diamplifikasi

dengan optimal pada suhu 47°C. Analisis menggunakan elektroforesis gel DNA 1% menunjukkan adanya pita fragmen DNA yang berukuran sekitar 900 pasang basa (pb) optimal pada suhu annealing 47°C. Hal ini sesuai dengan ukuran yang diharapkan yaitu 864 pb (Gambar 1).



Gambar 1. Elektroforegram Hasil Optimasi Suhu Annealing PCR Fragmen DNA Pengkode Integrase HIV-1. 1= Marka DNA 100bp, 2= 47°, 3= 48°C, 4= 49°C, 5= 50°C, 6= Kontrol Negatif.

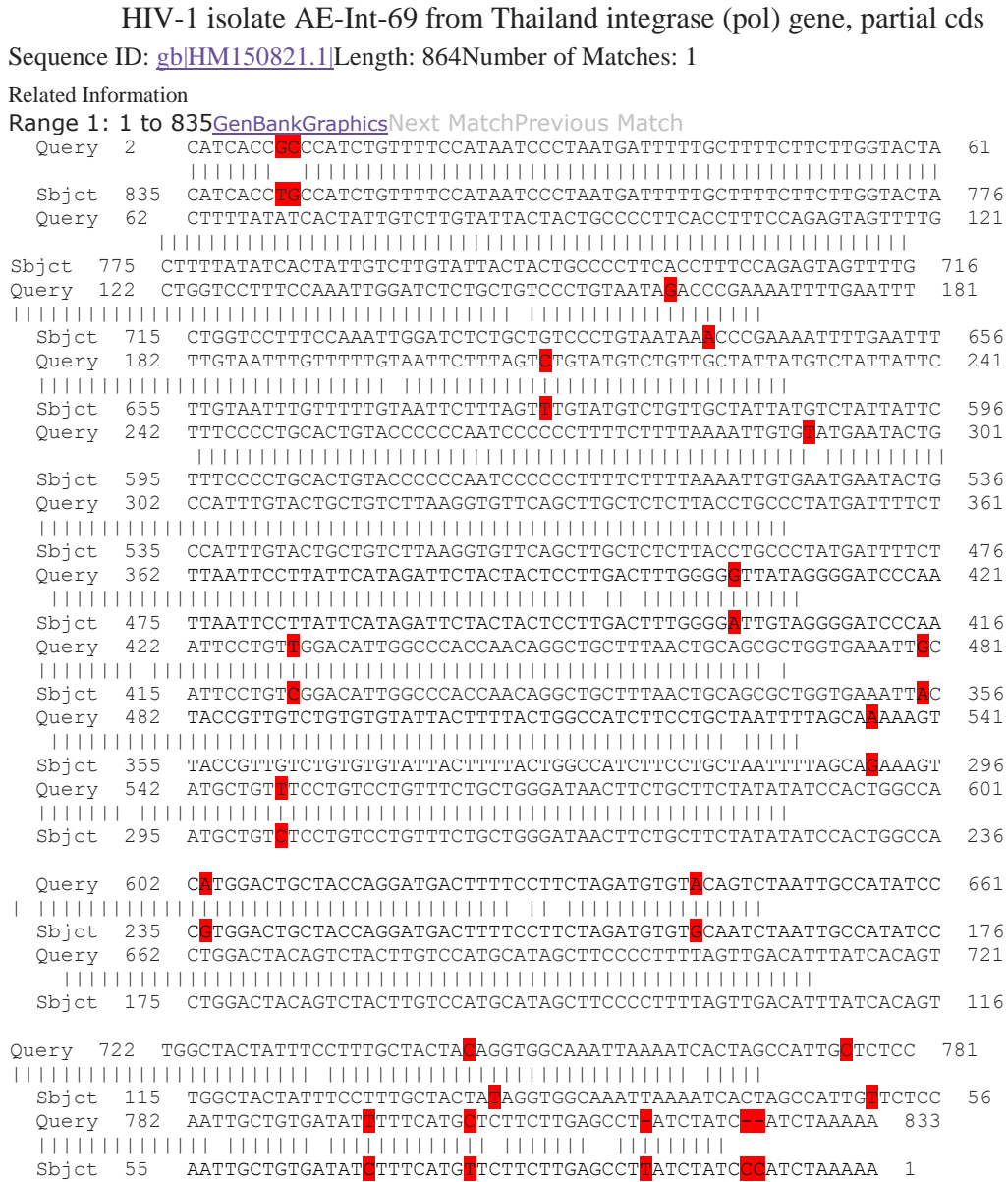
Produk PCR dimurnikan menggunakan metode ekstraksi gel dan dikarakterisasi lebih lanjut menggunakan teknik sekuensing. Produk PCR yang telah disekuensing selanjutnya dikonfirmasi sekuen nukleotidanya dengan membandingkan urutan nukleotida yang diperoleh dengan data nukleotida yang terdapat pada gen bank, yaitu pada fitur BLAST. Hasil analisis sekuen nukleotida menunjukkan bahwa produk PCR memiliki homologi yang tinggi terhadap integrase HIV-1 yang tersedia pada genbank murni di dalam *E.coli*JM109. Klon yang diperoleh dikarakterisasi menggunakan teknik elektroforesis gel dan sekuensing. Produk PCR yang

terkonfirmasi integrase HIV-1 selanjutnya diligasi ke vektor kloning pJETclone, suatu plasmid linear *blunt ended* berukuran 2974 pb. Vektor ini membawa gen *lethal Eco47IR* yang aktivitasnya akan terhambat jika terdapat DNA sisipan. Hal tersebut menyebabkan hanya transforman yang membawa DNA sisipan yang dapat tumbuh. Meski begitu, karakterisasi lebih lanjut perlu dilakukan seperti analisis migrasi terhadap plasmid yang diisolasi dari transforman untuk mengetahui karakter plasmid rekombinan (Gambar 3), dan analisis urutan nukleotida plasmid rekombinan.

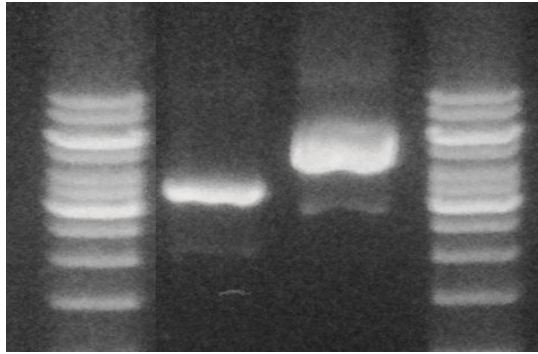
Gen *lethal Eco47IR* yang terdapat pada pJETclone menyebabkan kontrol plasmid berupa pJETclone tanpa DNA sisipan tidak dapat tersedia. Untuk itu, dalam studi ini, vektor kloning pGEM-T sirkuler berukuran 3018 pb tanpa DNA sisipan digunakan sebagai pembanding jarak migrasi. Analisis migrasi menunjukkan pJETint-HIV1 menunjukkan jarak migrasi yang lebih pendek dibandingkan pGEM-T. Hal ini menunjukkan bahwa ada DNA sisipan pada transforman. Hasil analisis urutan nukleotida pada plasmid tersebut menginformasikan bahwa DNA sisipan tersebut adalah integrase HIV-1.

Produk PCR disisipkan ke vektor kloning dengan memanfaatkan aktivitas enzim T4DNA *ligase*. Reaksi ligasi digunakan untuk mentransformasi *E.coli* JM109 yang sebelumnya rentan terhadap antibiotik ampisilin menjadi resistant terhadap antibiotic tersebut. Sifat resistan tersebut muncul karena adanya gen pengkode resistensi terhadap ampisilin yang terdapat pada plasmid yang digunakan sebagai vektor. Transforman yang tumbuh dikarakterisasi dengan analisis migrasi dan sekuensing. Hasil analisis migrasi menunjukkan adanya DNA sisipan yang diharapkan (Gambar 3). Hasil sekuensing juga menunjukkan bahwa DNA sisipan adalah benar integrase HIV-1 (Gambar 4). Klon yang diperoleh ini akan dilanjutkan untuk ekspresi gen

integrase HIV-1 ke *E. coli* BL21 dengan vektor ekspresi yang akan digunakan adalah pETsumo.



Gambar 2. Homologi Sekuen Produk PCR dengan Integrase HIV-1 pada Genbank.



Gambar 3. Hasil Isolasi Plasmid pJETint-HIV-1.
(Lajur 1 dan 4 Adalah Marker DNA 250 bp, Lajur 2 Adalah pGEM-T Tanpa DNA Sisipan, Lajur 3 Adalah pJETint-HIV-1)

HIV-1 isolate ID17 from Indonesia integrase (pol) gene, partial cds
Sequence ID: [gb|AY214050.1](#) Length: 864 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 450 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
259 bits(140)	3e-65	351/452(78%)	17/452(3%)	Plus/Plus
Query 51	TTTTAGATGGAATAGATAAGGCTTTTAAAA-AACATGGAGGAGTT-TCAGAAATGGAG	108		
Sbjct 1	TTTCTAGATGGGATAGATAAGGCT-CAAGAAGACCATGAAAGATATCACAGCAATGGAG	59		
Query 109	AACACTGGCTAGTGTATTTAATCTGCCCCCTATAGGAGCAAACGAAATATCTCTCACTG	168		
Sbjct 60	AACACTGGCTAGTGTATTTAATTTGCCACCTATAGTAGCAAAGGAAATAGTAGCCAACCTG	119		
Query 169	TGATACATGTCTACTGC-AGGCGAAGCTATGCATGGTCAAGTAGACTGTAGCCCACCGAT	227		
Sbjct 120	TGATAAATGTCAACTAAAAGGGGAAGCTATGCATGGACAAGTAGACTGTAGTCCAGGGAT	179		
Query 228	-TGGCAATTTGACTGTATCC-TCTGGATTTAATAGTC-TCCTGGTATCCGTCACGTGGC	284		
Sbjct 180	ATGGCAATTAGATTGCACACATCTAGAAGGAAAAGTCATCCTGGTAGCAGTCCACGTGGC	239		
Query 285	CAGTGATATATATT-GCTGACTTTATCCCACCTTAAACAGGCCAG-ATACTGGCTATTT	342		
Sbjct 240	CAGTGGATATATAGAAGCAGAAGTTATCCCAGCAGAAACAGGACAGGAGACAGCATACTT	299		
Query 343	TCTGCTAAAATTTTCAGGAAAATGGCCATTAATTTT-ATACACACATCAACTTTGG-AA	400		
Sbjct 300	CCTGCTAAAATTAGCAGGAAGATGGCCAGTAAAAGTAAATACACACAGACAACGGTAGCAA	359		
Query 401	TTTCTTCAGCGCTGCA-TTAAAATA-CTTGGTTGTGGGCCAAGGCCAATCG-AATTTGG	457		
Sbjct 360	TTTACCAGCGCTGCAGTTAAAGCAGCCTGTTGGTGGGCCAATGTCCGACAGGAATTTGG	419		
Query 458	GGATCCCC-ACATTCCCCAAGGT-AAGGAGTA	487		
Sbjct 420	G-ATCCCCTACAATCCCCAAGTCAAGGAGTA	450		

Gambar 4. Homologi Sekuen pJETint-HIV1 dengan Integrase HIV-1 pada Genbank

Hasil analisis homologi sekuen pJETint-HIV-1 terhadap sekuen integrase HIV1 pada gen bank menunjukkan variasi yang cukup tinggi. Hal ini bisa disebabkan oleh sekuens HIV-1 yang dikloning memiliki sekuens nukleotida yang tidak biasa di beberapa titik pada fragmen DNA integrase.

Integrase HIV-1 merupakan protein dengan bobot 32 KDa yang terdiri atas 3

domain fungsional, yaitu region aminoterminal (residu 1-50) yang dicirikan oleh motif *HHCC Zinc finger-like*. Motif *HHCC* penting untuk meningkatkan multimerisasi dengan berkordinasi dengan ion Zinc yang berperan dalam integrasi kedua ujung cDNA virus ke kromosom sel inang. Domain *central core* (residu 50-212) yang mengandung residu asam yang sangat

terpelihara, yaitu D64, D116, dan E152 (motif DDE) yang berperan penting dalam proses katalisis. Domain lain yaitu *carboxyl-terminal* (residu 212 – 288).^{7,8}

Integrase HIV-1 berada pada bagian hilir gen polimerase HIV-1. Gen

polymerase mengkode poli protein yang terdiri atas protease, *reverse transcriptase* dan ntegrase. Primer dirancang untuk mengamplifikasi DNA integrase secara utuh agar nantinya diperoleh protein integrase HIV-1 yang fungsional.

Daftar Rujukan

1. Sukaswara B. Jumlah Kasus HIV/AIDS per 31 Maret 2009 (online). Available from <http://www.aidsindonesia.or.id/repo/DataKasusPapuaTriwulanI2009.pdf>
2. Clavel F, Hance AJ. HIV Drug Resistance, *N Engl J Med* 2004; 350: 1023 – 1035.
3. Jackson BJ, Pergola GB, Guay LA, Musoke P, Mracna M, Fowler MG, et al. Identification of the K103N Resistance Mutation In Ugandan Women Receiving Nevirapine to Prevent HIV-1 Vertical Transmission. *AIDS* 2000 4(11): 111 – 115.
4. Pommier Y, Johnson AA, Marchand C. Integrase Inhibitors to Treat HIV/ AIDS, *Nature Reviews* 2005; 4: 236 – 248.
5. Hazuda DJ, Felock P, Witmer M, Wolfe A, Stillmock K, Grobler JA, et al. Inhibitors of Strand Transfer That Prevent Integration and Inhibit HIV-1 Replication in Cells, *Science* 2000; 287: 646 – 650.
6. Goldgur Y, Craigie R, Cohen GH, Fujiwara T, Yoshinaga T, Fujishita T, et al. Structure of HIV-1 Integrase Catalytic Domain Complexed with an Inhibitor: A Platform for Antiviral Drug Design, *PNAS* 1995; 96 (23): 13040 – 13043.
7. Cherepanov P, Pluymers W, Claeys A, Proost P, Clercq ED, Debyser Z. High-level Expression of Active HIV-1 Integrase from a Synthetic Gene in Human Cells, *The FASEB Journal* 2000; 14: 1389 – 1399.
8. Evering TH, Markowitz M. HIV-1 Integrase Inhibitors, *The PRN Notebook* 2008; 13:1 – 9