

Konstruksi Plasmid Pengekspresi Antigen Gag dan Protein Penghantar VP22 untuk Pengembangan Vaksin HIV-1

Plasmid Construction of Gag Antigen Expression and VP22 Delivery Protein for the Development of HIV-1 Vaccine

Melinda Remelia,^{1,2} Budiman Bela,^{3,4} Silvia Tri Widyaningtyas,^{3,4} dan Fera Ibrahim^{3,4}

¹Program Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jln. Salemba Raya No. 6, Jakarta Pusat 10430, Indonesia

²Departemen Biomedik Dasar, Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Indonesia, Jln. Mayjen Sutoyo No 2. Jakarta 13630, Indonesia

³Pusat Riset Virologi dan Kanker Patobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jln. Salemba Raya No. 6, Jakarta Pusat 10430, Indonesia

⁴Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jln. Salemba Raya No. 6, Jakarta Pusat 10430, Indonesia

*Korespondensi penulis: melinda.remelia@uki.ac.id

Submitted: 28-03-2020, *Revised:* 02-05-2021, *Accepted:* 15-05-2021

DOI: <https://doi.org/10.22435/mpk.v3i12.3046>

Abstrak

Vaksin endogen HIV-1 berbasis protein Gag diharapkan dapat menstimulus respons imun sel T CD8+ (sitotoksik). Protein Gag yang telah diproduksi dengan sistem prokariota *E.coli* merupakan antigen yang bersifat eksogen. Fusi protein VP22 diharapkan mampu menghantarkan antigen Gag masuk ke sitoplasma sel, diamati dengan marker eGFP. Sekuens VP22 (114 pb), GagHIV1 (1506 pb), dan eGFP (733 pb) telah diinsersikan pada vektor pQE80L. Protein rekombinan diekspresikan pada sistem *E.coli* dan dipurifikasi dengan metode Ni-NTA. Penghantaran antigen yang difusikan dengan VP22 dan marker eGFP diamati dengan mikroskop fluoresens dan konfokal. Konstruksi plasmid rekombinan pengekspresi protein eGFP, VP22-eGFP, GagHIV1-eGFP, dan VP22-GagHIV1-eGFP telah diverifikasi dengan sekuensing DNA sesuai dengan sekuen referensi. Plasmid rekombinan pengekspresi GagHIV1-eGFP dan VP22-GagHIV1-eGFP masih perlu dioptimasi agar dapat diekspresikan di sistem *E.coli*. Protein rekombinan VP22-eGFP (27,02 kDa) telah berhasil diperoleh serta berpendar fluoresens hijau (masuk) ke sitoplasma dan nukleus sel vero. Selain vaksin HIV-1, plasmid rekombinan pQE80L-eGFP dan pQE80L-VP22-eGFP juga berpotensi dapat digunakan sebagai 'tools' dalam pengembangan vaksin endogen dari virus atau mikroba lainnya.

Kata kunci: vaksin endogen; Gag HIV-1; VP22; eGFP; sel vero

Abstract

The endogenous HIV-1 vaccine based on Gag protein is expected to stimulate the immune response of CD8+ T cells (cytotoxic). The Gag protein that has been produced by the E.coli prokaryote system is an exogenous antigen. The fusion of VP22 protein is expected to deliver Gag antigen into the cytoplasm of cell, observed by eGFP markers. Sequences of VP22 (114 pb), GagHIV-1 (1506 pb), and eGFP (733 pb) were inserted into the pQE80L, respectively. The recombinant protein was expressed in the E.coli system and purified by the Ni-NTA method. Antigen delivery fused with VP22 and eGFP was observed

with fluorescence and confocal microscopy. The recombinant plasmid constructs of protein expression eGFP, VP22-eGFP, GagHIV-1-eGFP, VP22-GagHIV-1-eGFP were verified by DNA sequencing according to the reference. The recombinant plasmid constructs of Gag HIV-1-eGFP and VP22-GagHIV-1-eGFP still need to be optimized so they can be expressed in the *E.coli* system. The recombinant protein VP22-eGFP (27.02 kDa) was successfully obtained and fluorescent green (entered) into the cytoplasm and nucleus of vero cells. In addition to the HIV-1 vaccine, this recombinant plasmids pQE80L-eGFP and pQE80L-VP22-eGFP also have the potential to be used as tools in the development of endogenous vaccines for another viruses/microbes.

Keywords: endogenous vaccine; Gag HIV-1; VP22; eGFP; vero cell

PENDAHULUAN

Human Immunodeficiency Virus Type-1 (HIV-1) merupakan patogen penyebab *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (AIDS) yang berhasil diidentifikasi sejak 1983.¹ Penyakit AIDS memberi dampak signifikan bagi manusia di Indonesia maupun dunia. Peneliti berupaya mengembangkan vaksin untuk mengeradikasi (terapeutik) dan mencegah infeksi (profilaksis) virus HIV-1.^{1,2} Upaya pengembangan vaksin pada penelitian ini menggunakan antigen Gag (*group specific antigen*) karena pada studi primata (*non human primate*) diketahui antigen ini mampu menghasilkan imunitas yang protektif. Protein Gag juga memiliki sifat yang lebih lestari (*conserved*) dibandingkan protein *envelope*. Protein Gag merupakan protein struktural dari HIV-1 yang meliputi matriks (MA), kapsid (CA), dan nukleokapsid (NC).³ Antigen Gag yang dihasilkan dengan sistem ekspresi prokariota *Escherichia coli* (*E. coli*) bersifat eksogen karena tidak mampu berpenetrasi ke dalam sel. Antigen dalam cairan ekstraselular menghasilkan pembentukan antibodi spesifik, namun tidak merespon pembentuk sel T-sitotoksik. Protein Gag HIV-1 tidak dapat dikenali oleh antibodi spesifik karena terletak di bagian dalam virion, dan diselubungi oleh protein *envelope*. Oleh karena itu, antigen Gag HIV-1 perlu diupayakan masuk ke sitoplasma agar dapat memberikan proteksi bagi penerima vaksin.^{1,3,4}

Penemuan *Cell Penetrating Peptide* (CPP) menunjukkan potensi transportasi seluler dari beragam molekul (peptida, oligonukleotida, dan protein). Molekul CPP merupakan peptida yang

mampu masuk ke banyak jenis sel dan dapat menghantarkan suatu biomolekul masuk ke sel. Pada penelitian ini, digunakan CPP protein VP22 yang berasal dari HSV-1 (*Herpes Simplex Virus*) tipe-1.⁵ Apabila Gag difusikan dengan VP22, diharapkan antigen Gag dapat berpenetrasi pada membran lipid bilayer melalui muatan positif lokal CPP tersebut. Dengan demikian, Gag diharapkan dapat masuk ke sitoplasma sel dan menimbulkan respon imun sel T CD8+ (sel T sitotoksik).^{3,6}

Analisis lokalisasi protein fusi VP22-Gag dapat dilakukan dengan menambahkan marker gen egfp (*enhanced-green fluorescence protein*). Protein eGFP banyak digunakan sebagai reporter ekspresi gen untuk mempelajari lokasi suatu protein di dalam tubuh makhluk hidup. Apabila eGFP terpapar oleh sinar transiluminator energi dari ion Ca²⁺ photoprotein aequorin akan dipancarkan sehingga teraktivasi mengekspresikan tag fluorescent yang berpendar hijau.^{5,7,8} Pada penelitian ini plasmid yang mengandung gen VP22, Gag, dan eGFP ditransformasikan ke sistem ekspresi prokariota *E.coli* pQE80L. Gen Gag dan eGFP diharapkan dapat masuk ke sel mamalia dengan keberadaan VP22. Dengan demikian, VP22 dapat digunakan sebagai *delivery system* dalam pengembangan vaksin gag HIV-1.⁹

METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Pusat Riset Virologi dan Kanker Patobiologi Universitas Indonesia (PRVKP-UI) pada bulan Juli 2013 sampai April 2014. Gen

penyandi antigen rekombinan dirancang melalui studi bioinformatik dan literatur untuk menentukan epitop dalam penyusunan antigen. Studi bioinformatik dilakukan di antaranya menggunakan piranti lunak NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), *mega software*, dan *bioedit* untuk analisis sekuens.

Persiapan DNA Sisipan

Penentuan susunan nukleotida primer untuk sekuensing dan untuk sintesis fragmen DNA sisipan penyandi protein VP22, Gag HIV-1, dan eGFP dilakukan dengan menggunakan *software Gene Designer*. Optimasi kodon dilakukan dengan menambahkan situs restriksi pada primer spesifik (Tabel 1) untuk amplifikasi DNA sisipan.

Tahapan persiapan DNA sisipan antara lain; amplifikasi DNA dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR); purifikasi dari sisa garam dengan 1% *Low Melting Agarose* (LMA) dan QIAEX II *purification kit*; lalu digesti dengan enzim restriksi. Gen *gag* berasal dari klon plasmid pQE80L-Gag yang diperoleh dari laboratorium PRVKP-UI. Plasmid tersebut merupakan vektor ekspresi prokariota mengandung DNA sisipan penyandi protein Gag HIV-1 lengkap yaitu terdiri dari protein matriks (MA), kapsid (CA), dan nukleokapsid (NC), p1, p2, dan p6. Gen *gag* lengkap (tanpa stop kodon)

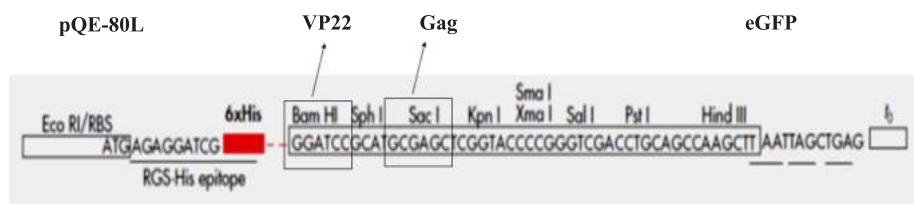
tersebut setelah ditambahkan situs restriksi *Sac* I di kedua sisi berukuran 1506 pb sedangkan plasmid pQE80L memiliki panjang 4751 pb sehingga panjang total plasmid pQE80L-Gag yaitu 6257 pb.

Gen VP22 berasal dari klon plasmid pcDNA3.1-VP22 HSV yang diperoleh dari laboratorium PRVKP-UI. Plasmid tersebut merupakan vektor ekspresi prokariota mengandung DNA sisipan penyandi protein VP22 tidak lengkap yaitu VP22₂₆₈₋₃₀₁. Gen VP22 setelah ditambahkan situs restriksi *Bam* HI di kedua sisi (tanpa stop kodon) berukuran 114 pb sedangkan plasmid pcDNA 3.1 memiliki panjang 5428 pb sehingga panjang total plasmid pcDNA 3.1-eGFP yaitu 5542 pb.

Gen *eGFP* berasal dari klon plasmid pcDNA 3.1-eGFP yang diperoleh dari laboratorium PRVKP-UI. Plasmid tersebut merupakan vektor ekspresi prokariota mengandung DNA sisipan penyandi protein eGFP lengkap yang berasal dari ubur-ubur (*Aequorea victoria* L.). Gen *eGFP* lengkap dengan stop kodon setelah ditambahkan situs restriksi *Hind* III di kedua sisi berukuran 733 pb sedangkan plasmid pcDNA 3.1 memiliki panjang 5428 pb sehingga panjang total plasmid pcDNA 3.1-eGFP yaitu 6161 pb.

Tabel 1. Primer Spesifik yang Digunakan dalam Penelitian

Nama Primer	Urutan Basa Nukleotida
CaMV_HindIII_F	5'-ATT TGC CGC CCT ATC ACT CAC GCG CCG TTG TCG-3'
eGFP_HindIII_R	5'-ATATAAGCTT-AGTTACTTGTACAGCTCGTC-3'
Gag_SacI_F	5'-ATATGAGCTC-GGTGCGAGAGCGTCAGTATTA-3'
Gag_SacI_R	5'-ATATGAGCTC-CTGTGACAAGGGGTCGTTGCCAAAG-3'
VP22_BamHI_F	5'-AATTGGATCCGACGCTGCTACAGCTACACG3'
VP22_BamHIR2	5'-GTA CGG ATC CTT CTT CAA CTG GAC GAC GTG GAC GAC-3'
pQE_F	5'-CCCGAAAAGTGCCACCTG-3'
pQE_R	5'GTTCTGAGGTCATTACTG3'
AE_p17R	5'-AATTGGATCCCCCGGACTATAGGTTAGTAATTTGGCTGAC-3'
AE_p24F	5'-CCGTGGATCCCCTATAGTGCAAAATGCACAAG-3'
AE_p24R	5'ATGTGGATCCCCCGGTTACAAAACCCTTGCYTTATGG3'



Gambar 1. Posisi DNA Sisipan VP22, Gag, dan eGFP pada Plasmid pQE80L

Persiapan Vektor Plasmid dan DNA

Plasmid didigesti dengan enzim restriksi sehingga DNA plasmid terlinearisasi dan memiliki ujung yang komplementer dengan DNA sisipan.

Vektor yang sudah linear dipurifikasi dengan QIAEX II-purification kit lalu diberi *Bacterial Alkaline Phosphatase* (BAP) untuk menghilangkan gugus fosfat pada ujung 5' dan 3' DNA sehingga *self ligation* pada saat pemberian ligase dapat dicegah. Purifikasi DNA kemudian dilakukan kembali.

Proses Ligasi

Proses ligasi vektor pQE80L dan gen eGFP dilakukan dengan enzim T4 DNA ligase. Rasio komposisi DNA vektor dan sisipan yaitu 1:3. Reaksi ligasi berlangsung selama 16-18 jam pada suhu 16°C. Posisi DNA sisipan pada situs restriksi di vektor pQE80L (Gambar 1).

Pembuatan Sel Kompeten DH5α

Bakteri yang akan digunakan dikultur dalam media Luria bertani (LB) dan diinkubasi *overnight*. Kemudian ditambahkan 1/100 bagian dari kultur yang *overnight* tersebut ke 30 mL medium LB, diinkubasi selama 1,5 jam (atau OD 600 nm). Kultur didinginkan selama 30 menit, lalu disentrifus 3500 rpm selama 10 menit, 4°C. Supernatan dibuang lalu ditambahkan 6 mL MgCl₂ 100 mM dan diinkubasi di es selama 15 menit, lalu disentrifus 3500 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang lalu ditambahkan 0,6 mL CaCl₂ 100 mM dan diinkubasi di es selama 1 jam, lalu disentrifus 3500 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang lalu ditambahkan 0,2 mL MgCl₂ 100 mM, sel kompeten siap untuk digunakan.

Transformasi Plasmid

Situs restriksi *Sac I* digunakan untuk menghubungkan gen *gag* HIV-1 dan plasmid pQE-80L-eGFP. Situs restriksi *Bam*HI digunakan untuk menghubungkan gen VP22 dan plasmid pQE-80L-Gag-eGFP dan pQE-80L-eGFP. Sebanyak 50 µL sel kompeten ditambahkan dengan masing-masing 0,1 ng/mL DNA rekombinan. Kemudian diinkubasikan di es selama 1 jam. *Heat shock* dilakukan pada suhu 42°C selama 1 menit lalu dimasukkan ke es selama 2 menit. Media SOC 200 µL ditambahkan untuk setiap 50µL sel kompeten, lalu dihomogenisasi dan diinkubasi dengan kecepatan 200 rpm, 37°C selama 1 jam. Sebanyak masing-masing 50 µL disebar pada media agar yang mengandung ampisilin, lalu diinkubasi 37°C, *overnight*. Efisiensi transformasi pada media dihitung (cfu/µg).

Verifikasi DNA Plasmid

Tahap verifikasi diawali dengan isolasi DNA plasmid lalu proses digesti dengan enzim restriksi dan divisualisasi dengan elektroforesis. Verifikasi PCR dilakukan dengan menggunakan pasangan primer spesifik lalu dilakukan sekuensing DNA.

Uji Fungsi Protein eGFP

Uji fungsi protein eGFP dilakukan dengan memaparkan lisat kultur bakteri *E.coli* DH5α hasil transformasi dengan sinar UV transiluminator. Apabila lisat kultur berpendar hijau menunjukkan bahwa protein rekombinan eGFP fungsional dapat dihasilkan pada kultur sel *E.coli*.

Ekspresi DNA Plasmid Rekombinan

Kultur *overnight* dari keempat plasmid rekombinan disiapkan dengan medium LB (5 mL) + Ampisilin 1/1000x. Sebagai kontrol negatif disiapkan juga kultur *overnight* dari sel kompeten DH5 α dengan medium LB (5 mL). Masing-masing kultur 1/10 volume (500 μ l) ditanam ke medium TB lalu diinkubasi selama 4 jam, suhu 37°C, 200 rpm. Sebanyak 1 ml kultur dipindahkan ke tabung 1,5 ml, lalu disentrifus 12.000 rpm, 1 menit (pelet merupakan protein hasil ekspresi waktu 0 induksi IPTG). Sisa kultur ditambahkan IPTG dengan konsentrasi 1 mM, lalu diinkubasi kembali selama 4 jam. Setiap 0, 1, 2, 3, dan 4 jam induksi IPTG masing-masing kultur diambil 1 ml dan disentrifus 12.000 rpm, 1 menit.

Analisa Kemampuan VP22 pada Sel Vero

Protein yang telah dipurifikasi diinokulasikan pada kultur sel vero dengan konfluensi 50-75% (dalam *plate* kultur bersumur

96), lalu diinkubasi pada suhu 37°C dan CO₂ 5%. Setelah itu dilakukan pengamatan pada waktu 10 menit, 30 menit, 1, 6, 8, dan 24 jam. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop luoresens dan mikroskop konfokal.

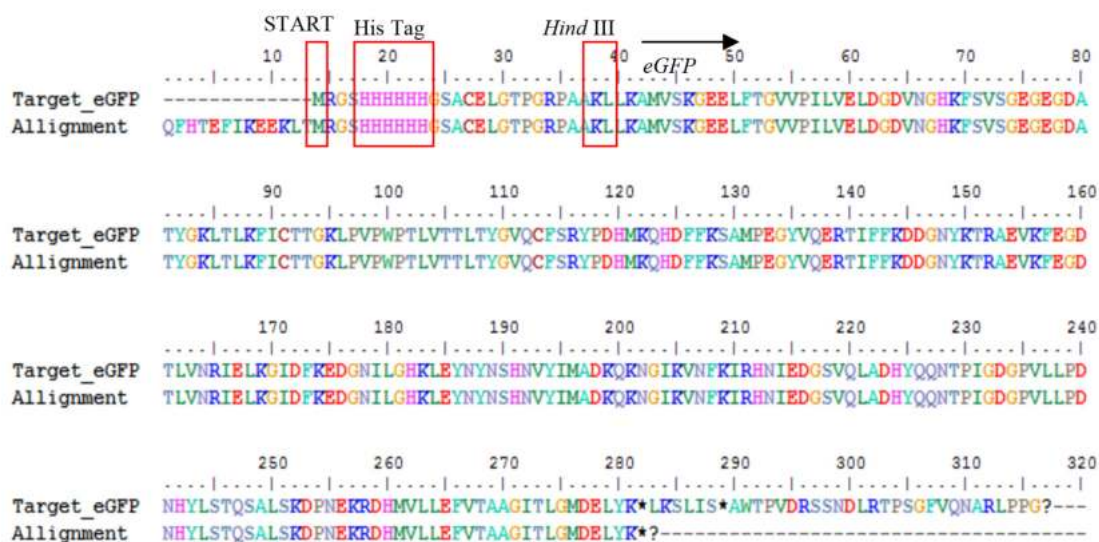
HASIL

Sekuensing DNA Plasmid Rekombinan

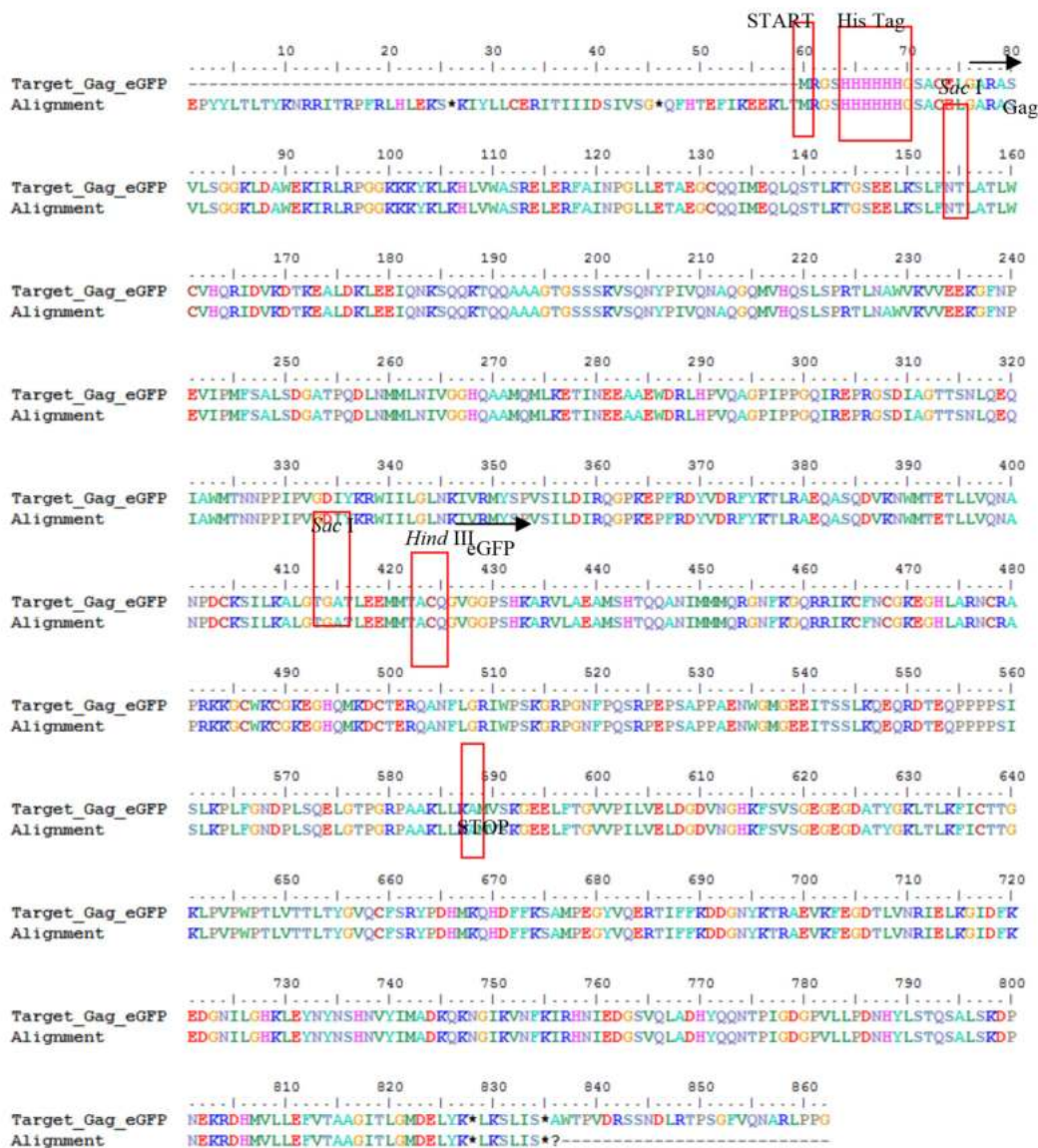
Hasil sekuensing telah dianalisis sesuai dengan asam amino referensi. Hal tersebut menunjukkan bahwa DNA sisipan yang diinsersikan ke dalam vektor tidak mengalami mutasi.¹⁰

Ekspresi DNA Plasmid Rekombinan

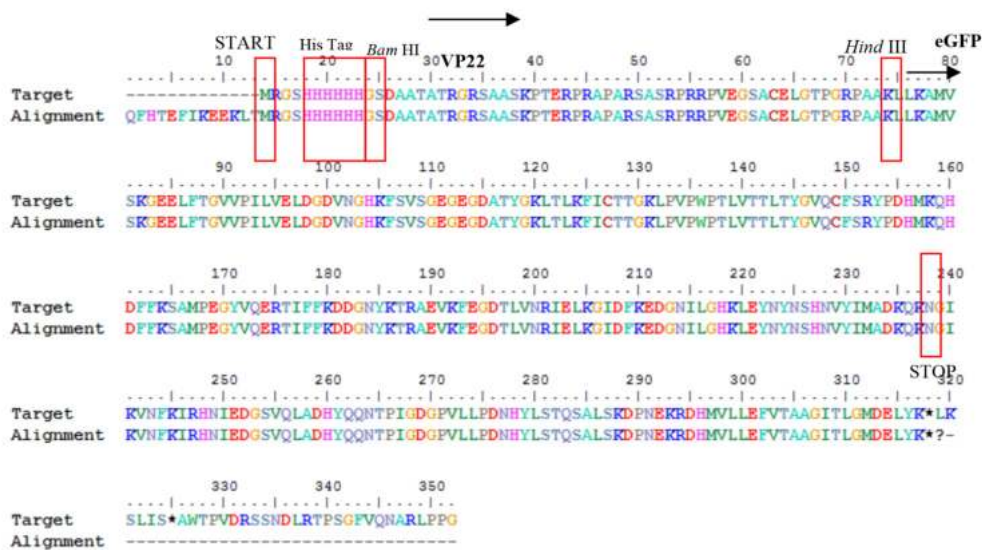
Plasmid rekombinan pengekspresi GagHIV1-eGFP dan VP22-GagHIV1-eGFP belum berhasil diperoleh pada penelitian ini. Meskipun urutan basa nukleotida dan kodon yang dirancang sudah sesuai (*in frame*) dengan referensi. Hasil sekuensing dapat dilihat pada Gambar 2-5.



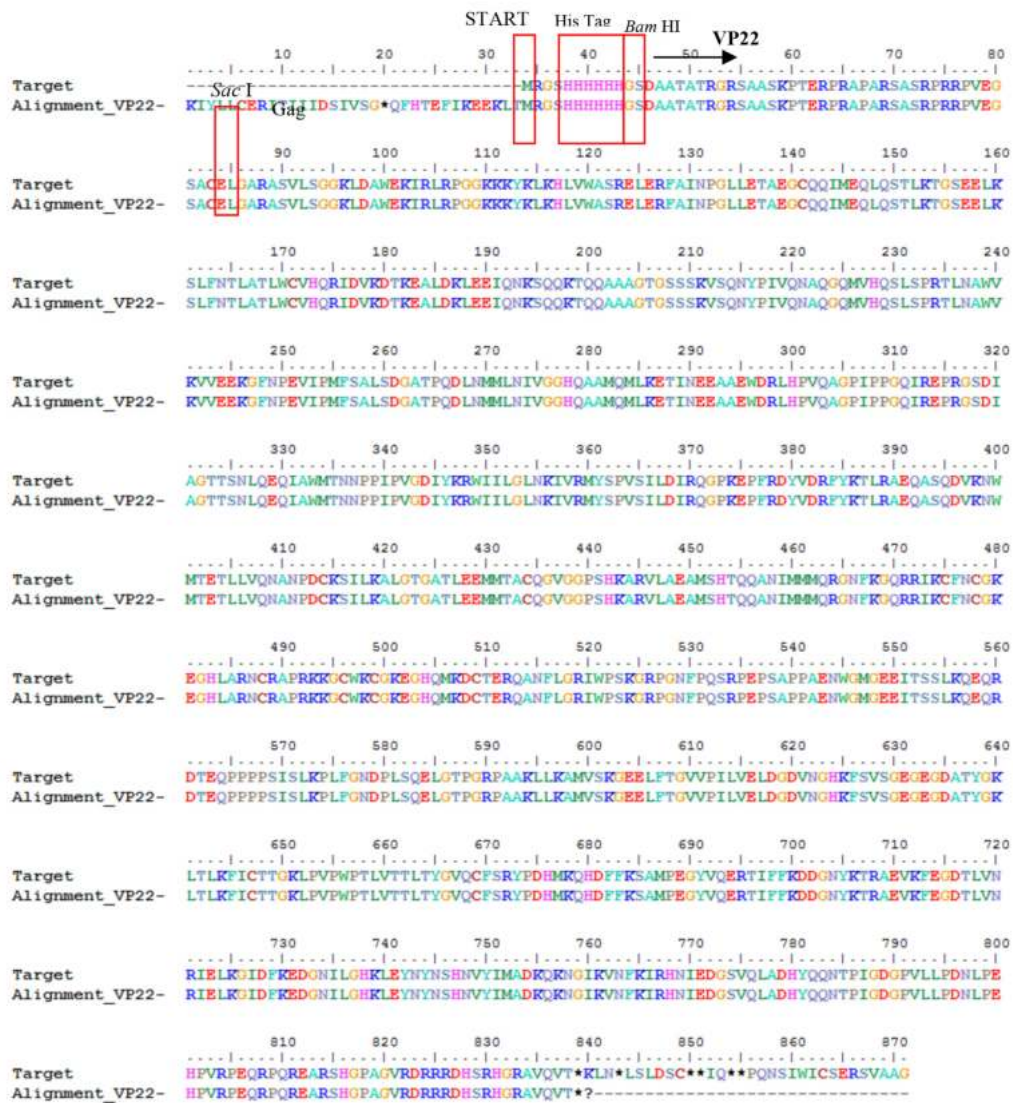
Gambar 2. Urutan Asam Amino Hasil Translasi Protein eGFP



Gambar 3. Hasil Translasi Protein GagHIV1-eGFP

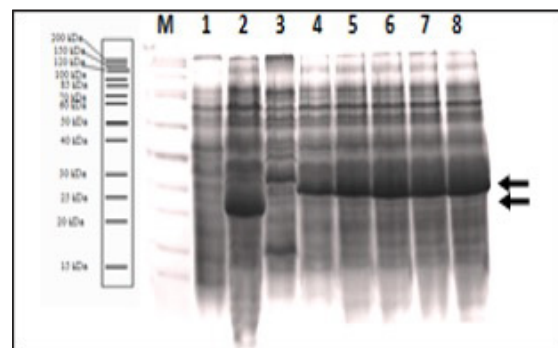


Gambar 4. Urutan Asam Amino Hasil Translasi Protein VP22-eGFP



Gambar 5. Urutan Asam Amino Hasil Translasi Protein VP22-Gag-eGF

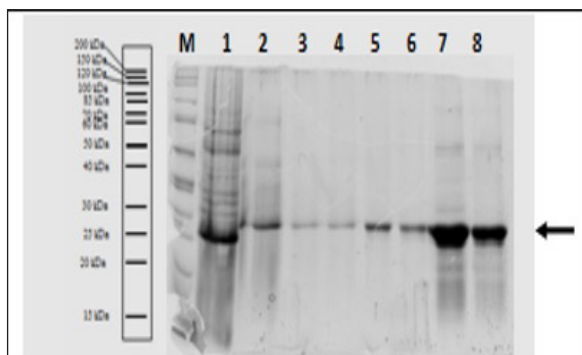
Berdasarkan hasil analisis SDS PAGE, protein rekombinan GagHIV1-eGFP, dan VP22-GagHIV1-eGFP belum berhasil diekspresikan oleh sel kompeten DH5α maupun BL21CP dengan konsentrasi IPTG, 0,2 mM, 0,5 mM, maupun 1 mM dan dengan suhu 27° C maupun 37° C. Plasmid rekombinan pengekspresi eGFP dan VP22-eGFP sudah berhasil diperoleh pada penelitian ini. Protein rekombinan eGFP dan VP22-eGFP dapat diekspresikan oleh sel kompeten DH5α maupun BL21CP dengan konsentrasi IPTG, 0,2 mM, 0,5 mM, maupun 1 mM dan dengan suhu 27° C maupun 37° C (Gambar 6).



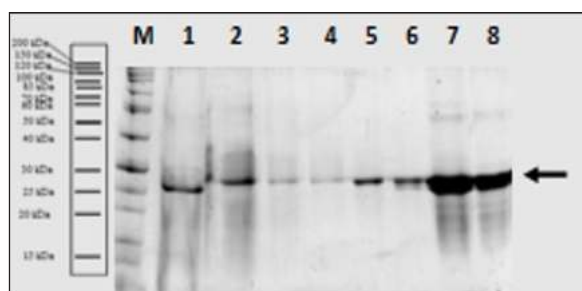
Gambar 6. Hasil Ekspresi Protein VP22-eGFP (31,38 kDa) Diinduksi dengan IPTG 1 mM. Lajur M: Marker Protein. Lajur 1: *E.coli* DH5a. Lajur 2: *E.coli* DH5a dengan pQE80L-eGFP (27,02 kDa). Lajur 3: *E.coli* DH5a dengan pQE-80L_{wt}. Lajur 4-8: *E.coli* DH5a dengan pQE80L-VP22-eGFP Induksi 0, 1, 2, 3, dan 4 jam.

Hasil Purifikasi Protein Rekombinan

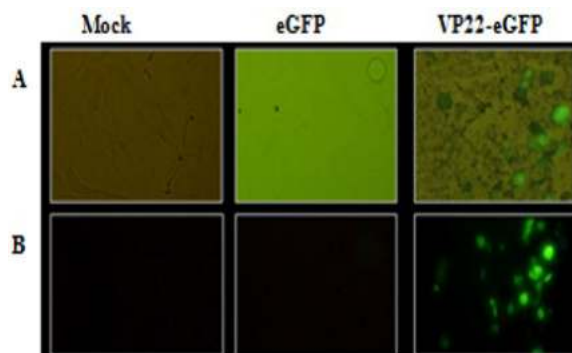
Hasil purifikasi protein eGFP dan VP22-eGFP rekombinan dapat dilakukan pada kondisi *denature* dengan konsentrasi imidazole 20 mM, dapat dilihat pada Gambar 7 dan 8.



Gambar 7. Hasil Purifikasi Protein eGFP (27,02 kDa.) Diinduksi dengan IPTG 1 mM. Lajur M: Marker Protein. Lajur 1: *Flowthrough* Proses *Binding* Ni-NTA. Lajur 2, 3, 4: Supernatan setelah Pencucian ke- 1, 2, dan 3 dengan Buffer C Lajur 5-6: Elusi ke-1 dan 2 dengan Buffer D; Lajur 7-8: Elusi ke-3 dan 4 dengan Buffer E.



Gambar 8. Hasil Purifikasi Protein VP22-eGFP (31,38 kDa). Diinduksi dengan IPTG 1 mM. Lajur M: Marker Protein. Lajur 1: *Flowthrough* Proses *Binding* Ni-NTA. Supernatan setelah Pencucian ke- 1, 2, dan 3 dengan Buffer C Lajur 5-6: Elusi ke-1 dan 2 dengan Buffer D; Lajur 7-8: Elusi ke-3 dan 4 dengan Buffer E.

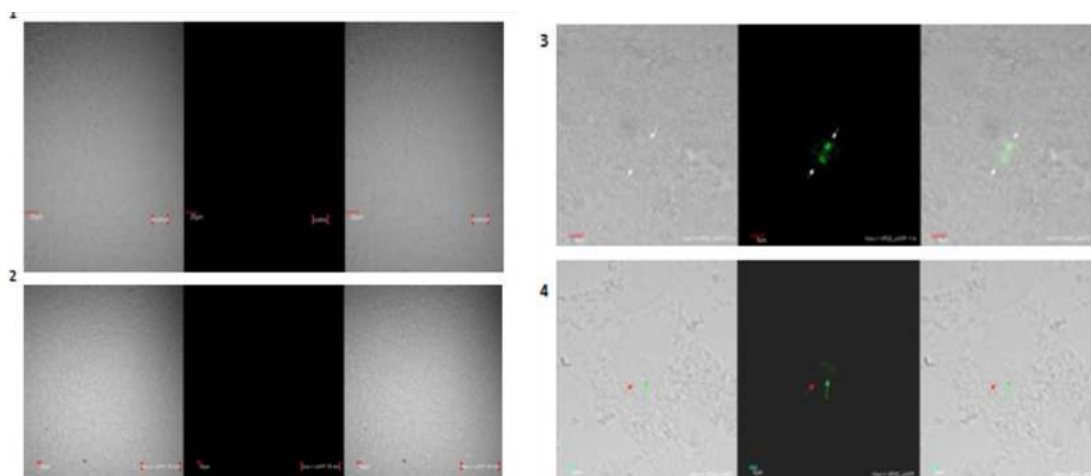


Gambar 9. Pengamatan Protein eGFP dan VP22-eGFP pada Sel Vero dengan Mikroskop Fluorescent Konvensional. A: Pengamatan dengan Gabungan Mikroskop Cahaya dan Fluoresen, B: Pengamatan dengan Sinar Fluoresen.

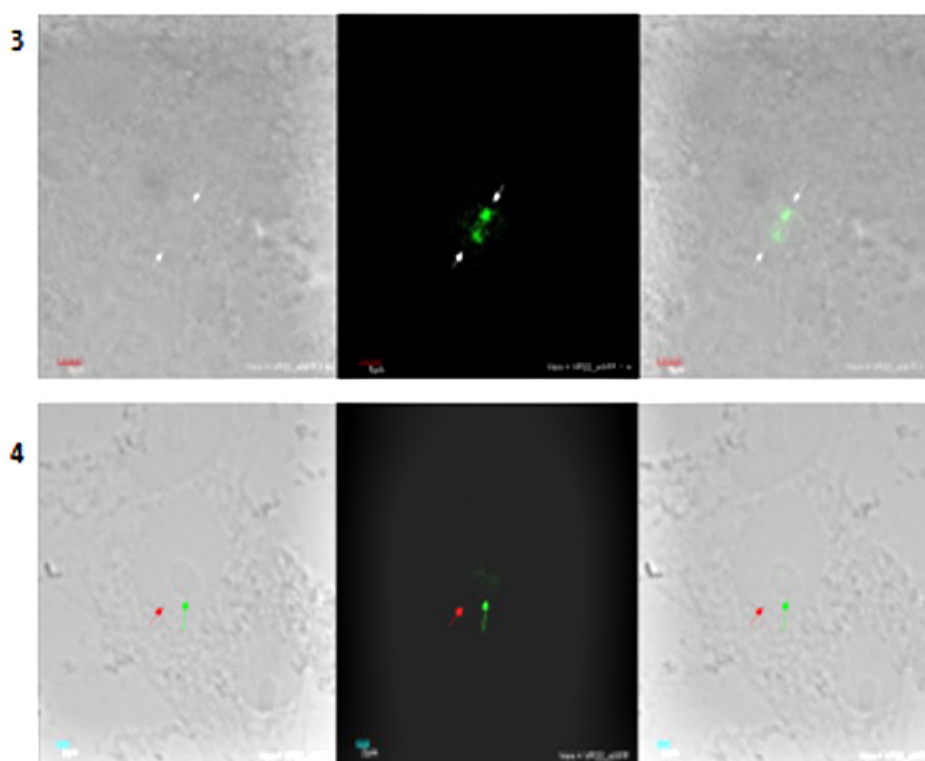
Analisis Fungsi VP22 pada Sel Vero

Protein eGFP dan VP22-eGFP pada sel vero berhasil diamati dengan mikroskop fluorescent konvensional. Sel berpendar hijau ditemukan setelah 1 jam protein rekombinan diinkubasi dengan kultur sel vero.

Pengamatan dengan mikroskop fluoresen belum memastikan bahwa pendaran eGFP berada di dalam sel. Ada kemungkinan protein eGFP hanya berada di permukaan sel. Lokalisasi protein eGFP pada sel vero perlu diamati dengan mikroskop konfokal. Hal ini dilakukan dengan melakukan pengamatan sel pada potongan longitudinal dari sel vero. Dengan demikian, dapat diketahui keberadaan protein di permukaan, sitoplasma, atau nukleus sel. Hasil pengamatan VP22-eGFP menunjukkan sel vero dengan pendaran hijau di sitoplasma dan nukleus. Sedangkan sel vero *mock* dan yang ditambahkan eGFP tidak ditemukan sel yang berpendar hijau. Hasil pengamatan dengan mikroskop konfokal dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Pengamatan ProteinVP22-eGFP dan eGFP pada Sel Vero dengan Mikroskop Konfokal. 1: Kontrol Sel Vero Tanpa Protein Rekombinan, 2: Sel Vero Ditambah dengan Protein Rekombinan eGFP, 3 dan 4: Sel Vero Ditambah dengan Protein Rekombinan VP22-eGFP. (Tanda Panah Menunjukkan Keberadaan eGFP di Sitoplasma (3) dan Nukleus (4)).



[Hasil Perbesaran Gambar 7. (3) dan (4)]

PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini, plasmid rekombinan pengeksresi GagHIV1-eGFP dan VP22-GagHIV1-eGFP belum berhasil diperoleh diekspresikan oleh sel kompeten DH5 α maupun BL21CP dengan konsentrasi IPTG, 0,2 mM, 0,5 mM, maupun 1 mM dan dengan suhu 27° C maupun 37° C.

Sebaliknya, eGFP dan VP22-eGFP sudah berhasil diperoleh dengan sel kompeten DH5 α maupun BL21CP dengan konsentrasi IPTG, 0,2 mM, 0,5 mM, maupun 1 mM dan dengan suhu 27° C maupun 37° C (Gambar 2). Hasil ini menunjukkan bahwa protein rekombinan eGFP (27,02 kDa) dan VP22-eGFP (31,38 kDa) relatif mudah untuk mengalami overekspresi saat diekspresikan pada strain *E.coli* walaupun tidak mengandung kodon tRNA tambahan seperti pada BL21CP.

Protein rekombinan Gag-eGFP (83,98 kDa) dan VP22-Gag-eGFP (88,08 kDa) belum berhasil diekspresikan dengan menggunakan strain *E. coli*. Hal tersebut kemungkinan karena ukuran protein cukup besar (> 60 kDa) sehingga tidak stabil diekspresikan. Berdasarkan hasil analisis SDS PAGE pita-pita protein yang diharapkan tidak dapat diamati. Optimasi untuk ekspresi kedua protein tersebut masih perlu dilakukan.

Upaya mengurangi ukuran protein rekombinan juga dapat dilakukan dengan membuat konstruksi tanpa eGFP. Protein VP22 berukuran sekitar 4 kDa ditambah dengan protein Gag HIV-1 berukuran sekitar 48 kDa sehingga total berukuran 52 kDa (< 60 kDa). Marker penanda pada mikroskop konfokal dapat dilakukan dengan penambahan antibodi spesifik (misal: antibodi HisTag) untuk mendeteksi keberadaan protein fusi VP22-GagHIV1 di sel vero.^{2,11}

Ekspresi protein eGFP dapat dilihat pada sel kultur hidup maupun lisat sel. Secara visual, koloni *E. coli* pada *plate* kultur, pelet dan lisat yang mengandung eGFP dan VP22-eGFP nampak lebih hijau dibandingkan *wild type*. Saat dipaparkan dengan sinar UV transiluminator, koloni *E. coli* pada *plate* kultur, pelet dan lisat yang mengandung eGFP dan VP22-eGFP nampak berpendar hijau (berfluoresensi) (Gambar tidak ditampilkan). Pada proses purifikasi protein

rekombinan eGFP (27,02 kDa) dan protein fusi VP22-eGFP (31,38 kDa) berhasil dilakukan dengan kondisi *denature* bukan *native*. Hal tersebut disebabkan karena berdasarkan hasil analisis SDS PAGE setelah sonikasi, protein target lebih banyak terdapat di pelet sel.⁹

Prosedur purifikasi protein dalam keadaan *denature* ini menggunakan *guanidine hydrochloride* untuk mendenaturasi protein. Protein yang terdenaturasi akan kehilangan kemampuan untuk membentuk struktur dua dimensi sehingga protein akan berada dalam keadaan linear. Dalam keadaan tersebut, peptida histidin yang difusikan pada bagian N-terminal protein rekombinan akan lebih mudah diakses oleh Ni-NTA.¹¹ Di sisi lain, jika protein dilisiskan dalam *buffer native* (tidak mengandung denaturan) maka protein akan membentuk lipatan-lipatan sesuai dengan lipatan (konformasi) protein yang kemungkinan dapat mengubah atau menutup akses 6x His Ni-NTA.^{3,11}

Optimasi purifikasi protein rekombinan dapat dilakukan dengan volume Ni-NTA yang berbeda-beda. Volume Ni-NTA yang semakin kecil diharapkan akan memperkecil ikatan tidak spesifik antara protein Ni-NTA dengan protein hospes karena diharapkan semua protein target rekombinan yang difusikan akan mengisi semua situs pengikatan pada Ni-NTA. Konsentrasi imidazole 20 mM dapat mengurangi ikatan nonspesifik yang dapat terjadi antara Ni-NTA dengan protein kontaminan yang mengandung residu Histidin. Purifikasi pada kondisi *denature* dilakukan dengan proses denaturasi protein-protein yang diekspresikan oleh *E.coli*. Hal tersebut mengakibatkan tingginya jumlah protein yang tampak pada proses pencucian pertama (pada lajur 2). Seluruh prosedur purifikasi kondisi *denature* ini dilakukan pada suhu \pm 4° C untuk mencegah terjadinya denaturasi protein sehingga hasil purifikasi dapat lebih optimal. Konsentrasi garam yang digunakan selama langkah *binding* dan *washing* adalah 300 mM NaCl untuk memastikan kekuatan ion dari buffer yang digunakan.^{9,11}

Plasmid rekombinan pQE80L-eGFP dan pQE80L-VP22-eGFP berpotensi untuk pengembangan vaksin terhadap virus lainnya, dengan target vaksin sub-unit yang bersifat

eksogen yang juga ingin dijadikan endogen.^{3,7} Sebelum diujicobakan secara *in vivo* (dengan hewan percobaan), penelitian secara *in vitro* dengan analisis lokalisasi pada kultur sel eukariot penting dilakukan terlebih dahulu untuk meminimalkan dan mengefektifkan jumlah hewan coba yang digunakan dalam penelitian.^{1,12,13}

Berdasarkan analisis dengan mikroskop fluoresens menunjukkan bahwa protein VP22-eGFP dapat masuk ke dalam sel vero setelah waktu inkubasi satu jam (berpendar hijau) (Gambar 5). Protein eGFP dengan VP22 kemungkinan masuk melalui membran lipid bilayer sel melalui muatan positif lokal dari VP22 sehingga menghasilkan momentum yang mengarahkannya masuk ke sitoplasma.^{6,14} Protein eGFP tersebut kemungkinan juga dapat masuk melalui mekanisme endositosis, namun hal ini masih perlu dibuktikan dan fenomena ini jarang terjadi.^{7,8,12,15}

Inkubasi 6 jam pada kultur sel vero yang ditambahkan protein rekombinan VP22-eGFP, menunjukkan intensitas fluoresens yang lebih tinggi dibandingkan 1 jam. Pada waktu inkubasi 24 jam, masih terdapat sel yang berpendar hijau, meskipun intensitasnya nampak melemah. Hal ini menunjukkan bahwa protein GFP kemungkinan belum dihancurkan oleh proteosom sel vero.^{12,15}

Analisis dengan mikroskop konfokal menunjukkan tidak ditemukan sel yang berfluoresens pada sel vero kontrol eGFP, pada waktu inkubasi 15 menit, 30 menit, 1 jam, 6 jam, maupun 24 jam. Hal ini menunjukkan bahwa protein eGFP tidak masuk ke dalam sel jika tidak difusikan dengan VP22. Sedangkan pada sel vero yang ditambahkan protein VP22-eGFP dapat diamati sel vero yang berpendar pada *slide* kultur dengan waktu inkubasi 1 jam, 6 jam dan 24 jam.

Pengamatan dari waktu inkubasi 1 jam, dengan mikroskop konfokal juga ditemukan pendaran hijau di inti sel. Hal ini menunjukkan bahwa protein VP22 tidak hanya mampu berpenetrasi dan melakukan transduksi protein ke sitoplasma tetapi juga ke inti sel.^{5,8,12} Mekanisme VP22 berpenetrasi ke dalam sel kemungkinan juga disebabkan oleh *signal peptide* terhadap inti sel. Protein VP22-Gag-eGFP yang diekspresikan diharapkan berukuran 88 kDa. Protein VP22

mampu mengangkut protein dengan ukuran hingga 120 kDa. Oleh karena itu, apabila protein VP22-Gag-eGFP berhasil diekspresikan maka protein tersebut diharapkan juga dapat masuk ke dalam sitoplasma sel.^{12,15}

Potensi Pengembangan Vaksin

Selain vaksin Gag HIV1, plasmid rekombinan pQE80L-eGFP dan pQE80L-VP22-eGFP pada penelitian ini juga berpotensi digunakan sebagai vektor dalam pengembangan vaksin sub unit virus lainnya yang bersifat eksogen untuk diubah menjadi endogen. Vaksin endogen diharapkan dapat menstimulus respon imun sel T CD8+ (sitotoksik). Antigen yang masih bersifat eksogen kemungkinan dapat diubah menjadi endogen (intraseluler) apabila dibantu masuk oleh VP22 atau *protein delivery* lainnya.¹⁵⁻¹⁷ Apabila antigen masuk ke sitoplasma sel maka akan diubah menjadi fragmen peptida kecil oleh proteosom. Fragmen ini kemudian diangkut ke lumen retikulum endoplasma (ER) membentuk kompleks dengan molekul MHC-I dan selanjutnya dipresentasikan ke permukaan sel dan dikenali oleh sel T. Molekul MHC-I yang berikatan dengan peptida Gag diharapkan dikenali oleh sel T CD8+ sehingga terbentuk T CD8+ efektor dan T CD8+ memori.^{14,18}

Sel T CD8+ efektor tersebut pada pengembangan vaksin diharapkan bersifat terapeutik dengan mengenali antigen HIV-1 dan melakukan respon sel T sitotoksik terhadap sel yang terinfeksi.¹⁸ Vaksin protein Gag endogen tidak menginduksi antibodi netralisasi namun tetap berperan sebagai antigen profilaksis karena menginduksi sel T CD8+ memori. Kondisi tersebut diharapkan dapat lebih efektif untuk mencegah penyebaran infeksi virus HIV-1.¹⁶⁻¹⁸

KESIMPULAN

Protein rekombinan VP22-eGFP pada penelitian ini terbukti dapat masuk ke sitoplasma dan inti sel vero. Selain antigen Gag HIV1, plasmid rekombinan ekspresi protein VP22 pada penelitian ini juga berpotensi digunakan sebagai *'tools'* dalam pengembangan vaksin sub unit eksogen lainnya untuk diubah menjadi bersifat endogen.

SARAN

Penelitian selanjutnya, ukuran total protein yang dihasilkan sebaiknya tidak lebih dari 60kDa. Untuk itu, ukuran antigen yang digunakan dapat dikurangi supaya stabil dapat diekspresikan di sistem ekspresi *E.coli*. Upaya mengurangi ukuran protein rekombinan juga dapat dilakukan dengan membuat konstruksi tanpa eGFP.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada dr. Fera Ibrahim, M.Sc, Phd, Sp.MK (K) selaku direktur Pusat Riset Virologi dan Kanker Patobiologi (PRVKP) FKUI-RSCM, Dr.Budiman Bela, Sp.MK (K) dan Dr.drh. Silvia Tri Widyaningtyas, M.Biomed atas bimbingan penelitian yang diberikan serta kepada Kementerian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi yang telah memberikan dana penelitian melalui program Insentif Riset Sistem Inovasi Nasional (INSINAS).

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. Global Report UNAIDS Report on the Global AIDS Epidemic 2020. Switzerland: 2013. Available from: <http://unaids.org>
2. Balachandran A, Cochrane A. Screening for Small Molecule Inhibitors of HIV-1 Gag Expression. *Methods*. 2017;126:201-208.
3. Cervera L, Gòdia F, Tarrés-Freixas F, et al. Production of HIV-1-based virus-like Particles for Vaccination: Achievements and Limits. *Appl MicrobiolBiotechnol*. 2019;103(18):7367-7384.
4. Sabo Y, de los Santos K, Goff SP. IQGAP1 Negatively Regulates HIV-1 Gag Trafficking and Virion Production. *CellRep*. 2020;30(12):4065-4081.e4.
5. Gabanyi I, Lojudice FH, Kossugue PM, Rebelato E, Demasi MA, Sogayar MC. VP22 Herpes Simplex Virus Protein can Transduce Proteins Into Stem Cells. *Brazilian J Med Biol Res*. 2013;46(2):121-127.
6. Bolhassani A, Gholami E, Zahedifard F, et al. Leishmania major: Protective Capacity of DNA Vaccine using Amastin Fused to HSV-1 VP22 and EGFP in BALB/c mice model. *ExpParasitol*. 2011;128(1):9-17.
7. Perkins SD, Hartley MG, Lukaszewski RA, Phillpotts RJ, Stevenson FK, Bennett AM. VP22 Enhances Antibody Responses from DNA Vaccines but not by Intercellular Spread. *Vaccine*. 2005;23(16):1931-1940.
8. Okada A, Kodaira A, Hanyu S, Izume S, Ohya K, Fukushi H. Intracellular Localization of Equine Herpesvirus Type 1 Tegument Protein VP22. *Virus Res*. 2014;192:103-113.
9. Schatz M, Tong PBV, Beaumelle B. Unconventional Secretion of Viral Proteins. *Semin Cell Dev Biol*. 2018;83:8-11.
10. Kang Z, Ding G, Meng Z, Meng Q. The Rational Design of Cell-Penetrating Peptides for Application in Delivery Systems. *Peptides*. 2019;121(August):170149.
11. Novex. Life Technologies. Ni-NTA Purification System. 2006
12. Zhang Y, Røise JJ, Lee K, Li J, Murthy N. Recent Developments in intracellular Protein Delivery. *Curr Opin Biotechnol*. 2018;52:25-31.
13. Ulasov A V., Rosenkranz AA, Sobolev AS. Transcription factors: Time to Deliver. *J Control Release*. 2018;269(September 2017):24-35.
14. Robert MA, Lytvyn V, Deforet F, Gilbert R, Gaillet B. Virus-Like Particles Derived from HIV-1 for Delivery of Nuclear Proteins: Improvement of Production and Activity by Protein Engineering. *Mol Biotechnol*. 2017;59(1):9-23.
15. Grau M, Walker PR, Derouazi M. Mechanistic Insights into the Efficacy of cell Penetrating Peptide-Based Cancer Vaccines. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(16):2887-2896.
16. Abdulla F, Adhikari UK, Uddin MK. Exploring T & B-cell Epitopes and Designing Multi-Epitope Subunit Vaccine Targeting Integration Step of HIV-1 Lifecycle Using Immunoinformatics Approach. *MicrobPathog*. 2019;137(January):103791.
17. Sun P, Crum-Cianflone NF, Defang G, et al. Evaluation of T and B Memory Cell Responses Elicited by the Pandemic H1N1 Vaccine in HIV-Infected and HIV-uninfected Individuals. *Vaccine*. 2017;35(45):6103-6111.
18. Murakoshi H, Zou C, Kuse N, et al. CD8+ T Cells Specific for Conserved, Cross-Reactive Gag Epitopes with Strong Ability to Suppress HIV-1 Replication. *Retrovirology*. 2018;15(1):1-14.