

PENGEMBANGAN ANTIVIRUS HUMAN PAPILLOMA VIRUS BERBASIS MOLEKUL KECIL

Dwi Wulandari¹, T. Mirawati Sudiro²

Abstrak

Sekalipun telah ada program skrining deteksi dini infeksi HPV maupun kanker serviks serta adanya dua vaksin yang telah berlisensi, sekarang ini belum ada obat antivirus yang efektif. Prospek pengembangan molekul kecil inhibitor sebagai antivirus HPV sangat menjanjikan. Modulasi interaksi antara protein-protein virus atau protein virus dengan protein hospes menjadi strategi dalam upaya pengembangan molekul inhibitor sebagai antiviral HPV. Hal ini didukung oleh kemajuan pengetahuan mengenai fungsi protein HPV yang terlibat dalam siklus hidupnya diantaranya yaitu protein E1, E2, E6 dan E7. Beberapa kandidat antivirus telah ditemukan dan masih dalam penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan senyawa turunan dengan aktivitas yang lebih tinggi diantaranya asam bifenil sulfonasetat (inhibitor ATPase E1), Indandione dan repaglinide (inhibitor interaksi E1-E2) dan senyawa-senyawa lainnya.

Kata kunci: HPV, antivirus, molekul kecil, inhibitor

Abstract

Eventhough there has been screening programs for HPV infection and cervical cancer as well as the two vaccines that have been licensed, currently there is no effective cure for HPV. The prospects of the development of small molecule inhibitors as HPV antiviral is very promising. Development strategy was based on the modulation of interactions between viral proteins or viral proteins with host proteins. This is supported by the advances in knowledge about HPV's protein functions involved in their life cycle such as E1, E2, E6 and E7 proteins. Some antiviral molecule candidates have been found and need further studies to obtain derivatives with higher activity including acid biphenyl sulfonasetat (inhibitor ATPase E1), Indandione & repaglinide (inhibitor interaction E1-E2), etc.

Keywords: HPV, antiviral, small molecule, inhibitor

Afiliasi penulis: 1. Puslit Bioteknologi-LIPI, 2. Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Korespondensi: Dwi Wulandari, Puslit Bioteknologi-LIPI, Jl. Raya Bogor Km. 46 Cibinong Bogor, Email: wulandedy@yahoo.com/ tjahjanims@cbn.net.id

PENDAHULUAN

Human papilloma virus (HPV) adalah virus yang menginduksi lesi hiperproliferasi tumor jinak dan ganas dari epitel kulit dan mukosa yang berdiferensiasi. HPV resiko tinggi telah dinyatakan sebagai agen penyebab terjadi kanker serviks saat ini. Meskipun infeksi HPV sangat umum, sebagian besar infeksi secara spontan tereliminasi dengan berjalannya waktu. Namun, dalam beberapa kasus infeksi akan bertahan menjadi infeksi yang persisten, dan menjadi faktor risiko perkembangan menuju karsinogenesis.¹

Kanker serviks masih merupakan penyebab utama kedua kematian terkait kanker pada wanita di seluruh dunia. WHO melaporkan pada tahun 2010, diperkirakan 529.828 wanita didiagnosis menderita kanker serviks dan 275.128 meninggal tiap tahun. Beban yang lebih besar infeksi HPV berada di negara berkembang dan menyumbang sekitar 83% dari semua kasus baru. Hal ini disebabkan karena kurangnya program skrining yang memadai.^{2,3} Indonesia termasuk negara berkembang, dimana diperkirakan sekitar 13.762 perempuan didiagnosis kanker serviks dan 7493 meninggal. Kanker serviks merupakan kanker yang paling umum ketiga di kalangan perempuan di Indonesia, dan kanker paling umum kedua di antara perempuan usia 15-44 tahun.²

Skrining deteksi dini dengan memakai metode *Pap smear* dinyatakan dapat menurunkan tingkat kematian yang disebabkan kanker serviks. Berbagai metode untuk deteksi genotip HPV pada pasien juga telah dikembangkan sehingga dapat diketahui ada tidaknya infeksi baik HPV resiko tinggi maupun rendah bahkan sebelum terjadi kelainan sitologi. Selain itu, produk komersil vaksin profilaksis HPV yang telah disetujui oleh FDA pada bulan Juni 2006, yaitu Gardasil® dan Cervarix™ telah terbukti cukup efektif dalam mencegah infeksi. Gardasil® diproduksi oleh Merck and Co Inc untuk pencegahan infeksi HPV 6, -11 -16, dan -18 dan Cervarix™ oleh Glaxo Smith Kline untuk pencegahan infeksi HPV -16 dan -18.^{3,4}

Sayang sekali vaksin tersebut tidak menawarkan perlindungan terhadap semua jenis HPV serta tidak berfungsi terapeutik pada pasien yang sudah terinfeksi³, sementara infeksi HPV dan penyakit ganas

yang terkait masih cukup tinggi dan belum ada antivirus yang efektif yang tersedia untuk terapi. Pendekatan terapi saat ini biasanya ditujukan pada penghapusan lesi HPV dengan bedah eksisi atau *cryotherapy* yang invasif. Sejumlah perawatan non-bedah telah disetujui, termasuk aplikasi topikal klinis atau podofilin imiquimod untuk pengobatan kutil kelamin. Namun, karena adanya persistensi virus dan efikasinya yang terbatas serta tidak spesifik, maka tingkat kekambuhan cukup tinggi, terutama untuk pasien dengan defisiensi imunologi.⁵ Artikel ini meninjau kemajuan terakhir perkembangan agen antivirus baru untuk pengobatan infeksi HPV.

METODE

Artikel ini ditulis berdasarkan hasil penelusuran dan review kepustakaan mengenai agen antivirus baru untuk pengobatan infeksi HPV. Penelusuran ditekankan pada identifikasi molekul kecil inhibitor yang secara khusus mempunyai target menghambat fungsi protein penting dari HPV dan interaksi protein virus dengan hospes.

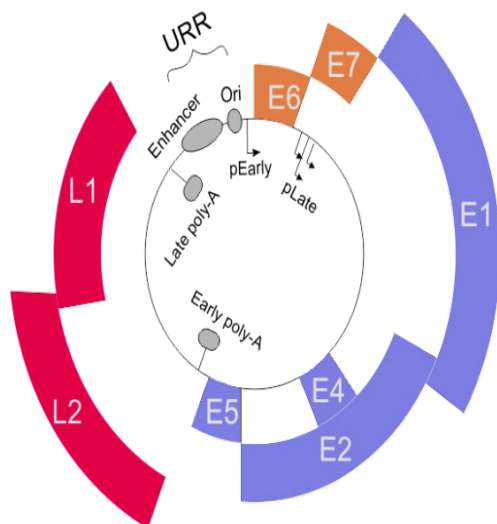
HASIL DAN PEMBAHASAN

HPV merupakan virus DNA dari golongan ordo *Papillomavirales* dan famili *Papillomaviridae*, memiliki struktur ikosahedral terdiri atas 72 kapsomer, tidak memiliki envelop dan berdiameter 55nm. HPV memiliki genom DNA untai ganda sirkuler berukuran kira-kira 7900 bp dan bereplikasi di dalam nukleus sel hospes.⁶

Untuk saat ini, lebih dari 150 tipe HPV yang berbeda telah diidentifikasi termasuk sekitar 30 sampai 40 spesies yang menginfeksi mukosa pada saluran anogenital, menyebabkan berbagai gangguan mulai dari kutil kelamin hingga kanker yang invasif. HPV tipe onkogenik atau risiko tinggi seperti HPV -16, -18, -31, -33 atau -45 ditetapkan sebagai agen penyebab kanker serviks. Selain itu HPV resiko tinggi juga terlibat dalam perkembangan kanker saluran kelamin lainnya serta kanker kepala dan leher. Diantara HPV tipe onkogenik, HPV16 adalah penyebab yang paling umum untuk lebih dari 50% lesi kanker dan prekursor kanker. HPV resiko rendah seperti HPV6 dan -11 terkait dengan kondisi patologis tertentu yaitu kondiloma anogenital atau kutil kelamin jinak, serta papillomatosis laring.⁶

Organisasi genom papilloma virus cukup stabil (lestari). Genome HPV terdiri atas tiga domain utama yaitu gen *early* (E1, E2, E4, E5, E6 dan E7) dan gen *late* (L1 dan L2) serta fragmen LCR (*long control region*) yang sering disebut juga *Upstream Regulatory Region* (URR) dapat dilihat pada Gambar 1. Setiap gen mempunyai peran masing-masing sesuai dengan tahap perkembangan virus mulai dari inisiasi infeksi hingga munculnya partikel HPV lengkap yang baru (Tabel 1). Gen *early* (E) mempunyai fungsi pada tahap awal infeksi mengkode protein regulator untuk replikasi virus dan transkripsi, selain itu mengontrol siklus sel, berkontribusi terhadap transformasi. Gen *late* (L) mengkode protein kapsid, berfungsi pada tahap akhir hingga pembentukan kapsid dan partikel virus lengkap, sedangkan LCR berisi sebagian besar urutan DNA regulator yang diperlukan untuk replikasi genom virus dan untuk ekspresi gen virus, termasuk *ori* dari replikasi DNA, *enhancer* dan domain promoter.⁷

Pengetahuan mengenai berbagai tahapan dari siklus hidup virus HPV telah diketahui dengan baik dan sangat penting sebagai dasar molekuler untuk pengembangan dan evaluasi senyawa anti-virus HPV.



Gambar 1. Genom HPV. *Ori* (*replication origin*) dan Beberapa Elemen Regulator Transkripsi Ditemukan pada URR pEarly= Promoter Early, PLate= Promoter Late, E= Early, L= Late.

Tabel 1. Fungsi Masing-Masing Protein HPV

Jenis Protein	Fungsi
E6	Onkoprotein
E7	Onkoprotein
E1	Helikase DNA, replikasi DNA virus
E2	Kontrol transkripsi, penarikan pisom, replikasi DNA virus
E4	Amplifikasi genom, interaksi dengan sitoskeleton/keratin
E5	Amplifikasi genom, proliferasi seluler
L2	Protein kapsid minor
L1	Protein kapsid mayor

Infeksi produktif HPV bersandar pada program diferensiasi seluler dari keratinosit menuju epitel. Virion HPV menginfeksi sel-sel epitel di lapisan basal, DNA beruntai ganda dari genom virus dipertahankan sebagai elemen ekstra kromosomal yang bereplikasi secara otonom yaitu episomes di dalam inti sel yang terinfeksi. Setelah masuk ke sel epitel basal, virus memanfaatkan mesin replikasi seluler untuk sintesis DNA virus dengan level rendah dengan jumlah salinan 50-100 episom per sel. Setelah sel yang terinfeksi berdiferensiasi, replikasi produktif terjadi sehingga genom virus diamplifikasi lebih dari 1000 kopi dan ekspresi protein kapsid diinduksi untuk sintesis virion infeksius yang kemudian dilepaskan bersama lepasnya sel-sel epitel. Replikasi episom HPV tergantung pada faktor sel host yang diekspresikan pada fase-S, dengan demikian tidak secara normal disintesis pada saat diferensiasi keratinosit pasca mitosis. HPV memproduksi onkoprotein E6 dan E7 yang masing-masing menghambat p53 dan retinoblastoma (Rb) sehingga menstimulasi keratinosit yang berdiferensiasi untuk masuk kembali ke dalam fase-S.⁸

Kandidat senyawa inhibitor anti HPV

1. Inhibitor interaksi E1-E2

Selain memanfaatkan mesin replikasi seluler, replikasi genom HPV memerlukan

protein virus yaitu E1 dan E2. Protein E1 berisi tiga domain fungsional: C-terminal ATPase/domain helikase ber-oligomerisasi menjadi hexamers, domain pengikatan *ori*-DNA (origin DNA-binding Domain=OBD), dan domain N-terminal yang penting untuk replikasi. Lebih khusus, domain N-terminal berisi urutan yang lestari untuk *nuclear localization* (NLS) dan *nuclear export* (NES). Sehingga, fungsi E1 selain sebagai protein pengikat DNA dan mengenali *ori* virus juga sebagai enzim helikase untuk membuka untai ganda DNA pada garpu replikasi.⁹

E2 adalah protein yang mengikat secara spesifik pada daerah regulasi genom virus untuk mempromosikan replikasi DNA. Protein E2 memiliki dua domain fungsional: *N-terminal transactivation domain* (TAD) yang terlibat dalam regulasi transkripsi dan berinteraksi dengan E1, dan *C-terminal domain DNA-binding/dimerization* (DBD). Kedua domain dipisahkan oleh sebuah domain engsel (Hinge/H) dengan fungsi yang belum diketahui.¹⁰

Replikasi DNA virus diinisiasi dengan rekrutmen E1 oleh protein E2 pada sekuen daerah *ori* pada gen LCR virus sehingga terbentuk kompleks heksamer ganda yang selanjutnya akan membuka untai ganda DNA dan terjadi replikasi dua arah.¹¹ Interaksi E1-E2 ini merupakan interaksi antara TAD E2 dan *C-terminal* domain ATP-ase E1. Interaksi protein-protein atau protein-DNA pada *ori* dapat menjadi target untuk pengembangan inhibitor sebagai antiviral untuk terapi lesi HPV. Penelitian White et al, memperlihatkan molekul kecil bernama indandion secara spesifik menghambat interaksi protein E1-E2 dengan berikatan pada domain TAD E2. Molekul ini merupakan hasil skrining dari 100.000 senyawa kimia dan sekarang ini sedang dilakukan penelitian untuk mendapatkan senyawa analog yang lebih aktif untuk menghambat perakitan kompleks E1-E2-*ori* DNA.¹²

Skrining senyawa lain juga telah dilakukan untuk menemukan senyawa inhibitor interaksi E1-E2 yang *reversible*. Studi modeling menunjukkan bahwa inhibitor turunan repaglinida membentuk interaksi yang lebih lemah dengan TAD E2 tetapi menduduki porsi yang lebih luas pada kantong ikatan inhibitor dibandingkan indandion. Hal ini menunjukkan bahwa molekul kecil ini mampu menghambat interaksi protein-

protein yang relatif besar. Interaksi E1-E2 ini cukup lestari diantara HPV mukosa dan HPV kulit sehingga senyawa antiviral yang bersifat antagonis terhadap interaksi E1-E2 akan efektif melawan infeksi terhadap berbagai tipe HPV yang berbeda.¹⁰

2. Inhibitor ATPase E1

HPV tidak memiliki enzim yang umumnya menjadi target oleh agen anti-virus yang tersedia saat ini, seperti protease dan polimerase. E1 adalah satu-satunya produk gen yang berupa enzim dengan aktivitas ATPase dan helikase. Aktivitas ATPase dan helikase terletak pada domain C-terminal E1, domain yang sama untuk pengikatan E2. White et al, menunjukkan bahwa ikatan E2 menghambat aktivitas ATPase E1, sebaliknya ATP melemahkan interaksi E1-E2 dan mengganggu ikatan E1-E2 pada *ori*. Dengan demikian, gangguan pengikatan ATP dan aktivitas ATPase akan menghambat replikasi DNA HPV.¹³

Molekul kecil inhibitor dengan target aktivitas ATPase dari HPV6 E1 yang telah diidentifikasi melalui skrining dari 500.000 senyawa kimia. Molekul utama terdiri dari analog asam biphenylsulfon-asetat ditandai oleh ada kelompok bifenil tersubstitusi asam sulfonil asetat. Studi kinetik menunjukkan adanya kompetisi melalui mekanisme alosterik terhadap situs yang pengikatan ATP pada domain ATPase E1.¹⁴

3. Inhibitor ikatan E2 pada protein seluler

Bromodoamin4 (Brd4) merupakan salah satu protein yang banyak dipelajari sebagai target anti kanker dan antivirus. Brd4 mengikat E2 baik pada HPV resiko tinggi maupun rendah untuk penambatan episom virus pada benang spindel saat mitosis sehingga semua sel anak akan memiliki episom. Hal ini penting untuk pemeliharaan episom dan regulasi transkripsi onkogen virus. Penghambatan interaksi Brd4-E2 merupakan target obat yang potensial dan dilaporkan bahwa JQ1 dapat menggantikan Brd4 dari kromatin.⁵

4. Inhibitor E6-E6AP

Eksresi E6 dan E7 diregulasi/direpresi oleh E2 selama siklus hidup virus.

Perkembangan kanker terjadi integrasi genom virus yang menyebabkan delesi ORF E2 sehingga protein E2 tidak diekspresikan dan terjadi overekspresi protein E6 dan E7. Baik E6 dan E7 ini berperan dalam proses immortalisasi keratinosit yang menginduksi karsinogenesis. Protein E6 dari HPV16 dan 18 ini akan menginaktivasi produk gen supresor tumor p53 dengan membentuk suatu kompleks yang mengaktifasi ubiquitinasi dari p53 dan menyebabkan degradasi p53. Hal ini menyebabkan sel terus membelah dan sel menjadi abnormal. Sedangkan protein E7 akan mengikat pRb yang membentuk kompleks dengan faktor transkripsi E2F. Hal ini menyebabkan E2F terlepas sehingga dapat berinteraksi dengan gen promotor yang diperlukan untuk memasuki fase S. Protein E7 juga dapat menginduksi degradasi pRb sehingga menginaktivasi fungsinya secara total. Proses ini akan menstimulasi proliferasi yang tidak terkontrol sehingga berubah menjadi karsinoma.¹⁵

E6 dan E7 diduga memanfaatkan sistem ubiquitin proteasome untuk proses degradasi dan inaktivasi protein seluler

yang menjadi target. E6 berikatan dengan protein ligase ubiquitin E3 seluler (E6AP), membentuk kompleks E6/-E6AP yang mampu mengikat p53 dan menginduksi ubiquitinasi spesifik kemudian p53 didegradasi oleh proteasome.¹⁶

Berdasarkan uraian diatas maka inhibisi degradasi p53 oleh E6 ataupun inhibisi interaksi Rb dengan E7 berpotensi sebagai antiviral HPV yang efektif. Sekalipun ada beberapa kandidat inhibitor yang cukup berpotensi, tetapi masih sangat jauh untuk sampai pada studi klinik.¹⁰

SIMPULAN

Beberapa kandidat antivirus telah ditemukan dan masih dalam penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan senyawa turunan dengan aktivitas yang lebih tinggi diantaranya Indandione dan repaglinide (inhibitor interaksi E1-E2), asam bifenil sulfonasetat (inhibitor ATPase E1), inhibitor ikatan E2 pada protein seluler, dan inhibitor E6-E6AP.

DAFTAR RUJUKAN

1. Bodily J, Laimins LA. Persistence of human papilloma virus infection: keys to malignant progression. *Trends Microbiol* 2011;19(1):33-9.
2. WHO. Information centre on HPV and cancer. Diakses dari <http://www.who.int/hpvcentre/en/>, tanggal 27 Oktober 2011.
3. Chaudhary A, Pandya S, Mehrotra R, Bharti AC, Singh M, Singh M. Comparative study between the Hybrid Capture II test and PCR based assay for the detection of human papillomavirus DNA in oral submucous fibrosis and oral squamous cell carcinoma. *Virol J* 2010;7(253):1-10.
4. Hung C, Ma B, Monie A, Tsen S, Wu T. Therapeutic human papillomavirus vaccines: current clinical trials and future directions. *Expert Opin Biol Ther* 2008;8(4):421-39.
5. Stanley MA. Genital human papilloma virus infections: current and prospective therapies. *J Gen Virol* 2012;93:681-91.
6. Novel S, Nuswantara S, Safitri R. Kanker serviks dan infeksi Human Papillomavirus (HPV). Jakarta; Java Media Network 2010.
7. Mc Cance D. Human tumor viruses. Washington D.C; ASM Press 1998.
8. Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papilloma viruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68(2):362-72.
9. Abbate EB, Berger JM, Botchan MR. The X-ray structure of the papillomavirus helicase in complex with its molecular matchmaker E2. *Genes Dev* 2004;18(16):1981-96.
10. D'Abramo CM, and Archambault J. Small molecule Inhibitors of human papilloma virus protein-protein interactions. *Open Virol J* 2011;5:80-95.
11. Masterson PJ, Stanley MA, Lewis AP, Romanos MA. A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit. *J Virol* 1998; 72:7407-19.
12. White PW, Titolo S, Brault K, et al. Inhibition of human papillomavirus DNA replication by small molecule antagonists

- of the E1-E2 protein interaction. *J Biol Chem* 2003;278:26765–72.
13. White PW, Pelletier A, Brault K, et al. Characterization of recombinant HPV 6 and 11 E1 helicases: effect of ATP on the interaction of E1 with E2 and mapping of a minimal helicase domain. *J Biol Chem* 2001;276:22426–38.
 14. White PW, Faucher AM, Massariol MJ, Welchner E, Rancourt J, Cartier M, Archambault. Biphenylsulfon-acetic acid inhibitors of the human papilloma virus type 6 E1 helicase inhibit ATP hydrolysis by an allosteric mechanism involving tyrosine 48. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(12):4834–42.
 15. Hebner CM, Laimins LA. Human papilloma viruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol* 2006;16:83–97.
 16. Talis AL, Huibregtse JM, Howley PM. The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papilloma virus (HPV)-positive and HPV-negative cells. *J Biol Chem* 1998;273:6439-45.