Penyusunan ulang asam amino protein Early (E) 7 Human Papillomavirus tipe 16 untuk meningkatkan keamanan vaksin terapeutik

Fera Ibrahim[1,2*], Sofy Meilani[2], Dicky Mahardhika Taryono[3], Silvia Tri Widyaningtyas[2], Budiman Bela[1,2]

[1.] Departemen Mikrobiologi Klinik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia – RSUPN Dr. Cipto Mangunkusumo, Jakarta, Indonesia
[2.] Pusat Riset Virologi dan Kanker Patologi (PRVKP), Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia – RSUPN Dr. Cipto Mangunkusumo, Jakarta, Indonesia
[3.] Program Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

*E-mail: feraib@yahoo.fr

Abstract

The Early (E) 7 protein of Human Papillomavirus 16 (HPV16) is an important transformation agent that plays a role in the progression of HPV infection to the invasive lesion, cervical cancer. The HPV16 E7 protein has a significant assignment in the activation of CD8 to destroy the cancer cells. Nevertheless, E7 protein has a domain that can activate the protooncogenes pRB. To increase the safety of the E7 vaccine, in this study, the E7 protein sequence has been rearranged to disrupt the continuity of the pRB interaction domain by considering the important epitopes of CD8 and CD4. The E7 protein sequences from patients and from the reference sequence were aligned and the most frequent amino acids at each position were picked up to generate an E7 canonical sequence that then was rearranged. To interrupt the continuity of the pRB binding site, the amino acid of canonical E7 was rearranged while still considering the continuity of CD4 and CD8 epitopes. Based on its major active sites, which are pRB, and metal-binding sites, the canonical E7 was divided into 4 regions, and the order of those 4 major active sites was reassembled. CD8 and CD4 epitope of the new reassembled E7 were analyzed using The Immune Epitope Data Base (IEDB), a free epitope database, and prediction resource. Five novels have been produced which rearrange E7 protein. Based on the elimination of pRB binding site and epitope analysis one novel rearranged E7 protein was choose as an antigen that will be developed as a therapeutic vaccine.

Keywords: Human papillomavirus 16 (HPV16), E7 recombinant antigen, therapeutic vaccine

Abstrak

Protein *Early* (E) 7 *Human Papillomavirus* 16 (HPV16) memiliki kemampuan menginduksi kanker dan berperan dalam perkembangan infeksi HPV dari lesi kanker invasif sampai kanker serviks. Dalam kaitannya dengan aktivasi sistem kekebalan tubuh, protein E7 HPV16 dapat mengaktivasi CD8 untuk menghancurkan sel-sel kanker. Namun demikian, protein E7 memiliki domain yang dapat mengikat protooncogenes pRB. Dalam penelitian ini dilakukan pengaturan ulang urutan domain protein E7 untuk meningkatkan keamanan vaksin E7 dan menghilangkan atau mengganggu kontinuitas domain E7 yang bertanggung jawab untuk berinteraksi dengan pRB. Pengaturan ulang tersebut dilakukan dengan tetap mempertimbangkan epitop-epitop penting CD8 dan CD4. Dalam penelitian ini, sekuen protein E7 yang digunakan merupakan sekuen konsensus yang dibuat berdasarkan sekuen protein E7 asal pasien dan sekuen referensi. Pengaturan ulang dilakukan dengan menganggu kontinuitas domain yang berperan dalam pengikatan pRB dengan masih mempertimbangkan epitop CD4 dan CD8. Berdasarkan situs aktif yaitu domain pengikat pRB dan pengikat logam, dalam penelitian ini protein E7 dibagi ke dalam 4 bagian, serta dilakukan penyusunan ulang posisi keempat bagian tersebut. Epitop CD8 dan CD4 protein E7 hasil pengaturan ulang dianalisis menggunakan *The Immune Epitope Data Base* (IEDB), suatu *data base* dan prediksi epitop. Kami menghasilkan 5 protein E7 hasil pengaturan ulang. Berdasarkan eliminasi

situs pengikat pRB dan analisis epitope, satu protein E7 hasil pengaturan ulang akan dipilih dan dikembangkan menjadi antigen vaksin terapeutik berbasis E7

Kata kunci : Human papillomavirus 16 (HPV16), E7 antigen rekombinan, vaksin terapeutik

Pendahuluan

Di dunia, kanker serviks merupakan penyebab kematian terbesar kedua kanker pada wanita setelah kanker payudara. Pada umumnya kanker serviks dikaitkan dengan infeksi *Human Papillomavirus* (HPV). Tipe HPV16 dan HPV18 merupakan tipe HPV yang sering dihubungkan dengan kanker serviks. Wanita yang terinfeksi HPV16 memiliki risiko menderita kanker serviks 400 kali lipat, sedangkan infeksi kanker HPV18 adalah 250 kali lipat. Sampai saat ini belum ditemukan obat antivirus khusus untuk infeksi HPV. Pencegahan infeksi dilakukan dengan vaksinasi pada kelompok yang belum aktif secara seksual.[1]

Vaksin pencegahan atau profilaksis untuk kanker serviks akibat infeksi HPV yang beredar saat ini adalah Gardasil dan Cervarix dibuat berdasarkan protein capsid L1. Vaksin ini menginduksi pembentukan antibodi netralisasi yang dapat mencegah terjadinya infeksi HPV. Walaupun efektif mencegah terjadinya infeksi HPV, kedua vaksin tersebut diindikasikan tidak memiliki efek untuk menurunkan derajat atau menghilangkan lesi kanker serviks akibat infeksi HPV.[2]

Regresi lesi kanker serviks tersebut lebih dihubungkan dengan respon kekebalan seluler, bukan dengan respon humoral[3,4], oleh karena itu sangat diharapkan adanya vaksin terapeutik yang menginduksi respon seluler.[5] Salah satu protein HPV yang dikembangkan menjadi vaksin terapeutik adalah E7.[6,7] Hal tersebut dikarenakan protein E7 diekspresikan oleh sel terinfeksi HPV yang sedang berkembang atau telah menjadi kanker serviks.[8]

Disisi lain, protein E7 memiliki kemampuan berikatan dengan protein seluler seperti protein protoonkogen Retinoblasma (pRB), p107, p130, Cycilin A serta protein seluler lain yang secara langsung atau tidak langsung berperan dalam pembentukan kanker. pRB merupakan protein tumor suppressor yang memegang peranan penting sebagai pengatur negatif siklus sel dan perkembangan tumor. Ikatan E7 pada pRB dan anggota pocket protein lain melalui motif XLXCXE yang terdapat pada asam amino posisi 20-25.[9] pRB yang tidak berfungsi dapat menyebabkan hilangnya regulasi pembelahan sel, sehingga sel berkembang menjadi kanker/tumor.[10] Selain itu protein E7 memiliki *metal-binding* motif (CXXC-X29-CXXC) yang bermanfaat untuk mengikat beberapa macam protein seluler hospes, termasuk *histone modifiying enzyme* yang berperan dalam transformasi sel.[11]

Untuk meningkatkan keamanan vaksin terapeutik menggunakan protein E7 sebagai antigen, para peneliti melakukan modifikasi pada gen E7. Metode yang dilakukan dengan mutasi dengan menggantikan asam amino domain yang dihubungkan dengan kanker.[12] Modifikasi juga dilakukan dengan menghilangkan beberapa asam amino motif *metal-binding*.[13]

Peningkatan keamanan vaksin berbasis E7 juga dilakukan dengan metode pengaturan ulang antigen E7 pada tingkat susunan DNA.[14] Dalam penelitiannya tersebut [14], gen E7 dibagi menjadi 4 yaitu : bagian, basa 1-30, basa 31-120, basa 121-210, dan basa 211-294. Selanjutnya dilakukan pengaturan ulang susunan fragmen basa tersebut untuk menghasilkan

protein E7.[14] Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan gen E7 HPV16 yang telah diatur ulang untuk menghilangkan domain yang mempunyai kemampuan menginduksi kanker. Dalam penelitian ini pengaturan ulang E7 dilakukan pada tingkat protein karena sel T CD8 dan CD4 mempunyai respon yang tinggi terhadap protein E7 terutama pada pasien dengan *squamous intraepitelial neoplasia* (SIL).

Metode

Penelitian ini telah mendapat persetujuan etik dari Komite Etik FKUI-RSCM dengan No. 514/UN2FI/etik/2010.

Spesimen dan amplifikasi gen E7

Dalam studi ini gen E7 diamplifikasi dari 30 sampel biopsi pasien kanker serviks di Indonesia. DNA HPV diekstraski menggunakan Qiagen DNA *extraction kit* sesuai dengan prosedur yang dijelaskan oleh manufaktur. Gen E7 diamplifikasi menggunakan pasangan primer :

E7F:
5'-
GTAGAGAAACCCAGCTGTAATCATG
-3'

E7R:
5'-CTGCAGGATCAGCCATGGTAG-3'.

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan enzim *high fidelity* (HiFi) *Taq Polymerase* [Invitrogen]. Reaksi PCR dilakukan sebagai berikut 2 µl Buffer, 1 µl 20 µM primer HPV E7R, 1 µl 20µM primer E7F, 5 µl *template*, 2 µl HiFi *Taq Enzyme* [Invitrogen], dan *Nuclease free water* sampai volume mencapai 50 µl. Reaksi amplifikasi PCR dilakukan dengan siklus 94^{o}C selama 15 detik, 57^{o}C selama 20 detik, dan 68^{o}C selama 2 menit, sebanyak 40 siklus. Hasil PCR dianalisis dengan menggunakan gel akrilamid.

Sekuensing dan penentuan sekuen konsensus E7

Produk PCR selanjutnya dipurifikasi menggunakan QIAquick *PCR purification kit* sesuai dengan prosedur yang dijelaskan oleh Qiagen. Amplikon selanjutnya disekuensing menggunakan ABI *BigDye* 3.1 *Terminator Cycle sequencing kit* (*Applied Biosystem*). Campuran reaksi PCR dilakukan sebagai berikut 2 µl 5x *Sequencing Buffer*, 4 µl larutan *Big Dye Terminator*, 1 µl primer sekuensing dan *nuclease free water* sampai volume mencapai 18 µl, dan 2 µl *template*. Siklus PCR sekuensing sebagai berikut 96^{o}C selama 10 detik, 55^{o}C selama 5 detik, dan 60^{o}C selama 4 menit menit, sebanyak 25 siklus. Hasil PCR selanjutnya diperiksa secara manual menggunakan program *SeqScape*. Selanjutnya sekuen DNA di alignment menggunakan program Clustal dan Bioedit dengan menggunakan sekuen reference yang diunduh dari NCBI. Setelah itu dilakukan pembuatan sekuen konsensus E7 dengan bantuan program yang ada di Bioedit.

Metode penataan ulang dan analisis epitop asam amino hasil penataan ulang

Protein E7 dibagi menjadi 4 bagian. Pembagian tersebut dilakukan tepat pada domain pengikatan pRB, dan motif *metal-binding* sehingga kontinuitas domain-domain penting E7 seperti pengikatan pRB (*pRB binding site*), *metal-binding* dan domain yang berperan dalam transformasi sel akan terganggu. Keberadaan epitop CD8 pada protein E7 hasil pengaturan ulang dianalisis dengan menggunakan pendekatan studi Bioinformatik menggunakan program untuk memprediksi afinitas pengikatan (*binding affinity*) epitop dengan *major histocompatibility complex* (MHC)[8,9] dan juga dianalisis berdasarkan informasi yang diperoleh dari literatur.

Analisis epitop E7 hasil penata ulangan ditujukan untuk memastikan tidak

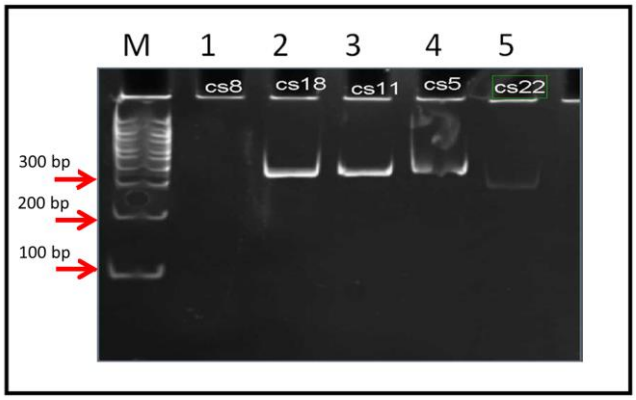
ada epitop penting yang hilang atau berubah selama proses penata ulangan epitop. Analisis epitop dilakukan dengan menggunakan piranti lunak *The Immune Epitope Data Base* (IEDB) yang dapat diakses dari: http://tools.immunoepitope.org/main.

Dalam situs tersebut dapat dilakukan prediksi peptida yang dapat berikatan dengan suatu MHC kelas I dan kelas II tertentu. Penentuan suatu peptida merupakan suatu epitop didasarkan pada nilai kekuatan ikatan peptida dengan MHC kelas I/II tertentu yang dinyatakan dengan satuan *inhibition activities* (IC) 50nM. Semakin rendah nilai IC50, semakin tinggi kemungkinan nilai afinitas suatu peptida dengan MHC kelas I/II. Dalam penelitian ini, penilaian suatu peptida dinyatakan sebagai epitop CD4 atau CD8 jika memiliki nilai IC5 <50nm.

Hasil

Amplifikasi gen E7 dari sampel pasien

Dari 30 sampel asal pasien, sebanyak 17 sampel berhasil menghasilkan PCR produk dengan ukuran 340 pasang basa (pb).

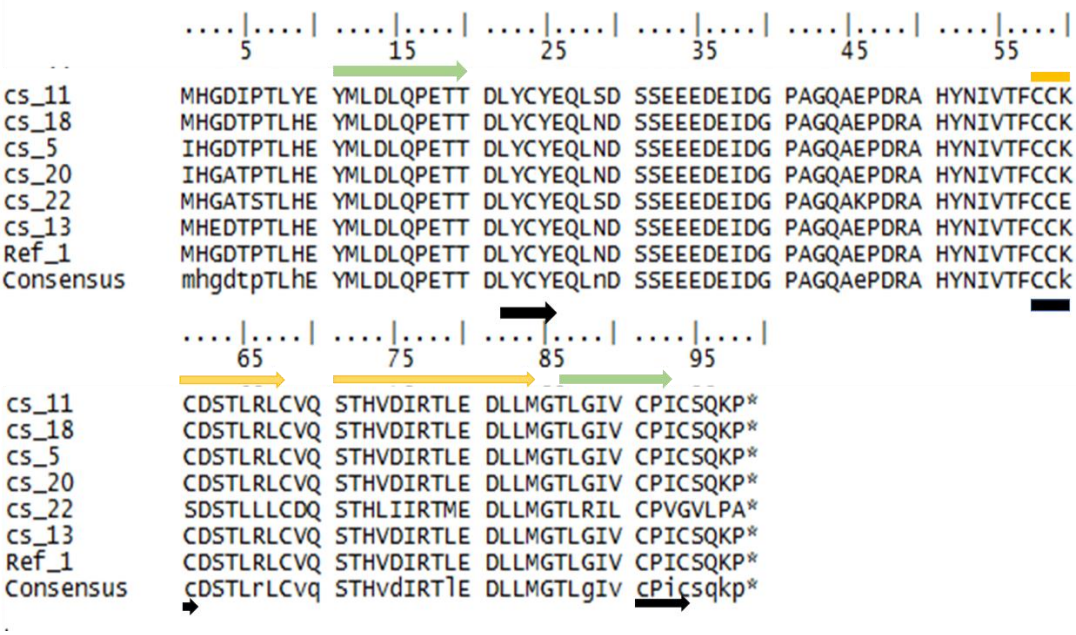


Gambar 1. Analisis gel akrilamid hasil amplifikasi gen E7 HPV16.

Keterangan: M: marker 100bp DNA *ladder*; lajur 1: CS8; lajur 2: CS18; lajur 3: CS11; lajur 4: CS5; lajur 5: CS22

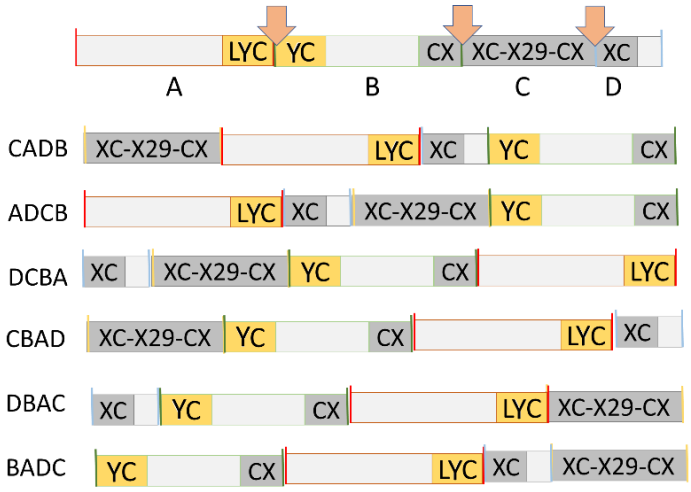
Selanjutnya setelah dilakukan sekuensing, hanya 6 sampel yang menghasilkan data yang bisa dianalisis. Urutan basa hasil sekuensing dilakukan dengan menggunakan piranti lunak *Seqscape*. Hasil menunjukkan semua isolat memiliki kesamaan dan dilakukan proses editing, data DNA di-*alignment* menggunakan program *Bioedit* dan *Clustal W*. Untuk memastikan kebenaran sekuen basa, ke dalam *alignment Bioedit* dan Clustal W dimasukkan sekuen *reference* yang diunduh dari *Genbank* (Gambar 2). Sekuen *reference* ini merupakan sekuen konsensus yang diperoleh dari semua data E7 yang ada di *Genbank*. Untuk mengetahui kebenaran susunan asam amino, maka dilakukan pengujian susunan asam amino tersebut di situs *basic local alignment search tool* (BLAST). Hasil menunjukkan kesamaan asam amino E7 yang diperoleh dari pasien hampir 100% sama dengan susunan asam amino E7 yang ada di *Genbank.*

Berdasarkan *alignment* sekuen asam amino dilakukan pembuatan sekuen asam amino konsensus dengan menggunakan program yang ada di dalam *Bioedit* (Gambar 2). Epitop CD8 pada protein E7 telah dikembangkan untuk pembuatan vaksin terapeutik dan terbukti dapat meghambat laju lesi *high grade cervical* atau *vulvular intraepithelial neoplasia* antara lain $E7^{12-20}$ dan $E7^{86-93}$ (Gambar 3).[6,15,16] Epitop CD4 yang terdapat pada E7 dan terbukti dapat mengurangi lesi kanker antara lain $E7^{58-68}$ dan $E7^{71-85}$ (Gambar 2).[17] Keempat epitop seluler tersebut dapat ditemukan pada semua isolat asal pasien. Satu isolat (CS_22) memiliki perbedaan satu asam diujung terminal C epitop serta mengalami perubahan pada salah satu domain metal binding. Salah satu epitop CD4, $E7^{58-68}$, tumpang tindih dengan salah satu motif *metal-binding* (Gambar 2).



Gambar 2. Keragaman sekuen E7 asal pasien Indonesia dan identifikasi keragaman epitop seluler CD4 dan CD8. Panah hijau: epitop CD8, panah kuning: epitop CD4, panah hitam: domain aktif E7 yang berperan dalam induksi kanker.

Penyusunan ulang antigen E7 berdasarkan domain penting yang ada di E7 ditujukan untuk meningkatkan keamanan vaksin, Protein E7 memiliki domain pengikatan pada pRB XLXCXE (LYCYC) dan motif *metal-binding* CXXC-X29-CXXC dengan X mewakili semua jenis asam amino. Motif *metal-binding* berperan dalam membawa sifat perubah (*transforming properties*).[14] Pengaturan ulang dilakukan dengan memisah E7 menjadi 4 bagian. Daerah A meliputi posisi asam amino 1-22, daerah B meliputi asam amino ke 23-58, daerah C meliputi asam amino ke-59-93, daerah D meliputi asam amino ke 94-98. Pembagian E7 ke dalam 4 daerah ini menyebabkan domain pengikat pRB dan *metal-binding site* mengalami gangguan kontinuitas yang kemungkinan menyebabkan gangguan pada kemampuan E7 untuk menyebabkan kanker.



Gambar 3. Pengaturan ulang protein E7 HPV16 yang menyebabkan gangguan pada kontinuitas domain pengikat pRB (LYCYC) dan *metal-binding* (CXXC-X29-CXXC). Tanda panah menunjukkan posisi pengaturan ulang asam amino E7.

Hasil analisis prediksi epitop dengan situs IEDB menunjukkan penyusunan ulang antigen E7 menyebabkan perubahan jumlah epitop untuk CD4 dan CD8 dalam setiap antigen jika dibandingkan dengan E7 *wild type* (Tabel 1). Selain itu penyusunan ulang antigen juga menyebabkan perubahan epitop CD4 dan CD8 yang telah dibuktikan dengan pengujian laboratorium [6,15,16,17]. Beberapa hasil penyusunan ulang antigen yang diperoleh menyebabkan perubahan epitop. Adanya perubahan asam amino yang memiliki sifat yang berbeda dapat menyebabkan epitop menghilang, seperti CBAD menyebabkan perubahan asam amino yang memiliki sifat berbeda, misalnya dari non polar berubah menjadi polar (Tabel 2).

Tabel 1. Keberadaan epitop CD8 $E7^{12-20}$ dan $E7^{86-93}$ dan epitop CD4 $E7^{58-68}$ dan $E7^{71-85}$ dalam protein E7 yang telah mengalami penata ulangan

Epitop	Variasi antigen E7						
	Wild type	CADB	ADCB	DCBA	CBAD	BADC	DBAC
$E7^{12-20}$	+	+	+	+	+	+	+
$E7^{86-93}$	+	+/- Perubahan 1 asam amino terakhir di epitop dari I (non polar) ke M (Non polar)	- Perubahan 1 asam amino terakhir di epi top dari I (non polar) ke Y (polar)	- Perubahan 1 asam amino terakhir di epitop dari I (non polar) ke Y (polar)	- Perubahan 1 asam amino terakhir di epitop dari I (non polar) ke Y (polar)	+/- Delesi pada 1 asam amino terakhir	+/- Delesi pada 1 asam amino terakhir
$E7^{58-68}$	+	+	+	+	+	+	+
$E7^{71-85}$	+	-	+/- Perubahan 2 asam amino ujung N dari CC (polar polar) ke SG (polar polar)	+/- Perubahan 2 asam amino ujung N dari CC (polar polar) ke SG (polar polar)	-	+/- Perubahan 2 asam amino ujung N dari CC (polar polar) ke SG (polar polar)	+/- Perubahan 2 asam amino ujung N dari CC (polar polar) ke SG (polar polar)

+ : menunjukkan keberadaan epitop ; +/- : kemungkinan epitop masih bisa mengaktivasi kekebalan seluler karena perubahan asam amino masih dalam satu sifat (sesama non polar atau sesama polar); -: tidak dapat mengaktivasi kekebalan seluler karena asam amino berubah sifat (dari polar ke non polar)

Tabel 2. Hasil analisis epitop CD4 dan CD8 protein E7 hasil pengaturan ulang menggunakan IEDB.

Tipe HLA*	Variasi antigen E7						
	Wild type	CADB	ADCB	DCBA	CBAD	BADC	DBAC
HLA-A*02:01	+++	-	-	+	-	+	-
HLA-A*02:03	-	+	+	+	++	++	+
HLA-A*02:04	-	-	+	-	-	-	-
HLA-A*02:06	-	+	-	+	+	+	-
HLA-A*02:09	-	-	+	-	-	-	-
HLA-A*01:01	+	-	-	-	-	-	-
HLA-A*03:01	+	-	-	-	-	-	-
HLA-A*32:01	-	+	-	+	-	-	++
HLA-A*11:01	+	-	-	-	-	-	-
HLA-A*24:02	-	-	+	-	-	-	-
HLA-A*26:02	-	-	-	+	-	-	-
HLA-A*68:01	-	-	-	-	-	-	-
HLA-B*15:01	-	-	-	+	-	-	+
HLA-B*15:03	-	+	-	-	+	-	-
HLA-B*18:01	-	+	-	-	-	-	-
HLA-B*35:01	-	+	++	-	+	-	-
HLA-B*40:01	-	-	-	+	-	-	+
HLA-B*44:03	+	-	-	-	-	-	-
HLA-B*51:01	-	-	-	+	-	-	-
HLA-B*58:01	-	+	-	-	+	-	-
HLA-DRB1*15-01	-	-	-	-	-	+	-
HLA-DRB1*03-01	++	-	+	-	-	+	-
HLA-DRB3*01-01	+	++	++	-	++	+	+++
HLA-DRB3*07-01	-	-	-	-	+	-	-

+ : menunjukkan jumlah keberadaan epitop yang dikenali HLA ; -: menunjukkan tidak ada epitop yang dikenali oleh HLA

* HLA yang ditampilkan disini hanya epitop yang berikatan dengan *human leucocyte antigen* (HLA) dengan nilai ICMM <1.

Pembahasan

Dalam penelitian ini telah dilakukan isolasi dan amplifikasi DNA E7 dari 30 sampel. Hasil menunjukkan hanya 13 sampel yang dapat diamplifikasi menggunakan pasangan primer E7. Seiring dengan perkembangan siklus hidup HPV di dalam tubuh pasien terinfeksi HPV, jenis DNA HPV berada dalam 2 bentuk. Pada awal infeksi, dimana lesi kanker belum terbentuk, genom HPV didominasi oleh DNA genom virus yang dapat diisolasi dari virus yang terdapat dalam spesimen swab vagina. Sedangkan pada infeksi yang telah berkembang menjadi kanker, genom virus HPV terintegrasi di dalam kromosom, dan DNA HPV akan lebih banyak ditemukan dalam biopsi sel kanker.[18] Keberhasilan ekstraksi DNA juga dipengaruhi oleh jenis metode/kit yang digunakan.[19,20] Ekstraksi DNA dari biopsi tentunya memerlukan deterjen seperti *sodium dedoxyl sulfate* (SDS) untuk membantu merusak lipid bilayer membran sel dan membran inti sel.

Salah satu penentu keberhasilan amplifikasi genom HPV adalah kesesuaian antara sekuen primer dengan DNA template. Adanya ko infeksi HPV dari tipe yang berbeda pada satu individu[21], seringkali merupakan penyebab sulitnya amplifikasi genom HPV. *Genotyping* HPV dengan metode sekuensing *Sanger* pada sampel yang kemungkinan terinfeksi oleh lebih dari satu jenis HPV akan mengalami kesulitan pada saat analisis. Hal tersebut terkait dengan ditemukannya

2 puncak basa pada hasil elektroferogram, terutama pada posisi yang menunjukkan adanya variasi antar tipe HPV.

Modifikasi antigen E7 HPV16 untuk meningkatkan keamanan vaksin tanpa mengurangi efikasi vaksin telah dilaporkan oleh beberapa peneliti[12,13,14.] Hasil modifikasi yang dilakukan dalam penelitian ini, menyebabkan perubahan pada epitop CD4 dan CD8. Hampir semua E7 hasil penyusunan ulang antigen mengalami perubahan pada epitop CD8 $E7^{86-93}$. Perubahan tersebut terjadi pada asam amino terakhir epitop. Perubahan asam amino pada epitop ada kemungkinan tidak menyebabkan perubahan pada kemampuan vaksin untuk mengaktivasi sel CD8, selama perubahan tersebut tidak meyebabkan epitop tersebut menjadi antigen sendiri atau *self antigen* yang tidak dapat menginduksi sistem kekebalan tubuh.[22,23] Selain itu perubahan asam amino dalam epitop dapat dinilai dengan algoritma tertentu untuk membuktikan bahwa epitop tersebut masih dapat menginduksi sistem kekebalan tubuh yang diharapkan.[24]

Salah satu parameter untuk menentukan potensi suatu epitop CD4 dan CD8 untuk menginduksi kekebalan tubuh adalah kekuatan ikatan epitop tersebut dengan tipe HLA. Kekuatan ikatan epitop CD4 dan CD8 HPV sangat dipengaruhi oleh tipe HLA. Ada beberapa epitop seperti epitop CD8 E712-20 hanya berikatan kuat dengan HLA A*020115,17 dan epitop CD4 $E7^{71-85}$ hanya berikatan kuat dengan HLA DQB1*0201.17 Berdasarkan hasil prediksi epitop menggunakan IEDB, diketahui beberapa epitop di E7 merupakan epitop CD4 dan CD8 yang dikenali oleh HLA tipe lain selain HLA tersebut diatas. Hal tersebut menunjukkan kemungkinan antigen E7 dapat digunakan untuk kelompok yang memiliki tipe epitop berbeda, namun hal tersebut masih perlu diuji lebih lanjut untuk mengetahui aktivitas epitop tersebut dengan teknik Elispot atau teknik yang lain.

Kesimpulan

Dalam penelitian ini telah berhasil diperoleh susunan asam amino E7 yang mengalami perubahan kontinuitas domain pengikat pRB dan *metal-binding*, dan susunan yang baru tersebut masih memiliki epitop CD4 dan CD8. Namun demikian pemanfaatan antigen tersebut

sebagai kandidat vaksin masih perlu dikaji apakah perubahan epitop tersebut berpengaruh pada kemampuan antigen E7 hasil pentatalaksanaan ulang untuk menginduksi sel CD4 dan CD8.

Ucapan terimakasih

Ucapan terima kasih kepada para responden yang bersedia berpartisipasi pada penelitian ini. Penelitian ini dibiayai oleh hibah PT. Bio Farma.

Daftar Rujukan

1. WHO. Human papillomavirus vaccines: WHO position paper, October 2014. Releve Epidemiologique Hebdomadaire. 2014;89(43):465-91.
2. Chabeda A, Yanez RJR, Lamprecht R, Meyers AE, Rybicki EP, Hitzeroth II. Therapeutic vaccines for high-risk HPV-associated diseases. Papillomavirus Research. 2018;5:46-58.
3. Deligeoroglou E, Giannouli A, Athanasopoulos N, Karountzos V, Vatopoulou A, Dimopoulos K, et al. HPV infection: immunological aspects and their utility in future therapy. Infect. Dis. Obstet. Gynecol.2013:540850.
4. Woo YL, van den Hende M, Sterling JC, Coleman N, Crawford RA, Kwappenberg KM, et al. A prospective study on the natural course of low-grade squamous intraepithelial lesions and the presence of HPV16 E2-, E6- and E7-specific T-cell responses. Int. J. Cancer.2010;126:133–141.
5. Kim TJ, Jin HT, Hur SY, Yang HG, Seo YB, Hong SR, et al. Clearance of persistent HPV infection and cervical lesion by therapeutic DNA vaccine in CIN3 patients. Nat Commun. 2014;5:5317. Epub 2014/10/31. pmid:25354725; PubMed Central PMCID: PMC4220493.
6. Cid-Arregui A. Therapeutic vaccines against human papillomavirus and cervical cancer. Open Virol J. 2009;3:67–83. doi:10.2174/1874357900903010067.
7. Yang A, Farmer E, Wu TC, Hung CF. Perspectives for therapeutic HPV vaccine development. J Biomed Sci. 2016;23(1):75. doi:10.1186/s12929-016-0293-9.
8. Yugawa T, Kiyono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. Rev. Med. Virol. 2009:19:97–113.
9. Roman A, Munger K. The papillomavirus E7 proteins. Virology.2013;445(1-2):138–168. doi:10.1016/j.virol.2013.04.013.
10. Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression. Oncogene.2006; 25:5220-27.
11. Mu¨nger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis.J Virol.2004;78:11451–11460.
12. Wieking BG, Vermeer DW, Spanos WC, Lee KM, Vermeer P, Lee WT, et al. A non-oncogenic HPV16 E6/E7 vaccine enhances treatment of HPV expressing tumors. Cancer Gene Therapy. 2012;19(10):667–674. doi:10.1038/cgt.2012.55.
13. Li YL, Ma ZL, Zhao Y, Zhang J. Immunization with mutant HPV16 E7 protein inhibits the growth of TC-1 cells in tumor-bearing mice. Oncology letters. 2015;9(4):1851–1856. doi:10.3892/ol.2015.2911.
14. Osen W, Peiler T, Öhlschläger P, Caldeira S, Faath S, Michel N, et al. A DNA vaccine based on a shuffled E7 oncogene of the human papillomavirus type 16 (HPV16) induces E7-specific cytotoxic T cells but lacks transforming activity. Vaccine. 2001;19(30): 4276–4286. doi:10.1016/s0264-410x(01)00154-2.
15. Riemer A, Keskin DB, Zhang G, Handley M, Anderson K, Brusic V, et al. A Conserved E7-derived Cytotoxic T Lymphocyte Epitope Expressed on Human Papillomavirus 16-transformed HLA-A2+ Epithelial Cancers. The Journal of Biological Chemistry.2010; 285 :29608 –29622.
16. Muderspach L, Wilczynski S, Roman L, Bade L, Felix J, Small LA, et al. A phase I trial of a human papillomavirus (HPV) peptide vaccine for women with high-grade cervical and vulvar intraepithelial neoplasia who are HPV16 positive. Clin Cancer Res. 2000;6(9):3406-16.
17. Wang Z, Tuong ZK, Fraze IH. Papillomavirus Immune Evasion Strategies Target the Infected Cell and the Local Immune System. Frontiers in Oncology. 2019;9: 1-18.
18. Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. Human papillomavirus and cervical cancer. The Lancet. 2013;382(9895):889–899. doi:10.1016/s0140-6736(13)60022-7.
19. Dona MG, Benevolo M, Pimpinelli F, Battista M, Rollo F, et al.. Comparative evaluation of different DNA extraction methods for HPV genotyping by Lin-ear Array and INNO-LiPA. Journal of Medical Virology. 2011;83(6):00633209 doi: 1042.10.1002/jmv.22088.
20. Brestovac B, Wong ME, Costantino PS, Groth D. A rapid DNA extraction method suitable for human papillomavirus detection. Journal of Medical Virology. 2014;86(4): 653–657. doi:10.1002/jmv.23882.
21. Mastutik G, Alia R, Rahniayu A, Rahaju AS, Kurniasari N, Putra ST. Genotyping of Human

Pappilomavirus in Cervical Precancerous Lesion and Squamous Cell Carcinoma at Dr. Soetomo Hospital, Surabaya, Indonesia. Afr J Infect Dis. 2018;12(1 Suppl):7–12. doi:10.21010/Ajid.12v1S.2.
22. Nilyanimit P, Chansaenroj J, Poomipak W, Praianantathavorn K, Payungporn S, Poovorawan Y. Comparison of Four Human Papillomavirus Genotyping Methods: Next-generation Sequencing, INNO-LiPA, Electrochemical DNA Chip, and Nested-PCR. Ann Lab Med. 2018;38(2):139–146. doi:10.3343/alm.2018.38.2.139.
23. Capano G, Fasano C, Lucchese G, Kanduc C. HPV-Associated Cancer and Autoimmunity: Searching for Therapies. Vaccines. 2015;3(1):74-89.
24. Ogishi M, Yotsuyanagi H. Quantitative prediction of the landscape of T cell epitop immunogenicity in sequence space. Front. Immunol.2018. 10:827. doi:10.3389/ fimmu.2019.00827.