

Adhesin 61 kDa OMP *C.pneumoniae* Menghambat Apoptosis Makrofag

Adhesin 61 kDa OMP *C.pneumoniae* Inhibition Effect to Macrophage Apoptosis

Andrew Halim¹, Sri Murwani², Sumarno²

¹ Program Studi Pendidikan Dokter Universitas Brawijaya Malang

² Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

ABSTRAK

Banyak bukti menunjukkan *Chlamydia pneumoniae* dapat menginduksi terjadinya aterosklerosis dan rupturnya plak aterosklerosis. Hal ini diperantarai oleh berbagai hal, salah satunya adalah mekanisme penghambatan apoptosis makrofag. Penelitian ini menguji keterlibatan protein struktural adhesin 61 kDa pada *Outer Membrane Protein* (OMP) *C.pneumoniae* dalam menghambat apoptosis makrofag. Makrofag diperoleh dari monosit darah perifer individu sehat. Rancangan penelitian berupa penelitian eksperimental laboratorik *in vitro, post control design only*. Pada penelitian ini digunakan 4 sampel monosit. Pada setiap sampel dilakukan isolasi dan kultur, serta pemberian *Phorbol Myristate Acetate* (PMA) agar monosit berdiferensiasi menjadi makrofag. Makrofag kemudian dipapar dengan adhesin 61 kDa OMP *C.pneumoniae* (kecuali pada kontrol positif) dan diinduksi agar apoptosis dengan H₂O₂ berbagai macam konsentrasi (5mM, 10 mM, 15mM, 20mM, 25mM, 25mM pada kontrol positif) selama 6 jam. Deteksi apoptosis makrofag dilakukan dengan menggunakan metode imunositokimia, menggunakan antibodi monoklonal terhadap kaspase 3. Hasil dianalisis secara statistik menggunakan ANOVA satu arah, $\alpha=0,05$. Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan bermakna jumlah makrofag yang apoptosis diantara perlakuan dan kontrol positif. Dapat disimpulkan adhesin 61 kDa OMP *C.pneumoniae* memiliki kemampuan menghambat apoptosis makrofag.

Kata Kunci: Apoptosis, adhesin 61 kDa OMP, *C.pneumoniae*, H₂O₂, makrofag

ABSTRACT

Many evidences show the ability of *Chlamydia pneumoniae* inducing atherosclerosis and rupturing the atherosclerosis plaque. The process mediated by various factors, which one of it is through the hindering of macrophage apoptosis. This study investigates the role of structural protein adhesin 61 kDa at the *Outer Membrane Protein* (OMP) of *C.pneumoniae* in hindering macrophage apoptosis. Macrophages are obtained from circulating blood monocytes of healthy people. The design of the study is laboratory experimental *in vitro, post control design only*. This study used 4 samples of monocytes. The monocytes in each sample were isolated, cultured and induced by *Phorbol Myristate Acetate* (PMA) in order to the monocytes can be differentiated to macrophages. Macrophages were then exposed to adhesin 61 kDa OMP of *C.pneumoniae* (except for positive control) and induced to apoptosis using H₂O₂ with different concentrations (5mM, 10 mM, 15mM, 20mM, 25mM, 25mM for positive control) for 6 hours. Macrophage apoptosis detected by immunocytochemistry methode, using monoclonal antibody toward caspase 3. The result was analyzed statistically using one way ANOVA, $\alpha=0,05$. The result shows significant difference in the quantity of macrophage apoptosis between adhesin-61-kDa-OMP-*C.pneumoniae*-exposed-groups and positive control groups. It can be concluded that adhesin 61 kDa OMP of *C.pneumoniae* has the ability to hinder macrophage apoptosis.

Keywords: Apoptosis, adhesin 61 kDa OMP *C.pneumoniae*, H₂O₂, macrophage

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. 26, No. 4, Agustus 2011; Korespondensi: Andrew Halim. Program studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, Jl. Veteran Malang Tel. (0341) 596117 Email: ndrew_lien1987@yahoo.com.

PENDAHULUAN

Chlamydia pneumoniae (*C. pneumoniae*) merupakan agen patogen saluran pernafasan yang sering menyebabkan faringitis, laringitis, bronkitis, atau pneumonia interstitial. Secara signifikan bakteri ini menyebabkan infeksi saluran pernafasan pada komunitas di seluruh dunia dan insidennya tidak dipengaruhi oleh musim (1). Antibodi terhadap *C.pneumoniae* terdeteksi setidaknya pada 50%-80% populasi, akan tetapi angka kejadian infeksi saluran pernafasan tetap tinggi (1-5). Epidemi infeksi *C.pneumoniae* terjadi setiap 5-7 tahun. Mayoritas orang dewasa telah terinfeksi setidaknya 2-3 kali selama hidupnya (5). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa *C.pneumoniae* mempunyai hubungan dengan terjadinya proses aterosklerosis pada arteri koronaria yaitu melalui studi seroepidemiologis, deteksi *C.pneumoniae* pada jaringan aterosklerotik, studi kultur sel, model hewan, dan percobaan pencegahan dengan menggunakan antibiotik (5-14).

Chlamydia pneumoniae bersifat intraselular obligat dan dilaporkan dapat hidup di dalam makrofag, dan menghambat proses apoptosis makrofag. Hal ini berkaitan dengan induksi produksi IL-10 (3), hambatan *caspase-3*, hambatan *caspase-9*, hambatan redistribusi *cytochrome c* pada sel yang terinfeksi *C. pneumoniae* (11-15), dan degradasi protein proapoptotik BH3 (16). Makrofag adalah sel penting pada lesi aterosklerotik, tidak hanya karena sebagian besar lesi terbentuk dari makrofag, tapi makrofag juga dapat mengeluarkan berbagai jenis protein (seperti apoE, apoAI, ACAT dll) yang dapat mempengaruhi clearance lipoprotein dan metabolisme kolesterol, yang merupakan 2 faktor signifikan yang mempengaruhi perkembangan lesi aterosklerosis (17).

Keberadaan sel-sel apoptotik di lesi aterosklerosis telah banyak dilaporkan pada beberapa penelitian. Mayoritas sel apoptotik yang ditemukan adalah makrofag. Hambatan apoptosis makrofag ternyata meningkatkan ukuran lesi aterosklerosis. Apoptosis makrofag justru memegang peranan protektif penting dalam perkembangan lesi aterosklerosis, yaitu dengan mensupresi perkembangan lesi lebih lanjut (17).

Hambatan apoptosis makrofag yang terinfeksi *C.pneumoniae* adalah salah satu mekanisme agar bakteri ini dapat bertahan hidup. Tanpa proses apoptosis yang adekuat, infeksi *C.pneumoniae* akan terus berlangsung dan menjadi persisten, yang akhirnya memberi kontribusi pembentukan lesi aterosklerosis (15,18). Apalagi ternyata infeksi oleh *C.pneumoniae* ini tidak selalu menimbulkan gejala klinis atau asimtomatik (2-5%), sehingga proses aterosklerosis karena infeksi akan terus berjalan tanpa diketahui (4).

Terapi dengan mengintervensi aktivitas antiapoptosis yang dimiliki oleh *C.pneumoniae* mungkin dapat memfasilitasi eliminasi bakteri ini dan dapat mengurangi risiko aterosklerosis. Untuk itu perlu diketahui sifat-sifat anti-apoptosis yang dimiliki oleh *C.pneumoniae* terutama pada makrofag yang turut berperan dalam proses atherogenesis dan ruptur plak aterosklerosis (11).

Adhesin 61 kDa telah dapat diisolasi dari *Outer Membrane Protein* (OMP) bakteri *C.pneumoniae*. Adhesin tersebut bersifat imunodominan dan imunoreaktif, karena selalu bereaksi dengan serum penderita IMA. Adhesin 61 kDa

(tanpa komponen bakteri *C.pneumoniae* yang lain) ternyata mampu menginduksi mediator peradangan dan proses aterosklerosis (19). Kepentingan adhesin dapat menjadi kandidat vaksin untuk penyakit infeksi, karena berperan dalam proses perlekatan dan terletak di superfisial sehingga mudah diikat oleh antibodi (20,21).

Sel makrofag adalah sel yang mengawali terjadinya respons imun selular ataupun humoral. Apoptosis pada sel makrofag justru memegang peranan penting dalam pertahanan diri terhadap patogen ini. Sejauh ini, belum ada penelitian tentang potensi dari adhesin 61 kDa OMP *C.pneumoniae* ini dalam menghambat apoptosis makrofag. Pada penelitian ini akan diteliti potensi dari adhesin 61 kDa OMP *C.pneumoniae* ini dalam menghambat apoptosis makrofag, yang nantinya bisa dikembangkan vaksin yang mempunyai basis protein adhesin 61 kDa *C.pneumoniae*.

METODE

Penelitian eksperimental laboratorium dilakukan dengan *post control design* untuk mendeteksi tingkat apoptosis makrofag. Sampel penelitian menggunakan makrofag yang berasal dari monosit darah individu sehat. Monosit tersebut dikultur dan dipapar adhesin 61 kDa OMP *C.pneumoniae*. Kelompok perlakuan dibagi dalam beberapa kelompok yaitu kultur makrofag yang dipapar adhesin 61 kDa, ditambah dengan H₂O₂ dengan dosis bertingkat, yaitu 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM. Kontrol positif dipapar H₂O₂ 25 mM, tapi tidak diberi adhesin. Dilakukan isolasi monosit, kemudian dilakukan induksi monosit menjadi makrofag dengan *Phorbol Myristate Acetate* (PMA) pada konsentrasi 10⁻⁷ mM, Selanjutnya dilakukan paparan adhesin 61 kDa OMP *C.pneumoniae* pada makrofag, dan dilanjutkan dengan induksi H₂O₂. Data yang diperoleh dianalisis dengan uji *One Way ANOVA*.

HASIL

Pada penelitian ini dilakukan uji, apakah adhesin 61 kDa OMP *C.pneumoniae* mempunyai peran dalam menghambat apoptosis makrofag yang diinduksi dengan H₂O₂ berbagai macam konsentrasi. Apoptosis dideteksi dengan pewarnaan imunositokimia dengan kromogen DAB, menggunakan antibodi monoklonal terhadap *caspase-3*. Terdapat perbedaan jumlah sel apoptosis antara kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan yang dipapar dengan adhesin 61 kDa OMP *C.pneumoniae* dan H₂O₂ berbagai konsentrasi. Kelompok yang dipapar dengan adhesin 61 kDa OMP *C.pneumoniae* hanya sedikit yang mengalami apoptosis (Tabel 1).

Tabel 1. Jumlah apoptosis makrofag

Kelompok	Dosis H2O2	Mean	SD
I. Perlakuan	5 mM	32,25 ^a	9,394147
	10 mM	34,25 ^a	8,539126
	15 mM	73,25 ^b	10,436315
	20 mM	67,75 ^b	8, 693868
	25 mM	22,75 ^a	7,182154
II. Kontrol Positif	25 mM	191,75 ^c	10,210289

Keterangan:

^{a,b,c}: huruf yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan

Hasil uji *One Way* ANOVA menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antara jumlah makrofag yang apoptosis diantara perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa H₂O₂ mampu menginduksi terjadinya apoptosis dan adhesin 61 kDa OMP *C.pneumoniae* mampu menghambat terjadinya apoptosis makrofag. Hasil analisis *post hoc* menunjukkan ada perbedaan yang bermakna antara kelompok yang hanya dipapar H₂O₂ 25 mM dengan setiap kelompok perlakuan. Perbedaan rata-rata jumlah sel apoptosis antara kelompok perlakuan dosis H₂O₂ 5 mM, 10 mM, dan 25 mM adalah tidak bermakna. Perbedaan rata-rata jumlah sel apoptosis antara kelompok perlakuan dosis H₂O₂ 15 dan H₂O₂ 20 mM juga tidak bermakna. Terdapat perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan dosis H₂O₂ 5 mM, 10 mM, 25 mM dengan kelompok perlakuan dosis H₂O₂ 15 mM, 20 mM.

DISKUSI

Chlamydia pneumoniae adalah bakteri intraselular obligat yang dapat menyebabkan infeksi saluran pernafasan atas dan bawah. *Chlamydia pneumoniae* bereplikasi di dalam vakuola sel eukariotik. Bakteri ini dapat beradaptasi dengan sangat baik sehingga mampu bertahan hidup dalam jangka waktu yang lama. Sel yang diinfeksi oleh *C.pneumoniae* dapat melepaskan sitokin inflamasi. Tetapi, respon inflamasi yang terbentuk sering kali gagal untuk mengeliminasi bakteri ini (14,18). Demi kelangsungan hidupnya di dalam makrofag, bakteri ini mempunyai berbagai mekanisme untuk mencegah apoptosis dari makrofag. Padahal apoptosis justru memegang peranan penting dalam pertahanan diri terhadap patogen ini. Tanpa apoptosis, sel hospes akan tetap menyuplai nutrisi untuk pertumbuhan *C.pneumoniae*. Selain itu, bakteri ini juga akan terlindungi dari proses fagositosis dan respon imun spesifik. Hal ini dapat menyebabkan infeksi yang

persisten (15-17).

Mekanisme penghambatan apoptosis sel-sel yang terinfeksi oleh *C.pneumoniae* ini diperantarai oleh berbagai macam hal, seperti adanya sintesa protein oleh *C.pneumoniae* untuk menghambat apoptosis, hambatan aktivasi Kaspase 3 p-32, hambatan hidrolisis PARP p112, hambatan fragmentasi DNA nukleosomal, blok pelepasan sitokrom c mitokondria, induksi IL-10 makrofag, dan degradasi protein proapoptotik BH3 (3, 15, 16,18).

Pada penelitian ini dilakukan eksperimen untuk mengetahui apakah protein struktural adhesin 61kDa OMP *C.pneumoniae* mampu menghambat apoptosis. Sebagai *inducer* apoptosis digunakan H₂O₂ berbagai macam konsentrasi. Hidrogen peroksida sendiri telah diketahui dapat menginduksi terjadinya apoptosis lewat jalur intrinsik (jalur mitokondria). Hidrogen peroksida dapat berdifusi dengan bebas melewati membrane sel makrofag, terakumulasi di dalam sel, dan akhirnya menginduksi disfungsi mitokondria sehingga melepaskan sitokrom c dan faktor apoptogenik lain seperti Smac/DIABLO, Omi, dan AIF (*Apoptosis Inducing Factors*) melalui regulasi golongan Bcl-2 pada membran mitokondria. Pada akhirnya akan terbentuk *caspase 9* yang akan mengaktifasi eksekutor kematian utama—*caspase 3* (17).

Hasil penelitian ini dapat membuktikan bahwa adhesin 61kDa OMP *C.pneumoniae* mampu menghambat apoptosis makrofag melalui jalur intrinsik. Sebenarnya kedua jalur apoptosis (intrinsik dan ekstrinsik) mampu untuk saling berhubungan (*cross talk*) dan mempengaruhi satu sama lain. Perlu penelitian lebih lanjut, apakah hambatan apoptosis oleh paparan adhesin 61kDa OMP *C.pneumoniae* melalui jalur intrinsik saja atau melalui kedua jalur.

DAFTAR PUSTAKA

1. Strohl WA, Rouse H, and Fisher BD. *Microbiology (Lippincott's Illustrated Reviews)*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
2. Kohlhepp SJ, Hardick J, and Gaydoss C. *Chlamydia pneumoniae in Peripheral Blood Mononuclear Cells Isolated from Individuals Younger than 20 Years or Older than 60 Years*. Journal of Clinical Microbiology. 2005; 43(6): 3030.
3. Geng Y, Shane RB, Berencsi K, et al. *Chlamydia pneumoniae Inhibits Apoptosis in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Through Induction of IL-10*. The Journal of Immunology. 2000; 164(10): 5522-5529.
4. Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, and Zinkernagel RM. *Medical Microbiology* 2005. New York: Thieme; 2005; p. 339-340.
5. Yamashita K, Ouchi K, Shirai M, Gondo T, Nakazawa T, and Ito H. *Distribution of Chlamydia pneumoniae Infection in the Atherosclerotic Carotid Artery*. Stroke. 1998; 29: 773-778.
6. Brooks GF, Butel JS, and Morse SA. *Medical Microbiology (Jawetz, Melnick, & Adelberg's)*. 24th edition. USA: McGraw-Hills; 2007.
7. Belland RJ, Ouellette SP, Gieffers J, and Byrne GI. *Chlamydia Pneumoniae and Atherosclerosis*. Cellular Microbiology. 2004; 6(2): 117-127.
8. Camm AJ and Fox KM. *Chlamydia Pneumoniae (And Other Infective Agents) in Atherosclerosis and Acute Coronary Syndromes*. European Heart Journal. 2000; 21(31): 1046-1051.
9. Sander D, Winbeck K, Klingelhöfer J, Etgen T, and Conrad B. *Enhanced Progression of Early Carotid Atherosclerosis is Related to Chlamydia Pneumoniae (Taiwan Acute Respiratory) Seropositivity*. Circulation. 2001; 103(10): 1390-1395.
10. Murwani S, Ali M, Muliarta K, Purwato, Susilawati S, dan Yuni DNA. *Studi Seroepidemiologis Chlamydia Pneumoniae dan Beberapa Mikroorganisme yang Diduga Menyebabkan Infark Miokard Akut*. Jurnal Kedokteran YARSI. 2007; 15(1): 22-26.
11. Fischer SF, Schwarz C, Vier J, and Hacker G. *Characterization of Antiapoptotic Activities of Chlamydia Pneumoniae in Human Cells*. Infection and Immunity. 2001; 69(11): 7121-7129.
12. Herrera VL, Shen L, Lopez LV, Didishvili T, Zhang YX, and Ruiz-Opazo N. *Chlamydia pneumoniae Accelerates Coronary Artery Disease Progression in Transgenic Hyperlipidemia-Genetic Hypertension Rat Model*. Journal of Molecular Medicine. 2003; 9(5-8): 135-142.
13. Sander D, Winbeck K, Klingelhöfer J, Etgen T, and

- Conrad B. *Reduced Progression of Early Carotid Treatment and Chlamydia Pneumoniae Seropositivity*. *Circulation Journal*. 2002; 106: 2428-2433.
14. Törmäkangas L, Alakärppä H, David DB, Leinonen M, and Saikku P. *Telithromycin Treatment of Chronic Chlamydia pneumoniae Infection in C57BL/6J Mice*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004; 48(10): 3655-3661.
 15. Fan T, Lu H, Hu H, et al. *Inhibition of Apoptosis in Chlamydia-infected Cells: Blockade of Mitochondrial Cytochrome c Release and Caspase Activation*. *Journal of Experimental Medicine*. 1998; 187(4): 487-496.
 16. Fischer SF, Vier J, Kirschnek S, et al. *Chlamydia Inhibit Host Cell Apoptosis by Degradation of Proapoptotic BH3-only Proteins*. *Journal of Experimental Medicine*. 2004; 200(7): 905-916
 17. Liu J. *Role of Macrophage Apoptosis in Atherosclerosis*. [Dissertation]. East Tennessee State University, Tennessee. 2004.
 18. Greene W, Xiao YM, Huang YQ, McClarty G, and Zhong GM. *Chlamydia-Infected Cells Continue to Undergo Mitosis and Resist Induction of Apoptosis*. *Infection and Immunity*. 2004; 72 (1): 451-460.
 19. Murwani S. *Peran Adhesin pada Outer Membrane Protein Chlamydia pneumoniae dalam Degradasi Kolagen tipe-IV melalui Aktivasi Makrofag dan Peningkatan MMP-9*. [Disertasi]. Universitas Brawijaya, Malang. 2008.
 20. Timpe JM, Holm MM, Vanlerberg SL, Basrur V, and Lafontaine ER. *Identification of a Moraxella catarrhalis Outer Membrane Protein Exhibiting Both Adhesin and Lipolytic Activities*. *Infection and Immunity*. 2003; 71(8): 4341-4350.
 21. Wizemann TM, Adamou JE, and Langermann S. *Adhesins as Targets for Vaccine Development (Synopsis)*. *Emerging Infectious Diseases Journal*. 1999; 5(3): 395-403.