

# IDENTIFIKASI PROTEIN IMUNOGENIK *CHLAMYDIA PNEUMONIAE* TERHADAP SERUM PENDERITA INFARK MIOKARD AKUT

## IDENTIFICATION OF IMMUNOGENIC PROTEIN OF *CHLAMYDIA PNEUMONIAE* TO ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION PATIENTS SERUM

Sri Murwani, Dwi Yuni Nur Hidayati  
Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

### ABSTRACT

*Chlamydia pneumoniae* is human respiratory tract pathogen and recently investigated as pathogen causing atherosclerosis and acute myocardial infarction (AMI). This research was carried out to detect protein pattern of *C. pneumoniae*, and to study its relation to AMI through detection of immunogenic protein. Design research was laboratory observational and analyzed descriptively. The subject was *C. pneumoniae*. Protein pattern of the bacteria was detected by electrophoresis method, and to detect the immunogenic protein was done immunoblotting. Serum was obtained from AMI patients in Saiful Anwar and Lavallette hospitals. The result showed, protein pattern of *C. pneumoniae* was protein with molecular weight 117, 107, 97, 91, 86, 61, 58, 52, 46, 44, 34, 23, 19, 9, 5, 4 kDa. Immunogenic proteins vary between AMI patients was 117, 107, 86, 61, 58, 52, 46, 44, 34 kDa. Non immunogenic proteins were 97, 91, 23, 19, 9, 5 and 4 kDa. Protein 61 kDa react to all of patient's serum. It was concluded, *C. pneumoniae* have protein fractions 117, 107, 97, 91, 86, 61, 58, 52, 46, 44, 34, 23, 19, 9, 5, and 4 kDa. Immunogenic proteins vary between AMI patients was 117, 107, 86, 61, 58, 52, 46, 44, 34 kDa, and 61 kDa was the immunodominant protein. The result proved *C. pneumoniae* as causative agent of atherosclerosis and acute myocardial infarction, in Indonesia particularly.

**Key words:** *C. pneumoniae*, immunogenic, AMI

### PENDAHULUAN

Sejak tahun 1988 infeksi *C. pneumoniae* dihubungkan dengan patogenesis aterosklerosis dan manifestasi klinisnya seperti penyakit jantung koroner, stenosis arteri carotid, aneurisma aortic, klaudifikasi dan stroke. Studi seroepidemiologi menunjukkan, bahwa pada penderita aterosklerosis titer antibodinya terhadap *C. pneumoniae* dua atau lebih tinggi dibanding individu normal. Hubungan tersebut didukung ditemukannya organisme pada atheroma (1,2), yaitu ditemukan dalam sel endotelial, makrofag dan (*smooth-muscle cell*) SMC plak aterosklerotik. Peran *C. pneumoniae* pada patogenesis aterosklerosis ditunjukkan adanya respons seluler yang dihubungkan dengan inflamasi, proliferasi sel dan remodeling jaringan (3)

*Chlamydia pneumoniae* dapat menginfeksi sel endotelial manusia secara *in vitro* dan menstimulasi ekspresi selectin-E, (*Intracellular Adhesion Molecule*) ICAM-1, (*Vascular Adhesion Molecule*) VCAM-1. Hal tersebut diduga merupakan faktor mekanisme patogenik lokal *C. pneumoniae* dalam menyebabkan gangguan inflamasi vascular, termasuk aterosclerosis (1,2). Menurut SE. Epstein (disitasi oleh Sherer dan Shoenfeld, 2001), *C. pneumoniae* dapat menginfeksi secara langsung dinding pembuluh darah (4).

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. XXIII, No. 2, Agustus 2007  
Korespondensi: Sri Murwani; Lab. Mikrobiologi FK Unibraw  
Malang; Jl. Veteran Malang; Telp: 580993 ext. 111

Semua spesies *Chlamydia* mempunyai (*Lipopolysaccharide*) LPS yang bersifat *genus-specific*, yang berada pada permukaan sel (*Elementary Body*) EB dan (*Reticulate Body*) RB (5). Lipopolisakarida tersebut dapat menginduksi diferensiasi monosit menjadi makrofag, dan meningkatkan kemampuan fagositosis (6), selain itu dapat menyebabkan terbentuknya *foam cells* makrofag secara *in vitro*, apabila dipapar dengan (*Low Density Lipoprotein*) LDL. Endotoksin bakteri dan pelepasan TNF- $\alpha$  dapat mengganggu pelepasan nitric-oxide dan prostacyclin, yang berlanjut terjadinya perubahan sel endotel. Kerusakan sel endotel dapat menyebabkan absorpsi LDL yang teroksidasi, menyebabkan kondisi patologis sel endotel, menginduksi rekrutmen sel mononuklear, mediator inflamasi dan *growth-factor*. Induksi respons fibroproliferatif SMC pembuluh dan terbentuknya plak aterosklerotik (7).

Selain itu (*Heat Shock Protein 60*) HSP60 *C. pneumoniae* (cHSP60) mempunyai kontribusi terjadinya aterosklerosis, yaitu menyebabkan teroksidasinya LDL (8). Dikatakan (*chlamydial Heat Shock Protein 60*) cHSP60, homolog dengan protein vaskuler manusia, sehingga terjadi *antigenic mimicry*, *cross-reaction* dan menyebabkan luka pada sel endotel vaskuler (9). cHSP60 ditemukan pada karotid atheroma manusia (10).

Hal paling penting pada patogenesis (*Infark Miokard Akut*) IMA adalah hancurnya plak dan terbentuknya thrombus. Ruptur plak sering terjadi pada daerah dekat *shoulder*

plak, yang mempunyai *fibrous cap* tipis dan *core* yang kaya lipid. Integritas struktural dinding arteri terutama tergantung pada *extracellular matrix* (ECM). Degradasi kolagen fibriler akan menurunkan kemampuan *fibrous cap* menahan stress mekanik. Famili (*Materix Metalloproteinase*) MMP merupakan enzim yang memegang peran penting terhadap integritas jaringan pada lesi aterosklerotik, dapat menyebabkan ruptur plak dan *unstable coronary syndrome* (11).

*Smooth-Muscle Cell* vaskuler manusia merupakan sel yang paling banyak pada dinding pembuluh arteri, dan pada kultur mengekspresikan MMP-2 secara konstitutif dan MMP-1, MMP-3, MMP-9 pada level yang tidak memberikan arti. Pada lesi aterosklerotik, SMC mengekspresikan keempat MMP tersebut sebagai protein yang *immunoreactive* (11). Huang *et al* (1999), mendemonstrasikan MMP-1, MMP-9 dan MMP-3 yang diekspresikan oleh sel-sel di ateroma, yang meliputi luminal, *neovascular endothelial cells*, makrofag, SMC. Ketiga MMP tersebut tidak ditemukan pada arteri normal. Dikatakan MMP-1 paling dominan dan mengawali rusaknya kolagen, pada pH normal terutama kolagen tipe 1 (12). *C. pneumoniae* menginduksi ekspresi 92Kda gelatinase oleh makrofag. Stimulasi produksi 92 kDa gelatinase oleh *monocyte-derived macrophage* oleh *C. pneumoniae* melalui beberapa protein chlamydia yaitu *Omp2*, *MOMP* dan *HSP60* (13).

Hasil-hasil penelitian yang menyebutkan adanya keterlibatan kuman *C. pneumoniae* pada aterosklerosis dan IMA diperkuat dengan hasil penelitian sebelumnya, yaitu penelitian seroepidemiologi *C. pneumoniae* pada penderita IMA yang dihubungkan faktor resiko IMA lainnya (hipertensi, merokok, usia, jenis kelamin) dan kemungkinan adanya infeksi multipel dengan bakteri-bakteri lain yang diduga dapat menyebabkan IMA (*Cytomegalovirus*, *Helicobacter pylori*, *Phorphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans*). Hasil penelitian menunjukkan, bahwa dari 27 pasien IMA dari Rumah Sakit Saiful Anwar Malang dan Rumah Sakit Lavalette Malang, menunjukkan bahwa 25 pasien (92,59%) terinfeksi *C. pneumoniae* dan sebagian besar terjadi *infection burden*. Infeksi *C. pneumoniae* tersebut tidak disertai dengan faktor resiko lainnya (merokok, hipertensi, hiperkolesterol dan diabetes) (14).

Berdasar pustaka-pustaka yang ada dan penelitian pendahuluan yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa ada hubungan antara *C. pneumoniae* dengan IMA. Pada penelitian ini dilakukan karakterisasi profil protein *C. pneumoniae* (berdasar berat molekul) dan dicari protein-protein yang imunogenik pada penderita IMA. Harapan lebih lanjut protein imunogenik tersebut dapat digunakan sebagai diagnosa dini individu terinfeksi *C. pneumoniae* terhadap resiko terkena IMA.

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi profil protein *C. pneumoniae* dan imunogenisitasnya pada pen-

derita IMA. Sedangkan manfaat penelitian ini adalah sebagai dasar pengembangan penelitian tentang *C. pneumoniae*, dan pengembangan ilmu pengetahuan tentang hubungan penyakit-penyakit infeksi dengan IMA.

## METODE

### Rancangan penelitian

Rancangan penelitian adalah observasional laboratorik dan dianalisa secara analitik diskriptif. Sampel penelitian adalah *C. pneumoniae* strain TWAR.

### Bahan

Antigen *C. pneumoniae* diperoleh dari United States Biological (Catalog No. C4250-28), sedang serum darah penderita di peroleh dari RS. Saiful Anwar dan RS. Lavalette Malang. Bahan lain yang dipergunakan antara lain akrilamid, tris base, biru komasik, methanol, TEMED, sample buffer, SDS, membran nitroselulose, konjugat, substrat, *bovine serum albumin*, *high molecular weight protein marker*,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaCl}$  dan akuades.

Alat yang diperlukan adalah 1 unit alat elektroforesis, 1 unit alat elektroblotting, *heparinized venoject*. Tempat penelitian berada di Laboratorium Sentral Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

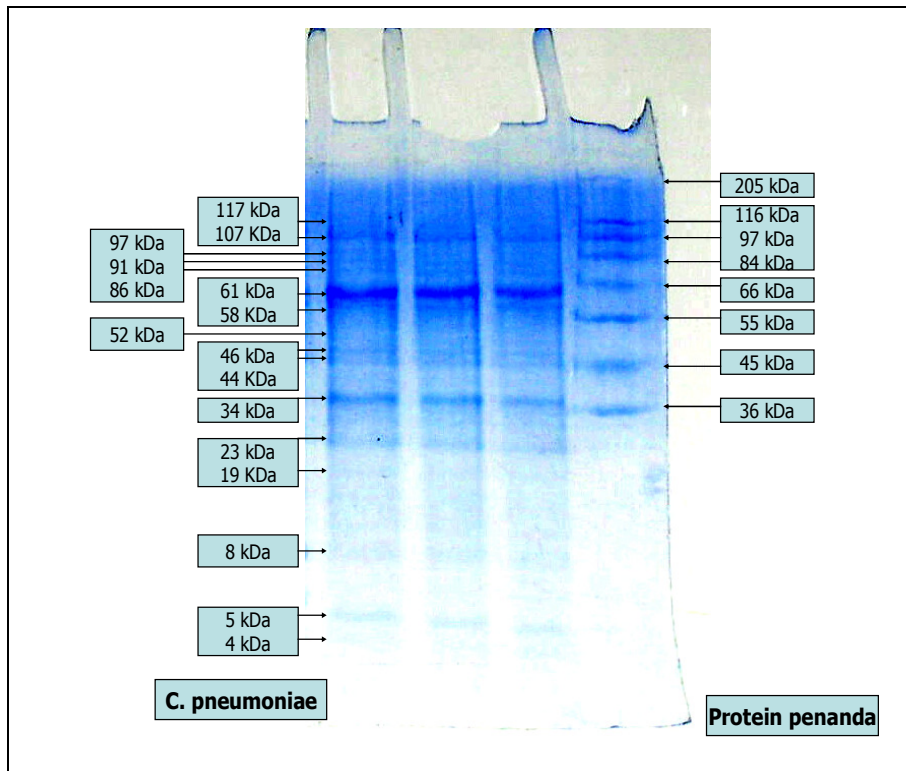
### Langkah-langkah penelitian

Profil protein *C. pneumoniae* dideteksi menggunakan elektroforesis pada akrilamid 12,5%. Deteksi reaktifitas protein *C. pneumoniae* pada penderita IMA menggunakan tehnik imunoblotting. Metode yang digunakan adalah *semidry immunoblotting*.

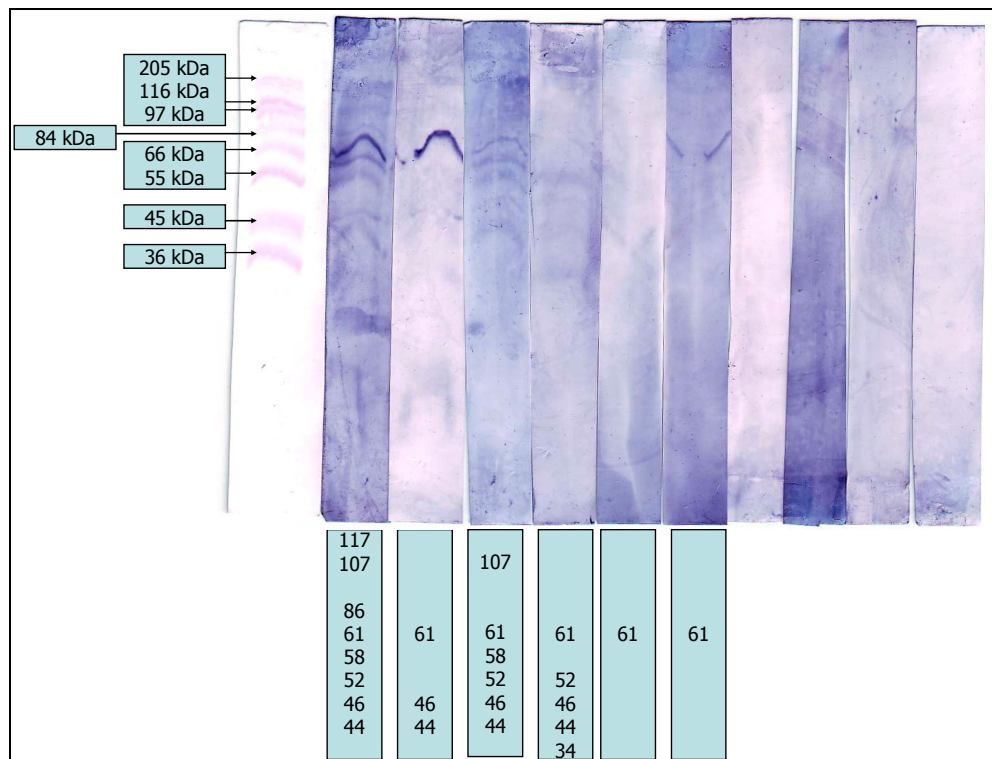
## HASIL PENELITIAN

*Whole cell C. pneumoniae* dielektroforesis pada akrilamid 12,5 %. Hasil elektroforesis menunjukkan fraksi-fraksi protein *C. pneumoniae* dengan berat molekul (Gambar 1): 117.000; 107.000; 97.000; 91.000; 86.000; 61.000; 58.000; 52.000; 46.000; 44.000; 34.000; 23.000; 19.000; 8.000; 5.000; 4.000 Dalton (Da). Diperoleh satu protein mayor dengan berat molekul 61.000 Da (perhitungan berat molekul menggunakan regresi eksponensial).

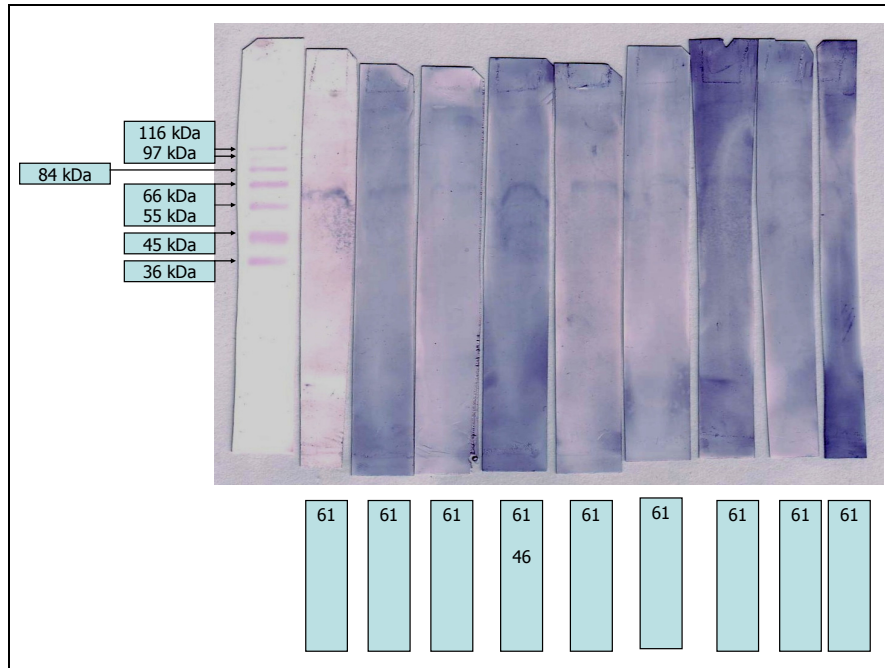
Hasil elektroforesis kemudian direaksikan dengan antibodi penderita IMA untuk melihat sifat imunogenisitas protein. Selama 10 bulan penelitian, diperoleh 19 serum penderita IMA dari RS. Saiful Anwar dan RS. Lavalette Malang. Diagnosis IMA ditentukan berdasar anamnesis, pemeriksaan klinis, EKG dan tes darah (CPK; CKMB; dan troponin).



Gambar 1. Hasil elektroforesis *C. pneumoniae* (lajur 1, 2, 3). Lajur 4, protein penanda



Gambar 2. Hasil imunobloting fraksi protein *C. pneumoniae* terhadap antibodi penderita IMA



Gambar 3. Hasil imunoblotting fraksi protein *C. pneumoniae* terhadap antibodi penderita IMA

Tabel 1. Hasil imunoblotting antara protein *C. pneumoniae* terhadap antibodi penderita IMA

Nomor Serum Penderita IMA	Fraksi Protein <i>C. pneumoniae</i> (Dalton) yang Bereaksi Positif terhadap Serum Penderita IMA
1	117.000, 107.000, 86.000, 61.000, 58.000, 52.000, 46.000, 44.000
2	61.000, 46.000, 44.000
3	107.000, 61.000, 58.000, 52.000, 46.000, 44.000
4	61.000, 52.000, 46.000, 44.000, 34.000
5	61.000
6	61.000
7	Tidak bereaksi
8	Tidak bereaksi
9	Tidak bereaksi
10	Tidak bereaksi
11	61.000
12	61.000
13	61.000
14	61.000, 46.000
15	61.000
16	61.000
17	61.000
18	61.000
19	61.000

Dari 19 serum tersebut yang menunjukkan reaksi positif terhadap fraksi protein *C. pneumoniae* sebanyak 15 (Gambar 2 dan Gambar 3). Fraksi protein yang bereaksi variatif di antara penderita IMA. Fraksi protein tersebut adalah protein 117.000, 107.000, 86.000, 61.000, 58.000, 52.000, 46.000, 44.000, 34.000 Da. Sedang yang tidak bereaksi adalah protein 97.000, 23.000, 19.000, 8.000, 5.000, dan 4.000 Da. Protein 61.000 Da selalu reaktif pada serum setiap penderita (Tabel 1).

## DISKUSI

Hasil elektroforesis diperoleh hasil fraksi-fraksi protein *C. pneumoniae* dengan berat molekul: 117.000; 107.000; 97.000; 91.000; 86.000; 61.000; 58.000; 52.000; 46.000; 44.000; 34.000; 23.000; 19.000; 8.000; 5.000; 4.000 Dalton (Da). Menurut Vehmaan-Kreula *et al.* (2001), pada bagian luar *elementary body (EB)* *C. pneumoniae* mengandung protein struktural yang kaya sistein, dengan berat molekul 98, 60-doublet, 39,5 dan 15,5 kDa. Protein 60 kDa merupakan protein mayor, yang sebenarnya terdiri dari 2 fragmen protein, yaitu protein omp-2 dan cHSP60 (13).

Dari hasil penelitian ini, yang merupakan protein mayor adalah 61 kDa, diduga protein tersebut sebenarnya adalah protein 60 kDa *C. pneumoniae*. Hal ini didukung oleh hasil immunoblotting, bahwa protein 61 kDa merupakan antigen yang paling imunodominan. Akan tetapi untuk meyakinkan diperlukan uji lebih lanjut, misalnya dengan immunoblotting protein tersebut terhadap antibodi monoklonal anti-60 kDa. Vehmann-Kreula *et al.*, (2001), menambahkan bahwa protein 60 kDa merupakan *outer membrane protein-2 (omp2)* membran luar chlamydia, dan merupakan imunogen utama *C. pneumoniae* (13). Ciervo *et al.* (2002), mengatakan bahwa protein 60 kDa merupakan protein proinflamatori dan bersifat sangat imunogenik (15).

Bereaksinya fraksi protein *C. pneumoniae* dengan antibodi penderita memperkuat dugaan bahwa *C. Pneumoniae* dapat menimbulkan aterosklerosis dan IMA. Hal ini didukung dari hasil penelitian pendahuluan yang peneliti lakukan (Murwani dkk, 2004), tentang studi seroepidemiologi *C. pneumoniae* pada penderita IMA dan hubungannya dengan faktor resiko konvensional dan *burden infection*. Hasil penelitian pendahuluan tersebut menunjukkan, bahwa dari 27 penderita IMA positif mempunyai IgG terhadap *C. pneumoniae*.

Fraksi protein *C. pneumoniae* yang reaktif terhadap antibodi penderita IMA bervariasi. Hal tersebut kemungkinan dapat dihubungkan dengan kondisi penderita. Pada penderita yang sangat lemah atau *immunocompromized*,

kemungkinan dapat meningkatkan patogenisitas, imunogenisitas relatif dari patogen yang menginfeksi.

Fraksi protein *C. pneumoniae* yang reaktif pada penelitian ini adalah protein 117.000, 107.000, 86.000, 61.000, 58.000, 52.000, 46.000, 44.000 dan 34.000 Da. Protein 61 kDa merupakan protein yang imunodominan. Kuo *et al.* (1995), meneliti profil protein beberapa isolat *C. pneumoniae* (TWAR) dan memperoleh hasil bahwa pada semua isolat ditemukan protein 39,5 kDa yang analog dengan MOMP tetapi tidak imunodominan dan bereaksi silang dengan chlamydia spesies lainnya. Ditemukan juga protein 15,5, 60 dan 98 kDa. Penelitian lain menggunakan analisis immunoblotting serum kelinci yang diimunisasi dan serum pasien yang terinfeksi *C. pneumoniae*, menemukan beberapa protein reaktif yaitu protein MOMP, protein 30, 43, 50, 60, 68 dan 75 kDa. Freidank *et al.* (disitasi oleh Kuo *et al.*, 1995) menemukan protein dominan yang reaktif dengan berat molekul 54 kDa. Iijima *et al.* (disitasi oleh Kuo *et al.*, 1995) menemukan protein imunodominan 43, 46 dan 53 kDa. Dikatakan bahwa ketiga protein tersebut bersifat spesifik untuk *C. pneumoniae* (16).

## KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan:

1. Bereaksinya fraksi protein *C. pneumoniae* terhadap antibodi penderita IMA memperkuat dugaan bahwa *C. pneumoniae* dapat menyebabkan IMA
2. *C. pneumoniae* mempunyai fraksi-fraksi protein dengan berat molekul: 117.000; 107.000; 97.000; 91.000; 86.000; 61.000; 58.000; 52.000; 46.000; 44.000; 34.000; 23.000; 19.000; 8.000; 5.000; 4.000 Dalton (Da).
3. Fraksi protein *C. pneumoniae* yang bereaksi dengan antibodi penderita IMA bervariasi, yaitu protein 117.000; 107.000; 86.000, 61.000, 58.000, 52.000, 46.000, 44.000 dan 34.000 Da.
4. Protein 61 kDa bersifat imunodominan. Diduga protein tersebut merupakan omp-2.

## SARAN

Hasil penelitian ini masih jauh dari sempurna, sehingga masih perlu perbaikan, misalnya:

1. Sampel serum perlu ditambah jumlah maupun tempat pengambilan, agar mendapat hasil yang dapat dipakai sebagai dasar penelitian selanjutnya.
2. Perlu dilakukan uji reaksi silang antigen *C. pneumoniae* terhadap patogen lainnya, untuk menghilangkan positif palsu.

## DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Campbell LA, Kuo C-C, Grayston JT. *Chlamydia pneumoniae and Cardiovascular Disease*. Emerging Infectious Disease, October-December 1998; 18(4).
2. Kaukoranta-Tolvanen SS, Ronni T, Leinonen M, Saikku P, Laitinen K. *Expression of Adhesion Molecules on Endothelial Cells Stimulated by Chlamydia pneumoniae*. Microb Pathog 1999; 21(5): 407-411
3. Rodel J, Woytas M, Groh A, Schmidt K-H, Hartmann M, Lehmannm, Straube E. *Production of Basic Fibroblast Growth Factor and Interleukin 6 by Human Smooth Muscle Cells following Infection with Chlamydia pneumoniae*. Infection and Immunity, 2000; 3635-3641
4. Sherer Y and Shoenfeld Y. Archived Reports. *Report on the European Atherosclerosis Society Workshop on Immune System in Atherosclerosis*. 2001.[http://www.rheuma21st.com/archives/shoenfeld\\_immune\\_sys\\_atherosclerosis%20.html](http://www.rheuma21st.com/archives/shoenfeld_immune_sys_atherosclerosis%20.html)
5. Christiansen G, Boesen T, Hjerno K, Daugaard L, Mygind P, Madsen AS, Knudson K, Falk E, Birkelund S. *Molecular biology of Chlamydia pneumoniae surface protein and their role in immunopathogenicity*. Denmark: Department of Medical Microbiology and Immunology and Department of Molecular and Structural Biology, University of Aarhus, Lake Diagnostic, University Hospital Aarhus. 1999.
6. Yamaguchi H, Haranaga S, Widen R, Friedman H, Yamamoto Y. *Chlamydia pneumoniae Infection Induce Differentiation of Monocytes into Macrophages*. Infection and Immunity, 2002; 70(5): 2392-2398
7. Ngeh J and Gupta S. *Chlamydia pneumoniae and Atherosclerosis: Causal or Coincidental Link?*, ASM News, 2000; 66 (12)
8. Byrne GI and Kalayoglu MV. *Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis: Link to diseases process*. Madison: Department of Medical Microbiology & Immunology, University of Wisconsin. 1999.
9. Mayr M, Metzler B, Kiechl S, Willeit J, Schett G, Xu Q, Wick G. *Endothelial Cytotoxicity Mediated by Serum Antibodies to Heat Shock Proteins of Escherichia coli and Chlamydia pneumonia*. Institute for Biomedical Aging Research, Austrian Academy Sciences Innsbruck; Department of Neurology, University Clinic, Innsbruck; Institute for General and Experimental Pathology, University of Innsbruck, Medical School, Innsbruck, Austria. E-mail [IBA@oaeaw.ac.at](mailto:IBA@oaeaw.ac.at)
10. Kol A, Sukhova G.K, Lichtman, AH, Libby P. *Chlamydial Heat Shock Protein 60 Localizes in Human Atheroma and Regulates Macrophage Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Matrix Metalloproteinase Expressin*. Circulation, 1998; 300-307.
11. Schoenbeck U, Mach F, Sukhova GK, Murphy C, Bonnefoy J-Y, Fabunmi RP, Libby P. *Regulation of Matrix Metalloproteinase Expression in Human Vascular Smooth Muscle Cells by T Lymphocytes, A Role for CD40 Signaling in Plaque Rupture?* Circulation Research, 1997; 81: 448-454.
12. Huang Y, Mironova M, Lopes-Virella MF. *Oxidation LDL Stimulates Matrix Metalloproteinase-1 Expression in Human Vascular Endothelial Cells*. Atherosclerosis, Thrombosis, Vascular Biology, 1999;19:2640
13. Vehmaan-Kreula P, Puolakkainen M, Sarvas M, Welgus HG, Kovanen PT. *Chlamydia pneumoniae Protein Induce Secretion of the 92-kDa Gelatinase by Human Monocyte-Derived Macrophages*. Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2001;21:ie
14. Murwani S, Muliarta K, Ali M, Purwanto, Susilowati IDA, Yuniarti, Nur'aini DD. *Studi seroepidemiologi Infark Miokardial Akut (IMA) yang terkait dengan infeksi Chlamydia pneumoniae dan adanya infeksi multiple dengan mikroorganisme lain yang diduga dapat menyebabkan IMA*. Malang: Pasca Sarjana Universitas Brawijaya. 2001.
15. Ciervo A, Visca P, Petrucca A, Biasucci LM, Maseri A, Cassone A. *Antibodies to 60-Kilodalton Heat Sock Protein and Outer Membrane Protein-2 of Chlamydia pneumoniae in Patients with Coronary Heart Disease*. Clinical and Diagnosis Laboratory Immunology, 2002; 9(1): 66-74
16. Kuo A, Sukhova GK, Lichtman AH, Libby P. *Chlamydial HeatShock Protein 60 Localize in Human Atheroma and Regulates Macrophage Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Matrix Metalloproteinase Expression*. Circulation; 1998; 98: 300-307.



