



MATA KULIAH PENUNJANG DISERTASI (MKPD)

**Suilysin: Peran dalam Patogenesis Meningitis
Streptococcus Suis terkait *Brain Microvascular
Endothelial Cells***

DOSEN PENGAMPU MATA KULIAH:

Prof. Dr. dr. A.A. Raka Sudewi, Sp.S(K)

MAHASISWA:

dr. Tjokorda Istri Pramitasuri, S.Ked., M.Biomed

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS UDAYANA**

2020

PENDAHULUAN

Suilysin adalah salah satu faktor virulen penting yang dimiliki oleh bakteri *Streptococcus suis* (*S. suis*). Studi Takeuchi *et al* (2014) menunjukkan bahwa persentase mortalitas dan densitas bakteri pada darah dan otak dari tikus yang terinfeksi *Streptococcus suis* strain ST1 setelah 72 jam lebih tinggi dibandingkan pada SLY-*knockout mice* (Takeuchi *et al*, 2014). Suilysin diketahui sebagai faktor virulensi yang paling berpengaruh pada strain epidemik dari *S. suis*, terutama *highly virulent strain* yang menyebabkan *Streptococcal Toxic Shock-Like Syndrome* (STSLS) (Takeuchi *et al.*, 2014). Setelah timbul tanda dan gejala bakteremia, infeksi dapat berlanjut ke sistem saraf pusat (SSP). Bakteri harus dapat menembus Sawar Darah Otak (SDO) terlebih dahulu sebelum menimbulkan reaksi inflamasi di parenkim. Bagian SDO yang paling krusial dalam perlindungan terhadap agen infeksius adalah *Brain Microvascular Endothelial Cells* (BMEC). *S. suis* memiliki Suilysin sebagai faktor virulen yang memfasilitasi perusakan BMEC.

TINJAUAN PUSTAKA

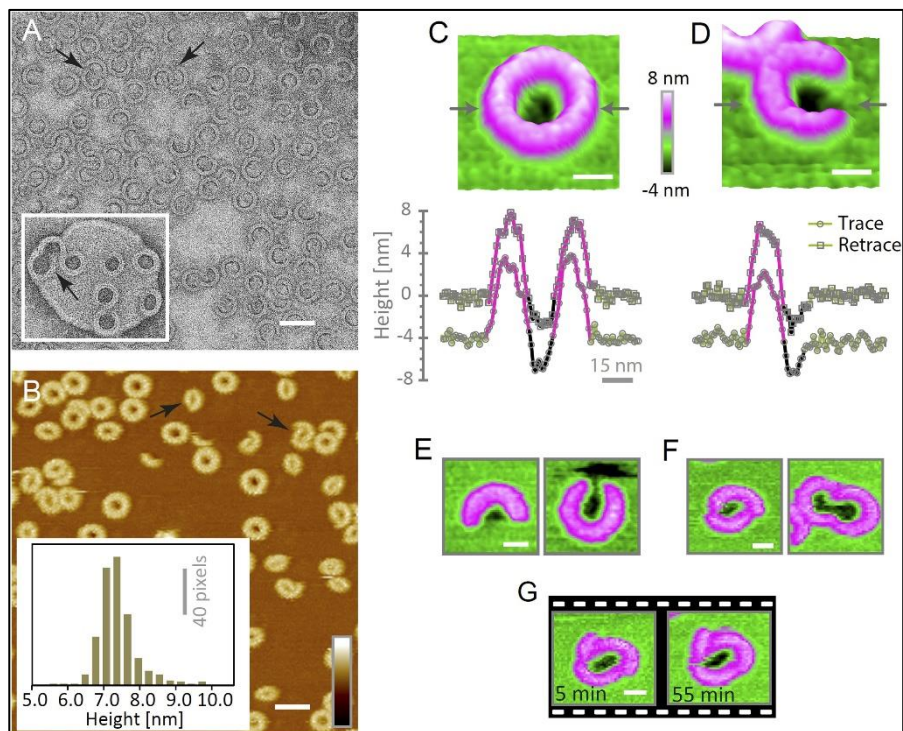
Pembentukan Pori pada Membran Epitel oleh Suilysin

Suilysin adalah anggota dari *Cholesterol Dependent Cytolysin* (CDC). Anggota CDC menunjukkan kesamaan dalam kepemilikan dua fungsi dasar. Pertama, mereka berikatan dengan membran sel target melalui interaksi spesifik antara domain 4 *carboxy-terminal* dan reseptor kolesterol pada membran. Kedua, sebagai respon dari pengikatan terhadap membran, protein akan membentuk oligomer, mengubah konformasinya pada *amino-terminal portion*, dan membentuk pori transmembran (Polekhina *et al.*, 2005). Studi lainnya menunjukkan bahwa struktur 3D Suilysin yang diteliti memiliki *conserved region* yang sama dengan anggota CDC lainnya. Suilysin memiliki sekuen primer yang bersifat *highly conserved* di dua region; inti hidrofobik di N-terminus dan *Trp-rich motif* di ujung dari C-terminus domain keempat. Trp-rich motif telah lama dispekulasikan terlibat dalam pengikatan CDC dengan kolesterol. Variasi pada motif ini diketahui berhubungan dengan perbedaan fungsi di antara anggota CDC (Nagamune *et al.*, 2004; Polekhina *et al.*, 2005; Soltani *et al.*, 2007).

Sebagai salah satu faktor virulen penting, Suilysin berperan dalam memfasilitasi *S. suis* untuk melewati SDO. Penelitian Guo *et al* (2014) memeriksa kemampuan Suilysin yang diproduksi oleh *S. suis* serotipe 2 strain CVCC606 dalam menginduksi pelepasan sitokin proinflamasi oleh *Rat Brain Microvascular Endothelial Cells* (RBMEC). RBMEC yang telah ditambahkan *purified* Suilysin menunjukkan kadar Interleukin (IL)-6 dan permeabilitas SDO yang lebih tinggi dibandingkan kontrol (Guo *et al*, 2014). Penelitian

tersebut membuka jalan bagi peneliti lain untuk menelaah lebih lanjut mengenai patomekanisme yang mendasari peningkatan permeabilitas SDO yang terinduksi Suilysin.

Suilysin adalah *Cholesterol-Dependent Cytolysin* (CDC) yang bersifat toksik terhadap sel epitel dan endotel inang serta makrofag. Penelitian Leung *et al* (2014) memvisualisasikan transisi struktur Suilysin selama pembentukan pori pada membran sel epitel oleh CDC secara detail. Aktivitas Suilysin *wild-type* dan mutan mengalami *co-assembling* selama inkubasi, sehingga transisi yang terjadi hingga pembentukan pori pada epitel (*prepore-to-pore transition*) memerlukan perubahan konformasional dari seluruh subunit dari Suilysin dan diperlukan insersi dari subunit ke dalam membran. Mobilitas *prepore assemblies* pada permukaan membran menyebabkan subunit untuk bergeser mengikuti arah pembukaan pori, yang dikonfirmasi dengan ekspansi diameter sebanyak 8% (Leung *et al.*, 2014). Oligomer Suilysin menunjukkan distribusi *pore assembly* yang beragam, dari bentuk *arc* hingga *ring-shaped* dalam keadaan lingkungan yang dibuat menyerupai inang asli. Hasil penelitian Leung *et al* menunjukkan bahwa perforasi membran membentuk lengkungan yang berukuran antara 15 dan 37 monomer, dan hal tersebut dapat membuktikan bahwa β -*barrel* yang tertutup sempurna tidak berpengaruh terhadap insersi β -*hairpin* transmembrane dan perforasi membran (Leung *et al.*, 2014). Ukuran lesi pada membran bervariasi antara setengah dari lumen hingga pori yang lebih besar yang terbentuk dari *interlocked arcs* (Gambar 2.1) (Leung *et al.*, 2014).



Gambar 2.1. Suilyisin menyebabkan pembentukan pori pada membran epitel. A) Pencitraan negatif EM dari *arc- and ring-shaped assembly* dari Suilyisin pada *monolayer* berbahan kolesterol. B) Suilyisin mengalami ekstensi sejauh 7-8 nm di atas dasar *lipid bilayer* membran yang ditunjukkan oleh histogram tinggi untuk 402 partikel individu (inset). C) Topografi dari Suilyisin *ring* menunjukkan lubang berwarna hitam pada lumen, sedangkan *lipid bilayer* yang masih intak berwarna hijau. D) Topografi Suilyisin *arc* menunjukkan warna hitam pada membran. E) Contoh Suilyisin *arc* dengan panjang yang berbeda-beda. Tampak lubang transmembrane yang terlihat secara konsisten. F) Contoh *interlocked-arc assembly*. G) Gambar sekuen dari *interlocked-arc assembly* yang terlihat stabil selama 50 menit (Leung *et al.*, 2014).

Induksi Inflamasi oleh Suliyisin setelah Menembus SDO

Peningkatan permeabilitas SDO dipengaruhi oleh beberapa mekanisme, yaitu peningkatan *Matrix Metalloproteinase 9* (MMP9), penurunan ekspresi *E-cadherin*, kerusakan protein *tight junction* pada SDO oleh molekul toksik seperti *phosphatidylinositol-3-kinase γ* , gangguan produksi protein sitoskeletal endothelial, peningkatan eksitotoksitas endotel yang dipicu oleh peningkatan ekspresi reseptor *N-methyl-D-aspartate* (NMDA) subunit 1, dan kerusakan metabolisme oksidatif mitokondria pada endotel (Najjar, 2013). Seluruh mekanisme tersebut melibatkan sitokin proinflamasi, aktivasi dan proliferasi mikroglia, serta peningkatan mediator inflamasi yang seluruhnya berkaitan dengan Suliyisin (Vadeboncoeur *et al.*, 2003). Salah satu mediator inflamasi yang menarik perhatian klinisi dan peneliti adalah prostaglandin.

Prostaglandin E2 (PGE2) adalah salah satu jenis mediator inflamasi yang dibentuk dari asam arakhidonat oleh bantuan *Cyclooxygenase* (COX) dan *PGE2-synthase enzyme*, dan mampu berikatan dengan reseptor heteromerik *G-protein coupled receptor* (GPR) E-Prostanoid (EP) 1, 2, 3, dan 4. Keempat reseptor memiliki efek yang berbeda pada kadar kalsium intraseluler, *phosphatidylinositol turnover*, dan produksi *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP), yang secara akumulatif dapat merangsang efek toksik atau fisiologis, tergantung dari konteks cedera yang ditimbulkan serta jenis sel yang mengekspresikan reseptor tersebut, sehingga interaksi PGE2 dan reseptornya menjadi salah satu pertimbangan dalam merancang strategi terapeutik dari meningitis *S.suis* (Phillis *et al.* 2006; Ahmad *et al.* 2008; Andreasson, 2009; Ahmad *et al.* 2013). Dalam keadaan patologis, PGE2 meningkatkan permeabilitas SDO bersama dengan *Nitric Oxide* (NO) yang diekskresikan oleh iNOS dan meningkatkan survival *S.suis*

terhadap serangan sel imun dengan merangsang apoptosis dan menghambat maturasi sel B dan T (Tilley *et al.*, 2001; Harris *et al.*, 2002).

Stres oksidatif dalam patogenesis *S.suis* diperankan oleh NO, *Malondialdehyde* (MDA), dan penurunan antioksidan endogen, dan diantara ketiganya, NO merupakan mediator yang paling berperan dalam cedera endotel vaskuler dan SDO (Chen *et al.*, 2018). NO adalah mediator yang diproduksi oleh tiga isoform dari *Nitric Oxide Synthase* (NOS), yaitu neuronal NOS, *endothelial* NOS (eNOS), dan *inducible* NOS (iNOS), dan diantara ketiganya, iNOS adalah produsen NO yang berperan dalam patogenesis *S.suis*, sedangkan eNOS dan nNOS memproduksi NO yang bersifat neuroprotektif. *Reactive Oxygen Species* (ROS) memicu konversi oksidatif BH₄ (kofaktor eNOS) menjadi *dihydrobiopterin* (BH₂), kemudian menurunkan bioavailabilitas BH₄ (Chen *et al.*, 2018). Akibatnya, aktivitas eNOS dihambat. Penurunan BH₄ dan peningkatan kadar BH₂ pada endotel memisahkan oksidasi L-arginine dari reaksi transfer *proton-coupled electron*, kemudian mengganti substrat NOS dari L-arginine menjadi oksigen molekuler, yang secara akumulatif memfasilitasi sintesis O₂⁻ sekaligus menurunkan bioavailabilitas NO fisiologis pada endotel. O₂⁻ kemudian akan bergabung dengan NO residual menjadi *peroxynitrite* (ONOO⁻), yaitu *Reactive Nitrogen Species* (RNS) yang memiliki sifat oksidan yang kuat dan mampu menyebabkan cedera endotel vaskular. Mekanisme umpan balik positif dari produksi ONOO⁻ akan semakin meningkatkan konversi oksidatif dari BH₄ menjadi BH₂, sehingga aktivitas eNOS juga akan semakin rendah secara kuantitas maupun kualitas (Chen *et al.*, 2018).

ROS yang umum ditemui terdiri dari *superoxide* (O₂⁻), *hydroxyl radical* (HO⁻), *hydrogen peroxide* (H₂O₂⁻), dan *peroxynitrite* (ONOO⁻) (Najjar, 2013). Otak manusia

sangat rawan terhadap paparan stress oksidatif karena tingginya kadar asam lemak tidak jenuh yang dapat diperoksidasi dan mineral transisi yang memicu peroksidasi lipid dan mengkonversi H_2O_2 menjadi HO^\cdot , selain itu, kebutuhan oksigen otak tergolong tinggi dan mekanisme pertahanan dari antioksidan relatif rendah (Najjar, 2013). Walaupun ROS dapat membatasi cedera dan membantu akselerasi pemulihan cedera otak pada kadar yang rendah, namun pada kondisi kadar ROS yang tinggi akan terjadi kerusakan makromolekul biologis seperti lipid, protein, dan *Deoxyribonucleic Acid* (DNA). NO dijuluki sebagai “*Janus-faced substance*” karena memiliki dua kemampuan yang bertolak belakang, yaitu untuk melindungi fungsi sel endotel vaskuler dan merusaknya, tergantung dari sumber sel penghasilnya (endotel dan non-endotel) dan konsentrasinya (Najjar, 2013).

Studi lainnya menunjukkan bahwa peningkatan $ONOO^\cdot$ pada endotel (BMVEC) berasosiasi dengan peningkatan permeabilitas SDO dan defisit neurologis, selain itu, terapi yang berbasis antioksidan S-nitrosoglutathione memperbaiki mekanisme reparasi neuron dan meningkatkan fungsi unit neurovaskuler dengan cara menurunkan sintesis $ONOO^\cdot$ pada endotel. Dengan demikian, terlihat hubungan yang saling terkait antara stres oksidatif, penurunan eNOS, kadar NO, dan neuroinflamasi pada abnormalitas struktural dan fungsional SDO (Najjar, 2013).

Selain memfasilitasi *S. suis* untuk melewati SDO, Sulisyn memiliki efek sitotoksik berupa penghambatan *uptake* mikroorganisme oleh sel fagosit inang serta merusak *barrier* epitel, sehingga dapat memfasilitasi translokasi *S. suis* menuju jaringan yang lebih dalam (He et al, 2014). Berkaitan dengan hasil penelitian tersebut, studi oleh Takeuchi (2013) mengkonfirmasi adanya infiltrasi intensif sel-sel inflamasi serta destruksi struktur fisiologis pada parenkim otak yang terlihat pada pemeriksaan

histopatologi. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa pada SSP, Suilysin berkontribusi terhadap peningkatan densitas bakteri serta memicu inflamasi yang tidak terkontrol pada jaringan parenkim otak tikus yang terinfeksi *S. suis wild-type strain* (Takeuchi, 2013). Studi oleh Jacobs (1996) menunjukkan bahwa imunisasi yang menarget Suilysin efektif untuk membentuk proteksi imun dalam menurunkan progresivitas dan melawan sifat letal dari strain *S. suis* serotipe 2 pada hewan coba tikus dan babi (Jacobs, 1996). Studi Takeuchi et al (2013) menunjukkan bahwa persentase mortalitas dan densitas bakteri pada darah dan otak dari tikus yang terinfeksi *S. suis* strain ST1 setelah 72 jam lebih tinggi dibandingkan pada *SLY-knockout mice* (Takeuchi et al, 2013).

PENUTUP

Suilysin adalah satu-satunya hemolysin pada *Streptococcus suis* (*S. suis*) yang berperan penting dalam memfasilitasi *S. suis* untuk melewati Sawar Darah Otak (SDO) melalui pembentukan pori pada membran epitel dan induksi inflamasi. Peningkatan permeabilitas SDO dipengaruhi oleh beberapa mekanisme, yaitu peningkatan *Matrix Metalloproteinase 9* (MMP9), penurunan ekspresi *E-cadherin*, kerusakan protein *tight junction* pada SDO oleh molekul toksik seperti *phosphatidylinositol-3-kinase* γ , gangguan produksi protein sitoskeletal endothelial, peningkatan eksitotoksisitas endotel yang dipicu oleh peningkatan ekspresi reseptor *N-methyl-D-aspartate* (NMDA) subunit 1, dan kerusakan metabolisme oksidatif mitokondria pada endotel.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad AS, Maruyama T, Narumiya S, Doré S. PGE2 EP1 Receptor Deletion Attenuates 6-OHDA-Induced Parkinsonism in Mice: Old Switch, New Target. *Neurotox Res.* 2013;23 (3):260–266. doi: 10.1007/s12640-013-9381-8.
- Ahmad AS, Yun YT, Ahmad M, Maruyama T, Doré S. Selective blockade of PGE2 EP1 receptor protects brain against experimental ischemia and excitotoxicity, and hippocampal slice cultures against oxygen-glucose deprivation. *Neurotox Res.* 2008;14 (4):343–351.
- Andreasson K. Emerging roles of PGE2 receptors in models of neurological disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2010 April; 91(3-4): 104–112. doi:10.1016/j.prostaglandins.2009.04.003.
- Chen C, Tang J, Dong W, Wang C, Feng Y, Wang J, Zheng F, Pan X, Liu D, Li M, et al. A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *S. suis* 2 Chinese isolates. *PLoS One.* 2007;2:e315. doi: 10.1371/journal.pone.0000315.
- Guo, Y & Yi, P & Zhang, T & Zhu, X & Hu, G & Dong, H & Jiang, D & Duan, H & Wang, J & Mu, X & Wei, X. (2014). Purified suilysin secreted by streptococcus suis serotype 2 induce interleukin-6 by rat brain microvascular endothelial cells. *Journal of Pure and Applied Microbiology.* 8. 1493-1503.
- Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D & Phipps RP (2002) Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* 23: 144–150.
- Leung C, Dudkina NV, Lukoyanova N, et al. Stepwise visualization of membrane pore formation by suilysin, a bacterial cholesterol-dependent cytolysin. *eLife.* 2015;4:e06740. Published 2015 Feb 11. doi:10.7554/eLife.06740
- Nagamune, H., Ohnishi, C., Katsuura, A., Fushitani, K., Whiley, R.A., Tsuji, A., and Matsuda, Y. (1996). Intermedilysin, a novel cytotoxin specific for human cells secreted by *Streptococcus intermedius* UNS46 isolated from a human liver abscess. *Infect Immun* 64, 3093–3100.
- Najjar, S. (2017). Neurovascular Unit Dysfunction and Blood – Brain Barrier Hyperpermeability Contribute to Schizophrenia *Neurobiology : A Theoretical integration of Clinical and experimental evidence,* 8(May). <https://doi.org/10.3389/fpsy.2017.00083>
- Phillis JW, Horrocks LA, Farooqui AA. Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders. *Brain Res Rev.* 2006;52 (2):201–243. S0165-0173(06)00011-7.
- Polekhina, G., Giddings, K.S., Tweten, R.K., and Parker, M.W. (2005). Insights into the action of the superfamily of cholesterol-dependent cytolysins from studies of intermedilysin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 600–605.
- Soltani, C.E., Hotze, E.M., Johnson, A.E., and Tweten, R.K. (2007). Structural elements of the cholesterol-dependent cytolysins that are responsible for their cholesterol-sensitive membrane interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 20226–20231.
- Takeuchi, D., Akeda, Y., Nakayama, T., Kerdsin, A., Sano, Y., Kanda, T., Hamada, S., Dejsirilert, S. & Oishi, K. 2014. The contribution of suilysin to the pathogenesis of *Streptococcus suis* meningitis. *J Infect Dis,* 209, 1509-19.

Tilley SL, Coffman TM & Koller BH (2001) Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin Invest* 108: 15–23.

Vadeboncoeur N, Segura M, Al-Numani D, Vanier G, Gottschalk M. Pro-inflammatory cytokine and chemokine release by human brain microvascular endothelial cells stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003 Jan 21;35(1):49-58.