

Mekanisme Toksigenitas Molekuler dan Potensi Medik Toksin Difteri

Djaja Rusmana, Endah Tyasrini, Inggreat Limmargo

Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Maranatha

Abstrak

*Diphtheria is a very acute contagious and acute upper respiratory tract infection caused by toxigenic strain Corynebacterium diphtheriae. The characteristic pseudomembrane may cause respiratory obstruction, so untreated infection can be fatal. Pathogenesis of Corynebacterium diphtheriae begins with colonization of the upper respiratory tract, followed by production of exotoxin which inactivate EF-2, consequently protein synthesis is block completely and irreversibly, causing cell death. Regulation of diphtheria toxin is controlled by *dtxR* gene in bacteria activated by Fe system. Nowadays, diphtheria toxin has been introduced as a new method in cancer therapy. Diphtheria toxin can be modified by substitution or germline engineering so that its toxicity is aimed only to cancer cells.*

Key words: Diphtheria toxin, cancer therapy

Pendahuluan

Difteri adalah suatu penyakit infeksi yang bersifat lokal pada membran mukosa atau kulit yang disebabkan *Corynebacterium diphtheriae*. Pada lokasi infeksi dapat ditemukan pseudomembran yang karakteristik. Beberapa strain *C. diphtheriae* memproduksi toksin difteri, yaitu protein yang dapat menyebabkan inflamasi lokal (pseudomembran), miokarditis, polineuritis dan gejala sistemik lainnya.⁵

Mengingat hal tersebut, penting bagi kita untuk lebih mengetahui mekanisme toksisitas *Corynebacterium diphtheriae* dan ba-

gaimana mekanisme regulasinya terhadap produksi toksin *Corynebacterium diphtheriae*. Selain itu juga kita perlu juga untuk lebih memahami kemungkinan pemanfaatan toksin difteri sebagai terapi kanker.^{2,9}

Toksigenitas

Terdapat dua faktor yang mempengaruhi kemampuan *Corynebacterium diphtheriae* untuk menghasilkan toksin difteri, yaitu kadar Fe ekstraseluler yang rendah dan keberadaan profaga pada kromosom bakteri yang diperoleh melalui siklus lisogenik. Gen un-

tuk produksi toksin terdapat pada kromosom profaga, namun ekspresi gen ini dikendalikan oleh protein represor bakteri yang diaktifkan oleh zat besi (Fe). Melalui mekanisme ini maka keberadaan Fe sangat mempengaruhi produksi toksin. Jumlah toksin yang besar hanya diperoleh bila bakteri telah mengalami siklus lisogenik dengan profaga dan dalam keadaan defisiensi Fe.¹¹

Peranan Fe

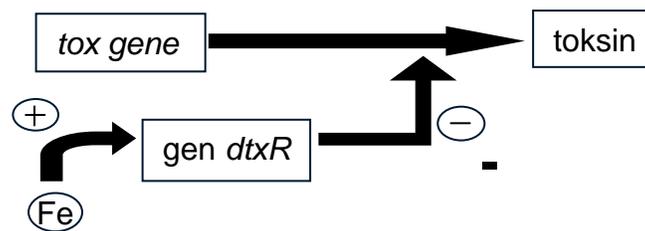
Pada keadaan *in vitro*, produksi toksin sangat bergantung kepada konsentrasi zat besi (Fe). Produksi toksin mencapai optimal pada kadar 0,14 µg/ml Fe, sedangkan bila kadar Fe meningkat sampai 0,5 µg/ml maka produksi toksin menjadi tertekan. Pada kultur *in vivo*, konsentrasi Fe anorganik (Fe²⁺ atau Fe³⁺) menjadi faktor yang sangat penting dalam mengendalikan produksi toksin. Toksin akan disintesis dalam jumlah

besar hanya setelah persediaan Fe ekstraseluler menipis.^{2,11}

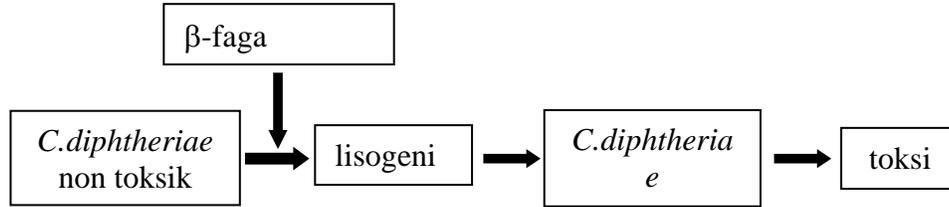
Produksi toksin oleh *tox gene* diatur oleh suatu mekanisme kontrol negatif dimana molekul represor, yaitu produk dari gen *dtxR*, diaktifkan oleh Fe. Molekul represor yang aktif akan mengikat *tox gene* pada posisi operator kemudian menghambat transkripsi gen tersebut. Bila Fe dihilangkan dari molekul represor maka terjadilah derepresi, molekul represor menjadi inaktif dan transkripsi *tox gene* berjalan. Fe dianggap sebagai korepresor karena dibutuhkan dalam proses represi dari *tox gene*.¹¹

Peranan β-faga

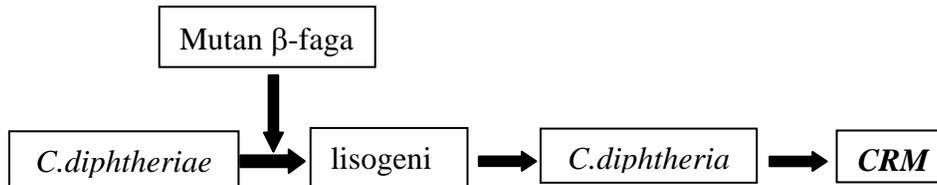
Hanya strain *Corynebacterium diphtheriae* yang telah mengalami siklus lisogenik dengan β-faga spesifik yang dapat menghasilkan toksin difteri. Faga mengandung gen struktural untuk membentuk molekul toksin.



Gambar 1. Peranan Fe terhadap produksi toksin
(Modifikasi dari Todar, K. 2002)



Gambar 2. Peranan β -faga dalam virulensi *Corynebacterium diphtheriae* (Modifikasi dari Todar, K. 2002)



Gambar 3. Demonstrasi pembuktian peran β -faga terhadap virulensi *Corynebacterium diphtheriae*. (Modifikasi dari Todar, K. 2002)

Keberadaan *tox gene* pada kromosom β -faga dapat dibuktikan melalui suatu proses lisogenik *Corynebacterium diphtheriae* oleh β -faga yang telah mengalami berbagai macam mutasi. Dari proses lisogenik ini akan dihasilkan material nontoksik tetapi masih bersifat antigenik, disebut *cross-reacting material* (CRM). Dengan diketahuinya CRM maka dapat disimpulkan bahwa *tox gene* berada pada kromosom faga dan bukan pada kromosom bakteri.¹¹

Patogenesis Difteri

Patogenesis infeksi bakteri meliputi langkah awal proses infeksius dan mekanisme selanjutnya yang menimbulkan perkembangan gejala penyakit. *Coryne-*

bacterium diphtheriae memiliki faktor virulensi yang memungkinkannya untuk menginvasi sel epitel saluran pernafasan atas dan kemudian menghasilkan suatu eksotoksin. Kemampuan invasi dan virulensi basil difteri ditentukan oleh antigen K bersama-sama dengan glikolipid. Antigen K adalah suatu protein termolabil dan terdapat pada permukaan dinding sel. Antigen ini berperan penting dalam imunitas antibakteri dan hipersensitivitas, tetapi tidak ada hubungannya dengan imunitas anti toksin. Selain antigen K, basil difteri juga memiliki *cord factor* berupa glikolipid yang mengandung *mycolic acids*. Pada tikus, *cord factor* ini terbukti menyebabkan kerusakan mitokondria, mereduksi respi-

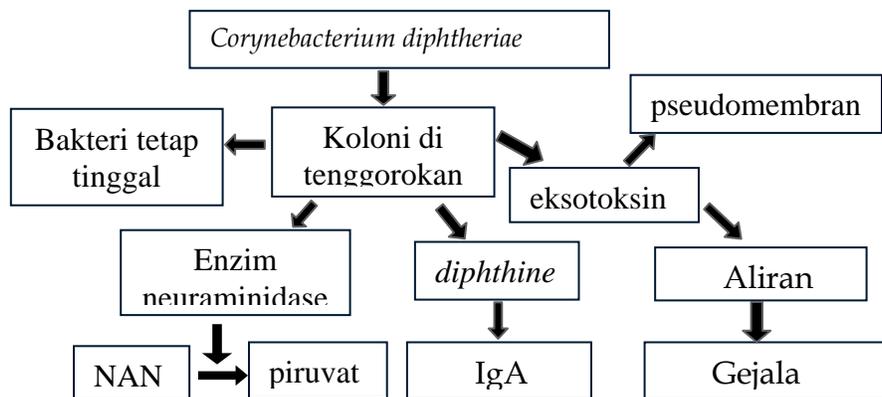
rasi, mereduksi fosforilasi dan mengakibatkan kematian sel.^{1,2,6,11}

Setelah menginvasi epitel saluran pernafasan atas, *C. diphtheriae* akan membentuk koloni pada tenggorokan dan kemudian menghasilkan enzim neuraminidase yang akan memecah *N-acetylneuraminic acid* (NAN) pada permukaan sel untuk menghasilkan piruvat yang berperan sebagai pemicu pertumbuhan. *C. diphtheriae* juga menghasilkan *diphthine*, yaitu suatu protease yang menginaktivkan IgA. *C. diphtheriae* juga akan menghasilkan protein eksotoksin yang potensial, toksin difteri, yang akan memasuki aliran darah lalu didistribusikan ke jaringan-jaringan tubuh dan menyebabkan gejala difteri disertai gejala komplikasi, terutama miokarditis dan neuritis.^{3,9}

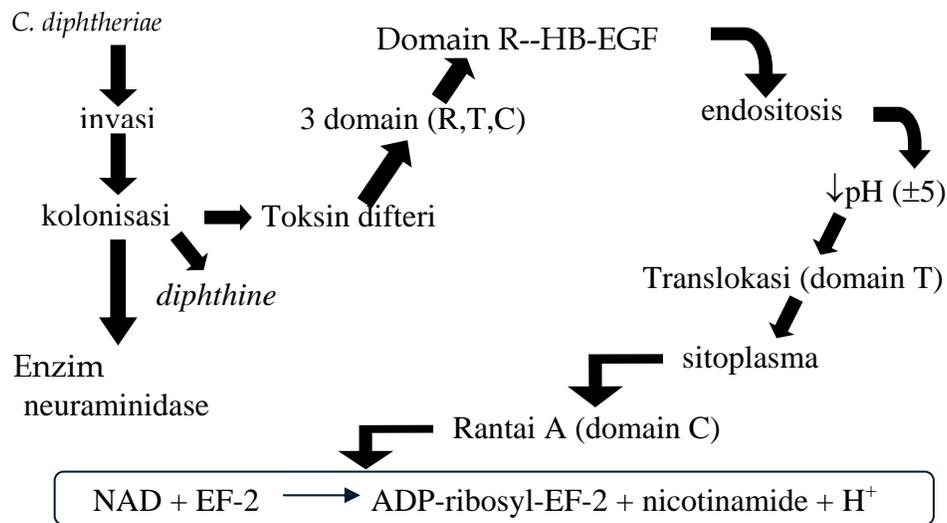
Toksin Difteri

Toksin difteri diproses dalam 2 langkah. Pertama, hasil translasi dari toksin difteri akan disekresikan melalui membran sitoplasma ke cairan ekstraseluler, menghasilkan polipeptida 58,3 kDa. Kedua, polipeptida ini selanjutnya diputus oleh enzim proteolitik atau mengalami digesti oleh tripsin menjadi rantai A dan rantai B yang dihubungkan oleh ikatan disulfida.^{3,9}

Struktur kristal toksin difteri menunjukkan tiga domain yang berbeda (R,T dan C) masing-masing untuk daerah fungsional reseptor (R), translokasi (T) dan katalitik (C) dari toksin tersebut. Domain C berada pada rantai A sedangkan domain R dan T didapatkan pada rantai B.⁹



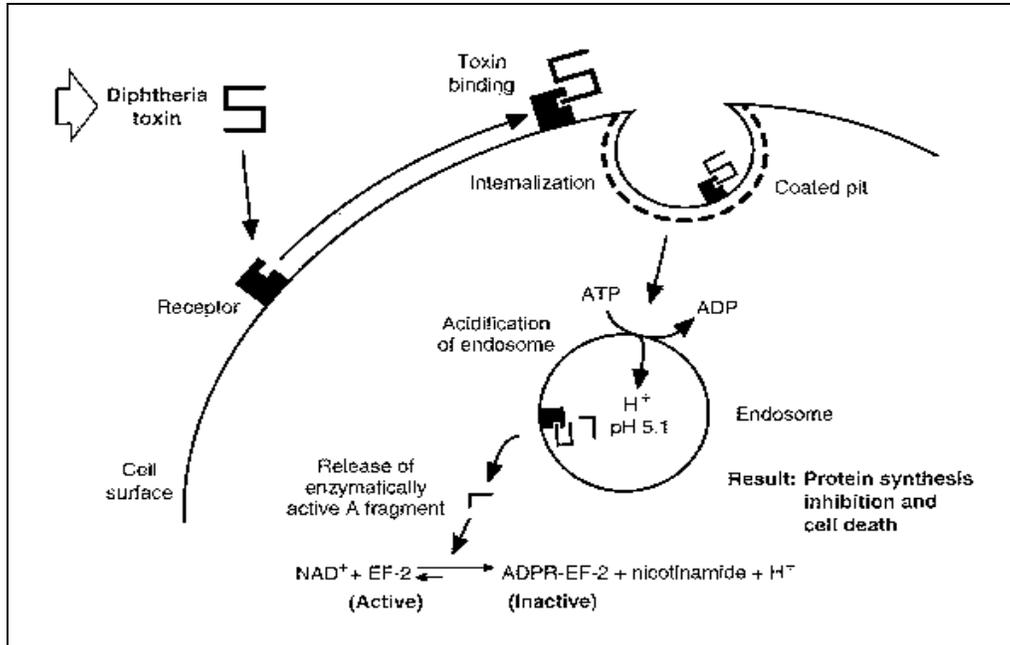
Gambar 4. Kolonisasi *Corynebacterium diphtheriae*
(Modifikasi dari Todar, K. 2002; Fix, 2004.)



Gambar 5. Skema singkat mengenai patogenesis *Corynebacterium diphtheriae* (Modifikasi dari Todar, K. 2002; Fix, 2004; Salyer & Whitt, 1994)

Setelah toksin terikat pada permukaan sel, sel hospes akan melakukan endositosis sehingga toksin berada di dalam vesikel endositik. Proses endositosis merupakan langkah penting yang mempengaruhi aksi toksin karena terjadi penurunan pH segera setelah vesikel endositik terbentuk yang memungkinkan terjadinya proses translokasi. Pada pH 7 toksin difteri terutama berbentuk globuler. Di dalam vesikel endositik, dimana pH menurun sampai ± 5, asam-asam amino mengalami protonasi sehingga menjadi kurang hidrofilik. Perubahan ini meningkatkan distribusi rantai polipeptida dan memungkinkan terbentuknya rantai A dan B yang

terbuka sebagian sehingga mengekspos area hidrofobik yang dalam keadaan normal ditemukan pada bagian dalam dari bentuk globuler. Area hidrofobik ini bersama dengan residu asam amino terprotonasi menyebabkan regio rantai A dan B dapat menginsersi ke dalam membran vesikel. Model rantai A dan B yang terbuka sebagian ini akan menempatkan bagian dari masing-masing rantai ke dalam membran dan mengekspos rantai A pada sisi sitoplasma. Reduksi ikatan disulfida akan membebaskan rantai A dan melepaskannya ke dalam sitoplasma. Setelah mencapai sitoplasma, rantai A kembali berbentuk globuler.^{7,9}



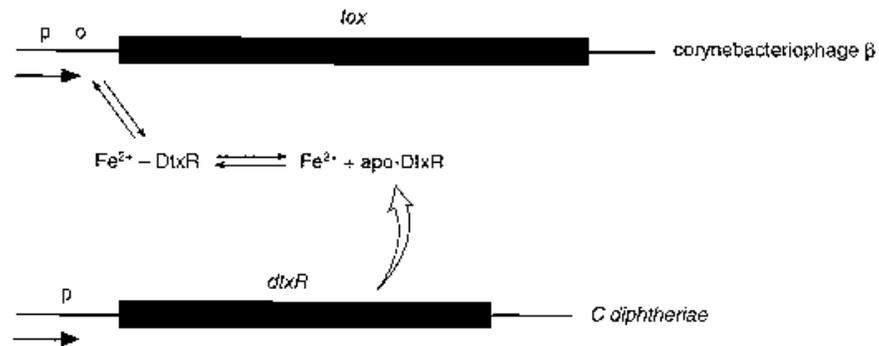
Gambar 6. Pengikatan, endositosis dan translokasi toksin difteri oleh sel eukariot (Cuplikan dari Murphy, J.R., 2002)

Rantai A mengkatalisis pemindahan ADP-ribosil dari NAD kepada *elongation factor 2* (EF-2) dan melepaskan *nicotinamide*. Proses ini akan menghambat fungsi EF-2 selanjutnya dalam sintesis protein. EF-2 yaitu suatu komponen penting dalam proses sintesis protein dari sel eukariot. EF-2 berperan dalam tahap elongasi pada proses translasi. ADP-ribosilasi menyebabkan EF-2 menjadi in-aktif, kemudian pada akhirnya mengakibatkan kematian sel-sel hospes.^{9,11}

Penempelan ADP-ribosil terjadi pada derivat histidin yaitu *diphthamide*: (3-carboxyamido-

3[trimethylamino]propyl) histidine. Modifikasi residu histidin menjadi *diphthamide* terjadi setelah EF-2 ditranslasi dan didapat pada semua tipe sel eukariot. Bentuk derivat histidin ini hanya terdapat pada EF-2 dan tidak ada pada sel-sel lainnya. Dengan kenyataan ini dapat dijelaskan mengapa rantai A toksin difteri secara spesifik menginaktifkan EF-2.⁹

Reseptor untuk toksin difteri akhirnya dapat dikenali dengan memanfaatkan perbedaan kepekaan dari spesies mamalia yang berbeda.



Gambar 7. Regulasi toksin diferi oleh *dtxR* dan Fe

Percobaan dengan menggunakan tikus yang resisten terhadap toksin (reseptor minus) yang ditransfeksi dengan cDNA yang dibuat dari genom kera yang peka (*Vero cells*).

Transfektan kemudian menjalani pemeriksaan penyaring (*screening*) untuk kepekaan terhadap toksin, karena dengan adanya ekspresi reseptor toksin yang berasal dari cDNA menandakan kepekaan dari tikus yang resisten. Transfektan yang sensitif terhadap toksin akhirnya ditemukan dan bagian cDNA yang berperan untuk fenotip ini didapatkan. Dari pemeriksaan terhadap bagian cDNA tersebut, ditemukan bahwa reseptornya adalah *heparin-binding epidermal growth factor* (HB-EGF).⁹

Regulasi Produksi Toksin

Toksin difteri tidak diproduksi oleh semua strain *Corynebacterium diphtheriae*. Pengamatan ini dapat dijelaskan ketika ditemukan bahwa gen toksin dibawa oleh kelompok dekat dari bakteriofaga temperate (β -faga dan ω -faga). Hanya strain yang mengalami siklus lisogenik dengan faga tersebut yang dapat menghasilkan toksin. Produksi toksin oleh *Corynebacterium diphtheriae* melalui siklus lisogenik menjadi jauh lebih banyak ketika medium pertumbuhan mengandung kadar Fe^{2+} yang rendah.⁹

Ketika kadar Fe^{2+} meningkat, DtxR berada dalam bentuk terikat pada Fe^{2+} dan bentuk ini mampu berikatan dengan operator pada *tox* gene, sehingga proses transkripsi dari gen toksin tersebut menjadi terhambat.

Tabel 1. Beberapa penggunaan konjugat yang mengandung rantai A toksin difteri dan substitusi tertentu untuk rantai B. ⁹ (Cuplikan dari Salyers)

Penggunaan	Substitusi untuk Rantai B
Membunuh sel eritroleukemia	Antibodi rantai tunggal terhadap reseptor transferin
Membunuh sel otot polos yang membentuk plak aterosklerosis	EGF (mengikat reseptor EGF pada sel otot)
Membunuh sel mononuklear pada darah perifer dari pasien <i>CLL</i>	Antibodi rantai tunggal terhadap reseptor interleukin-2
Membunuh sel yang terinfeksi HIV	Antibodi rantai tunggal terhadap antigen permukaan spesifik HIV

Pada keadaan rendah Fe, represor DtxR tidak terikat pada Fe, maka protein tersebut tidak akan mengikat DNA sehingga memungkinkan gen toksin untuk ditranskripsi. ⁹

Potensi Medik Toksin Difteri

Rantai A toksin difteri memiliki toksisitas yang tinggi. Kenyataan ini menjadikan rantai A toksin difteri sebagai kandidat yang menarik untuk aplikasi terapeutik, karena dapat digunakan untuk membunuh sel tertentu seperti sel tumor atau sel yang terinfeksi HIV. Strateginya adalah menghubungkan rantai A dengan suatu molekul yang mengikat reseptor yang spesifik untuk tipe sel tertentu yang menjadi target. ⁹

Selain dengan cara substitusi rantai B, ada cara lain dalam penggunaan rantai toksin difteri sebagai terapi terhadap kanker. Strateginya adalah dengan rekayasa *germline* yaitu bahwa suatu faktor transkripsi tertentu akan

mengaktifkan promotornya hanya jika terdapat hormon, seperti hormon-hormon testosteron. Faktor transkripsi seperti ini dapat berfungsi sebagai reseptor hormon karena hanya akan berfungsi bila mengikat molekul hormon. Kompleks hormon dengan faktor transkripsi tertentu ini akan mengubah bentuk reseptor, sehingga reseptor tersebut dapat berikatan pada promotornya dan mengaktifkan gen tertentu.

Teknik rekayasa *germline* telah dikembangkan untuk melindungi individu terhadap kanker prostat (Ca prostat) dengan membuat *two-gene cassette* dimana gen ke-1 mengkode reseptor *ecdysone* yang akan diekspresikan dari suatu faktor transkripsi tertentu pada prostat. Reseptor *ecdysone* berfungsi sebagai *ecdysone-dependent transcription factor* yang akan mengendalikan ekspresi gen ke-2, yang mengkode toksin difteri. Prinsipnya adalah bila reseptor *ecdysone* telah diaktivasi maka gen toksin

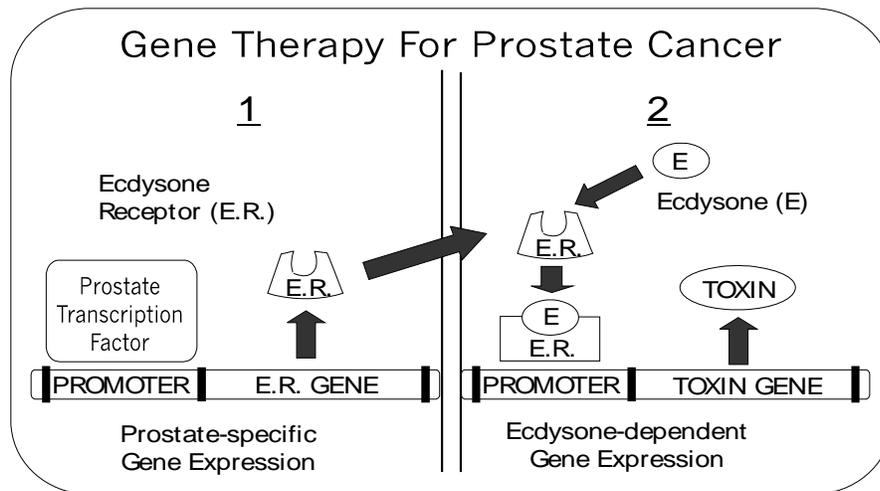
difteri akan diekspresikan pada sel-sel kelenjar prostat dan berakhir dengan kematian sel-sel kanker prostat tersebut. Gen toksin tidak diekspresikan pada sel-sel lain karena tidak ada yang men-sintesis *ecdysone-dependent transcription factor* selain kelenjar prostat.

Reseptor *ecdysone* dapat diilustrasikan sebagai pelatuk, sedangkan pistolnya adalah gen yang mengkode rantai toksin difteri. Gen untuk toksin difteri akan diaktifkan oleh *ecdysone* melalui *ecdysone-dependent promoter*.

Manusia tidak membuat reseptor *ecdysone*, sehingga gen yang mengkode reseptor *ecdysone* harus diambil dari genom insekta. Sebelum diberikan kepada seseorang, gen reseptor *ecdysone* diberi suatu promotor yang hanya aktif pada sel-sel kelenjar prostat dan sensitif terhadap kanker.

Reseptor *ecdysone* akan disintesis secara kontinu hanya oleh sel-sel kelenjar prostat. Reseptor ini akan tetap dalam keadaan inaktif selama tidak ada *ecdysone*. Jika seseorang didiagnosis atau dicurigai menderita kanker prostat, ia akan mendapat suntikan *ecdysone*. Hormon ini kemudian mengaktifkan reseptor *ecdysone* yang berada pada sel-sel kelenjar prostat. Setelah disuntikkan, *ecdysone* berada di seluruh tubuh, tetapi hanya sel-sel prostat yang memiliki reseptor *ecdysone* yang akan mengikatnya, karena *ecdysone* bukan merupakan hormon alamiah pada manusia.

Strategi ini adalah salah satu bentuk umum. Dengan mengubah promotor untuk gen reseptor *ecdysone*, maka cara ini pun dapat digunakan pada jaringan payudara, pankreas dan sebagainya.¹⁰



Gambar 8. Teknik *two-gene cassette* untuk melawan kanker prostat

Kesimpulan

Langkah pertama proses patogenesis *Corynebacterium diphtheriae* diawali dengan pembentukan koloni bakteri di daerah tenggorokan. Selanjutnya *C. diphtheriae* akan menghasilkan enzim neuraminidase dan diphthine yang berperan sebagai pemacu pertumbuhannya. Selain kedua protein tersebut, *C. diphtheriae* juga akan menghasilkan suatu ekso-toksin yang sangat potensial yaitu toksin difteri yang akan mengkatalisis pemindahan ADP-ribosil dari NAD kepada *elongation factor 2* (EF-2) yang mengakibatkan terganggunya sintesis protein dan berakhir dengan kematian sel-sel hospes.

Regulasi toksin difteri bergantung pada dua hal yaitu adanya β -faga dan kadar Fe ekstraseluler. Bila *C. diphtheriae* tidak mengalami siklus lisogenik dengan β -faga maka *C. diphtheriae* tidak dapat menghasilkan toksin. Kadar Fe ekstraseluler yang tinggi berperan penting dalam hal regulasi dengan cara mengaktifkan gen *dtxR*, sehingga DtxR mampu mengikat DNA toksin pada area promotor sehingga menghambat proses transkripsi rantai toksin.

Toksin difteri memiliki toksisitas yang tinggi. Toksisitas dari toksin difteri ini mulai digunakan sebagai alternatif baru dalam terapi kanker.

Daftar Pustaka

1. Abdul Rahim, Mathilda Lintong, Suharto & Suharno Josodiwondo. 1994. Batang Positif Gram: *Corynebacterium*. Dalam: *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi revisi. Jakarta: Binarupa Aksara. p: 125-142
2. Brooks, G. F., Butel, J.S. & Morse, S. A. 1998. Non-Spore Forming Gram-Positive Bacilli: *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Listeria*, *Erysipelothrix*, and Related Species. In: *Jawetz, Melnick and Adelberg's medical microbiology*. edisi 21. USA: A Simon and Schuster Com-pany. p:190-196
3. Harnisch J.P. 1987. *Diphtheria*. In: Braunwald E., Isselbacher K.J., Petersdorf R.G., Wilson J.D., Martin J.B. & Fauci A.S., editor: *Harrison's principles of internal medicine*. edisi 11. USA: The McGraw Hill Companies. P: 671-675
4. Holmes R.K. 2001. *Diphtheria*, other Corynebacterial Infections and Anthrax. In: Braunwald E., Fauci A.S., Kasper D.L., Hauser S.L., Longo D.L. & Jameson J.L., editor: *Harrison's principle of internal medicine*. edisi 15. vol 1. USA: The McGraw Hill Companies. P: 909-915
5. Kanungo, R., Vijayalakshmi, N., Nalini, P. & Bhattacharya, S. 2002. *Diphtheria due to non-toxigenic corynebacterium diphtheriae: A report of two cases*. <http://www.ijmm.org/article.asp?issn=02550857;year=2002;volume=20;issue=1;spage=50;epage=52;aulast=Kanungo>, 22 November 2004
6. Mims, C., Nash, A. & Stephen, J. 2001. Mechanisms of Cell and Tissue Damage: Microbial Toxins. In: *Mim's pathogenesis of infections disease*. edisi 5. Cornwall : MPG Books Ltd., p: 227-275
7. Murphy, J.R. 2002. *Corynebacterium diphtheriae*. <http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch032.htm>, 20 Maret 2004
8. Salyers, A.A. & Whitt, D.D. 1994. *Diphtheria*. In: *Bacterial pathogenesis a molecular approach*. Washington DC: ASM press., p:113-121

9. **Stock, G. & Campbell, J.** 2004. *Germline intervention: An evolutionary perspective.* <http://research.arc2.ucla.edu/pmts/chapter1.htm>, 1 September 2004.
10. **Todar, K.** 2002. *Bacterial toxigenesis.* <http://www.textbookofbacteriology.net/proteintoxins.html>, 17 Maret 2004

