

KAJIAN ANTIGENISITAS DAN IMUNOGENISITAS PROTEIN GRA1 DARI *Toxoplasma gondii*

Didik T Subekti

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE Martadinata No. 30, Bogor 16114
subekti.vmd@lycos.com

(Makalah masuk 19 Februari 2013 – Diterima 9 September 2013)

ABSTRAK

Toksoplasmosis merupakan penyakit zoonosis yang disebabkan oleh protozoa *Toxoplasma gondii*. Protozoa tersebut memiliki kemampuan untuk menghindari dari sistem imun dengan membentuk vakuola parasitoforus. Modifikasi vakuola tersebut terkait dengan sekresi protein GRA (granula padat). Diantara protein GRA adalah GRA1 merupakan target atau sasaran untuk pengembangan vaksin. Permasalahan yang muncul adalah apakah protein GRA1 adalah protein yang antigenik dan imunogenik sehingga sangat sesuai untuk kandidat vaksin. Beberapa hasil penelitian yang telah dilakukan dengan menggunakan teknologi vaksin DNA menunjukkan bahwa teknologi vaksin DNA GRA1 mampu menginduksi respon imun seluler dan respon imun humoral yang proinflamatorik. Namun penelitian lain justru menunjukkan bahwa respon imun humoral terbentuk di bawah kendali sitokin non-inflamatorik. Pada kenyataannya, hasil studi lain memperlihatkan bahwa protein GRA1 hanya memiliki kecenderungan kuat sebagai antigen ditinjau dari berat molekul dan analisis bioinformatik. Berdasar analisis bioinformatik, protein GRA1 merupakan molekul dengan imunogenisitas lemah. Kemampuan protein GRA1 dalam menginduksi respon imun humoral dan menginduksi respon imun seluler cenderung disebabkan oleh adjuvan baik berupa motif CpG dari vektor DNA maupun adjuvan lain.

Kata kunci: *Toxoplasma gondii*, GRA1, respon imun seluler, respon imun humoral

ABSTRACT

STUDY OF ANTIGENICITY AND IMMUNOGENICITY GRA1 PROTEIN FROM *Toxoplasma gondii*

Toxoplasmosis is known as zoonotic disease caused by *Toxoplasma gondii* infection. This microorganism has ability to evade immune system by forming parasitophorous vacuole (PV) formed through the phagosome vacuole modification by secreting dense granule protein (GRA). Among GRAs protein, GRA1 was selected as candidate for vaccine development. However, it remains controversial whether the protein has adequate antigenicity and strong immunogenicity which are suitable for vaccine candidate. Some researcher reported that DNA vaccine of GRA1 was able to induce cellular mediated immunity and proinflammatory humoral immunity. In fact, another study demonstrated that GRA1 protein was only antigenic based on their molecular weight and bioinformatic analysis. The other studies also showed that GRA1 was considered as weak immunogen based on bioinformatic studies. The ability of GRA1 protein to stimulate immune responses, both humoral and cellular mediated immunity were seemingly caused by adjuvant.

Key words: *Toxoplasma gondii*, GRA1, cellular mediated immunity, humoral immunity

PENDAHULUAN

Toksoplasmosis merupakan penyakit zoonosis yang dapat menginfeksi manusia dan hewan. Penyebab toksoplasmosis yaitu protozoa *Toxoplasma gondii*. Umumnya protozoa maupun mikroorganisme lainnya akan dikenali sebagai material asing (antigen) oleh sistem imun dalam tubuh dan direspon untuk dihancurkan. Namun demikian, beberapa mikroorganisme memiliki kemampuan untuk menghindari sistem imun yang dikenal dengan nama evasi. Pada *T. gondii*, strategi evasinya dilakukan dengan cara membuat vakuola parasitoforus sehingga sulit dikenali oleh sistem imun. Pembentukan vakuola

parasitoforus menyebabkan kegagalan fusi dengan lisosom sehingga takzoit tidak dapat dihancurkan (Subekti dan Arrasyid 2006).

Vakuola parasitoforus (VP) merupakan modifikasi dari vakuola fagosom oleh takzoit *Toxoplasma gondii*. Modifikasi ini terjadi karena takzoit melepaskan sejumlah protein sekretorik ekskretorik. Salah satu protein sekretorik ekskretorik tersebut adalah protein granula padat (*dense granule protein*) yang disingkat GRA (Black dan Boothroyd 2000). Oleh sebab itu, secara teoritis pengenalan terhadap jenis protein GRA memiliki peran penting, karena apabila protein tersebut dapat dikenali dan direspon oleh sistem imun tubuh maka pembentukan VP akan dapat dihambat. Apabila

pembentukan VP terhambat, diharapkan proses pengenalan oleh sistem imun tubuh menjadi lebih optimal sehingga takizoit dapat dihancurkan karena terjadinya fusi dengan lisosom.

Pada saat ini telah teridentifikasi sekitar 12 jenis protein GRA tetapi pada *review* ini akan difokuskan pada protein GRA1 berdasarkan sifat antigenisitas dan imunogenisitasnya. Apabila protein tersebut terbukti antigenik dan imunogenik diharapkan akan mampu menstimulasi respon imun. Dengan demikian, akan terdapat kemungkinan bahwa strategi evasi tersebut tidak menjamin keberhasilan parasit untuk menghindari dari respon imun. Beberapa peneliti telah melaporkan bahwa protein GRA1 antigenik kuat dan seakan-akan memiliki imunogenitas yang baik dan mampu memberikan proteksi terhadap infeksi takizoit. Namun demikian, hal tersebut perlu dikaji secara kritis apakah kesimpulan demikian sudah tepat atukah belum.

RINGKASAN SIKLUS HIDUP INFEKSI DAN PEMBENTUKAN VAKUOLA PARASITOFORUS

Siklus hidup dari *T. gondii* secara prinsip terbagi atas dua yaitu siklus seksual dan aseksual. Siklus hidup secara seksual dan aseksual terjadi pada inang definitif, sedangkan pada inang antara hanya terjadi siklus aseksual (Dubey et al. 1998; Robert dan Janovy 2000). Siklus hidup seksual terjadi karena adanya peleburan gamet, adapun perkembangan aseksual terjadi karena pembelahan vegetatif. Siklus dimulai dengan tertelannya ookista yang telah bersporulasi akan mengakibatkan terjadinya eksistasi yang menyebabkan keluarnya sporozoit. Sporozoit kemudian menginfeksi sel epitel usus dari inang dan berubah menjadi takizoit untuk mengawali perkembangan siklus seksual dan aseksual (Carruthers 2002; Dzierszinski et al. 2004). Sporozoit yang menginfeksi sel-sel berinti akan berkembang menjadi takizoit dalam kurun waktu 24 jam setelah infeksi. Selanjutnya takizoit tersebut membelah diri secara endodiogoni (*endodyogony*) (Black dan Boothroyd 2000; Morrissette dan Sibley 2002; Dzierszinski et al. 2004).

Proses masuknya takizoit ke dalam sel merupakan proses yang aktif dan sangat singkat. Masuknya takizoit ke dalam sel target hanya memerlukan waktu sekitar 15-30 detik (Black dan Boothroyd 2000; Carruthers 2002; Huynh et al. 2003; Zhou et al. 2005). Proses fagositosis yang dilakukan oleh sel fagositik memerlukan waktu sekitar 2-4 menit (Black dan Boothroyd 2000). Proses penetrasi ke dalam sel target tersebut setidaknya melibatkan tiga tahapan yang berjalan secara integratif yaitu perlekatan, penetrasi-invasi dan pembentukan vakuola parasitoforus (Black dan Boothroyd 2000; Coppens dan Joiner 2001; Carruthers 2002). Protein yang pertama kali disekresi diperkirakan adalah MIC (*Micronema protein*) yang

berfungsi untuk pengenalan dan perlekatan dengan sel target (Nam 2009). Adapun proses masuknya takizoit ke dalam sel secara aktif dilakukan karena adanya gerakan gliding (*gliding motility*) dari takizoit sehingga mampu melakukan invaginasi ke dalam sel target lebih cepat dibandingkan dengan proses fagositosis (Black dan Boothroyd 2000; Morrissette dan Sibley 2002; Opitz dan Soldati 2002).

Proses invaginasi tersebut memicu pembentukan vakuola yang kemudian akan dimodifikasi dengan *Rhoptries protein* (protein ROP) menjadi VP (Nam 2009). ROP juga diperlukan untuk biogenesis VP serta berfungsi untuk asosiasi organelar dari sel inang dengan VP (Black dan Boothroyd 2000; Håkansson et al. 2001; Reichmann et al. 2002). Modifikasi pembentukan VP diperlukan agar vakuola tersebut tidak mengalami asidifikasi dan fusi dengan kompartemen seluler lain yaitu lisosom (Black dan Boothroyd 2000; Zhou et al. 2005). Vakuola non-fusogenik tersebut memungkinkan takizoit dapat terus melakukan penetrasi dan terus memodifikasi vakuola sehingga terbentuk VP tanpa dirusak oleh sel inang.

Protein lainnya adalah GRA yang secara umum berfungsi sebagai protein untuk modifikasi akhir VP serta memungkinkan pengambilan nutrisi dari sitoplasma sel inang (Cesbron-Delauw et al. 1996; Lecordier et al. 1999; Black dan Boothroyd 2000; Neudeck et al. 2002; Nam 2009). Modifikasi oleh protein GRA diperlukan agar VP dapat menjadi tempat yang sesuai dan mendukung perkembangan takizoit maupun bradizoit selama kehidupan intraseluler. Nam (2009) menyatakan bahwa GRA dibutuhkan untuk modifikasi VP sehingga dapat dipergunakan takizoit untuk bereplikasi dan bertahan hidup. Konsekuensi dari hal ini, maka VP akan terus dimodifikasi seiring bertambahnya jumlah takizoit yang berkembangbiak sehingga semakin lama VP akan membesar. Ossorio et al. (1994) menyatakan bahwa GRA terus disekresikan seiring dengan pembesaran VP dan bertambahnya parasit. Informasi serupa juga dilaporkan oleh Kafsack et al. (2009) yang menyatakan bahwa GRA1 secara konstitutif (terus menerus) disekresikan dalam VP dengan adanya *Calcium-ionophore*.

GRA UNTUK MODIFIKASI VAKUOLA PARASITOFORUS

Dewasa ini, kelompok protein GRA dilaporkan berjumlah 12 protein (Nam 2009). Ossorio et al. (1994) menyatakan bahwa GRA1, GRA2 dan GRA4 terlokalisir di *intravacuolar network* dan tidak berasosiasi dengan VP. Adapun GRA3 dan GRA5 terlokalisir dalam VP (Ossorio et al. 1994). Nam (2009) menyatakan bahwa GRA1, utamanya masih tetap terdapat dalam lumen vakuola. Lebih lanjut dinyatakan bahwa fraksi protein GRA1, GRA3 dan

GRA7 seperti halnya protein GRA2, 4, 6, 9, 12 dan 14 diketahui berasosiasi dengan *vacuolar network membranes*. Pada membran tersebut protein GRA2, 4 dan 6 berpartisipasi dalam pembentukan *multimeric protein complex* (Nam 2009). Adapun protein GRA3, 5, 7, 8 dan 10 terutama terdeteksi sebagai protein yang berasosiasi dengan VP (Nam 2009).

Berdasarkan pernyataan tersebut maka protein GRA1 terutama terdapat dalam lumen VP dan sebagiannya akan berasosiasi dengan *vacuolar network membranes*. GRA1 juga dilaporkan disekresi secara difus sampai ke sitoplasma sel inang yang terinfeksi sebelum terjadi *egress* (Kafsack et al. 2009). Adapun protein GRA7 akan terakumulasi dalam VP apabila sel inang diinfeksi oleh takizoit (Fischer et al. 1998). Sebaliknya apabila parasit intraseluler tersebut berada pada bentuk bradizoit ternyata GRA7 dapat ditemukan dalam sitoplasma sel yang terinfeksi (Fischer et al. 1998). Demikian pula halnya dengan GRA1 juga dikeluarkan dari VP menuju sitoplasma sel inang sebelum terjadinya *egress* (Kafsack et al. 2009). Keluarnya protein GRA dari VP ke sitoplasma sangat bermanfaat untuk pengenalan sel Tc/CD8⁺ (sel T sitotoksik) karena protein GRA1 dan GRA7 akan dapat diproses dan dipresentasikan oleh *major histocompatibility complex type I* (MHC I).

SISTEM DAN RESPON IMUN PADA TOKSOPLASMOSIS

Secara umum sistem imun yang terdapat pada hewan dan manusia terdiri atas respon imun spesifik dan non-spesifik. Respon imun spesifik memiliki kemampuan membedakan berbagai jenis antigen yang berbeda dan memiliki memori. Adapun respon imun non-spesifik tidak membedakan variasi antigen tetapi dengan membedakan antara antigen dan non-antigen. Respon imun spesifik diperankan oleh respon imun humoral dan seluler. Respon imun humoral secara spesifik diperankan oleh antibodi yang disekresikan oleh limfosit B. Adapun respon imun seluler diperankan oleh sel T sitotoksik (sel Tc/CD8⁺) atau *Cytotoxic T Lymphocyte* (CTL), sel Mast, sel NK (*Natural Killer*) dan sel fagositik lainnya (Abbas et al. 2004). Sel Mast, sel NK dan sel fagositik lainnya bekerja secara spesifik apabila bekerjasama dengan antibodi. Adapun respon imun non-spesifik diperankan oleh komponen seluler misalnya dengan fagositosis dan komponen humoral misalnya komplemen.

RESPON IMUN HUMORAL TERHADAP TOKSOPLASMOSIS

Kepentingan respon imun humoral berkaitan dengan bentuk takizoit ekstraseluler yang aktif dan

invasif dalam sistem sirkulasi. Respon imun humoral juga terjadi pada permukaan mukosa seperti pada saluran usus. Pada sistem sirkulasi (sistemik) yang berperan utama adalah IgM dan IgG, sedangkan pada permukaan mukosa yaitu sIgA (Subekti et al. 2005a;b). Bukti lain secara tidak langsung kepentingan respon imun humoral diperlihatkan pada mencit BALB/c yang mengalami defisiensi limfosit B ternyata menjadi sangat peka terhadap infeksi *T. gondii* (Sayles et al. 2000). Pada mencit dilaporkan bahwa toksoplasmosis fase akut (<21 hari setelah infeksi) maupun kronis (>56 hari setelah infeksi), respon imun humoral yang dominan adalah IgG_{2b} dan IgG_{2a} (Nguyen et al. 1998; 2003). Ini menunjukkan bahwa respon imun humoral yang terbentuk adalah respon imun humoral di bawah kendali sitokin proinflamatorik.

Laporan lain juga dikemukakan oleh McLeod et al. (1991) dan Sibley (2003) menyatakan, apabila takizoit yang berikatan dengan antibodi (membentuk kompleks antigen-antibodi) akan mudah difagositosis melalui perantaraan reseptor Fc (FcR) sehingga terbentuk vakuola fagosom yang akan mengalami fusi dengan lisosom. Fusi antar vakuola intraseluler tersebut mengakibatkan destruksi takizoit dalam sel.

RESPON IMUN SELULER PADA TOKSOPLASMOSIS

Beberapa peneliti menyatakan bahwa secara umum respon imun seluler cukup dominan dalam melindungi inang dari infeksi maupun reaktivasi *T. gondii* terutama bentuk intraseluler (Montoya et al. 1996; Denkers dan Gazzinelli 1998; Prigione et al. 2000). Aktivasi respon imun seluler tidak hanya terbatas pada sel NK (*natural killer*), limfosit T sitotoksik (sel Tc/CD8⁺) tetapi juga sel Th/CD4⁺ (Abou-Bacar et al. 2004). Informasi serupa juga dilaporkan oleh Gazzinelli et al. (1994) yang memperlihatkan terjadinya reaktivasi bradizoit menjadi takizoit serta peningkatan kerusakan jaringan di otak dan retina mata akibat pemberian anti CD8⁺ pada mencit yang mengalami infeksi kronis. Fakta tersebut menunjukkan efek langsung dari defisiensi sel Tc/CD8⁺ pada mencit menyebabkan peningkatan kepekaan terhadap infeksi *T. gondii*.

Peran sistem imun seluler dapat terjadi baik secara langsung (proses sitolitik dan fagositik) ataupun secara tidak langsung yang diperankan oleh limfosit T sitotoksik dan sel fagositik. Peran secara tidak langsung dalam proteksi terhadap toksoplasmosis terjadi melalui sitokin yang dihasilkan oleh sel-sel yang terlibat dalam respon imun seluler (Gazzinelli et al. 1994). Sitokin yang sangat berperan dalam resistensi dan proteksi terhadap toksoplasmosis adalah interleukin 18 (IL18), IL12, interferon gama (IFN γ) dan *tumor necrosing factor α* (TNF α) (Gazzinelli et al. 1994; Kasper dan

Buzoni-Gatel 2001; Sibley et al. 2002). Kedua jenis sitokin tersebut baik secara tunggal maupun bersama-sama akan dapat menghambat multiplikasi dan mengaktifasi makrofag untuk melakukan destruksi takizoit serta mencegah reaktivasi bradizoit sehingga meningkatkan resistensi terhadap toksoplasmosis (Subekti dan Arrasyid 2006). Sitokin lain yang juga dinyatakan memiliki peranan tersebut diantaranya adalah IL 10 (Neyer et al. 1997), IL 4 dan IL 5 (Zhang dan Denkers 1999). IL10, IL4 dan IL5 dikategorikan sebagai sitokin tipe 2 (non-inflamatorik) sedangkan sitokin tipe 1 (proinflamatorik) adalah IFN γ , TNF α dan interleukin 12 (IL 12) dan IL18. Menurut Cerávoló et al. (1999) TNF α dapat menghambat multiplikasi takizoit sampai 30%. Adapun IFN γ memiliki kemampuan menghambat replikasi takizoit sebesar 54-65% (Halonen et al. 1998; Cerávoló et al. 1999). Kombinasi antara IFN γ dan TNF α ternyata dapat menghambat replikasi takizoit sampai 73% (Cerávoló et al. 1999).

ANTIGENISITAS DAN IMUNOGENISITAS GRA1

Antigenisitas suatu molekul adalah keasingannya dalam struktur normal suatu makhluk hidup. Penentuan antigenisitas suatu molekul dapat dilakukan dengan tiga pendekatan atau sudut pandang, pertama secara konseptual atau teoritis dari sisi imunologi. Kedua, dari sisi analisis bioinformatik yang menganalisis tapak antigenik dan imunogenik suatu molekul berdasarkan urutan asam aminonya. Ketiga, secara empiris dengan membandingkan struktur molekul protein target dengan molekul yang ada dalam tubuh suatu makhluk hidup. Pendekatan ketiga ini merupakan pendekatan yang sangat sulit bahkan mungkin tidak realistis untuk dilakukan, sehingga yang tersedia hanya pendekatan pertama dan kedua.

Pada pendekatan imunologis, suatu molekul akan memiliki potensi antigenik jika memiliki sifat asing (*foreignness*) bagi tubuh, memiliki berat molekul (BM) diatas 1 kD, memiliki struktur kompleks (bukan urutan berulang seperti polisakarida) serta memiliki stabilitas molekul (Tizzard 2013). Protein dengan berat molekul 670 kD (misalnya *hemocyanin*) merupakan antigen yang poten sedangkan albumin (69 kD) merupakan antigen yang cukup baik tetapi juga dapat menginduksi toleransi respon imun. Sebaliknya, protein dengan berat molekul diatas 1 kD (misalnya angiotensin, 1 kD) merupakan antigen yang lemah, sedangkan kurang dari 1 kD diperkirakan tidak antigenik (Tizzard 2013).

Secara empiris berdasarkan hasil berbagai percobaan dalam penelitian, protein GRA1 dilaporkan bersifat imunogenik dan antigenik (Vercammen et al. 2000; Scorza et al. 2003; Döşkaya et al. 2007). Vercammen et al. (2000) telah melaporkan bahwa vaksinasi menggunakan vaksin DNA yaitu pVR1020-GRA1 (gen *gral* dalam vektor plasmid VR1020) secara intramuskular (i.m) dapat menginduksi respon imun humoral pada mencit dengan kecenderungan pada IgG_{2a} dibandingkan dengan IgG₁. Hasil tersebut memperlihatkan bahwa vaksin DNA yang diberikan secara i.m tersebut memiliki kecenderungan mengarah pada polarisasi sel Th₁/CD4⁺ (proinflamatorik) dan sel Th₂/CD4⁺ (non-inflamatorik) tergantung galur mencit yang dipergunakan (Tabel 1).

Namun di dalam Tabel 1 tersebut jelas terlihat bahwa infeksi oleh takizoit lebih kuat menstimulasi terbentuknya IgG_{2a} pada protein GRA7 dibandingkan dengan lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa secara alamiah, protein GRA7 imunogenik kuat sedangkan lainnya lebih lemah. Dengan demikian, protein GRA1 secara relatif merupakan protein dengan imunogenisitas lemah dibandingkan dengan GRA7. Pada tabel tersebut juga memiliki kekurangan, yaitu tidak adanya pembandingan vaksinasi menggunakan protein GRA1, GRA7 dan ROP2 tanpa ajuvan. Dengan demikian imunogenisitas masing-masing protein sulit ditetapkan secara akurat, sebab yang terlihat dari respon imun humoral hasil vaksinasi tersebut sudah dipengaruhi oleh adanya ajuvan.

Sebaliknya pada indeks stimulasi splenosit, hewan yang diinfeksi juga memiliki respon yang lebih tinggi dibandingkan dengan hewan yang divaksinasi menggunakan pVR1020-GRA1 (Vercammen et al. 2000). Hal ini menunjukkan bahwa antigenisitas dan imunogenisitas protozoa secara utuh lebih kuat dibandingkan dengan hanya sebagian proteinnya saja. Adapun kadar IFN γ yang disekresikan oleh splenosit dari hewan yang diinfeksi sebanding dengan yang divaksinasi menggunakan pVR1020-GRA1 (Vercammen et al. 2000). Bukti tersebut memperlihatkan bahwa stimulasi produksi IFN γ oleh splenosit pada hewan yang diinfeksi dan divaksinasi adalah sebanding.

Lebih lanjut (Scorza et al. 2003) melaporkan bahwa vaksin DNA berupa pVR1020-GRA1 (gen *gral* dalam vektor plasmid VR1020) yang diberikan secara i.m dapat menginduksi aktivitas sel Tc/CD8⁺ dan sel Th/CD4⁺ pada splenosit serta menginduksi sekresi interferon gama (IFN γ). IFN γ tersebut sebagian besar disekresikan oleh sel Th/CD4⁺ dibandingkan dengan

Didik T Subekti: Kajian Antigenisitas dan Immunogenisitas Protein GRA1 dari *Toxoplasma gondii***Tabel 1.** Titer IgG_{2a} dan IgG₁ mencit yang diinfeksi dan divaksinasi vaksin DNA terhadap protein GRA1, GRA7 dan ROP2 dari *Toxoplasma gondii*

Group	No.	Titer ^a											
		GRA1						T. gondii					
		GRA1		GRA7		ROP2		M. tuberculosis Ag85A					
IgG _{2a}	IgG ₁	IgG _{2a} /IgG ₁	IgG _{2a}	IgG ₁	IgG _{2a} /IgG ₁	IgG _{2a}	IgG ₁	IgG _{2a} /IgG ₁	IgG _{2a}	IgG ₁	IgG _{2a} /IgG ₁		
C ₃ H ^b	Infected	12.800	1.600	8	409.600	6.400	64	800	0				
	Vaccinated	1	409.600	6.400	64	25.600	6.400	4	3.200	100	32		
		2	409.600	12.800	32	51.200	800	64	1.600	100	16		
		3	102.400	25.600	4	6.400	0		800	200	4		
		4	102.400	102.400	1	3.200	12.800	1/4	400	0			
5	409.600	25.600	16	102.400	800	128	400	0					
BALB/c	Infected	1.600	3.200	1/2	204.800	1.600	128	800	50	16			
	Vaccinated ^c	1	204.800	>819.200	<1/4	102.400	204.800	1/2	1.600	400	4		
		2	204.800	25.600	8	25.600	25.600	1	800	3.200	1/4		
		3	204.800	102.400	2	6.400	3.200	2	3.200	3.200	1		
		4	51.200	51.200	1	12.800	12.800	1	25.600	800	32		
5	25.600	25.600	1	6.400	1.600	4	25.600	800	32				
Vaccinated ^d	1							<50	800	<1/16			
	2							400	>51.200	<1/128			
	3							800	6.400	1/8			
	4							800	25.600	1/32			
	5							400	25.600	1/64			

^aSampel dinyatakan positif apabila pada pengenceran teringginya masih memiliki nilai OD melebihi 0,3^bPool dari tiga hewan^cIndividu hewan divaksinasi secara intramuskular (tembus daging)^dIndividu hewan divaksinasi menggunakan plasmid berlapis partikel emas dengan *gene gun***Sumber:** Vercammen et al. (2000)

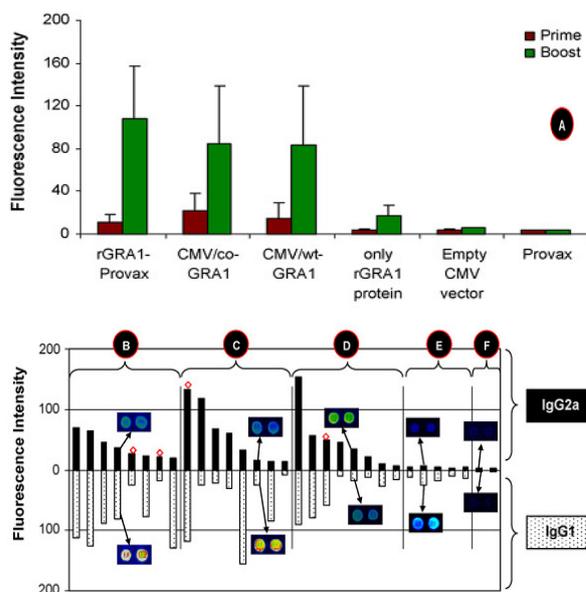
sel Tc/CD8⁺ (Scorza et al. 2003). Apabila sel Tc/CD8⁺ dari splenosit tersebut dikultur bersama dengan sel yang sebelumnya telah ditransfeksi dengan gen *gral* maupun makrofaq yang telah terinfeksi takizoit *T. gondii* maka terjadi aktivitas sitolisis (Scorza et al. 2003). Aktivitas sitolisis tersebut terkait dengan aktivitas sel Tc/CD8⁺ yang memiliki kemampuan mensekresikan granzym ataupun perforin untuk menghancurkan sel yang mempresentasikan peptida dari protein GRA1 di permukaan selnya.

Percobaan lain yang dilakukan oleh Döşkaya et al. (2007) adalah imunisasi menggunakan protein GRA1 rekombinan (rGRA1) maupun vaksin DNA yaitu pCMV/co-GRA1. Berdasar hasil *immunoblotting* diketahui bahwa imunisasi dengan vektor plasmid CMV tidak menghasilkan respon imun berupa antibodi spesifik terhadap GRA1 (Döşkaya et al. 2007). Hal ini tentu sangat logis mengingat vaksinasi dengan vektor kosong tanpa sisipan gen *gral* tentu tidak akan menghasilkan respon humoral spesifik (antibodi spesifik) yang mengenali protein GRA1. Namun yang menarik adalah bahwa pemberian rGRA1 (secara i.p) maupun pCMV/co-GRA1 (secara i.m) menghasilkan respon yang berbeda tipenya. Pada vaksinasi awal, titer antibodi spesifik terhadap protein GRA1 yang paling tinggi adalah vaksinasi menggunakan rGRA1-Provax (provax adalah ajuvan) kemudian imunisasi dengan pCMV/co-GRA1 (secara i.m) dan terakhir imunisasi dengan rGRA1 (secara i.p) yang hasilnya sangat rendah yaitu memiliki nilai absorbansi hampir setara dengan kontrol vektor maupun kontrol ajuvan (Döşkaya et al. 2007). Namun demikian setelah dilakukan pengulangan vaksinasi (*booster*) dengan rGRA1 secara i.p terdapat sedikit peningkatan tetapi secara umum masih sangat rendah (Gambar 1). Hasil tersebut secara umum membuktikan lemahnya imunogenisitas GRA1.

Pada penelitian (Döşkaya et al. 2007) diketahui bahwa vaksinasi dengan pCMV/co-GRA1 diperkirakan cenderung mengalami polarisasi ke arah sel Th₁/CD4⁺ (yang diamati dan diukur adalah IgG_{2a}) dan sel Th₂/CD4⁺ (yang diukur adalah IgG₁) dimana kedua antibodi tersebut menunjukkan kecenderungan yang seimbang dari sampel mencit yang dievaluasi. Sebaliknya pada vaksinasi dengan rGRA1 menunjukkan titer yang rendah pada IgG₁ dan IgG_{2a} dengan kecenderungan mengalami polarisasi ke arah IgG₁ (Döşkaya et al. 2007). Ini menunjukkan bahwa vaksinasi secara intraperitoneal (i.p) dengan rGRA1 kemungkinan cenderung mengarah pada polarisasi sel Th₂/CD4⁺.

Berdasarkan laporan ilmiah tersebut terdapat indikasi yang seolah-olah saling mendukung namun sesungguhnya terdapat kontradiksi yang cukup nyata terkait dengan antigenisitas dan imunogenisitas protein GRA1. Hal demikian memperlihatkan bahwa berbagai kesimpulan yang mengarah pada pernyataan bahwa

protein GRA1 bersifat imunogenik dan mampu menginduksi respon imun humoral dan seluler perlu dievaluasi secara kritis. Oleh karena itu, akan menjadi lebih tepat apabila juga dilakukan kajian tentang antigenisitas dan imunogenisitas protein GRA1 dari sudut pandang yang berbeda yaitu dari analisis bioinformatika. Apabila melihat sekuen asam amino dari protein GRA1, dapat dilakukan analisis bioinformatik untuk mengetahui berat molekul dan sifat antigenisitasnya.



Gambar 1. Respon imun humoral (IgG) dalam serum mencit terhadap GRA1. Merah: Vaksinasi awal; Hijau: Vaksinasi lanjutan (booster)

A) Rata-rata respon imun terhadap protein GRA1 pada mencit yang divaksinasi; B-F) Respon imun terhadap protein GRA1 dari individual mencit yang divaksinasi; B) Divaksinasi dengan rGRA1-Provax; C) Divaksinasi dengan CMV/co-GRA1; D) Divaksinasi dengan CMV/wt-GRA1; E) Divaksinasi dengan rGRA1 dan F) Divaksinasi dengan vektor dan provax saja

Sumber: Döşkaya et al. (2007)

Pendekatan lain yang dapat dilakukan adalah dengan melakukan analisis molekuler pada gen *gral* dan protein hasil translasinya. Setiap protein memiliki susunan asam amino yang unik dan khas. Susunan asam amino dalam suatu protein tidak hanya akan menentukan struktur tiga dimensi dan fungsionalitasnya dalam sistem biologis tetapi juga menentukan karakter fisika dan kimiawi dari masing-masing protein. Setiap asam amino memiliki massa dan muatan listrik tertentu. Subekti et al. (2012) menyatakan bahwa protein GRA1 memiliki BM 20,159 kD dengan titik isoelektrik 4,43 (Gambar 3a). Kalkulasi mengenai berat molekul dilakukan dengan menghitung total masa atom

penyusun polipeptida dari protein GRA1 yang didasarkan pada sekuen peptida seperti terdeskripsi dalam Gambar 2. Hasil prediksi tersebut sangat berbeda dengan hasil penelitian secara *in vivo* dimana protein GRA1 diisolasi dari protein solubel takizoit diperoleh data bahwa berat molekul protein GRA1 adalah 23-24 kD dengan titik isoelektrik sekitar 4 (Gambar 3b) (Zhou et al. 2005; Nam 2009). Lecordier et al. (2000) memperkirakan bahwa BM rGRA1-GST adalah 50 kDa. Dengan demikian BM rGRA1 tanpa GST (*Glutathione-S-Transferase*) yang diperoleh Lecordier et al. (2000) diperkirakan sekitar 30,33 kDa. Adapun Cohen et al. (2002) menyatakan bahwa BM GRA1 sekitar 28,2 kDa dengan titik isoelektrik sekitar 4,7. Oleh karena itu, secara umum diperkirakan bahwa BM GRA1 berkisar antara 20-30 kDa.

MVRVSAIVGA	AASVFCVLSA
GAYAAEGGDN	QSSAVSDRAS
LFGLLSGGTG	QGLGIGESVD
LEMMGNTYRV	ERPTGNPDLL
KIAIKASDGS	YSEVGNVVE
EVIDTMKSMQ	RDEDIFLRAL
NKGETVEEAI	EDVAQAEGLN
SEQTLQLEDA	VSAVASVVQD
EMKVIDDVQQ	LEKDKQQLKD
DIGFLTGERE	

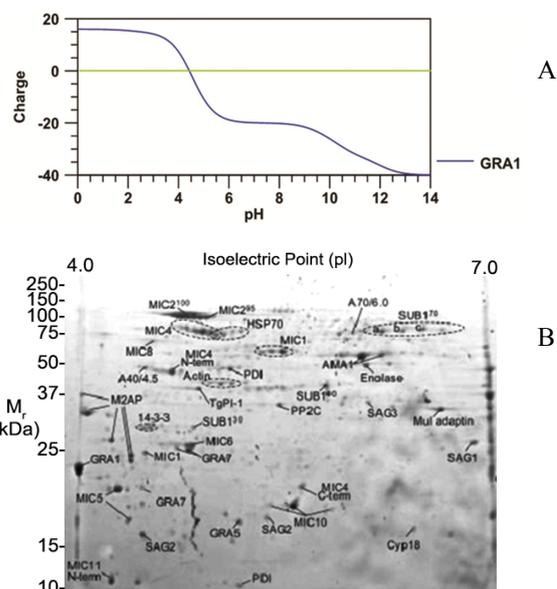
Gambar 2. Urutan asam amino dari protein GRA1 yang ditranslasi dari gen *gral*

Sumber: Subekti et al. (2012)

Berdasarkan susunan asam amino protein GRA1 juga dapat dianalisis tapak antigenik-immunogenik yang diperkirakan dapat dikenali sebagai epitop oleh *Cytotoxic lymphocyte* (CTL/Limfosit T sitotoksik/Sel T sitotoksik/CD8⁺) maupun limfosit B. Adanya pengenalan oleh Sel T sitotoksik/CD8⁺ (sel Tc/CD8⁺) menunjukkan bahwa molekul tersebut berpotensi membangkitkan respon imun seluler. Sebaliknya, adanya pengenalan tapak aktif oleh limfosit B menunjukkan potensi membangkitkan respon imun humoral yang diperantarai antibodi.

Subekti et al. (2012) melaporkan bahwa epitop untuk sel B diketahui sebanyak tujuh tapak yang immunogenik sebagaimana tercantum pada Tabel 2. Seluruh epitop untuk sel B tersebut bersifat hidrofilik yang bermakna bahwa fragmen tersebut berada di bagian permukaan struktur molekul (*surface exposed domain*). Apabila fragmen tersebut berada di bagian bukan permukaan struktur suatu molekul maka akan mudah diakses oleh IgM pada permukaan limfosit B (*IgM bearing membrane*). Artinya, bagian tersebut dapat dikenali dan diakses oleh bagian variabel dari struktur antibodi (*antigen binding site*) dan akan menginduksi ataupun mengaktivasi limfosit B.

Selanjutnya, hal tersebut menyebabkan *switching* menjadi IgM tersekresi, IgG atau IgA. Oleh sebab itu, hidrofilitas juga menjadi salah satu syarat untuk prediksi immunogenisitas fragmen peptida GRA1 terkait dengan limfosit B. Perkiraan urutan hidrofilitas fragmen pada Tabel 2 adalah fragmen peptida nomor (1 = 5) > (3 = 6 = 7) > (2 = 4) (Subekti et al. 2012).



Gambar 3. Berat molekul dan titik isoelektrik protein GRA1. A). Hasil prediksi dengan CLC bio protein. Garis biru: dinamika muatan listrik dari protein GRA1. Garis hijau: garis linier dimana muatan listrik nol. B). Hasil elektroforesis dua dimensi protein ESA

Sumber: Zhou et al. (2005); Subekti et al. (2012)

Penentuan epitop yang dapat dikenali oleh CTL umumnya memiliki panjang peptida yang terbatas yaitu sekitar 9 peptida (Subekti et al. 2012). Diantara epitop yang dikenali oleh limfosit T sitotoksik (Tabel 2) terdapat hasil yang serupa atau saling tumpang tindih (*overlapping*) dengan epitop yang dikenali limfosit B. Runutan tersebut adalah YAAEGGDNQ (tyr-ala-ala-glu-gly-gly-asp-asn-gln) yang berada pada posisi asam amino ke-23 sampai ke-31 (Subekti et al. 2012). Stimulasi limfosit T sitotoksik dilakukan oleh sel penyaji antigen yang mempresentasikan fragmen peptida di permukaan selnya melalui molekul MHC I (Abbas et al. 2004). Fragmen peptida tersebut dihasilkan melalui proses pengolahan (degradasi) berbagai struktur komponen mikroorganisme atau bahan asing tersebut tanpa dipengaruhi hidrofobitas maupun hidrofilitas. Adapun runutan YAAEGGDNQ bersifat sangat hidrofilik. Dengan demikian fragmen dengan runutan peptida YAAEGGDNQ dari struktur protein GRA1 tersebut diperkirakan memiliki potensi

Tabel 2. Lokasi dan sekuen peptida dari epitop yang dikenali oleh sel B maupun Sel Tc/CD8⁺ (Sel T Sitotoksik)

No.	aa awal	aa akhir	Sekuen epitop untuk CD8 ⁺	aa awal	aa akhir	Sekuen epitop untuk sel B
1	18	26	LSAGAYAAE	23	37	YAAEGGDNQSSAVSD
2	23	31	YAAEGGDNQ	47	56	GGTGQGLGIG
3	52	60	GLGIGESVD	68	78	YRVERPTGNPD
4	94	102	VGNVNVEEV	86	97	ASDGSYSEVGNV
5	109	117	MQRDEDIFL	108	111	SMQR
6	152	160	SAVASVVQD	123	142	GETVEEAIEDVAQAEGLNSE
7	-	-	-	170	179	QLEKDKQQLK

aa: asam amino

Sumber: Subekti et al. (2012)

antigenik dan imunogenik lebih kuat dibandingkan dengan fragmen lainnya. Namun demikian, hal tersebut perlu pembuktian secara *in vivo* sebagaimana dilakukan oleh Kong et al. (2003). Kong et al. (2003) telah melakukan diagnosis serologis menggunakan sejumlah peptida sintetik diantaranya adalah peptida CSYSEVGNVNEE dan CSYSEVGDVNEE dari GRA1, namun keduanya tidak dikenali oleh serum seropositif. Hal demikian dapat dipahami karena runutan peptida VGNVNVEE adalah epitop untuk sel Tc/CD8⁺ sebagaimana tercantum pada Tabel 2.

KAJIAN IMUNOGENISITAS PROTEIN GRA1

Beberapa penelitian terkait kajian imunogenisitas protein GRA1 (Vercammen et al. 2000; Scorza et al. 2003; Döşkaya et al. 2007) memperlihatkan bahwa menurut analisis penulis, jika ditinjau dari berat molekulnya maka imunogenisitas protein GRA1 sesungguhnya lemah dan sangat berpeluang untuk mengalami imunotoleransi oleh antibodi. Kaidah ini hanya dapat ditolak jika terdapat kaidah lain yang menunjukkan bahwa imunotoleransi dapat terjadi karena selain berat molekul dan juga jika terdapat bukti bahwasannya BM sekitar 20-30 kD tidak menginduksi imunotoleransi. Referensi yang menunjukkan informasi demikian masih belum penulis peroleh saat ini sehingga ketetapan yang berlaku dari analisis tersebut adalah GRA1 memiliki imunitas yang tidak terlalu baik karena memiliki peluang mengalami imunotoleransi atau setidaknya memiliki imunogenisitas lemah. Hal demikian disebabkan karena berat molekul protein GRA1 berkisar di interval 1-69 kD. Molekul dengan BM 69 kD akan ditoleransi sedangkan diatas 1 kD (tentunya <69 kD) imunogenisitasnya lemah. Suatu molekul yang dinyatakan antigenik tidak selalu imunogenik, demikian pula sebaliknya. Antigenisitas mengacu pada keasingan suatu molekul yang secara normal tidak terdapat dalam tubuh suatu makhluk hidup. Adapun imunogenisitas mengacu pada

kemampuan sistem imun tubuh untuk mengenali dan merespon molekul tersebut.

Analisis secara bioinformatik sebagaimana telah diuraikan sebelumnya untuk penetapan tapak antigenik dan imunogenik hanya menjelaskan prediksi fragmen dari protein GRA1 yang diperkirakan bersifat antigenik dan imunogenik. Analisis bioinformatik tersebut tidak diarahkan untuk menetapkan antigenisitas dan kekuatan imunogenisitasnya. Pada analisis tersebut juga belum terdapat bukti pendukung secara empiris dari percobaan *in vivo* yang meneguhkan kebenaran prediksi tersebut. Kesimpulan analisis berbasis bioinformatik hanya dapat diterima secara ilmiah jika terdapat kesesuaian antara bukti teoritis (prediktif) dengan bukti empiris (hasil percobaan *in vivo*) dengan prosedur percobaan yang menisbikan bias.

Pada percobaan yang dilakukan oleh Scorza et al. (2003) dan Vercammen et al. (2000) telah menggunakan teknik imunisasi secara i.m dengan vaksin DNA memiliki beberapa permasalahan yang perlu dikritisi. Vaksin DNA secara struktural akan mengandung motif CpG (*unmethylated cytosine-phosphate-guanosine*) disamping gen sisipan dari protein target. Pada vaksinasi i.m maka vaksin DNA akan mengalami dua kemungkinan, pertama akan berada dalam cairan ekstraseluler dan difagositosis oleh sel fagositik. Kemungkinan kedua, mayoritas akan tertransfeksi ke dalam lisosom sel otot (myosit) maupun keratinosit (Neumann dan Meier 2010).

Pada kemungkinan pertama, apabila vaksin pVR1020-GRA1 berada di cairan ekstraseluler, maka pertanyaannya adalah, apakah ekspresi protein dapat terjadi. Kalaupun hal ini dapat terekspresi, maka baik pVR1020-GRA1 maupun protein GRA1 akan difagositosis. Proses fagositosis akan mengakibatkan terbentuknya vakuola fagolisosom yang di dalamnya terdapat pVR1020-GRA1 maupun protein GRA1. Kondisi tersebut menyebabkan reseptor TLR9 (*Toll Like Receptor 9*) akan dapat teraktifkan oleh motif CpG vektor, sedangkan protein GRA1 akan didegradasi karena dalam vakuola fagolisosom terdapat enzim

protease yang akan melakukan degradasi protein. Degradasi protein GRA1 dalam vakuola fagolisosom akan mengakibatkan teraktifkannya molekul MHC II (*major histocompatibility complex II*) yang responnya akan menginduksi aktifnya sel Th/CD4⁺ yang selanjutnya akan menginduksi sel B dan bukan sel Tc/CD8⁺. Dengan demikian pada jalur inisiasi melalui molekul MHC II akan mengarah pada respon humoral oleh antibodi dengan regulasi sel Th₁/CD4⁺ ataupun sel Th₂/CD4⁺ sebagaimana hasil penelitian Döşkaya et al. (2007). Hasil penelitian ini lebih dekat dengan fakta infeksi alami sebagaimana dilaporkan oleh Nguyen et al. (1998) dan Nguyen et al. (2003). Perbedaannya adalah bahwa pada penelitian Döşkaya et al. (2007), variabel yang diamati adalah IgG_{2a} dan IgG₁ sebaliknya pada Nguyen et al. (1998) dan Nguyen et al. (2003) diketahui bahwa yang dominan adalah IgG_{2a} dan IgG_{2b} sedangkan IgG₁ berada pada urutan terakhir.

Bukti lain bahwa vaksin DNA GRA1 dapat menginduksi respon imun juga dilaporkan Vercammen et al. (2000) yang menunjukkan terbentuknya respon imun humoral. Secara umum pada penelitian tersebut dilaporkan bahwa antibodi yang dominan adalah IgG_{2a} yang diketahui sebagai antibodi yang terbentuk dalam pengaruh sitokin proinflamatorik dibandingkan dengan IgG₁. Hal yang menarik adalah setelah tiga kali imunisasi dengan pVR1020-GRA1 ternyata jumlah hewan yang menunjukkan seropositif terhadap GRA1 mengalami penurunan (Vercammen et al. 2000). Hal demikian memiliki beberapa makna, salah satu kemungkinannya adalah mulai terjadinya imunotoleransi. Kemungkinan ini selaras dengan pembahasan sebelumnya karena BM GRA1 yang rendah (berkisar antara 1-69 kD) yang berpeluang sebagai molekul yang tidak antigenik atau antigenisitas lemah atau immunogenisitas sedang dengan kemungkinan mengalami imunotoleransi.

Motif CpG akan dikenali oleh reseptor TLR9 yang merupakan reseptor pada komponen seluler pada sel B maupun sel penyaji antigen (Anders et al. 2004; van Duin et al. 2006). Sel-sel tersebut merupakan komponen respon imun non-spesifik, yang konsekuensinya adalah semua material yang mengandung motif CpG akan menginduksi reseptor TLR9 tanpa memperhatikan struktur molekul secara spesifik. van Duin et al. (2006) serta Reed et al. (2009) menyatakan bahwa reseptor TLR9 terdapat dalam fagolisosom, adapun menurut Akira (2003) dan Anders et al. (2004) TLR9 terdapat di permukaan sel.

Khan (2007) melaporkan, berdasarkan percobaan *in vitro* terdapat indikasi bahwa TLR9 terkait dengan inisiasi respon imun seluler terhadap *T. gondii*. Namun demikian, molekul TLR lain juga teraktifkan dan menampakkan respon imun dengan derajat yang berbeda tanpa diketahui pencetusnya dengan rinci (Khan 2007). Konsekuensi dari teraktifnya reseptor

TLR9 adalah terinduksinya respon imun seluler (baik spesifik maupun non-spesifik) dengan polarisasi dominan pada sel Th₁ (proinflamatorik). Hal demikian juga telah diindikasikan oleh Anders et al. (2004) dan Khan (2007) bahwa TLR9 terdapat pada sel penyaji antigen (sel dendritik dan makrofag) dan sel B yang selanjutnya dapat menstimulasi aktivitas sel B dan sel Th₁/CD4⁺.

Kemungkinan kedua dari vaksinasi DNA secara intramuskular yang dilakukan Scorza et al. (2003) dan Vercammen et al. (2000) adalah tertransfeksi ke dalam sitoplasma myosit dan keratinosit sebagaimana dijelaskan Neumann dan Meier (2010). Apabila hasil transfeksi berada dalam sitoplasma dan terekspresi menjadi protein akan disekresikan keluar dari myosit maupun keratinosit (Neumann dan Meier 2010). Konsekuensinya, protein GRA1 akan dikeluarkan dari sel dan difagositosis oleh sel fagositik atau sel penyaji antigen sehingga dapat dipresentasikan melalui molekul MHC II. Hasil aktivasi sistem imun melalui jalur MHC II adalah munculnya respon imun humoral.

Sebaliknya, jika protein GRA1 terekspresi di dalam sitoplasma tidak disekresikan keluar, maka protein tersebut akan didegradasi dan dipresentasikan oleh molekul MHC I. Aktivasi sistem imun melalui molekul MHC I akan menyebabkan teraktifkannya respon imun seluler khususnya sel Tc/CD8⁺. Artinya, walaupun hanya diimunisasi dengan vektor pVR1020 saja, maka respon imun seluler (sel Tc/CD8⁺) tetap akan teraktifkan walaupun mungkin akan rendah. Hal ini telah terbukti dari data yang dilaporkan oleh Scorza et al. (2003) tetapi justru hal demikian terluput dan tidak dibahas oleh mereka. Rendahnya respon sel Tc/CD8⁺ pada induksi dengan vektor pVR1020 dibandingkan dengan pVR1020-GRA1 adalah karena pada vektor yang mengekspresikan protein GRA1 terdapat dua antigen yaitu vektornya sendiri yang mengandung motif CpG dan protein GRA1 yang antigenik. Respon yang lebih tinggi pada pVR1020-GRA1 kemungkinan terkait dengan pembangkitan respon imun spesifik dan non-spesifik sekaligus yang keduanya akan bersinergi menghasilkan sitokin yang akan saling berpotensiasi dalam meregulasi respon imun. Hal ini selayaknya mendapat perhatian sehingga akan dapat didiskriminasi dengan baik masing-masing pengaruhnya secara tunggal.

Berdasarkan analisis kritis terhadap berbagai laporan ilmiah di atas, maka molekul TLRs (khususnya TLR9) dan molekul MHC memiliki fungsi dan konsekuensi yang berbeda dalam respon imun seluler. Variabel respon imun seluler berupa sel Tc/CD8⁺ kemungkinan merupakan respon integral yang melibatkan jalur inisiasi dari MHC I dan TLR sehingga penetapan kemampuan induksi protein GRA1 terhadap sel Tc/CD8⁺ belum dapat ditetapkan secara pasti. Dengan demikian, secara umum dapat dipahami bahwa

apabila pada cairan ekstraseluler maupun intraseluler, pVR1020-GRA1 dapat terekspresi maka baik pVR1020-GRA1 maupun protein GRA1 akan difagositosis sehingga sulit dibedakan apakah respon imun yang muncul tersebut akibat induksi/stimulasi oleh protein GRA1 ataukah oleh motif CpG dari pVR1020-GRA1 atau bahkan keduanya, sehingga tidak dapat ditetapkan dengan pasti imunogenisitas GRA1.

Fakta berikutnya terkait dengan imunogenisitas protein GRA1 datang dari hasil penelitian Döşkaya et al. (2007), yang memperlihatkan bahwa vaksinasi dengan pCMV-coGRA1 menginduksi IgG lebih kuat dibandingkan dengan rGRA1-provak sehingga disimpulkan bahwa GRA1 adalah imunogenik. Namun demikian, data yang ditampilkan (Gambar 1) justru membuktikan sebaliknya. Pada gambar tersebut diketahui bahwa vaksinasi dengan rGRA1 tanpa ajuvan justru menghasilkan titer IgG yang sangat rendah dibandingkan dengan vaksinasi dengan pCMV/co-GRA1 maupun rGRA1-provak (Döşkaya et al. 2007). Fakta tersebut dengan sangat jelas membuktikan lemahnya imunogenisitas protein GRA1 yang diwakili oleh rGRA1 dan hal demikian bersesuaian dengan kaidah imunologis sebagaimana dinyatakan oleh Tizzard (2013) bahwa molekul dengan BM di bawah 60 kD (1-60 kD) memiliki imunogenisitas lemah dan memiliki potensi untuk ditoleransi. Disisi lain, Vercammen et al. (2000) melaporkan bahwa setelah tiga kali vaksinasi dengan pVR1020-GRA1, ternyata jumlah hewan yang menunjukkan seropositif terhadap GRA1 mengalami penurunan sehingga dicurigai telah mulai terjadi imunotoleransi.

Döşkaya et al. (2007) juga melaporkan bahwa indeks stimulasi limfosit secara *in vitro* pada vaksinasi mencit dengan rGRA1 ternyata lebih rendah dibandingkan dengan vaksinasi menggunakan rGRA1-provak dan pCMV-coGRA1. Demikian pula halnya dengan sekresi IFN γ dan IL4, mencit yang divaksinasi dengan rGRA1 menunjukkan kadar sekresi yang sangat rendah dibandingkan dengan vaksinasi menggunakan rGRA1-provak dan pCMV-coGRA1 (Döşkaya et al. 2007). Secara keseluruhan, informasi tersebut memberikan bukti bahwa protein GRA1 kurang imunogenik terhadap respon imun seluler ditinjau dari kemampuan splenosit berproliferasi maupun dari rendahnya sekresi IFN γ yang dihasilkan oleh sel Th/CD4 $^+$ dan sel Tc/CD8 $^+$.

Secara keseluruhan, sumber pembuktian/fakta empiris yang tersedia saat ini memiliki kelemahan metodologis yang tidak dapat memberikan bukti langsung (*direct evidence*) yang akurat dan mampu menetapkan kuatnya imunogenisitas protein GRA1. Dukungan bukti/fakta ilmiah secara empiris tersebut harus memenuhi dua aspek, pertama membuktikan secara langsung kemampuan protein GRA1 secara tunggal dalam menginduksi sistem imun. Aspek kedua,

harus dapat menjelaskan bagaimana secara alami protein GRA1 pada proses infeksi *T. gondii* menginduksi sistem imun. Jika kedua aspek tersebut dapat dibuktikan dan dijelaskan secara ilmiah dengan data yang akurat maka ketetapan antigenisitas dan imunogenisitas protein GRA1 menjadi lebih kuat dan kokoh.

Adapun bukti lebih baik yang ada saat ini adalah fakta awal dari aspek pertama yang dilaporkan Döşkaya et al. (2007) namun hasilnya justru mengindikasikan lemahnya imunogenisitas GRA1. Walaupun demikian metodologi yang digunakan oleh Döşkaya et al. (2007) juga masih terdapat kelemahan. Adapun penelitian lain yang menggunakan vaksin DNA untuk GRA1 maupun protein GRA lainnya juga penggunaan rekombinan GRA1 dengan ajuvan (misalnya provak atau alum) justru menunjukkan bahwa protein GRA1 kurang imunogenik. Adanya respon imun terhadap protein GRA1 cenderung karena adanya DNA bakteri atau virus sebagai vektor (motif CPG) yang bertindak sebagai ajuvan sebagaimana provak. Ajuvan tersebut mengangkat imunogenisitas protein GRA1 yang lemah.

KESIMPULAN

Protein GRA1 memiliki kecenderungan kuat sebagai antigen ditinjau dari sudut pandang imunologis maupun analisis bioinformatik. Namun demikian kekuatan imunogenisitas protein GRA1 menjadi perdebatan secara ilmiah. Berdasarkan analisis bioinformatik, protein GRA1 merupakan molekul dengan imunogenisitas lemah. Kemampuan protein GRA1 dalam menginduksi respon imun humoral (dengan terbentuknya antibodi spesifik) dan menginduksi respon imun seluler (sel Tc/CD8 $^+$ maupun sel Th/CD4 $^+$) cenderung disebabkan oleh ajuvan baik berupa motif CpG dari DNA vektor maupun ajuvan lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2004. Effector mechanisms of humoral immunity. In: Cellular and Molecular Immunology. 4th ed. Philadelphia (Pennsylvania): WB Saunders Company.
- Abou-Bacar A, Pfaff AW, Georges S, Letscher-Bru V, Filisetti D, Villard O, Antoni E, Klein JP, Candolfi E. 2004. Role of NK cells and gamma interferon in transplacental passage of *Toxoplasma gondii* in a mouse model of primary infection. *Infect Immun.* 72:1397-1401.
- Akira S. 2003. Mammalian toll-like receptors. *Curr Opin Immunol.* 15:5-11.

- Anders HJ, Banas B, Schlöndorff D. 2004. Signaling danger: toll-like receptors and their potential roles in kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 15:854-867.
- Black MW, Boothroyd JC. 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 64:607-623.
- Carruthers VB. 2002. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop*. 81:111-122.
- Cerávolo IP, Chaves ACL, Bonjardim CA, Sibley D, Romanha AJ, Gazzinelli RT. 1999. Replication of *Toxoplasma gondii*, but not *Trypanosoma cruzi*, is regulated in human fibroblasts activated with gamma interferon: requirement of a functional JAK/STAT pathway. *Infect Immun*. 67:2233-2240.
- Cesbron-Delauw MF, Lecordier L, Mercier C. 1996. Role of secretory dense granule organelles in the pathogenesis of toxoplasmosis in *Toxoplasma gondii*. Berlin (German): Springer Verlag. p. 59-65
- Cohen AM, Rumpel K, Coombsand GH, Wastling JM. 2002. Characterisation of global protein expression by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry: proteomics of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*. 32: 39-51.
- Coppens I, Joiner KA. 2001. Parasite–host cell interactions in toxoplasmosis: new avenues for intervention. *Expert Rev Mol Med*. 3:1-20.
- Denkers EY, Gazzinelli RT. 1998. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev*. 11:569-588.
- Döşkaya M, Kalantari-Dehaghi M, Walsh CM, Hiszeczyńska-Sawicka E, Davies DH, Felgner PL, Larsen LSZ, Lathrop RH, Hatfield GW, Schulz JR, Guruz Y, Jurnak F. 2007. GRA1 protein vaccine confers better immune response compared to codon-optimized GRA1 DNA vaccine. *Vaccine*. 25:1824-1837.
- Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev*. 11:267-299.
- Dzierszinski F, Nishi M, Ouko L, Roos DS. 2004. Dynamics of *Toxoplasma gondii* differentiation. *Eukaryot Cell*. 3:992-1003.
- Fischer HG, Stachelhaus S, Sahm M, Meyer HE, Reichmann G. 1998. GRA7, an excretory 29 kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells. *Mol Biochem Parasitol*. 91:251-262.
- Gazzinelli RT, Brézin A, Li Q, Nussenblatt RB, Chan CC. 1994. *Toxoplasma gondii*: acquired ocular toxoplasmosis in the murine model, protective role of TNF- α and IFN- γ . *Exp Parasitol*. 78:217-229.
- Håkansson S, Charron AJ, Sibley LD. 2001. *Toxoplasma* vacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *EMBO J*. 20:3132-3144.
- Halonen SK, Chiu FC, Weiss LM. 1998. Effect of cytokines on growth of *Toxoplasma gondii* in murine astrocytes. *Infect Immun*. 66:4989-4993.
- Huynh MH, Rabenau KE, Harper JM, Beatty WL, Sibley LD, Carruthers VB. 2003. Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex. *EMBO J*. 22:2082-2090.
- Kafsack BFC, Pena JDO, Coppens I, Ravindran S, Boothroyd JC, Carruthers VB. 2009. Rapid membrane disruption by a perforin-like protein facilitates parasite exit from host cells. *Science*. 323:530-533.
- Kasper LH, Buzoni-Gatel D. 2001. Ups and down of mucosal cellular immunity against protozoan parasites. *Infect Immun*. 69:1-8.
- Khan IA. 2007. Toll road for *Toxoplasma gondii*: the mystery continues. *Trends Parasitol*. 23:1-3.
- Kong Jiang-Ti, Grigg ME, Uyetake L, Parmley S, Boothroyd JC. 2003. Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides. *J Infect Dis*. 187:1484-1495.
- Lecordier L, Fourmaux MP, Mercier C, Dehecq E, Masy E, Cesbron-Delauw MF. 2000. Enzyme-linked immunosorbent assays using the recombinant dense granule antigens GRA6 and GRA1 of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol*. 7:607-611.
- Lecordier L, Mercier C, Sibley LD, Cesbron-Delauw MF. 1999. Transmembrane insertion of the *Toxoplasma gondii* GRA5 protein occurs after soluble secretion into the host cell. *Mol Biol Cell*. 10:1277-1287.
- McLeod R, Mack D, Brown C. 1991. *Toxoplasma gondii*-new advances in cellular and molecular biology. *Exp Parasitol*. 72:109-121.
- Montoya JG, Lowe KE, Clayberger C, Moody D, Do D, Remington JS, Talib S, Subauste CS. 1996. Human CD4⁺ and CD8 T lymphocytes are both cytotoxic to *Toxoplasma gondii*-infected cells. *Infect Immun*. 64:176-181.
- Morrisette NS, Sibley LD. 2002. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol Mol Biol Rev*. 66:21-38.
- Nam HW. 2009. GRA proteins of *Toxoplasma gondii*: maintenance of host-parasite interactions across the parasitophorous vacuolar membrane. *Korean J Parasitol*. 47 Suppl:S29-S37.
- Neudeck A, Stachelhaus S, Nischik N, Striepen B, Reichmann G, Fischer HG. 2002. Expression variance, biochemical and immunological properties of *Toxoplasma gondii* dense granule protein GRA7. *Microbes Infect*. 4:581-590.
- Neumann L, Meier S. 2010. Veterinary immunology and immunopathology. New York (USA): Nova Science Publishers, Inc.

- Neyer LE, Grunig G, Fort M, Remington JS, Rennick D, Hunter CA. 1997. Role of interleukin-10 in regulation of T-cell-dependent and T-cell-independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun*. 65:1675-1682.
- Nguyen TD, Bigaignon G, Van Broeck J, Vercammen M, Nguyen TN, Delmee M, Turneer M, Wolf SF, Coutelier JP. 1998. Acute and chronic phases of *Toxoplasma gondii* infection in mice modulate the host immune responses. *Infect Immun*. 66:2991-2995.
- Nguyen TD, Bigaignon G, Markine-Goriaynoff D, Heremans H, Nguyen TN, Warnier G, Delmee M, Warny M, Wolf SF, Uyttenhove C, Snick JV, Coutelier JP. 2003. Virulent *Toxoplasma gondii* strain RH promotes T-cell-independent overproduction of proinflammatory cytokines IL12 and γ -interferon. *J Med Microbiol*. 52:869-876.
- Opitz C, Soldati D. 2002. "The glideosome": a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol*. 45:597-604.
- Ossorio PN, Dubremetz JF, Joiner KA. 1994. A soluble secretory protein of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* associates with the parasitophorous vacuole membrane through hydrophobic interactions. *J Biol Chem*. 269:15350-15357.
- Prigione I, Facchetti P, Lecordier L, Deslee D, Chiesa S, Cesbron-Delauw M, Pistoia V. 2000. T cell clones raised from chronically infected healthy humans by stimulation with *Toxoplasma gondii* excretory-secretory antigens cross-react with live tachyzoites: characterization of the fine antigenic specificity of the clones and implications for vacci. *J Immunol*. 164:3741-3748.
- Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M. 2009. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol*. 30:23-32.
- Reichmann G, Długońska H, Fischer HG. 2002. Characterization of TgROP9 (p36), a novel rhoptry protein of *Toxoplasma gondii* tachyzoites identified by T cell clone. *Mol Biochem Parasitol*. 119:43-54.
- Robert LS, Janovy J. 2000. *Foundations of parasitology*. Boston (USA): McGraw Hill. p. 127-132.
- Sayles PC, Gibson GW, Johnson LL. 2000. B cells are essential for vaccination-induced resistance to virulent *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun*. 68:1026-1033.
- Scorza T, D'Souza S, Laloup M, Dewit J, De Braekeleer J, Verschueren H, Vercammen M, Huygen K, Jongert E. 2003. A GRA1 DNA vaccine primes cytolytic CD8(+) T cells to control acute *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun*. 71:309-316.
- Sibley LD, Mordue DG, Su C, Robben PM, Howe DK. 2002. Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Philos Trans Royal Soc Lond Biol Sci*. 357:81-88.
- Sibley LD. 2003. *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. *Traffic*. 4:581-586.
- Subekti DT, Arrasyid NK, Artama WT, Soesatyo MHNE. 2005a. Perbandingan profil IgA secara proporsional pada cairan mukosa usus dan serum mencit setelah vaksinasi intranasal menggunakan protein solubel *Toxoplasma gondii*. Dalam: *Prosiding Seminar Nasional Revitalisasi Bidang Kesehatan Hewan dan Manajemen Peternakan Menuju Ekonomi Global*. Surabaya, 15-16 April 2005. Surabaya (Indonesia): Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. hlm. 105-112.
- Subekti DT, Arrasyid NK, Artama WT, Soesatyo MHNE. 2005b. Efek ajuvan toksin kolera dan enterotoksin tipe I terhadap profil IgG2a dan IgG2b pada mencit yang diimunisasi intranasal dengan protein solubel *Toxoplasma gondii*. *Media Kedokteran Hewan*. 22:10-16.
- Subekti DT, Arrasyid NK. 2006. Imunopatogenesis *Toxoplasma gondii* berdasarkan perbedaan galur. *Wartazoa*. 16:128-145.
- Subekti DT, Artama WT, Poerwanto SH, Sulistyarningsih E, Sari Y. 2012. Analisis imunogenisitas protein GRA1 dari hasil kloning gen GRA1 takizoit *Toxoplasma gondii*. *Ber Biol*. 11:43-52.
- Tizzard IR. 2013. *Veterinary immunology*. 9th ed. Philadelphia (Pennsylvania): WB Saunders Co.
- Van Duin D, Medzhitov R, Shaw AC. 2006. Triggering TLR signaling in vaccination. *Trends Immunol*. 27:49-55.
- Vercammen M, Scorza T, Huygen K, De Braekeleer J, Diet R, Jacobs D, Saman E, Verschueren H. 2000. DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7 and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. *Infect Immun*. 68:38-45.
- Zhang Y, Denkers EY. 1999. Protective role for interleukin-5 during chronic *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun*. 67:4383-4392.
- Zhou XW, Kafack BFC, Cole RN, Beckett P, Shen RF, Carruthers VB. 2005. The opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii* deploys a diverse legion of invasion and survival proteins. *J Biol Chem*. 280:34233-34244.