

**Karakterisasi Protein Target untuk Pengembangan Vaksin Dengue :
Analisis Proteomik terhadap Protein Imunomodulator Hasil Reaksi silang
Kelenjar Saliva *Aedes aegypti* dengan Serum Manusia**

Peneliti : Rike Oktarianti¹
Kartika Senjarini¹
Sumber Dana : DIPA Universitas Jember Tahun Anggaran
2014

¹ Staf pengajar Jurusan Biologi Fak MIPA Universitas Jember

ABSTRACT

Ae. aegypti is the main vector of *Dengue Haemorrhagic Fever* (DHF). The salivary gland (SG) of *Ae. aegypti* contain proteins that plays an important role in pathogen transmission especially immunomodulator proteins. We have characterized 2 immunogenic proteins from which are able to be recognized only by IgG of people living in endemic area. The objective of this research is to further characterize those two immunogenic proteins (bands) i.e. ~31 and 56 kDa from salivary gland of *Ae. aegypti* by using proteomic analysis i.e. mass-spectrometry analysis (LC MS/MS). The result of proteomic analysis by using LC MS/MS of 31 kDa band consisted of eleven proteins. The most abundant protein was identified as D7 protein (37 kDa salivary gland allergen Aed a2). Six proteins were identified of the band 56 kDa and the most abundant was Apyrase. We have identified 7 proteins were involved in blood feeding (41%) and 8 proteins (47%) had unknown function.

Key words: Immunogenic proteins, Salivary Gland, *Aedes aegypti*, Proteomic analysis

**Karakterisasi Protein Target untuk Pengembangan Vaksin Dengue :
Analisis Proteomik terhadap Protein Imunomodulator Hasil Reaksi Silang
Kelenjar Saliva *Aedes aegypti* dengan Serum Manusia**

Peneliti : Rike Oktarianti¹
Kartika Senjarini¹
Sumber Dana : DIPA Universitas Jember Tahun Anggaran
2014
Kontak email : rike_oktarianti@yahoo.com

¹ Staf pengajar Jurusan Biologi Fak MIPA Universitas Jember

Executive Summary

Dengue fever, dikenal di Indonesia sebagai Demam Berdarah Dengue (DBD) masih merupakan permasalahan yang sangat serius dengan angka mortalitas tinggi. Penyakit ini disebabkan oleh virus yang transmisinya ke manusia diperantarai vektor nyamuk *Ae. aegypti*. Sampai saat ini dilaporkan belum ada vaksin berlisensi untuk pencegahan penyakit DBD atau obat untuk mengatasi penyakit tersebut. Metode yang pada saat ini digunakan adalah dengan mengobati gejala penyakit tersebut dan mengendalikan vektornya yaitu *Ae. aegypti*. Vaksinasi akan merupakan strategi yang lebih efektif untuk mencegah dan mengatasi epidemi DBD. Gigitan nyamuk terhadap inang dalam proses transmisi selalu diikuti dengan gatal-gatal bahkan kadang pembengkakan. Hal ini menunjukkan bahwa banyak komponen saliva nyamuk bersifat imunogenik (memicu respon imun inang). Fenomena ini mendasari berkembangnya teori baru bahwa saliva dari vektor arthropoda mengandung komponen penting yang berfungsi sebagai vasomodulator dan immunomodulator. Faktor immunomodulator dapat meningkatkan transmisi patogen oleh vektor karena bersifat immunosupresif terhadap inang. Apabila inang diinjeksi dengan komponen anti-immunosupresif yang berada di saliva vektor arthropoda, diharapkan dapat mencegah transmisi patogen penyebab DBD. Hipotesis ini merupakan basis penting dalam pengembangan vaksin melawan patogen yang ditransmisikan sehingga merupakan kandidat target potensial dalam pengembangan vaksin melawan epidemi DBD. Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya (Hibah Doktor) telah berhasil diidentifikasi protein kelenjar saliva *Ae. aegypti* yang bersifat imunogenik dan diduga berperan penting dalam resistensi terhadap patogen penyebab DBD yaitu protein dengan berat molekul 31 kDa dan 56 kDa (Oktarianti *et al.* 2014). Hal ini karena protein tersebut bersifat imunogenik dengan memunculkan respon

imun adaptif yang dapat merangsang respon antibodi terhadap antigen saliva arthropoda pada penduduk yang hidup di daerah endemik. Oleh karena itu, protein tersebut diduga merupakan kandidat target potensial untuk dikembangkan sebagai vaksin dengue.

Penelitian ini bertujuan melakukan karakterisasi protein target (31 dan 56 kDa) hasil reaksi silang kelenjar saliva *Ae. aegypti* dengan serum manusia dengan menggunakan analisis proteomik. Analisis proteomik dilakukan dengan analisis spektrofotometri massa (LC MS/MS). Analisis mass spec (LC MS/MS) dilakukan dengan Q-TOF hybrid mass spectrometer (QSTAR Elite, AB Sciex, Foster City, CA, USA), akumulasi semua tandem mass spectrum digunakan software Protein pilot 2.0 (AB Sciex). Software ini menghitung unused score (score yang tidak terpakai), yaitu probabilitas peptida yang ambang batas untuk peptida yang teridentifikasi match ditetapkan pada sequence coverage sebesar $\geq 20\%$ dan unused scored ditetapkan sebesar ≥ 1.31 (ambang kepercayaan 0.95).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa Analisis proteomik terhadap protein imunogenik 31 kDa dengan mass spectrometry (LC MS/MS), ditemukan 11 jenis protein yaitu : protein dengan berat molekul ~ 31 kDa adalah D7 protein (37 kDa salivary gland allergen Aed a2), AAEL003600-PA, AAEL006417-PA, Angiopoietin-like protein variant, putative 34 kDa, putative serpin, AAEL000749-PA, Salivary anti FXa serpin, 30 kDa salivary gland allergen Aed a 3, AAEL006833-PA dan long form D7Bcl1 salivary protein. Diantara jenis protein tersebut 6 protein (54.54%) merupakan protein yang terlibat dalam blood feeding, termasuk D7 protein (37 kDa salivary gland allergen Aed a 2), AAEL006417-PA, putative serpin, 30 kDa salivary gland allergen Aed a 3, Salivary anti FXa serpin and Long form D7Bcl1 salivary protein. Jenis protein yaang jumlahnya paling melimpah diantara sekian banyak protein tersebut adalah D7 protein (37 kDa salivary gland allergen Aed a2). Hal ini ditunjukkan dengan nilai unused score sebesar 63.32 paling tinggi diantara protein yang lain. Protein D7 (37 kDa salivary gland allergen Aed a2) adalah protein sekresi yang jumlahnya melimpah pada saliva atau kelenjar saliva dari Diptera pemakan darah betina. Protein D7 merupakan protein sekretoris, pertama kali dilaporkan ada pada kelenjar saliva *Ae. aegypti* dan pada hampir semua spesies nyamuk betina (Calvo *et al.*, 2006). Protein D7 ini mempunyai bentuk panjang (BM 30-35 kDa) yang ditemukan pada nyamuk. dan bentuk pendek (15 kDa) ditemukan pada serangga. Bentuk pendek tidak memiliki daerah aminoterminal seperti yang dimiliki oleh bentuk panjang, namun keduanya memiliki daerah konserve yaitu residu sistein. Protein ini berkerabat dengan kelompok Odorant-Binding Protein (OBP) (Valenzuela *et al.*, 2002, Ribeiro *et al.*, 2007; Jariyapan *et al.*, 2012). D7 protein berikatan dan berperan dalam menghambat aksi amina biogenik seperti serotonin,

histamin, norepinephrine yang bertanggung jawab dalam proses *blood feeding* (Ribeiro *et al.*, 2007). Apyrase adalah molekul yang mampu menghambat agregasi trombosit karena mampu mendegradasi ATP atau ADP menjadi AMP dan P. Apyrase pada kelenjar saliva *Ae. aegypti* merupakan anggota dari kelompok gen pengkode 5'nucleotidase (Ribeiro & Franchicetti, 2003; Jariyapan *et al.*, 2012).

Identifikasi hasil mass spec terhadap protein imunogenik 56 kDa kelenjar saliva *Ae. aegypti* menunjukkan bahwa protein tersebut tersusun atas 6 jenis protein seperti Apyrase, AAEL000732-PA, 5'-nucleotidase, AAEL009524, AAEL004739-PA and putative secreted protein. Satu protein yaitu apyrase merupakan protein sekretoris yang berperan dalam blood feeding dan 3 protein belum diketahui fungsinya. Berdasarkan angka unused score, jenis protein yang didapatkan paling melimpah adalah apyrase dengan nilai paling tinggi diantara jenis protein lain. Apyrase adalah nucleoside triphosphate-diphosphohydrolase ditemukan banyak pada organism haematophagous.. Apyrase adalah enzim yang membantu proses blood feeding karena dapat mencegah terjadinya agregasi platelet dengan cara memecah atau menghidrolisis ADP atau ATP yang berperan sebagai mediator dalam agregasi platelet dan inflamasi. (Fontaine *et al.*, 2011). Pada kelenjar saliva nyamuk betina dewasa *Ae. aegypti*, protein 68 kDa teridentifikasi sebagai apyrase, terekspresi kuat pada kelenjar saliva betina (Dong *et al.*, 2012). Hybridization in situ mampu menunjukkan peranan lateral distal dan medial pada lobus terhadap proses blood feeding (Smarrt *et al.*, 1995, Juhn *et al.*, 2011). Secara keseluruhan protein imunogenik (31 & 56 kDa) berhasil diidentifikasi sebanyak 7 protein yang berperan dalam blood feeding (41%) dan 8 protein (47%) belum diketahui fungsinya.

DAFTAR PUSTAKA

- Calvo E, Mans BJ, Andersen JF, Ribeiro JM, 2006. Function and evolution of a mosquito salivary protein family. *J. Biol. Chem.* 281 (4): 1935-1942
- Dong F, Fu Y, Li X, Jiang J, Sun J, Cheng X. 2012. Cloning expression and characterization of salivary apyrase from *Aedes albopictus*. *Parasitol Res.* 110 : 931-937
- Fontaine A, Diouf I, Bakkali N, Misse D, Pages F, Fusai T, Rogier C, Almeras L. 2011. Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions. *Parasit & Vector.* 4 : 187
- Jariyapan, N, Roytrakul S, Paemane A, Junkum A, Saeung A, Thongsahuan S, Sor-suwan S, Phattanawiboon B, Poovorawan Y, Choochote W. 2012. Proteomic analysis of salivary glands of female *Anopheles barbirostris* species A2 (Diptera : Culicidae)

by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Parasitol Res.*
Published online : 15 may 2012

Juhn J, Naeem-Ullah U, Guedes BAM, Majid A, Coleman J, Pimenta PFP, Akram W, James AA, Marinotti O 2011. Spatial mapping of gene expression in the salivary glands of the Dengue vector mosquito *Ae. aegypti*. *Parasites and Vectors.* 41 (1 : 1-13).

Oktarianti, Senjarini K, Fatchiyah, Aulani'am. 2014. Immunogenic protein from salivary gland of *Ae. aegypti* against to human sera. *Advances Natural & Applied Science (ANAS)*, 8 (8) july : 101-107

Ribeiro JMC, and Francischetti IM 2003. Role of Arthropod Saliva in Blood feeding: Sialome and post-sialome perspective. *Ann Rev Entomol.* 48:73-78.

Ribeiro JMC, Arca B, Lombardo F, Calvo E, PhanVM, Chandra PK, & Wikel SK 2007. An Annotated Catalogue of Salivary Gland Transcripts in the Adult Female Mosquito, *Aedes aegypti*. *BMC Genomics.* 8: 6.

Smartt CT, Kim AP, Grosman GL, James AA. 1995. The apyrase gene of the vector mosquito *Ae. aegypti* expressed specifically the adult female salivary gland. *Experimental Parasitology* 81 : 239-248

Valenzuela JG, Charlab R, Gonzalez EC, Miranda-Santos IKF, Marinotti O, Francischetti IMB, Ribeiro JMC, 2002. The D7 family of salivary proteins in blood sucking Diptera. *Insect Mol. Biol.* 11(2):149-155.

