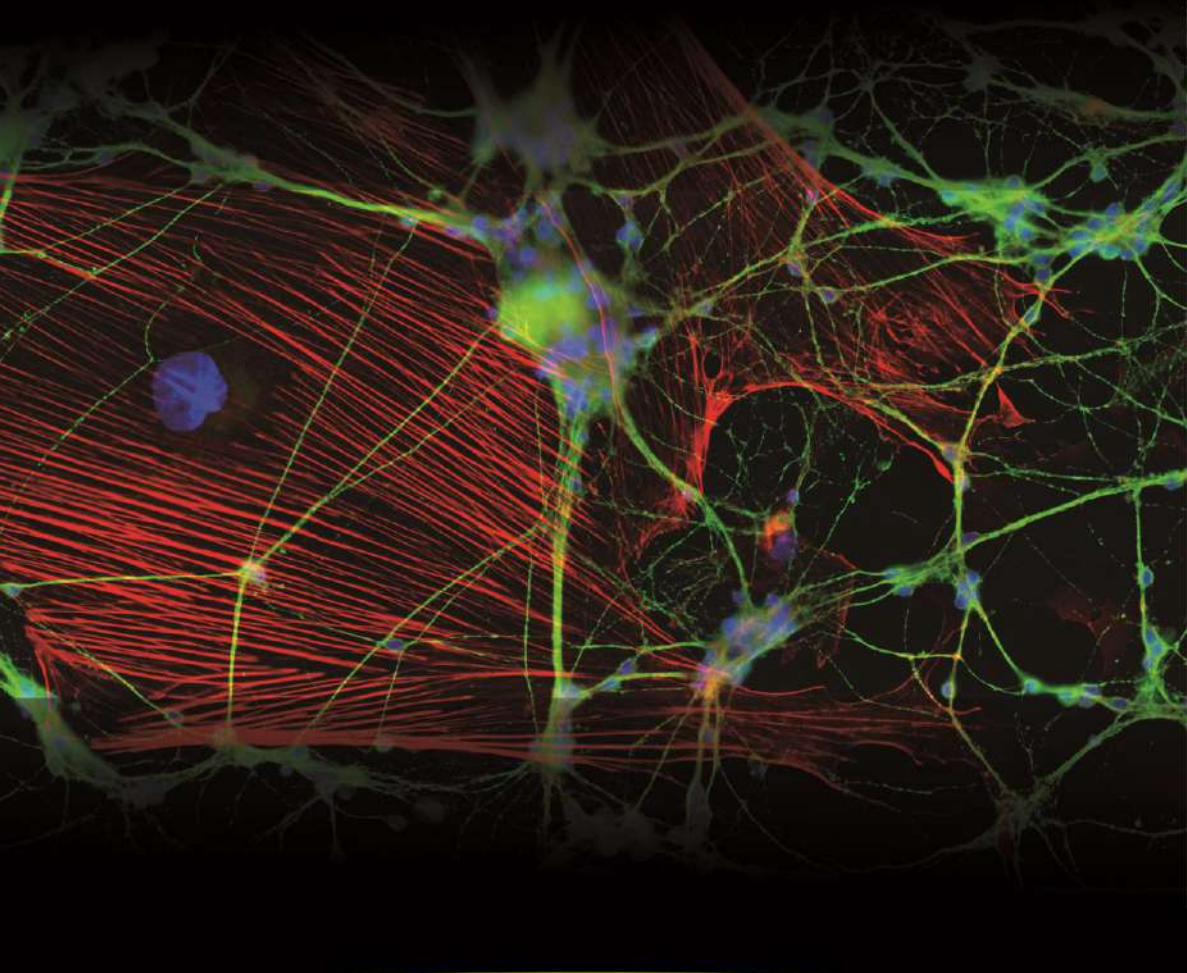


Unissula Press

# BASIC MOLECULAR STEM CELLS



---

Agung Putra

---

# **BASIC MOLECULAR STEM CELL**

# **BASIC MOLECULAR STEM CELL**

**Dr. dr. Agung Putra, M.Si. Med**

**Editor**

**Prof. Amin Soebandrio dr., Phd., Sp.MK (K)**

**Yuyus Kusnadi, Ph.D**

**Penerbit**

**Unissula press**

***BASIC MOLECULAR STEM CELL***

**Penulis**

Dr. dr. Agung Putra, M.Si. Med

**Editor**

Prof. Amin Soebandrio dr., Phd., Sp.MK (K)

Yuyus Kusnadi, Ph.D

400 halaman 15 x 23 cm

ISBN 978-623-7097-06-8

Cetakan pertama, Februari 2019

Hak cipta 2019, pada penulis

**Penerbit**

Unissula press

Jl. Raya Kaligawe Km.4 Semarang 50112

Telp. (024) 6583584

Fax. (024) 6582455

*Hak cipta dilindungi oleh undang-undang  
Dilarang keras menerjemahkan, memfotokopi atau  
Memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini  
tanpa izin dari penulis*

## **Ucapan terima kasih**

Buku referensi “*Basic Molecular Stem Cell*” ini disusun berdasarkan pengalaman hasil penelitian penulis dan banyak kontributor dalam menuangkan ide dan gagasan tentang perkembangan ilmu di bidang sel punca. Penulis melakukan penelitian dan pengkajian di berbagai macam jurnal penelitian Scopus yang sudah terbit di jurnal Internasional maupun Nasional berkaitan dengan sel punca, khususnya *mesenchymal stem cell* (MSC) dan *hematopoietic stem cell* (HSC) pada berbagai kasus medis seperti pada diabetes melitus, fibrosis dan sirosis liver, gagal ginjal serta kanker. Penelitian tentang sel punca akan dikaji hingga dalam dan akan terus lebih dalam lagi berkaitan dengan sisi molekuler, sehingga pengetahuan tentang sel punca dalam dunia riset dan aplikasi klinis akan semakin kaya dan melimpah.

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada seluruh kontributor, baik Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan tinggi Republik Indonesia, peneliti yang sudah menuangkan banyak riset, staf *Stem Cell and Cancer Research laboratory* dan pihak Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang sudah ikut membantu dalam mewujudkan terbit dan suksesnya buku referensi ini.

## **Kata Pengantar**

Puji syukur kehadirat Allah SWT, Tuhan penguasa alam semesta dan sumber segala ilmu, berkat rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan sebuah buku dengan judul “*Basic Molecular Stem Cell*”.

Buku ini disintesis dari berbagai sumber ilmiah terbaru, di samping hasil publikasi penelitian dan pengalaman penulis pribadi. Materi dalam buku ini diawali dengan konsep dasar sel punca, kemudian *stemness* dan *reprogramming*-transdiferensiasi, aspek molekuler sinyal transduksi, proliferasi sel punca, siklus sel, model komunikasi, *Mesencymal stem cell* (MSC), *Hematopoietic stem cell* (HSC), Immunoregulasi MSC, Polarisasi MSC, Konsep Homing MSC hingga Peran MSC dalam regenerasi jaringan rusak.

Buku ini diperuntukkan bagi para mahasiswa S-1, S-2 dan S-3 (doktoral) serta para peneliti di bidang rekayasa sel dan jaringan, yang ingin memperdalam ilmu atau konsep dasar terkait sel punca. Buku ini juga diharapkan dapat digunakan sebagai referensi bagi para akademisi yang ingin memperdalam terkait perkembangan molekuler sel punca, juga bagi para klinisi yang ingin memahami proses molekuler regenerasi sel punca terhadap berbagai kerusakan jaringan maupun penyakit degenerasi.

Akhirnya dengan penuh tawaddhu’ penulis menyadari atas segenap kekurangan dan kelemahan dalam penyelesaian buku ini, untuk itu kritik dan saran dibutuhkan demi membangun penyempurnaan karya berikutnya.

Semarang, Februari 2019

Penulis  
Agung Putra

## Daftar isi

### Basic Molecular Stem Cell

<b>Kata Pengantar .....</b>	<b>vi</b>
<b>Daftar isi .....</b>	<b>vii</b>
<b>Daftar istilah .....</b>	<b>xiv</b>
<b>Daftar tabel .....</b>	<b>xvii</b>
<b>Daftar gambar .....</b>	<b>xviii</b>
<b>BAB I KONSEP DASAR SEL PUNCA .....</b>	<b>1</b>
1. <i>Latar belakang .....</i>	<i>2</i>
2. <i>Konsep regenerasi .....</i>	<i>3</i>
3. <i>Konsep pembaharuan diri sel punca .....</i>	<i>5</i>
4. <i>Konsep diferensiasi sel punca .....</i>	<i>9</i>
5. <i>Konsep proliferasi .....</i>	<i>11</i>
6. <i>Potensi sel .....</i>	<i>13</i>
7. <i>Sel berkarakter seperti sel punca .....</i>	<i>16</i>
8. <i>Konsep niche .....</i>	<i>19</i>
9. <i>Konsep senescence dan quiescence .....</i>	<i>21</i>
10. <i>Terminologi sel punca .....</i>	<i>25</i>
11. <i>Klasifikasi sel punca .....</i>	<i>28</i>
12. <i>Sel punca embrionik .....</i>	<i>29</i>
13. <i>Sel punca dewasa .....</i>	<i>30</i>
<b>BAB II ISOLASI DAN KULTUR SEL PUNCA .....</b>	<b>35</b>
1. <i>Latar belakang .....</i>	<i>36</i>
2. <i>Prinsip dasar kultur sel .....</i>	<i>37</i>
3. <i>Kultur sel primer .....</i>	<i>41</i>
4. <i>Kondisi optimal kultur .....</i>	<i>44</i>

5.	<i>Media kultur</i> .....	47
6.	<i>Serum kultur</i> .....	49
7.	<i>Sistem buffer dan sodium bikarbonat</i> .....	50
8.	<i>Karakteristik pola pertumbuhan sel</i> .....	51
9.	<i>Teknik dasar kultur</i> .....	53
10.	<i>Protokol isolasi MSC asal darah</i> .....	56
11.	<i>Prosedur isolasi-kultur MSC asal tali pusat</i> .....	59
12.	<i>Panen MSC</i> .....	63
13.	<i>Perhitungan MSC (Cell counting)</i> .....	66

**BAB III EPIGENETIK DAN FAKTOR TRANSKRIPSI: STEMNESS-REPROGRAMMING .....70**

1.	<i>Latar belakang</i> .....	71
2.	<i>Stemness sel punca</i> .....	72
3.	<i>Faktor transkripsi</i> .....	76
4.	<i>Epigenetik</i> .....	78
5.	<i>Modifikasi DNA</i> .....	80
6.	<i>Modifikasi histon</i> .....	82
7.	<i>Remodeling kromatin</i> .....	83
8.	<i>Non-coding RNA</i> .....	84
9.	<i>Peran faktor transkripsi dalam epigenetik</i> .....	85
10.	<i>Gen promosi diferensiasi</i> .....	87
11.	<i>Soluble molecule ekstraseluler</i> .....	88
12.	<i>Faktor transkripsi dalam pluripoten</i> .....	92
13.	<i>Reprogramming</i> .....	98
14.	<i>Introduksi faktor transkripsi (iPS)</i> .....	100
15.	<i>Somatic cell nuclear transfer (SCNT)</i> .....	101
16.	<i>Cell fusion</i> .....	102
17.	<i>Transdiferensiasi</i> .....	103
18.	<i>Dediferensiasi</i> .....	105

**BAB IV KONSEP SINYAL TRANSDUKSI RESEPTOR-LIGAN..... 108**

1. Latar belakang .....	109
2. Ligan sinyal.....	110
3. Reseptor .....	116
4. Aktivasi reseptor .....	118
5. Protein-G dan reseptor .....	121
6. Reseptor terkait transmitter- ion channel .....	124
7. Second messenger(cAMP).....	125
8. Sinyal transduksi.....	127
9. Respon sel terhadap sinyal.....	129

**BAB V MODEL KOMUNIKASI SEL PUNCA PARAKRIN..... 133**

1. Latar belakang .....	134
2. Konsep komunikasi seluler .....	135
3. Model komunikasi sel.....	137
4. Parakrin.....	137
5. Autokrin.....	138
6. Endokrin.....	139
7. Model sinap (gap junction).....	140
8. Konsep parakrin sel punca.....	142

**BAB VI JALUR MOLEKULER PROLIFERASI SEL PUNCA ..... 148**

1. Latar belakang .....	149
2. Sirkuit molekuler proliferasi sel punca.....	150
3. Jalur proliferasi sel punca .....	152
4. Jalur sinyal transduksi PI3K/Akt.....	153
5. Reseptor c-MET.....	157
6. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) .....	162
7. Jalur Akt.....	163
8. NF- $\kappa$ B.....	166
9. Aktivasi mTOR.....	168

10. Jalur BMP/SMAD.....	169
11. Jalur LIF/STAT3.....	171
12. Jalur sinyal proliferasi embrionik.....	172
13. Jalur notch.....	173
14. Jalur Wnt.....	173
15. Jalur sonic hedgehog (Hh).....	177
16. Jalur proliferasi RTK: FGF/MAPK.....	179
17. Jalur protein integrin: non ikatan ligan-reseptor.....	187
<b>BAB VII SIKLUS SEL PUNCA .....</b>	<b>190</b>
1. Latar belakang.....	191
2. Siklus sel.....	192
3. Cyclin dependent kinase (Cdk).....	194
4. Siklin.....	195
5. Fase G <sub>1</sub> .....	196
6. pRB siklus sel.....	199
7. Fase S.....	201
8. Fase G <sub>2</sub> : Cdk-1 cyclin B.....	204
9. Fase mitosis.....	204
10. Sitokinesis.....	207
11. Akurasi kontrol sinyal proliferasi.....	207
12. Kontrol sinyal intrinsik: Checkpoint.....	208
13. Kontrol sinyal ekstrinsik proliferasi.....	210
<b>BAB VIII KONSEP DAN TERMINOLOGI MESENCHYMAL STEM CELL .....</b>	<b>215</b>
1. Latar belakang.....	216
2. Milestone MSC.....	218
3. Terminologi MSC.....	220
4. Marker Molekuler MSC.....	222
5. Tinjauan difinisi MSC kedepan.....	223

6.	<i>Evolusi MSC: konsep soluble molecule</i> .....	224
7.	<i>Molekuler MSC dalam diferensiasi</i> .....	225
8.	<i>Konsep evolusi MSC: small molecule GF</i> .....	226
9.	<i>Konsep MSC terkini</i> .....	228
10.	<i>Sumber sel punca</i> .....	232
11.	<i>MSC dalam regenerasi dan restorasi</i> .....	233
12.	<i>Imunoregulasi MSC</i> .....	234
13.	<i>Konsep homing MSC</i> .....	238
14.	<i>Fusi MSC dalam reparasi dan regenerasi</i> .....	239
<b>BAB IX HEMATOPOIETIC STEM CELL.....</b>		<b>242</b>
1.	<i>Latar belakang</i> .....	243
2.	<i>Hematopoietic stem cell</i> .....	244
3.	<i>Kompleksitas marker HSC</i> .....	245
4.	<i>Fisiologis dinamis hematopoiesis</i> .....	247
5.	<i>Perkembangan maturasi HSC</i> .....	249
6.	<i>Ontogeni HSC</i> .....	251
7.	<i>Karakterisasi HSC berdasarkan uji CFU</i> .....	253
8.	<i>HSC dalam aplikasi klinis</i> .....	254
9.	<i>Sirkuit molekuler diferensiasi HSC</i> .....	254
<b>BAB X MOLEKUL DANGER-TLR: SEL RADANG DAN MSC .....</b>		<b>257</b>
1.	<i>Latar belakang</i> .....	258
2.	<i>Molekul danger</i> .....	259
3.	<i>Peran molekul danger</i> .....	261
4.	<i>Reseptor TLR</i> .....	263
5.	<i>Sel dendritik</i> .....	267
6.	<i>Sel limfosit</i> .....	269
7.	<i>MSC menghindari sistem imun</i> .....	274
8.	<i>MSC supresi sel dendritik</i> .....	275
9.	<i>MSC menginduksi polarisasi sel monosit</i> .....	276

10. MSC supresi limfosit .....	277
11. MSC supresi sel leukosit .....	279
12. MSC supresi sel NK.....	280
<b>BAB XI IMUNOREGULASI MSC: POLARISASI MSC DALAM INFLAMASI.....</b>	<b>284</b>
1. Latar belakang .....	285
2. Polarisasi MSC .....	286
3. MSC tipe-2: immunosupresif.....	288
4. Mekanisme polarisasi MSC tipe-2 .....	290
5. Respon initial MSC: polarisasi MSC tipe-1 .....	291
6. Respon lanjut MSC: polarisasi MSC tipe-2 .....	296
7. MSC tipe-1: Pro-inflamatori .....	298
8. MSC supresi proses inflamasi.....	300
9. MSC supresi inflamasi pada animal model.....	301
10. Sirkuit jalur inflamasi JAK-STAT.....	303
11. JAK-STAT dengan PI3K/AKT/mTOR .....	304
12. JAK-STAT dengan MAPK/ERK.....	305
<b>BAB XII KONSEP HOMING.....</b>	<b>308</b>
1. Latar belakang .....	309
2. Konsep homing .....	310
3. Mekanisme molekuler homing MSC.....	312
4. Molekul-reseptor neutrofil dalam homing.....	313
5. Mekanisme molekuler homing leukosit .....	315
6. Molekul dan reseptor MSC dalam homing.....	316
7. Perbedaan homing MSC dan leukosit.....	318
8. Transmigrasi MSC/ neutrofil.....	319
<b>BAB XIII PERAN MSC DALAM REGENERASI JARINGAN CIDERA</b>	<b>324</b>
1. Latar belakang .....	325
2. Konsep molekuler dalam cedera.....	327

3. <i>Molekuler hemostasis</i> .....	328
4. <i>Homing MSC menuju area cedera</i> .....	332
5. <i>Molekuler inflamasi</i> .....	334
6. <i>Tahapan peningkatan permeabilitas kapiler</i> .....	335
7. <i>Molekuler sel neutrofil</i> .....	337
8. <i>Gerakan motilitas neutrofil</i> .....	342
9. <i>Aktivitas sel neutrofil</i> .....	343
10. <i>Molekuler sel monosit</i> .....	345
11. <i>Molekuler sel makrofag</i> .....	347
12. <i>Molekuler sel limfosit</i> .....	351
13. <i>MSC dan inflamasi</i> .....	354
14. <i>Tahapan proliferasi</i> .....	355
15. <i>Soluble molecule MSC</i> .....	356
16. <i>MSC dan angiogenesis</i> .....	359
17. <i>MSC dan Fibroblas</i> .....	361
18. <i>MSC dan re-epitelisasi</i> .....	364
<b>Indeks</b> .....	<b>367</b>
<b>GLOSARIUM</b> .....	<b>377</b>

## **Daftar istilah**

1-TMS	: Single-transmembrane segment
ADP	: Adenosine diphosphate
AKT/PKB	: Protein kinase B
ATP	: Adenosine Triphosphate
BFU-E	: burst-forming unit-erythroid
BMP	: Bone morphogenetic protein
BMPR	: Bone morphogenetic protein-Reseptor
BMPR	: Reseptor-BMP
cAMP	: Cyclic adenosine monophosphate
CD	: Cluster of differentiation
Cdk	: Cyclin dependent kinase
Cdx2	: Protein dalam tubuh manusia yang dikode oleh gen Cdx2
CFC	: Colony-forming cell
CFU	: Coloni forming unit
CFU-E	: Colony-forming unit-erythroid
CFU-G	: Colony-forming unit-granulocyte
CFU-GEMM	: Colony-forming unit-granulocyte/ erythrocyte/ macrophage/ megakaryocyte
CFU-GM	: Colony-forming unit-granulocyte/Macrophage
CFU-M	: Colony-forming unit-macrophage
CFU-Mk	: Colony-forming unit-megakaryocyte
CLP	: Common limfoid progenitor
CLP	: Common lymphoid progenitor
CMP	: Common myeloid progenitor
CMP	: Common myeloid progenitor
CXCR3	: Chemokine Reseptor-3
DAMP	: Damage-associated molecular pattern
DNA	: Deoxyribonucleic acid
EGF	: Ephidermal growth factor
ERK	: Extracelluler signal- regulated kinase
FGF	: Fibroblast growth factors
FGFR	: Reseptor-FGF
Gata6	: Protein dalam tubuh manusia yang dikode oleh gen

	GATA6
GDP	: Guanosin difosfat
GF	: Growth factor
GNRP	: Guanyl nucleotide release protein
GPCR	: G-protein couple receptor
GRB2	: Growth reseptor binding-2
GSK-3	: Glycogen syntase kinase 3
GTP	: Guanosin trifosfat
HDAC	: Histon deacetylase
HGF	: Hepatocyte growth factor
HGFR	: Hepatocyte growth factor reseptor
Hh	: Hedgehog
HMGB1	: High-mobility group box 1
HSC	: Hematopoietic stem cell
Hsp	: Heat shock protein
IDO	: Indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN $\gamma$	: Interferon gamma
IGFR	: Reseptor-IGF
IKK	: I $\kappa$ B kinase
IL	: Interleukin
iNOS	: Inducible nitric oxide synthase
IRAK-4	: IL-1 reseptorassociated kinase-4
ISCT	: International society for cellular therapy
JNK	: c-jun N-terminal kinase
Klf4	: Faktor transkripsi sel
Klf4	: Gut-enriched Krüppel-like factor or GKLf
LIF	: Leukemia inhibitory factor
LIFR	: Leukemia inhibitory factor-Reseptor
LIFR	: Reseptor-LIF
LT-HSC	: Long term-hemapoietic stem cell
MAPK	: Mitogen-activated protein kinase
MEP	: Megakariosit eritroid progenitor
MK	: Megakariosit
MPP	: Multipoten progenitor
MPP	: Multipotential progenitor
MSC	: Mesenchymal stem cells
Myc	: Myelocytomatosis

NF-kB	: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NSC	: Neural stem cell
Oct3/4	: Octamer-binding transcription factor 3/4
PAMP	: Pathogenic-associated molecular pattern
PDK-1	: Phosphoinositide dependent kinase-1
PGE2	: Prostaglandin E2
PI3K	: Phosphatidylinositol-3 phosphatase kinase
PIP2	: Phosphatidylinositol-(3,4) biphosphatase
PIP3	: Phosphatidylinositol-(3,4,5) triphosphatase
pRB	: Retinoblastoma protein
RNA	: Ribonucleic acid
RSMAD	: Reseptor-SMAD
RTK	: Reseptor tirosin kinase
SARA	: SMAD anchor for reseptor activation
SH2	: Src homology-2
SMAD	: Small mother against decapentaplegic
SOS	: Son of sevenless
Sox2/SRY	: Sex determining region Y
SPK	: Sel punca kanker
STAT3	: Signal transducer and activator of transcription
ST-HSC	: short-term hematopoietic stem cell
TGF	: Transforming growth factor
TIR	: Toll- interleukin-1 reseptor
TLR3	: Toll-like Reseptor 3
TNF $\alpha$	: Tumor necrosis factor – $\alpha$
VEGF	: Vascular endothelial growth factor

**Daftar tabel**

Tabel 1.	Marker MSC, HSC dan NSC	32
Tabel 2.	Well, flask dan disk	46
Tabel 3.	Modifikasi histon dan dampaknya dalam gen	85
Tabel 4.	<i>Second messenger</i> intrasel	127

## Daftar gambar

Gambar 1.	Konsep regenerasi	4
Gambar 2.	Konsep reparasi	5
Gambar 3.	Pembaharuan diri dan diferensiasi	6
Gambar 4.	Konsep gen pembaharuan diri	7
Gambar 5.	Arah pembelahan sel punca	9
Gambar 6.	Molekuler diferensiasi sel punca	11
Gambar 7.	Konsep proliferasi	13
Gambar 8.	Klasifikasi sel berdasarkan potensi	14
Gambar 9.	iPS cells	17
Gambar 10.	Sel punca kanker	18
Gambar 11.	Dampak perubahan niche terhadap sel punca	21
Gambar 12.	<i>Senescence</i> dan <i>quiescence</i>	24
Gambar 13.	Terminologi sel punca	25
Gambar 14.	Terminologi klasik sel punca	26
Gambar 15.	Terminologi molekuler-fungsional Sel punca	28
Gambar 16.	Sel punca embrionik	30
Gambar 17.	Klasifikasi sel punca dewasa	31
Gambar 18.	Subkultur	38
Gambar 19.	<i>Feeder layer</i>	39
Gambar 20.	Teori hayflick terkait <i>senescence</i>	40
Gambar 21.	Morfologi <i>senescence</i>	41
Gambar 22.	Kultur sel primer	42
Gambar 23.	Teknik kultur eksplan jaringan primer	43
Gambar 24.	Kondisi optimal kultur	47
Gambar 25.	Fase lag, log dan stasional dalam pertumbuhan	51
Gambar 26.	<i>Stemness</i> sel punca	73
Gambar 27.	Regulasi <i>stemness</i>	75
Gambar 28.	Peran faktor transkripsi <i>stemness</i>	77
Gambar 29.	Epigenetik	79
Gambar 30.	Konsep molekuler epigenetik	80
Gambar 31.	Modifikasi DNA	81

Gambar 32.	Modifikasi histon	82
Gambar 33.	Peran faktor transkripsi dalam dimetilisasi	86
Gambar 34.	Gata6	88
Gambar 35.	BMP	89
Gambar 36.	LIF	90
Gambar 37.	Jalur FGF	92
Gambar 38.	Konsep pluripoten	93
Gambar 39.	Pluripotensi sel punca embrionik	97
Gambar 40.	iPS	101
Gambar 41.	SCNT	102
Gambar 42.	Fusi sel	103
Gambar 43.	Transdiferensiasi	104
Gambar 44.	Dediferensiasi	105
Gambar 45.	Membran bilayer	112
Gambar 46.	Molekul ligan hidrofilik	113
Gambar 47.	Molekul ligan difusi	115
Gambar 48.	Reseptor pengikat ligan	117
Gambar 49.	Aktifasi reseptor	119
Gambar 50.	Aktifasi protein-G	122
Gambar 51.	Inaktifasi protein-G	123
Gambar 52.	Reseptor terikat transmitter-ion channel	124
Gambar 53.	cAMP	126
Gambar 54.	Tiga jalur sinyal transduksi seluler	129
Gambar 55.	Respon transkripsi	131
Gambar 56.	Sinyal parakrin	138
Gambar 57.	Sinyal autokrin	139
Gambar 58.	Sinyal endokrin	140
Gambar 59.	<i>Gap junction</i>	141
Gambar 60.	Molekul parakrin MSC	144
Gambar 61.	Faktor co/transkripsi pluripotensi	152
Gambar 62.	Proliferasi sel punca	153
Gambar 63.	PI3K dan fosforilasi	154
Gambar 64.	<i>Independent</i> RTK dan modulator	156
Gambar 65.	Interaksi MET dengan jalur beta-catenin	160
Gambar 66.	Interaksi MET dengan jalur RAS dan STAT	160

Gambar 67.	Interaksi MET dengan jalur sinyal notch	161
Gambar 68.	Mekanisme kerja IGF-1	163
Gambar 69.	Mekanisme kerja akt terhadap NF-kB, mTOR dan GSK3	165
Gambar 70.	Aktifasi NF-Kb	167
Gambar 71.	Aktifasi mTOR	169
Gambar 72.	Mekanisme jalur BMP/SMAD	171
Gambar 73.	Mekanisme jalur LIF/STAT3	172
Gambar 74.	Wnt dan reseptor	174
Gambar 75.	Aktifasi jalur Wnt	177
Gambar 76.	Terikatnya GF pada reseptor RTK	180
Gambar 77.	Dimerisasi RTK	181
Gambar 78.	Pengikatan SH-2 pada fosfotirosin	181
Gambar 79.	Ikatan SOS-Gbr2-SH3	182
Gambar 80.	Aktifasi protein Ras	183
Gambar 81.	Aktifasi MAPK	184
Gambar 82.	Aktifasi faktor transkripsi jun-fos	185
Gambar 83.	Fosforilasi pRB	185
Gambar 84.	Sinyal transduksi dan siklus sel	186
Gambar 85.	Siklus sel	193
Gambar 86.	Molekuler siklus sel	194
Gambar 87.	Sintesis siklin D (fase G1)	196
Gambar 88.	Fase G <sub>1</sub>	198
Gambar 89.	pRB	199
Gambar 90.	Fosforilasi pRB/E2F-DP	200
Gambar 91.	Peranan Cdk2-siklin E pada fase S	202
Gambar 92.	<i>Checkpoint</i>	203
Gambar 93.	Fase mitosis dan sitokinesis	206
Gambar 94.	Keterlibatan molekul ATM dan p53-p21	210
Gambar 95.	Kontrol eksternal <i>signalling</i>	212
Gambar 96.	Milestone MSC	219
Gambar 97.	MSC	220
Gambar 98.	Diferensiasi dan pembaharuan diri MSC	221
Gambar 99.	Visualisasi marker	221
Gambar 100.	Molekuler MSC dalam berdiferensiasi	225
Gambar 101.	<i>Small molecule</i> GF MSC	226
Gambar 102.	Konsep MSC <i>induced/soluble molecule</i>	228

Gambar 103.	Terminologi MSC	229
Gambar 104.	Terminologi klasik MSC	230
Gambar 105.	Terminologi fungsional MSC	232
Gambar 106.	Imunoregulasi MSC	234
Gambar 107.	Marker HSC	246
Gambar 108.	Marker kompleksitas molekuler HSC	247
Gambar 109.	HSC sumsum tulang	249
Gambar 110.	Hirarki HSC	250
Gambar 111.	Pembentukan molekuler HSC	252
Gambar 112.	Turunan HSC	255
Gambar 113.	<i>Danger molecule</i>	261
Gambar 114.	Respon <i>danger molecule</i>	263
Gambar 115.	<i>Danger molecule</i> dan reseptor TLR	265
Gambar 116.	Polarisasi fenotip	267
Gambar 117.	Maturasi sel limfosit	271
Gambar 118.	Seleksi klonal dan maturasi limfosit	273
Gambar 119.	Efek pleotropik MSC dalam supresi Sel inflamasi	275
Gambar 120.	Polarisasi MSC	286
Gambar 121.	TLR-3 dan TLR-4	288
Gambar 122.	<i>Soluble molecule</i> MSC Tipe-2	289
Gambar 123.	Reseptor MSC tipe 2	290
Gambar 124.	Aktivasi jalur NF-kB	291
Gambar 125.	Aktivasi jalur NF-kB via TNF- $\alpha$ /TNFR	293
Gambar 126.	Respon initial MSC: MyD88	294
Gambar 127.	Pengikatan IRAK dan TRAF-6	295
Gambar 128.	Respon initial MSC: IRAK/TRAF-6/TAK-1/TAB-1/2	296
Gambar 129.	Respon lanjut MSC: COX2 induksi PGE <sub>2</sub>	297
Gambar 130.	Polarisasi MSC	298
Gambar 131.	<i>Soluble molecule</i> MSC Tipe-1	299
Gambar 132.	Konsep <i>homing</i>	311
Gambar 133.	Mekanisme molekuler <i>homing</i> MSC	312
Gambar 134.	molekuler kemoatraktan dalam migrasi neutrofil	316
Gambar 135.	Pola pergerakan transmigrasi	321
Gambar 136.	Tahapan respon penyembuhan cedera	327

Gambar 137.	Molekuler hemostasis primer	329
Gambar 138.	Proses molekuler hemostasis sekunder	331
Gambar 139.	Mekanisme molekuler <i>homing</i> MSC	333
Gambar 140.	Tahapan inflamasi	335
Gambar 141.	Molekuler permeabilitas kapiler	337
Gambar 142.	Sistematika faktor migrasi sel neutrofil	339
Gambar 143.	Peranan molekuler adhesi sel neutrofil	341
Gambar 144.	Motilitas neutrofil	342
Gambar 145.	Aktivitas neutrofil aktif	344
Gambar 146.	Sistematika faktor migrasi sel monosit	345
Gambar 147.	Kompleksitas molekul makrofag	351
Gambar 148.	Imunoregulasi MSC	354
Gambar 149.	Peran MSC dalam mengontrol inflamasi	355

# **BAB I**

## **KONSEP DASAR SEL PUNCA**

### **Tujuan**

---

Setelah membaca Bagian Pertama ini, diharapkan pembaca mengerti tentang konsep dasar sel punca terkait dengan regenerasi dan reparasi, pembaharuan diri, diferensiasi dan proliferasi, potensi sel, sel dengan karakter seperti sel punca, konsep *niche*, *senescence* dan *quiescence*, terminologi, klasifikasi dari sel punca, sel punca embrionik dan sel sel punca dewasa.

*Sel punca adalah sel regenerasi. Regenerasi berbeda dengan reparasi. Regenerasi merestorasi struktur dan fungsi secara utuh, sedangkan reparasi hanya partial. Secara hierarki potensi sel regenerasi berupa totipoten, pluripoten, multipoten, progenitor hingga sel matur. Sel punca dibagi menjadi 2, yaitu sel punca embrionik dan sel punca dewasa. Terminologi sel punca dibagi menjadi 3, yaitu klasik berdasarkan biologi (sel punca dengan aktivitas perbaharui diri dan diferensiasi), molekuler (marker CD) dan fungsional berdasarkan sekresi molekul parakrin. Secara spesifik pembaharuan diri menghasilkan turunan identik (pembelahan simetris atau asimetris), sedangkan diferensiasi menghasilkan turunan sel spesifik. Niche berperan penting dalam aktivasi sel punca (sel punca quiescence). Sel punca mampu merespon perubahan niche secara benar sehingga menjadi konsep dasar dalam homeostasis.*

*Catatan penulis*

## **1. Latar belakang**

Setiap sel memiliki rentang waktu kehidupan tertentu, yang akan berakhir dengan kematian dan digantikan dengan sel baru. Peristiwa ini dikenal sebagai regenerasi. Kemampuan regenerasi setiap sel berbeda tergantung jenis dan tipe sel itu sendiri. Sel dengan potensi regenerasi terkuat adalah sel punca, sebaliknya sel dengan potensi hilang adalah sel matur. Potensi regenerasi sel akan berkurang dan menghilang seiring dengan maturitas. Lingkungan mikroseluler (*niche*) ikut mempengaruhi potensi regenerasi sel punca. Mengubah *niche* sel punca dapat memicu pembelahan sel ke arah tertentu dan hal ini menjadi dasar dalam memahami proses epigenetik.

Sel punca memiliki 2 karakteristik unik yaitu mampu melakukan pembaharuan diri dan berdiferensiasi. Konsep pembaharuan diri bertujuan untuk menghasilkan turunan yang identik dengan induk, baik melalui pembelahan simetris maupun asimetris. Konsep diferensiasi bertujuan untuk menghasilkan berbagai turunan

sel yang spesifik. Berdasarkan sumber asal sel punca dibagi menjadi 2 yaitu sel punca embrionik dan sel punca dewasa. Sisi lain terdapat jenis sel dengan karakter seperti sel punca, yaitu sel punca kanker (SPK) dan *induce pluripotens stem cell* (iPS) hasil rekayasa sel matur.

Mengingat peranan sel punca yang begitu penting dalam meregenerasi jaringan, maka perlu dilakukan pemahaman mendasar terkait sel punca, terutama terkait dengan regenerasi, mulai terminologi, klasifikasi, pembaharuan diri dan diferensiasi, *niche*, *quiescence* dan *senescence* sehingga dapat membantu dalam mempelajari sel punca pada bab selanjutnya.

## **2. Konsep regenerasi**

Kemampuan regenerasi setiap sel umumnya berbeda, tergantung jenis dan tipe sel dan potensi regenerasi tersebut akan menurun dan menghilang seiring dengan maturitas. Potensi regenerasi yang hilang akan berakhir dengan kematian secara apoptosis dan digantikan sel baru. Sekalipun demikian regenerasi berbeda dengan reparasi. Regenerasi merestorasi kembali struktur dan fungsi jaringan secara utuh, sedangkan reparasi hanya sebagian. Regenerasi sempurna akan menghasilkan jaringan normal, namun ketika terjadi inflamasi berkepanjangan, maka regenerasi tidak berjalan semestinya sehingga dapat memicu terjadinya fibrosis.

### **2.1 Pengertian regenerasi**

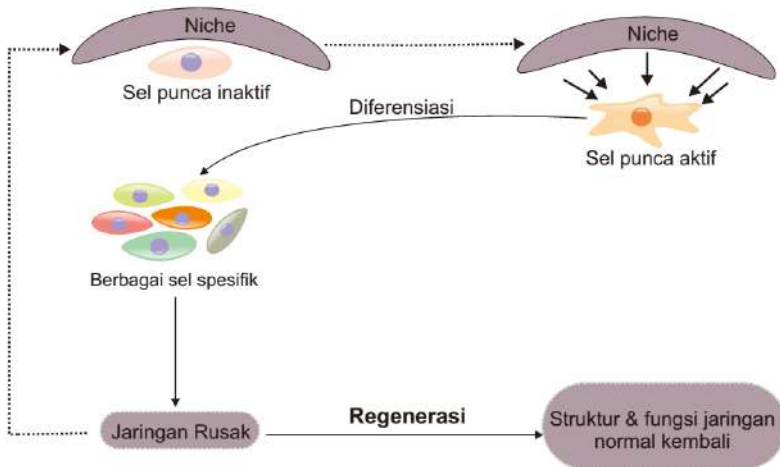
Regenerasi jaringan adalah proses restorasi struktur dan fungsi suatu jaringan/organ rusak untuk kembali normal secara utuh. Regenerasi menghasilkan pembentukan jaringan baru melalui aktivitas sel tertentu, terutama sel dengan kemampuan proliferasi dan diferensiasi tinggi. Sel dengan karakter demikian adalah sel punca.

### **2.2 Regenerasi dan sel punca dalam fibrosis**

Regenerasi yang sempurna tanpa fibrosis memerlukan kehadiran sel punca, disebabkan karena fibrosis dipicu oleh proses

inflamasi yang berkepanjangan. Sel punca mampu mengontrol inflamasi, sehingga mempercepat akses sel punca untuk masuk dalam fase proliferasi. Keadaan ini akan mendorong sel sekitar untuk terlibat aktif dalam proliferasi, termasuk sel punca. Secara spesifik sel punca akan berdiferensiasi menjadi berbagai sel matur untuk menggantikan sel sekitar yang rusak. Regenerasi membutuhkan kehadiran sel punca dengan potensi diferensiasi tinggi karena memungkinkan pergantian komponen jaringan/organ rusak menjadi normal kembali. Regenerasi akan selalu terjadi, karena sel punca/ sel progenitor berada pada hampir seluruh jaringan. Pembahasan lebih lanjut peran sel punca dalam regenerasi kami sajikan dalam bab selanjutnya.

Secara skematis konsep regenerasi sel punca dijelaskan pada gambar 1 dibawah ini.



Gambar 1. Konsep regenerasi

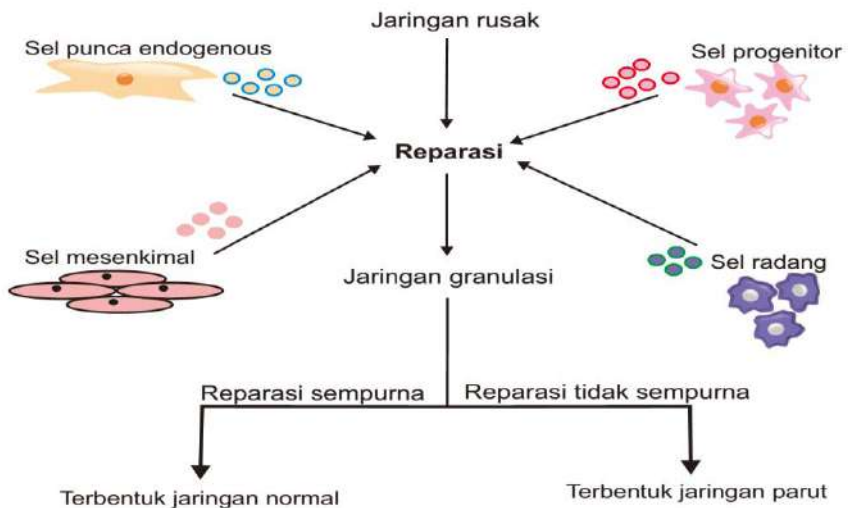
Regenerasi dimulai dengan pelepasan molekul sinyal cedera yang kemudian mengubah *niche* sel punca, sehingga mendorong sel punca berdiferensiasi menjadi sel spesifik penyusunan komponen jaringan.

### 2.3 Pengertian reparasi

Reparasi jaringan adalah proses perbaikan sebagian struktur dan fungsi jaringan rusak secara dinamis. Reparasi menghasilkan

jaringan normal kembali ketika regenerasi jaringan berjalan dengan sempurna, namun ketika sebagian besar jaringan rusak/ hilang atau terjadi inflamasi berkepanjangan, maka memungkinkan pembentukan fibrosis. Reparasi membutuhkan kesesuaian antara molekul sinyal dan tipe sel yang terlibat terutama sel punca endogenous/ progenitor dan sel radang, di samping matriks ekstraseluler. Pembahasan sel punca dalam reparasi dipelajari secara detail pada bab selanjutnya.

Konsep reparasi jaringan yang melibatkan interaksi berbagai dijelaskan pada gambar 2 dibawah ini.



Gambar 2. Konsep reparasi

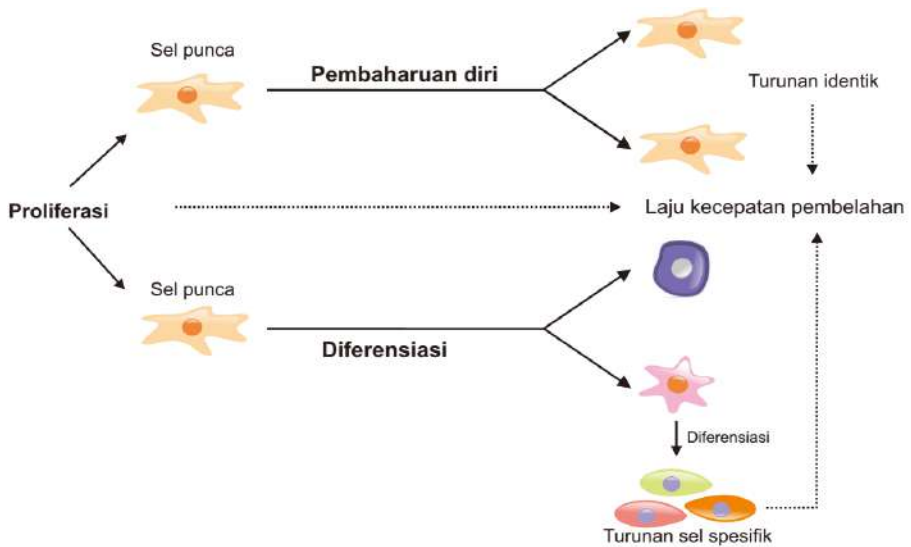
Reparasi melibatkan interaksi sel punca endogenous, progenitor, sel mesenkimal dan sel radang untuk menghasilkan pembentukan jaringan granulasi. Inflamasi yang berkepanjangan dan atau terjadi nekrosis masif, maka reparasi tidak berjalan sempurna dan potensi memicu pembentukan jaringan parut.

### **3. Konsep pembaharuan diri sel punca**

Berbagai hasil penelitian sebelumnya mengungkapkan bahwa pembelahan sel punca didasarkan atas kemampuan dalam

memperbaharui diri dan berdiferensiasi. Secara spesifik pembaharuan diri bertujuan untuk menghasilkan turunan yang identik dengan induk, yang secara bersamaan mempertahankan status tidak berdiferensiasi. Pembelahan sel menggambarkan laju kecepatan pembelahan sel, sehingga dikenal sebagai aktivitas proliferasi.

Konsep pembaharuan diri sel punca dijelaskan pada gambar 3 dibawah ini.



Gambar 3. Pembaharuan diri dan diferensiasi

Proliferasi menunjukkan laju aktivitas pembelahan sel baik melalui aktivitas pembaharuan diri dan atau diferensiasi. Pembaharuan diri menghasilkan turunan identik dengan induk, sedangkan diferensiasi menghasilkan turunan sel spesifik.

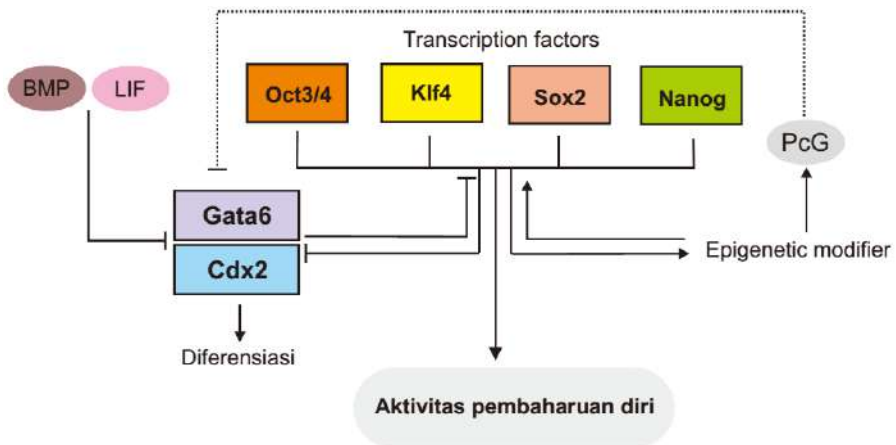
### **3.1. Pengertian pembaharuan diri**

Pembaharuan diri adalah kemampuan sel punca dalam menghasilkan turunan identik dengan sel induk baik melalui pembelahan simetris (dua turunan identik) maupun pembelahan asimetris (satu turunan identik). Hal ini menunjukkan bahwa setiap terjadi pembelahan sel punca secara bersamaan juga akan terjadi aktivitas mempertahankan status non-diferensiasi. Pembelahan sel

punca asimetris dan atau simetris adalah tergantung pada *niche* sekitar sel punca. Sekalipun demikian sel punca dewasa umumnya dalam status *quiescence* (inaktif) pada sebagian besar jaringan.

### 3.2. Molekuler pembaharuan diri

Secara spesifik terdapat sekelompok protein yang berperan penting dalam meregulasi aktivitas pembaharuan diri sel punca. Protein tersebut berupa faktor transkripsi pluripoten Oct4, Sox2, Klf4 dan Nanog yang saling terintegrasi membentuk sirkuit regulator untuk mempertahankan aktifitas pembaharuan diri suatu sel punca. Sekalipun demikian aktifitas pembaharuan diri di inhibisi oleh faktor diferensiasibaik berupa gen Gata6 dan Cdx2 maupun *soluble molecule* BMP dan LIF, disamping faktor epigenetik seperti dijelaskan dalam gambar 4 dibawah ini.



Gambar 4. Konsep gen pembaharuan diri

Pembaharuan diri terjadi ketika protein faktor transkripsi Oct4, Sox2, Klf4 dan Nanog menginduksi gen pembaharuan diri dan saat yang sama menginhibisi gen promosi diferensiasi (Gata6 dan Cdx2). Pembaharuan diri juga dipengaruhi epigenetik melalui *polycomb-group* (PcG) dan *soluble moleculebone morphogenetic proteins* (BMP) dan *leukimia inhibitory factor* (LIF) sebagai molekul inhibitor.

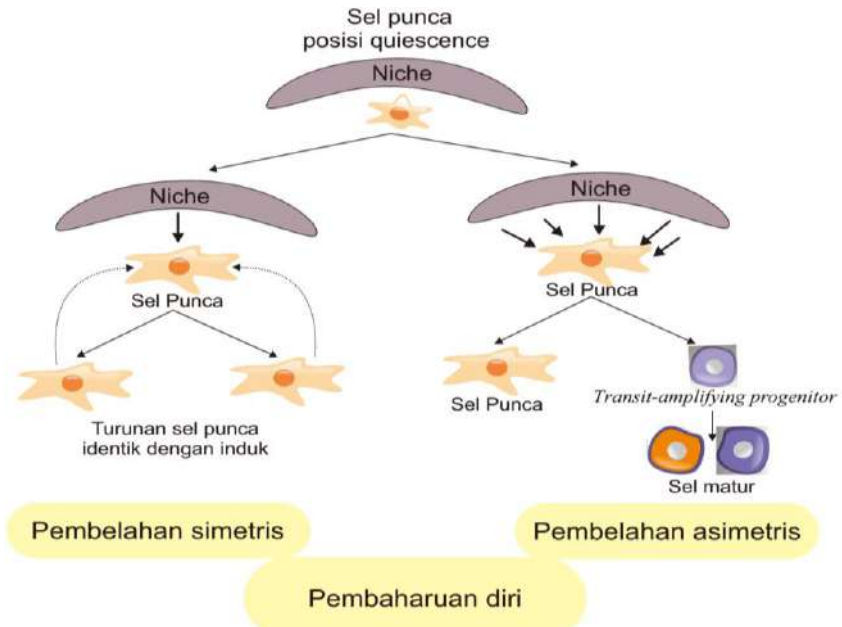
### **3.3. Konsekuensi pembaharuan diri**

Pembaharuan diri merupakan hal unik sel punca yang tidak dimiliki sel lain. Kemampuan pembaharuan diri ini memungkinkan sel punca diperbanyak secara *in-vitro* dalam laboratorium untuk kepentingan berbagai riset. Konsep pembaharuan diri berimplikasi bahwasel punca *endogenous* dalam jaringan tubuh akan selalu berada dalam jumlah yang stabil sekalipun sebagian besar sel punca mengalami diferensiasi ketika terjadi cedera jaringan. Hal ini dimungkinkan karena setiap kali sel punca membelah asimetris (saat terjadi cedera jaringan), maka saat bersamaan sel punca juga akan mempertahankan status non-diferensiasi melalui pembaharuan diri. Aktivitas pembaharuan dan diferensiasi menunjukkan kemampuan proliferasi sel punca yang lebih tinggi dibanding sel lain. Kemampuan pembaharuan diri sel punca terlihat jelas dalam embriogenesis.

### **3.4. Arah nasib pembelahan sel punca**

Sel punca dewasa dalam keadaan normal berada pada status *quiesence* (inaktif) di banyak jaringan jaringan. Sekalipun demikian status *quiesence* ini bersifat sementara, sehingga memungkinkan bagi sel punca untuk kembali memasuki siklus sel ketika distimulasi oleh molekul tertentu yang dilepas *niche*. Perubahan *niche* sekitar sel punca yang drastis terutama ketika terjadi inflamasi dapat menyebabkan perubahan pada sel punca dari status inaktif menjadi aktif memasuki siklus sel kembali. Hal ini menunjukkan *niche* ikut mempengaruhi arah nasib suatu sel punca. Secara spesifik sel punca dewasa didorong keluar *pool* untuk membelah secara asimetris agar menghasilkan satu turunan sel progenitor, dikenal sebagai *transit-amplifying progenitor* (turunan sel punca pertama), sementara turunan yang lain terus melakukan aktivitas pembaharuan diri. Hal ini menunjukkan bahwa keberadaan sel punca akan tetap stabil, sekalipun sebagian besar sel punca berdiferensiasi menjadi sel progenitor yang terus menghasilkan turunan sel yang lebih spesifik.

Lebih lanjut aktivitas pembaharuan diri dijelaskan dalam gambar 5 dibawah ini.



Gambar 5. Arah pembelahan sel punca

Sel punca yang dalam posisi *quiescence* (inaktif) akan menjadi aktif membelah ketika *niche* sekitar berubah. Pembelahan simetris maupun asimetris akan menghasilkan satu/dua turunan sel identik dengan induk, dikenal sebagai pembaharuan diri. Sisi lain pembelahan asimetris dapat menyebabkan sel punca berdiferensiasi menjadi *transit-amplifying progenitor*, yaitu sel progenitor yang komitmen berdiferensiasi menjadi sel yang lebih spesifik (matur).

#### 4. Konsep diferensiasi sel punca

Sel punca yang berdiferensiasi akan menghasilkan berbagai turunan sel yang lebih spesifik yang dibutuhkan dalam pembentukan berbagai komponen jaringan dan organ. Potensi diferensiasi sel punca embrionik terlihat dalam aktifitas pembentukan 3 lapisan germinal

(ektoderm, mesoderm dan endoderm), sedangkan potensi diferensiasi sel punca dewasa terlihat saat sel punca multipoten berubah menjadi berbagai sel spesifik pada peristiwa penyembuhan jaringan luka.

#### **4.1 Pengertian diferensiasi**

Diferensiasi adalah suatu potensi yang dimiliki sel punca untuk berubah menjadi bentuk sel lain yang lebih spesifik dan fungsional. Sel turunan yang dihasilkan akan mulai kehilangan potensi dalam memperbaharui diri maupun diferensiasi secara perlahan. Sekalipun demikian perubahan ini tidak terjadi pada tingkat sekuen DNA, namun hanya pada tingkat epigenetik. Hal ini mengesankan bahwa sel punca yang berdiferensiasi tidak melakukan pembelahan sel sesungguhnya (tahapan siklus sel).

#### **4.2 Molekuler diferensiasi**

Proses diferensiasi tidak melibatkan perubahan sekuen DNA, namun dipengaruhi oleh proses epigenetik paska stimulasi berbagai *soluble molecule* tertentu. Sekalipun demikian gen tertentu juga ikut terlibat dalam berjalannya proses diferensiasi. Secara spesifik faktor yang berperan dalam proses diferensiasi sel puncadibagi menjadi :

1. Aktivasi gen *Gata6* dan *Cdx2*

Gen *Gata6* dan *Cdx2* merupakan gen yang berperan penting dalam promosi diferensiasi sel punca. Gen ini berkerja dengan dengan cara mensupresi molekul pembaharuan diri yaitu protein faktor transkripsi pluripoten *Oct3/4*, *Klf4*, *Sox2* dan *Nanog*.

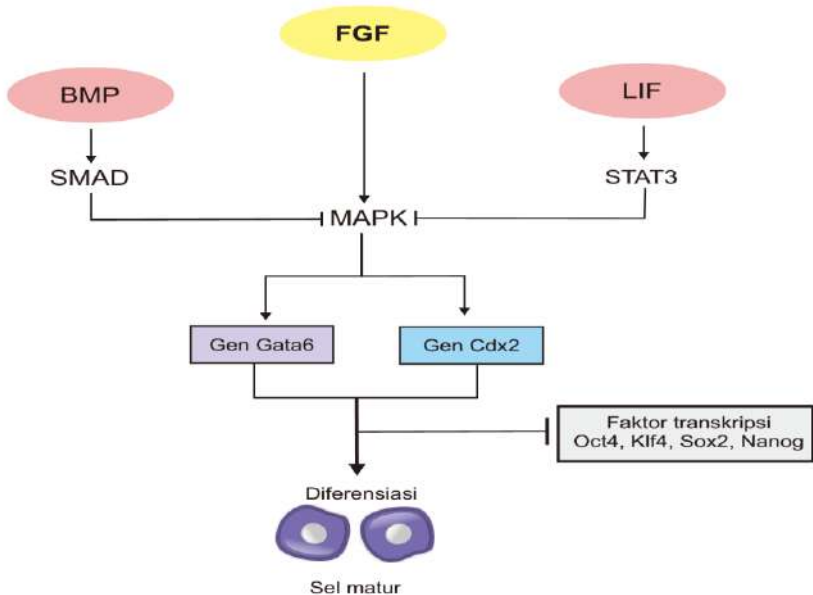
2. Stimulasi molekul *fibroblast growth factor* (FGF)

Sel punca secara autokrin melepas FGF yang dapat memicu jalur diferensiasi *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) teraktivasi sehingga gen *Gata6* dan *Cdx2* aktif.

3. Inaktifasi LIF dan BMP

Protein LIF menghambat jalur diferensiasi MAPK melalui aktifasi *signal transducer and activator of transcription* (STAT3), sedangkan BMP menghambat melalui aktifasi *small mother against decapentaplegic* (SMAD).

Molekuler diferensiasi sel punca dijelaskan dalam gambar 6 dibawah ini.



Gambar 6. Molekuler diferensiasi sel punca FGF mengaktivasi MAPK (jalur tirosin kinase) sehingga memicu gen Gata6 dan Cdx2 aktif. Gen ini berperan dalam promosi diferensiasi, dengan menghambat faktor transkripsi Oct4, Klf4, Sox2 dan Nanog sehingga diferensiasi diperkuat. Sisi lain BMP dan LIF menghambat diferensiasi melalui inhibisi MAPK (BMP-SMAD dan LIF-STAT3).

## 5. Konsep proliferasi

Proliferasi merupakan istilah umum yang mengacu pada laju kecepatan pembelahan suatu sel. Proliferasi menggambarkan aktivitas pembelahan sel yang aktif. Sekalipun demikian proliferasi berbeda dengan aktivitas pembaharuan diri sel punca.

### 5.1 Pengertian proliferasi

Proliferasi adalah laju aktivitas pembelahan suatu sel jenis apapun secara terus menerus sehingga menghasilkan nilai rerata terhadap kecepatan pembelahan. Proliferasi suatu sel dapat diukur

baik dengan menggunakan perhitungan hemositometer atau alat otomatis *cell counting*. Laju proliferasi sel yang berlebihan berkaitan dengan gangguan jalur sinyal tiroksin kinase, yang sering ditemukan pada berbagai sel malignan.

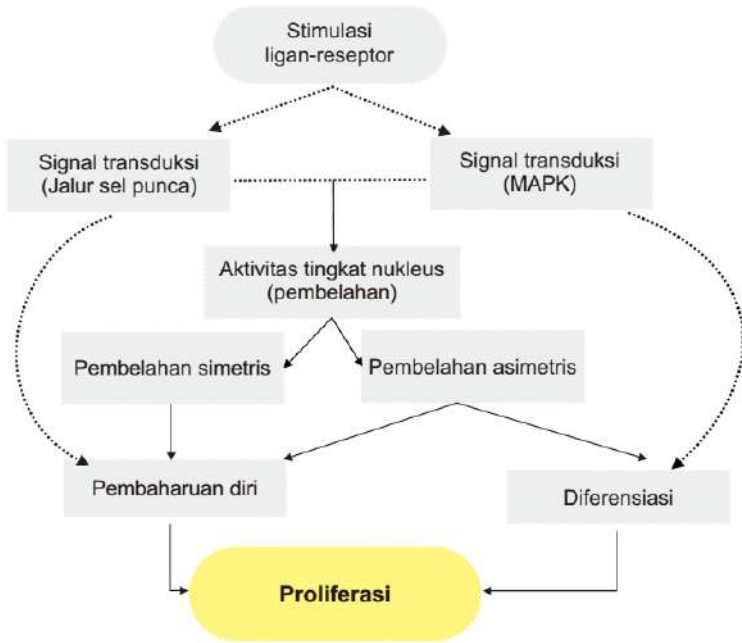
## **5.2 Perbedaan proliferasi dan pembaharuan diri**

Secara konseptual proliferasi berbeda dengan pembaharuan diri terutama dalam hal pembelahan sel. Proliferasi tidak menghasilkan turunan sel yang identik dengan induk, sedangkan pembaharuan diri menghasilkan. Hal ini menunjukkan bahwa proliferasi dapat terjadi pada setiap tipe sel apapun termasuk sel punca, sedangkan pembaharuan diri hanya terjadi pada sel punca. Aktivitas proliferasi dicontohkan oleh sel progenitor limfoid (hasil diferensiasi *hematopoietic stem cell*), dimana turunan yang dihasilkan hanya sel limfosit/ NK matur tanpa pernah menghasilkan turunan sel progenitor limfoid itu sendiri.

## **5.3 Molekuler proliferasi**

Aktifitas molekuler proliferasi merupakan konsep komunikasi sinyal transduksi yang akan dijelaskan lebih detail dalam bab selanjutnya. Aktivasi proliferasi terjadi melalui jalur sinyal transduksi MAPK dan atau jalur embrionik. Secara sistematis aktivasi jalur proliferasi dimulai dengan pengikatan molekul ligan tertentu (*growth factor*) pada reseptor tirosin kinase. Pengikatan ligan-reseptor ini akan menyebabkan aktivasi jalur sinyal transduksi secara kaskade hingga mencapai nukleus. Tahapan nukleus berperan penting dalam kontrol sinyal, karena pada tahapan ini akan dilakukan proses transkripsi terhadap berbagai sinyal masuk untuk kemudian dihasilkan protein terkait aktivitas proliferasi. Kesalahan dan kegagalan proses *checking* sinyal pada tahapan nukleus dapat berdampak pada kesalahan protein yang akan dihasilkan dan hal ini berkorelasi dengan manifestasi penyakit tertentu, terutama malignasi. Proses ini dijelaskan secara detail dalam bab siklus sel selanjutnya.

Secara sistematis konsep proliferasi dijelaskan dalam gambar 7 dibawah ini.



Gambar 7. Konsep proliferasi.

Proliferasi diawali dengan interaksi molekul ligan *growth factor* dengan reseptor tirosine kinase, yang kemudian mengaktivasi jalur sinyal transduksi embrionik dan atau MAPK yang berakhir dengan aktifasi berbagai gen proliferasi.

## 6. Potensi sel

Potensi sel menggambarkan kemampuan suatu sel dalam mengekspresikan protein tertentu terkait dengan aktifitas diferensiasi dan atau pembaharuan diri. Karakter turunan sel yang dihasilkan akan tergantung pada jenis dan tipe sel itu sendiri. Semakin bervariasi turunan sel yang dihasilkan (sel terdiferensiasi), semakin tinggi potensi sel tersebut dan sel punca adalah sel dengan potensi tertinggi.

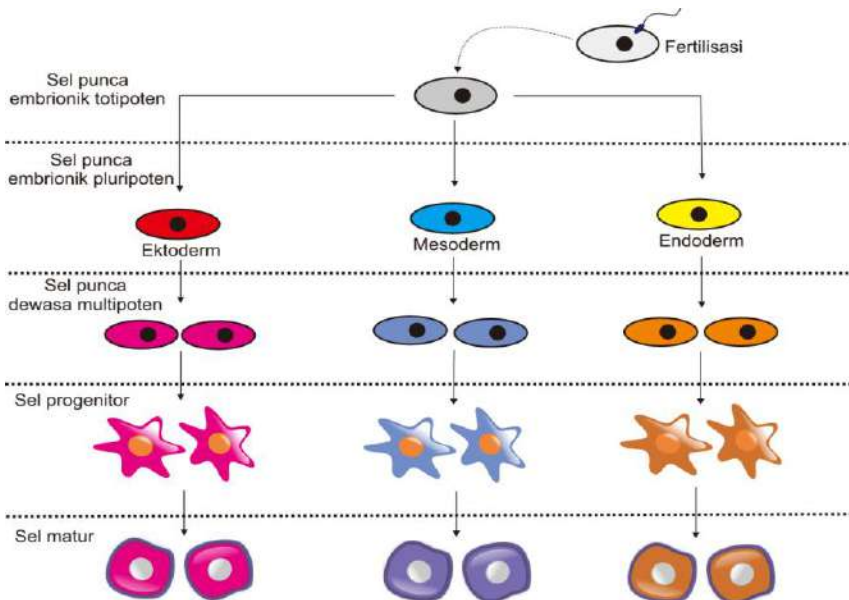
## 6.1 Pengertian potensi sel dalam diferensiasi

Potensi sel adalah kemampuan suatu sel dalam mengekspresikan protein tertentu terkait dengan tingkat diferensiasi. Secara hierarki tingkat potensi diferensiasi dimulai potensi pluripoten berupa diferensiasi tak terbatas, potensi multipoten berupa diferensiasi terbatas satu lapisan germinal hingga diferensiasi yang hilang (unipoten). Potensi sel punca menunjukkan kemampuan sel punca untuk mengubah diri menjadi berbagai sel turunan yang spesifik (terdiferensiasi), disamping kemampuan memperbaharui diri.

## 6.2 Klasifikasi sel berdasarkan potensi diferensiasi

Potensi sel akan menurun dan menghilang seiring dengan maturitas, namun saat yang sama fungsional sel semakin optimal.

Klasifikasi sel berdasarkan potensi diferensiasi dijelaskan pada gambar 8 di bawah ini.



Gambar 8. Klasifikasi sel berdasarkan potensi

Potensi sel diklasifikasikan atas 5 kelompok yaitu sel totipoten, sel pluripoten, sel multipoten, sel progenitor dan sel matur.

Secara hierarki potensi diferensiasi sel dapat diklasifikasikan menjadi 5 kelompok sel yaitu :

1. Sel totipoten
2. Sel pluripoten
3. Sel multipoten
4. Sel progenitor
5. Sel matur.

### **6.3 Sel totipoten**

Sel totipoten adalah sel punca embrionik berupa 4-8 sel yang identik secara fenotip dan genetik hasil pembelahan pertama oosit terfertilisasi (zygot) hingga fase morula 3-5 hari paska fertilisasi. Sel totipoten memiliki potensi diferensiasi dan pembaharuan diri terkuat diantara seluruh sel punca. Sel totipoten ini mampu menghasilkan seluruh tipe sel baik penyusun jaringan embrionik maupun ekstra-embrionik sehingga mampu membentuk kesatuan individu.

### **6.4 Sel pluripoten**

Sel pluripoten adalah sel punca embrionik yang mampu menghasilkan seluruh tipe sel asal dari 3 lapisan germinal (endoderm, ektoderm dan atau mesoderm) namun tidak mampu menghasilkan jaringan ekstra-embrionik. Potensi pembaharuan diri dan diferensiasi sel pluripoten adalah dibawah totipoten. Sel pluripoten didapatkan dari *inner cell mass* fase blastomer/ blastocyst (fase morula hingga 6 minggu kemudian).

### **6.5 Sel multipoten**

Sel multipoten adalah sel punca dewasa yang mampu menghasilkan berbagai turunan sel matur (terdiferensiasi), namun terbatas pada salah satu lapisan asal germinal dimana sel tersebut berasal. Tipe sel turunan yang dihasilkan tergantung pada asal jaringan sel punca. Sekalipun demikian sel punca dewasa asal tali pusat memiliki potensi lebih kuat di antara sel punca multipoten, yaitu berada antara multipoten dan pluripoten.

## **6.6 Sel progenitor**

Sel progenitor adalah sel yang masih memiliki potensi diferensiasi namun kemampuannya lebih terbatas yaitu hanya menjadi turunan subpopulasi tertentu. Sel progenitor *myeloid* misalnya (hasil diferensiasi sel punca dewasa hematopoietik), dimana turunan yang dihasilkan hanya sel leukosit, basofil dan eosinofil, namun sel progenitor ini tidak mampu menghasilkan sel jenis lain. Hal yang sama dengan sel progenitor *lymphoid* dimana turunan yang dihasilkan hanya selmonosit dan limfosit.

## **6.7 Sel matur**

Sel matur adalah sel spesifik yangtelah kehilangan potensi diferensiasi dan pembaharuan diri. Sel matur merupakan hasil diferensiasi terminal sel progenitor. Sekalipun demikian secara fungsional sel matur telah mencapai titik optimum dalam aktivitas metabolicmaupun respon fungsional terhadap suatu sinyal. Sel matur memiliki rentang waktu kehidupan yang terbatas dan akan mengalami kematian apoptosis seiring dengan perjalanan waktu.

## **7. Sel berkarakter seperti sel punca**

Sel dengan karakterseperti sel punca adalah sekelompok sel matur yang mendapatkan potensi seperti dengan sel punca embrionik, baik akibat rekayasa molekuler (*reprogramming*) dan atau proses mutasi genetik. Secara genetik sekuen DNA sel target (sel seperti sel punca) mengalami perubahan mutasi. Lebih lanjut sel dengan karakteristik seperti sel punca dapat diklasifikasi menjadi 2 kelompok besar yaitu :

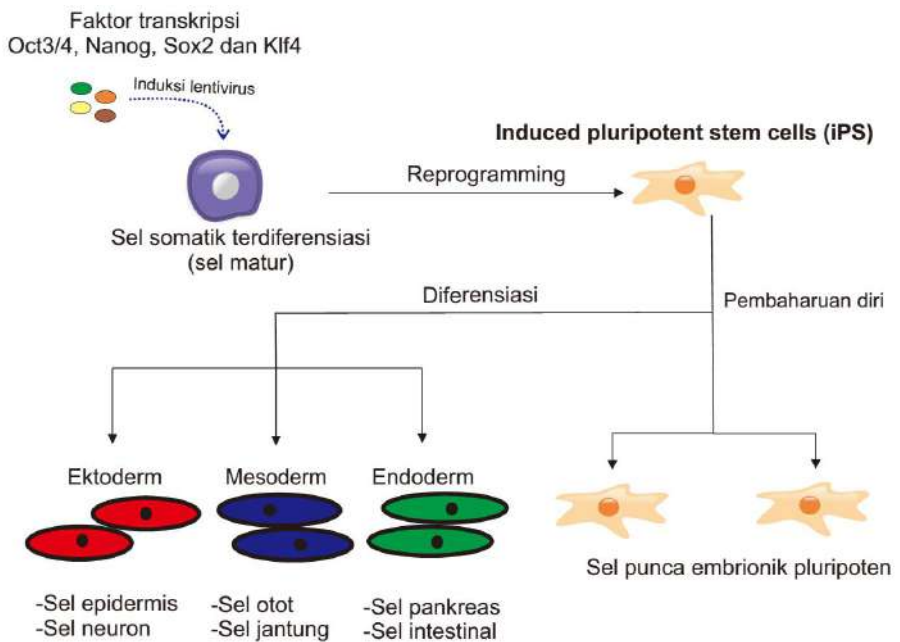
1. *Induce pluripotens stem cell* (iPS)
2. Sel punca kanker (SPK)

### **7.1 *Induce pluripotens stem cell***

*Induce pluripotens stem cell* (iPS) adalah sel punca embrionik pluripoten yang diperoleh dari rekayasa sel matur melalui induksi

faktor transkripsi pluripoten Oct4, Sox2, Klf4 dan Nanog via lentivirus sebagai mediator pembawa. Klon iPS merupakan bagian dari teknik rekayasa molekuler berupa *reprogramming* yang akan dibahas pada bab selanjutnya. Teknik ini ditemukan Mr. Yamanaka yang memungkinkan induksi sel matur berubah menjadi sel punca embrionik, sehingga iPS memiliki potensi pluripoten dan memperbaharui diri.

*Reprogramming* iPS dijelaskan dalam gambar 9 dibawah ini



Gambar 9 iPS Cells

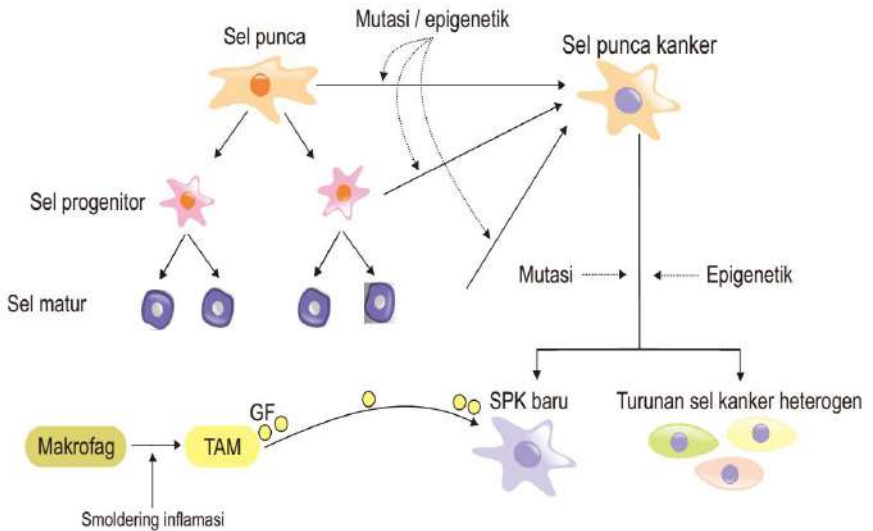
Sel matur yang diinduksi faktor transkripsi Oct4, Sox2, Klf4 dan Nanog via lentivirus menyebabkan perubahan fenotip sel matur menjadi sel embrionik pluripoten, dikenal sebagai iPS. Sel iPS ini mampu berdiferensiasi menjadi 3 lapisan germinal (ektoderm, mesoderm dan endoderm), disamping memperbaharui diri.

## 7.2 Sel punca kanker (SPK)

SPK adalah subpopulasi sel kanker dalam suatu tumor dengan

karakter seperti sel punca yaitu mampu memperbaharui diri dan berdiferensiasi menjadi berbagai sel tumor. SPK terjadi akibat mutasi genetik dan atau proses epigenetik, baik pada sel punca, sel progenitor dan atau sel matur. Perubahan *niche* yang drastis, terutama inflamasi berperan penting dalam memunculkan klon SPK.

Secara spesifik teori SPK dijelaskan dalam gambar 10 dibawah ini.



Gambar 10. Sel Punca Kanker

SPK terbentuk akibat paparan mutagen pada sel punca/sel progenitor/sel matur yang menyebabkan perubahan struktur DNA (mutasi) yang diperkuat dengan *niche* yang berubah akibat proses epigenetik. Paparan kembali mutagen dan proses epigenetik akan memicu kemunculan klon SPK baru yang dapat menghasilkan turunan sel kanker yang heterogen dan resisten.

Proses *smoldering* inflamasi (inflamasi masif) paska pemberian radio-kemoterapi menyebabkan perubahan drastis pada *niche* sel tumor yang dapat memicu polarisasi makrofag menjadi tipe-2, dikenal sebagai *tumor associated macrophage* (TAM) yang dapat melepas *growth factor* untuk memicu SPK baru.

## 8. Konsep *niche*

Konsep *niche* terkait dengan lingkungan mikroseluler dan yang ikut menentukan arah nasib suatu sel. *Niche* dapat berupa sel dengan berbagai macam tipe maupun matrik ekstraseluler. yang saling berinteraksi menuju keadaan homeostatis. *Niche* juga ikut mempengaruhi status *stemness* sel punca.

### 8.1 Pengertian *niche* sel punca

*Niche* sel punca adalah lingkungan mikroseluler sekitar sel punca yang saling berinteraksi dan ikut menentukan arah nasib suatu sel punca. Secara spesifik mengubah *niche* berkorelasi dengan perubahan epigenetik yang berimplikasi pada perubahan pola perilaku sel punca, apakah didorong memasuki tahapan diferensiasi, pembaharuan diri, proliferasi dan atau apoptosis.

### 8.2 Struktur *niche* sel punca

*Niche* sel punca berperan sentral dalam aktivasi sel punca. Secara struktural komponen *niche* sel punca dibagi menjadi:

1. Komponen sel, yaitu sel radang, sel mesenkimal dan sel endotel
2. Matriks ekstraseluler

Kedua komponen ini nya saling berinteraksi dengan melepaskan *soluble molecule* sehingga dapat mengubah ekspresi gen sel target. Hubungan koorporasi ini tampak jelas pada peristiwa kerusakan jaringan yang akan dijelaskan pada bab selanjutnya.

### 8.3 Peran *niche* dalam sel punca

Sel punca dalam keadaan normal berada pada posisi *quiescence* (inaktif) dalam sebagian besar jaringan dan aktivasi sel punca hanya terjadi ketika *niche* sel punca berubah.

Secara spesifik peranan *niche* dalam sel punca adalah :

1. Mendorong polarisasi sel punca

*Niche* berperan sentral dalam mendorong arah polarisasi suatu sel punca, apakah menuju pembelahan simetris dan atau asimetris.

Sisi lain polarisasi sel punca juga dapat mempengaruhi aktivitas parakrin sel punca. Hal ini terlihat dengan adanya polarisasi sel punca menjadi tipe-1 dan tipe-2 tergantung pada paparan molekul inflamasi yang dilepas *niche*. Polarisasi sel punca secara detail dibahas dalam bab selanjutnya.

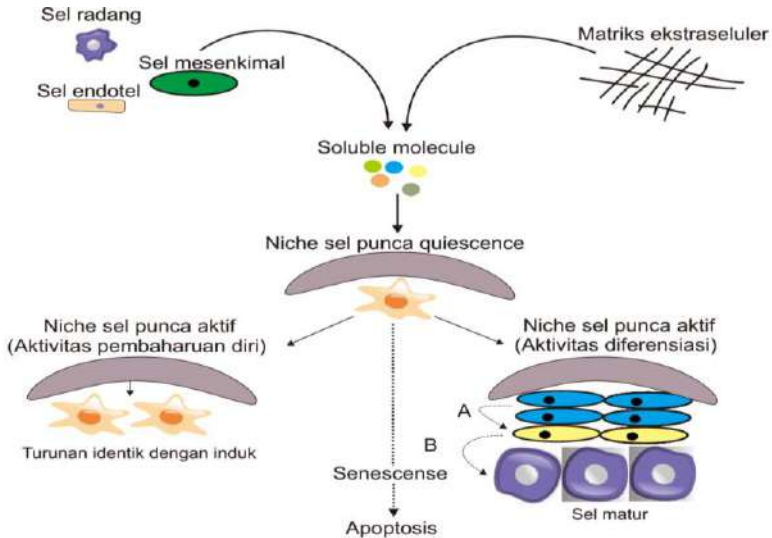
## 2. Mempengaruhi status sel punca

*Niche* ikut mempengaruhi status sel punca aktif kembali menuju keadaan *quiescence* (tidak aktif) ketika *niche* sel punca berangsur menjadi normal. Keadaan ini menyebabkan sel punca keluar siklus sel dan kembali memasuki fase G<sub>0</sub> (inaktif) untuk jangka waktu tertentu. Sekalipun demikian status *quiescence* sel punca ini adalah reversibel sehingga sel punca dapat kembali memasuki putaran siklus dan menjadi aktif ketika mendapat stimulasi *soluble molecule* tertentu yang dilepas *niche*. Sisi lain status *quiescence* juga dapat berubah menjadi *senescence* yang bersifat ireversibel ketika terjadi stress intraseluler yang kuat pada *niche* dan berlangsung lama.

## 8.4 Molekuler *niche* dalam polarisasi sel punca

Perubahan *niche* sel punca dapat dapat mempengaruhi aktivitas sirkuit regulator faktor transkripsi Oct3/4, Klf4, Sox2 dan nanog dan atau protein promosi diferensiasi Gata6 dan Cdx2 sehingga memungkinkan pembelahan sel punca menuju arah diferensiasi dan atau pembaharuan diri. Secara spesifik polarisasi sel punca terjadi akibat stimulasi *soluble molecule* (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) yang dilepas oleh sel radang, sel endotel dan atau sel mesenkimal serta oleh matriks ekstraseluler. Molekul ini akan mengikat reseptor sel punca sehingga terjadi kompleks ligan-reseptor yang dapat memicu aktivasi jalur sinyal transduksi sehingga menimbulkan respon sel punca, baik berupa aktivitas pembaharuan diri dan atau diferensiasi.

Perubahan *niche* dalam poliarisasi sel punca dijelaskan dalam gambar 11 dibawah ini.



Gambar 11. perubahan niche terhadap poliarisasi sel punca  
 Sel punca berada pada keadaan quiescence (inaktif) dan menjadi aktif ketika *niche* berubah, baik akibat pelepasan *soluble molecule* oleh sel sekitar (sel radang, mesenkimal dan endotel) dan atau matriks ekstraseluler. *Niche* juga ikut mempengaruhi sel punca memasuki status *senescence*. (A) diferensiasi sel punca menjadi sel progenitor, (B) diferensiasi sel progenitor menjadi sel matur.

## 9. Konsep *senescence* dan *quiescence*

Semua sel somatik yang memiliki kemampuan membelah dapat mengalami tahapan quiescence maupun *senescence*. Pembahasan quiescence dan *senescence* sel punca menjadi penting karena terkait dengan proses aging, yang berdampak pada proliferasi atau apoptosis hingga transformasi malignansi. Beberapa molekul yang terlibat dalam jalur *upregulation* dan *downregulation* program *senescence* digunakan sebagai marker pendeteksi.

### **9.1. Pengertian *quiescence***

*Quiescence* adalah suatu keadaan dimana sel punca berada dalam keadaan inaktif, tidak ada aktivitas pergerakan siklus sel, dikenal juga sebagai fase  $G_0$ . Sekalipun demikian sel yang dalam posisi *quiescence* masih memungkinkan untuk kembali memasuki siklus sel ketika mendapatkan stimulasi molekul sinyal ekstraseluler, terutama *growth factor*.

### **9.2. Peluang *quiescence* memasuki siklus sel**

Sel punca dalam status *quiescence* bersifat sementara dan *reversible*, oleh karenanya sel punca dalam status ini berpeluang memasuki siklus sel kembali ketika mendapatkan stimulasi *growth factor* yang dilepas oleh *niche*. Hal ini terjadi dengan cara mendorong sel punca melewati area restriksi (area R) di fase G1. Area R adalah suatu area dalam fase akhir G1 dimana setiap sel akan mengalami pengecekan sinyal untuk persiapan aktivitas selanjutnya, yaitu fase sintesis (S). Berbagai studi membuktikan bahwa dalam keadaan fisiologis sebagian besar sel punca berada pada keadaan *quiescence* (tidak ada aktivitas sel). Hal ini yang menjelaskan mengapa jumlah sel punca menjadi sangat terbatas pada setiap jaringan normal dan mengapa dibutuhkan sejumlah tertentu sel punca eksogenosus untuk meregenerasi berbagai kerusakan jaringan pada kasus klinik.

### **9.3. Pengertian *senescence***

*Senescence* adalah suatu keadaan dimana sel punca tidak mampu melakukan aktifitas proliferasi dalam jangka waktu panjang dan bersifat *irreversible*. Sel punca dapat memasuki keadaan *senescence* ketika berada pada fase  $G_0$  dalam waktu lama sebagai akibat stres intraseluler atau ekstraseluler ekksesif. Program *senescence* akan mengunci status pembelahan sel tertahan dalam jangka waktu lama dan ireversibel. Sel yang mengalami *senescence* akan mendapatkan fenotip baru, dikenal sebagai *senescence-associated secretory phenotype* (SASP). Sel dengan fenotip ini dapat mengubah perilaku sel fibroblas menjadi pro-inflamasi.

#### **9.4. Faktor *senescence***

Proses *senescence* diinisiasi melalui tahapan *quiescence* yang bertujuan untuk mencegah penyebaran sinyal kerusakan pada sel turunan berikutnya. Berbagai faktor yang dapat memicu *senescence* seluler adalah :

1. *Replicative senescence* (proses *aging*)

*Replicative senescence* adalah pembelahan sel berulang yang berkonsekuensi pada pemendekan telomer (*telomer uncapping*) hingga disfungsi telomer. Keadaan ini akan berdampak pada deteoriasi mitokondria (kemunduran fungsi mitokondria), gangguan kromatin (stres genotoksik) hingga kerusakan DNA berat yang tidak dapat direparasi kembali.

2. Stres oksidatif

*Reactive oxygen species* (ROS) juga berperan dalam memicu proses *senescence* karena molekul yang dilepas berpotensi untuk menyebabkan kerusakan pada sekuen DNA.

3. Sinyal mitogenik eksternal (stress onkogenik)

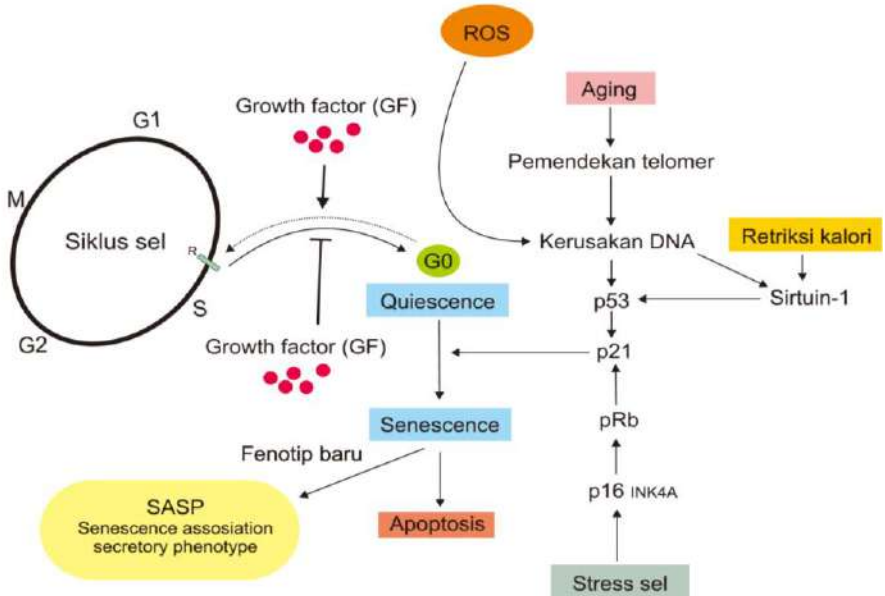
Sinyal *growth-related oncogene- $\alpha$*  (GRO- $\alpha$ ) adalah molekul hasil sekresisel tumor yang dapat memicu berbagai sel normal di sekitar sel tumor menjadi *senescence*.

#### **9.5. Mekanisme molekuler *senescence***

Terlepas dari berbagai faktor yang memicu terjadinya *senescence*, program *senescence* sendiri teraktivasi ketika sel tersebut mendapat kerusakan atau disfungsi yang hebat. Secara molekuler mekanisme *senescence* melalui aktivasi jalur tumor supresor :

1. p16 INK4a
2. pRB (protein retinoblastoma),
3. p53-p21.

Mekanisme molekuler jalur *senescence* dijelaskan pada gambar 12 dibawah ini.



Gambar 12. *Senescence* dan *quiescence*

Kerusakan DNA yang disebabkan oleh replikatif *senescence* (pemendekan telomer) dan ROS akan memicu jalur p53-p21, di samping sirtuin-1 yang dapat menyebabkan *senescence*. Sisi lain stres sel melalui aktivasi p16INK4a dan pRB akan memicu aktivasi p21 yang juga berdampak pada *senescence*.

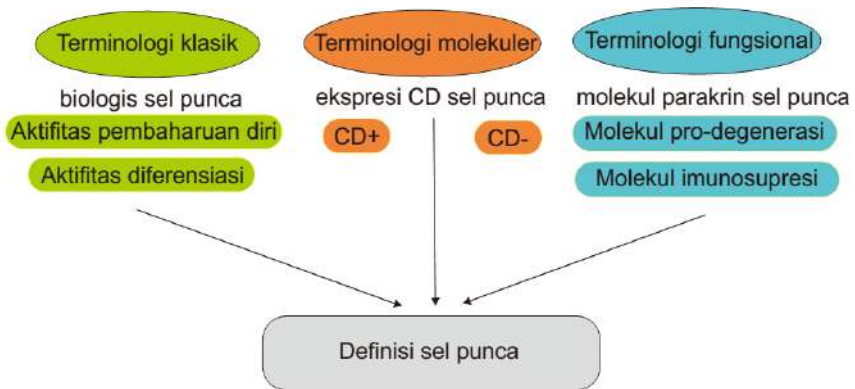
### 9.6. Fenotipe baru SASP *senescence*

Sel *senescence* adalah sel yang tertahan secara permanen pada siklus sel (*cycle cell arrest*). Sel demikian mendapatkan fenotipe baru berupa SASP yang memungkinkan mengubah perilaku berbagai sel fibroblas *senescence* bersifat pro-inflamasi. Hal ini menjadi faktor penting dalam promosi perkembangan sel tumor. Secara teoritis transformasi malignansi didukung oleh peranan sel radang, terutama sel makrofag yang berperan penting sebagai penyumbang *growth factor* yang dikenal sebagai *tumor associated macrophage* (TAM).

## 10. Terminologi sel punca

Secara umum definisi sel punca adalah sel yang memiliki kemampuan memperbaharui diri dan berdiferensiasi menjadi berbagai turunan sel yang spesifik. Pembaharuan diri terjadi melalui pembelahan simetris dan atau asimetris. Sekalipun demikian definisi tersebut belum dapat membedakan antara sel punca dengan sel yang membelah lainnya, namun definisi ini lebih praktis sehingga lebih banyak digunakan. Kriteria tambahan yang lebih ketat diperlukan untuk memperkuat definisi tersebut. Kriteria tersebut berupa ekspresi marker spesifik pada permukaan membran sel punca dan kontribusi substansial sel punca dalam proses regenerasi jaringan.

Berdasarkan hal tersebut, maka penulis mengusulkan definisi sel punca seperti pada gambar dibawah ini.



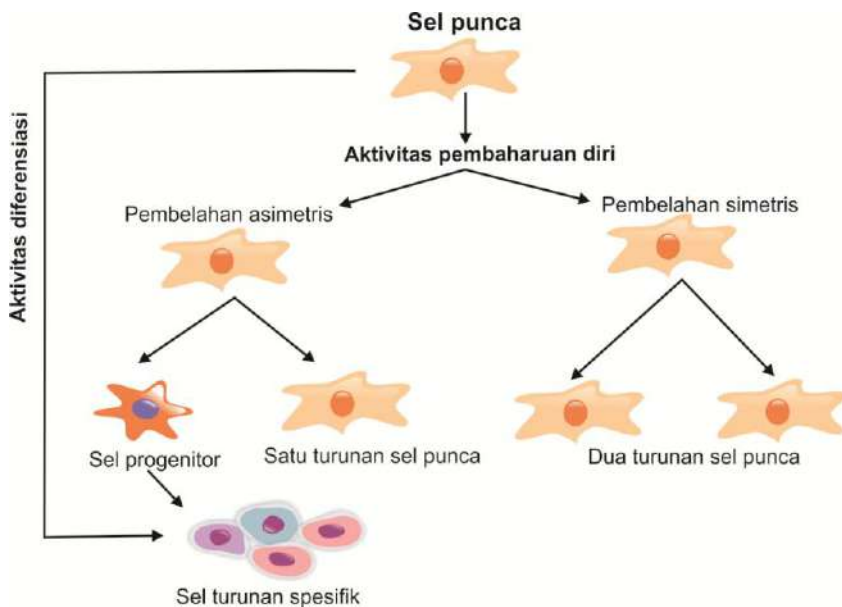
Gambar 13. Terminologi sel punca

Terminologi klasik sel punca hanya mendasarkan pada morfologi sel punca, namun identitas molekuler (CD) tidak diketahui secara persis. Terminologi molekuler sel punca sekalipun dapat mengetahui marker setiap sel punca, namun adanya polarisasi sel punca menjadi tipe-1 dan tipe-2 tidak dapat dijelaskan seperti pada terminologi fungsional. Terminologi fungsional didasarkan pada teori parakrin yang akan dijelaskan pada bab selanjutnya.

### 10.1 Terminologi klasik sel punca

Terminologi klasik sel punca didasarkan atas gambaran morfologi sel punca berdasarkan pada aktivitas pembaharuan diri dan potensi berdiferensiasi. Secara spesifik pembaharuan diri menggambarkan kemampuan sel punca untuk menghasilkan turunan sel yang identik dengan induk baik melalui pembelahan simetris dan atau asimetris. Sisi lain diferensiasi menunjukkan kemampuan sel punca dalam menghasilkan berbagai turunan sel yang spesifik. Terminologi klasik sel punca merupakan definisi minimal yang harus dipenuhi oleh setiap sel punca. Sekalipun demikian terminologi klasik ini sering digunakan dalam berbagai studi sel punca.

Terminologi klasik sel punca dijelaskan pada gambar 14 dibawah ini.



Gambar 14. Terminologi klasik sel punca

Terminologi klasik menggambarkan kemampuan sel punca dalam aktivitas pembaharuan diri dan potensi diferensiasi. Pembaharuan diri melalui pembelahan simetris dan asimetris, sedangkan diferensiasi menghasilkan berbagai turunan sel yang lebih spesifik.

## **10.2 Terminologi molekuler sel punca**

Terminologi molekuler sel punca didasarkan atas kemampuan sel punca dalam mengespresikan berbagai protein marker pada membran sel yang dikenal sebagai *cluster of differentiation* (CD). Sisi lain identitas molekuler sel punca juga didasarkan atas tidak diekspresikannya/ terekspresi lemah CD tertentu atau tidak ditemukannya marker diferensiasi (*lineage(-)*). Setiap kelompok sel punca memiliki marker CD tertentu yang seringkali lebih dari satu. Hal ini menunjukkan bahwa identifikasi molekuler sel punca didasarkan atas CD+ dan atau CD- yang secara spesifik akan dibahas pada bab selanjutnya.

## **10.3 Terminologi fungsional sel punca**

Terminologi fungsional sel punca didasarkan atas kemampuannya dalam mensekresi berbagai *soluble molecule* secara parakrin. Secara konseptual parakrin adalah komunikasi sel punca dengan sel dan matriks sekitarnya melalui molekul sinyal tertentu yang dilepas sel punca. Hal ini menjadi penting ketika berbagai penelitian melaporkan bahwa terjadi akselerasi kesembuhan melalui konsep parakrin dan akan dijelaskan lebih detail pada bab selanjutnya. Secara spesifik *soluble molecule* dan ligan yang diekspresikan sel punca berupa:

1. Molekul anti-inflamasi: IL-10, TGF- $\beta$ , IL-1ra, TSG6, PGE3

Sel punca terutama MSC paska terpapar molekul inflamasi poten seperti TNF $\alpha$ , IL-1 dan IFN $\gamma$  maka akan melepas berbagai molekul anti-inflamasi

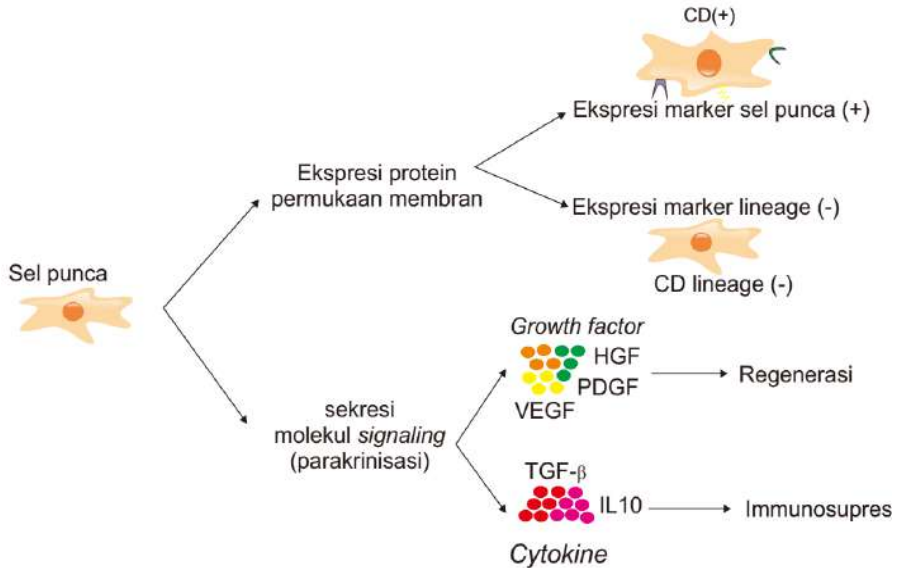
2. Molekul pro-regenerasi: VEGF, PDGF, IGF, FGF-2, Ang-1

Sel punca melepas berbagai molekul pro-regenerasi sebagai respon inflamasi terhadap inflamasi yang telah terkendali

3. Molekul/ ligan kemoatraksi: HGF, CXCR3-R

Sel punca mampu mendeteksi berbagai molekul kemoatraksi seperti HGF dan SDF-1 melalui reseptor CXCR-3 sehingga homing.

Terminologi fungsional sel punca dijelaskan pada gambar 15 dibawah ini.



Gambar 15. Terminologi molekuler-fungsional sel punca  
Sel punca mengeskpresikan berbagai CD tertentu dan atau marker diferensiasi *lineage* (-) serta mensekresi berbagai *soluble molecule* baik VEGF, HGF dan PDGF maupun TGF-β, IL-1ra, PGE3, TSG6 dan IL-10 secara parakrin.

## 11. Klasifikasi sel punca

Sel punca dapat diklasifikasikan berdasarkan asal mula jaringan dan tahapan perkembangan sel. Hal ini menyebabkan adanya perbedaan potensi dan karakter sel punca tergantung pada sumber asalnya. Berdasarkan tahapan perkembangan dan sumber asal sel punca, maka sel punca dapat diklasifikasikan menjadi 2 kelompok besar, yaitu:

1. Sel punca embrionik
  - 1) Sel punca totipoten
  - 2) Sel punca pluripoten

2. Sel punca dewasa
  - 1) MSC
  - 2) HSC

## **12. Sel punca embrionik**

Sel punca embrionik adalah sel punca yang berasal dari jaringan embrionik tahapan embriogenesis. Sel punca tipe ini memiliki potensi pembaharuan diri dan diferensiasi terkuat dibandingkan sel punca tipe lain. Secara spesifik peranan sel embrionik terlihat jelas pada pertumbuhan dan perkembangan embrio.

### **12.1 Klasifikasi sel punca embrionik**

Bedasarkan tahapan embriogenesis maka sel punca embrionik dibagi menjadi 2 kelompok yaitu:

1. Sel punca embrionik totipoten
2. Sel punca embrionik pluripoten

### **12.2 Sel punca embrionik totipoten**

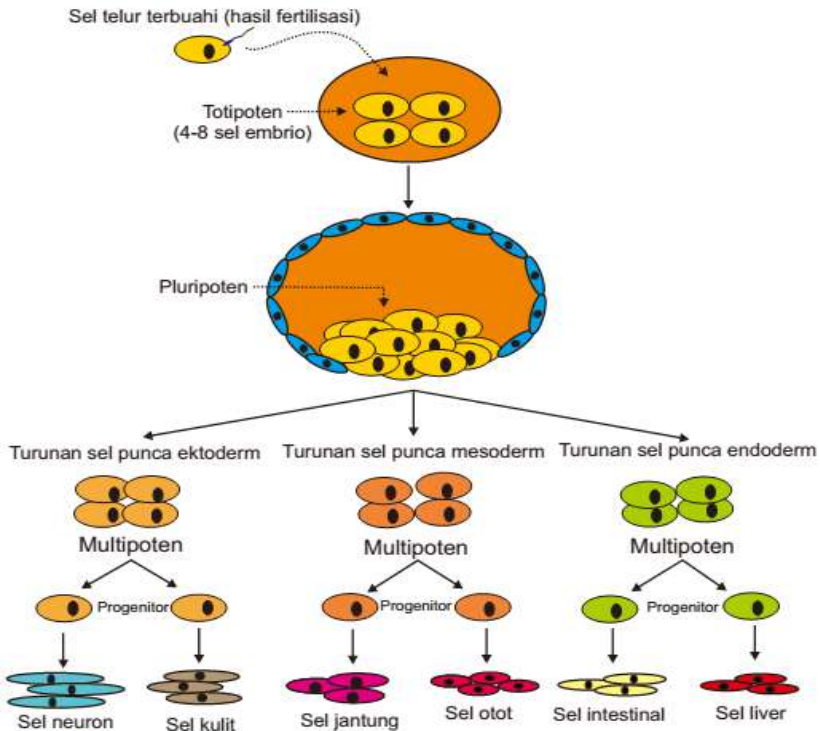
Sel punca embrionik totipoten adalah sel embrio dengan 4-8 sel hasil pembelahan oosit terfertilisasi (zygot) hingga fase morula (3-5 hari paska fertilisasi). Sel embrionik ini identik secara fenotip maupun genetik. Potensi pembaharuan diri sel embrionik totipoten adalah terkuat diantara sel punca embrionik lain. Sel embrionik ini mampu menghasilkan seluruh jaringan embrionik maupun ekstra-embrionik, sehingga dapat menghasilkan individu baru.

### **12.3 Sel punca embrionik pluripoten**

Sel punca embrionik pluripoten adalah sel embrionik yang mampu menghasilkan seluruh sel lapisan germinal, baik sel lapisan endoderm, ektoderm dan atau mesoderm, namun tidak mampu menghasilkan sel jaringan ekstra-embrionik. Sel embrionik ini didapatkan dari *inner cell mass* pada fase blastomer/*blastocyst* (paska fase morula hingga 6 minggu). Sel embrionik ini merupakan turunan epiblas yang membentuk embrio dan sel penyusun plasenta (*ectoderm*

dan *trophectoderm*). Kemampuan pembaharuan diri dan potensi diferensiasi sel embrionik pluripoten dibawah totipoten.

Secara sistematis hierarki sel punca dijelaskan pada gambar 16 dibawah ini



Gambar 16.Sel punca embrionik

Sel punca embrionik totipoten berupa 4-8 sel hasil pembelahan *zygot* yang kemudian terus membelah membentuk *inner cell mass* (fase *blastocyst*). Sel punca yang didapatkan dari *inner cell mass* adalah sel punca embrionik pluripoten, yang mampu menghasilkan 3 lapisan sel germinal, yaitu lapisan ektoderm, mesoderm hingga ektoderm. Ketiga sel lapisan tersebut berdiferensiasi menjadi sel spesifik (sel matur).

### 13. Sel punca dewasa

Sekali tiga lapisan sel germinal terbentuk maka sel punca yang berasal dari tiap lapisan sel ini akan diklasifikasikan sebagai sel punca

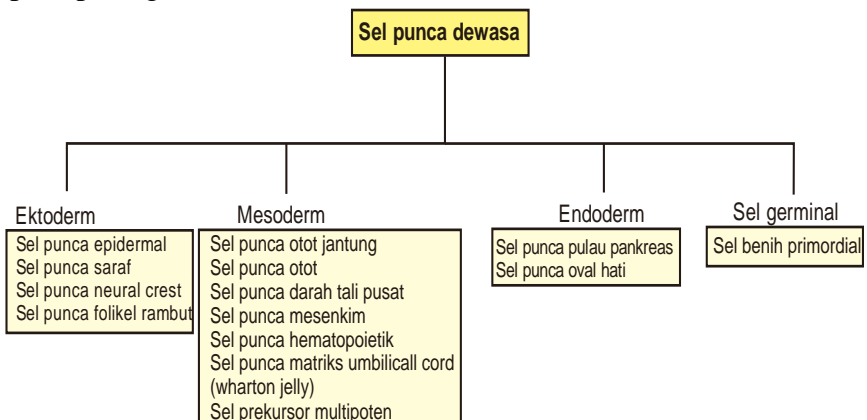
dewasa. Tipe sel turunan yang dihasilkan akan tergantung pada asal jaringan sel punca tersebut. Asal sumber sel punca dewasa menjadi penting dalam kepentingan riset terutama dalam merancang tipe sel spesifik yang akan dihasilkan. Sebagai contoh adalah *hematopoietik stem cell* (HSC) asal sumsum tulang dimana hanya akan menghasilkan seluruh tipe sel darah, namun tidak mampu menghasilkan turunan sel non-hematopoetik.

### 13.1 Pengertian sel punca dewasa

Sel punca dewasa adalah sel punca yang bersifat multipoten, yaitu mampu menghasilkan berbagai turunan sel terdiferensiasi, sekalipun terbatas pada salah satu lapisan asal germinal dimana sel punca tersebut berasal. Sel punca ini berasal dari jaringan dewasa paska tahapan embrio-organogenesis selesai (janin terbentuk). Sekalipun demikian *mesenchymal stem cell* (MSC) asal tali pusat memiliki potensi diferensiasi yang lebih kompleks dibanding dengan sel punca dewasa lainnya. Hal ini disebabkan karena potensi *stemness* MSC diduga berada antara pluripoten dan multipoten.

### 13.2 Klasifikasi sel punca dewasa

Bedasarkan atasjaringan asal lapisan germinal dimana sel punca diperoleh, maka sel punca dewasa dapat diklasifikasikan seperti pada gambar 14 di bawah ini.



Gambar 17. Klasifikasi sel punca dewasa

Lebih lanjut berdasarkan atas potensi diferensiasi dan marker yang diekspresikan, maka sel punca dewasa dapat diklasifikasikan menjadi :

1. *Mesencymal stem cell* (MSC)
2. *Hematopoetic stem cell* (HSC)
3. *Neural stem cell* (NSC)

Secara spesifik perbedaan ketiganya dijelaskan dalam skema di bawah ini.

Tabel 1. Marker MSC, HSC dan NSC

Tipe	Sumber asal	Marker		Potensi
		Mouse	Human	
<b>Hematopoietic (HSC)</b>	Sum sum tulang Darah	<b>Positif (+)</b>	<b>Positif (+)</b>	Seluruh turunan hematopoetik Jaringan liver Jaringan otot Jaringan epitel
		C-kit+	CD34+	
		SCA-1+	CD59+	
		CD150+	CD90+	
		EMCN+	EMCN+	
		Thy1.1+/lo	CD117+	
		CD38+	<b>Negatif (-)</b>	
		<b>Negatif (-)</b>	CD38-	
		CD34-	Lin-	
		Lin-		
		CD48-		
		<b>Mesenchymal (MSC)</b>	Tali pusat (Warton jelly dan darah) Sum sum tulang Jaringan adiposa	
CD44+	CD29+			
CD105+	CD44+			
CD29+	CD90+			
SCA-1+	CD49a-F+			
<b>Negatif (-)</b>	CD51+			
CD34-	CD73+			
CD45-	CD105+			
TER-119-	CD106+			
CD11b-	CD166+			
	Stro-1			
	<b>Negatif (-)</b>			
	CD45-			
	CD34-			
	CD14-			
	CD11b-			
	CD79a-			
	CD19-			
	HLA-DR-			
<b>Neural (NSC)</b>	Sistem saraf pusat Sistem saraf tepi Hipokampus	<b>Positif (+)</b>	<b>Positif (+)</b>	Seluruh jenis sel saraf Glia Otot polos
		Nestin+	CD90+	
		Integrina- $\alpha$ 4+	CD44+	
			S100+	
		<b>Negatif (-)</b>	<b>Negatif (-)</b>	
		p75-		

## Daftar pustaka

1. Caplan AI, Hariri R. Body Management: Mesenchymal Stem Cells Control the Internal Regenerator. *Stem Cells Transl Med.* 2015;4(7):695-701.
2. Biehl JK, Russell B. Introduction to stem cell therapy. *J CardiovascNurs.* 2009;24(2):98-103; quiz 104-5.
3. Gonzalez AC, Costa TF, Andrade ZA, Medrado AR. Wound healing - A literature review. *An Bras Dermatol.* 2016;91(5):614-620.
4. Krafts KP. Tissue repair: The hidden drama. *Organogenesis.* 2010;6(4):225-33.
5. Reinke J, M, Sorg H: Wound Repair and Regeneration. *EurSurg Res* 2012;49:35-43.
6. Yamashita YM, Yuan H, Cheng J, Hunt AJ. Polarity in stem cell division: asymmetric stem cell division in tissue homeostasis. *Cold Spring HarbPerspect Biol.* 2010;2(1):a001313.
7. Watt FM, Driskell RR. The therapeutic potential of stem cells. *Philos Trans R SocLond B Biol Sci.* 2010;365(1537):155-63.
8. Yeo JC, Ng HH. The transcriptional regulation of pluripotency. *Cell Res.* 2012;23(1):20-32.
9. Hwang NS, Varghese S, Elisseeff J. Controlled differentiation of stem cells. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;60(2):199-214.
10. Teschendorff AE, Enver T. Single-cell entropy for accurate estimation of differentiation potency from a cell's transcriptome. *Nature Communications.* 2017;8:15599.
11. Singh VK, Saini A, Kalsan M, Kumar N, Chandra R. Describing the Stem Cell Potency: The Various Methods of Functional Assessment and In silico Diagnostics. *Front Cell Dev Biol.* 2016;4:134.
12. W. Cai (ed.), *Engineering in Translational Medicine*, Springer-Verlag London. 2014.
13. Cao Y. Regulation of germ layer formation by pluripotency factors during embryogenesis. *Cell Biosci.* 2013;3(1):15. Published 2013 Mar 11. doi:10.1186/2045-3701-3-15
14. Bhartiya D, Boheler KR, Rameshwar P. Multipotent to pluripotent properties of adult stem cells. *Stem Cells Int.* 2013;2013:813780.
15. Weiskopf K, Schnorr PJ, Pang WW, et al. Myeloid Cell Origins, Differentiation, and Clinical Implications. *MicrobiolSpectr.* 2016;4(5):10.1128/microbiolspec.

16. Stadtfeld M, Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev.* 2010;24(20):2239-63.
17. Singh VK, Kalsan M, Kumar N, Saini A, Chandra R. Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. *Front Cell Dev Biol.* 2015;3:2. Published 2015 Feb 2. doi:10.3389/fcell.2015.00002
18. Chang JC. Cancer stem cells: Role in tumor growth, recurrence, metastasis, and treatment resistance. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(1 Suppl 1):S20-5.
19. Pennings S, Liu KJ, Qian H. The Stem Cell Niche: Interactions between Stem Cells and Their Environment. *Stem Cells Int.* 2018;2018:4879379. Published 2018 Oct 14. doi:10.1155/2018/4879379
20. Cheung TH, Rando TA. Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(6):329-40.
21. Gattazzo F, Urciuolo A, Bonaldo P. Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche. *BiochimBiophysActa.* 2014;1840(8):2506–2519.
22. Berika M, Elgayyar ME, El-Hashash AH. Asymmetric cell division of stem cells in the lung and other systems. *Front Cell Dev Biol.* 2014;2:33. Published 2014 Jul 31. doi:10.3389/fcell.2014.00033
23. Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci Rep.* 2015;35(2):e00191. Published 2015 Apr 28. doi:10.1042/BSR20150025
24. Putra A, Hutagalung A, Hasanah IH, Trisnadi S, Djannah D, et al. PeranInduksi TNF- $\alpha$  Serial Doses dalamPeningkatan VEGF dan PDGFMesenchymal Stem Cells. 2018. *MKB.* 50(2):67–73.
25. Putra A, Antari AD, Kustiyah AR, Intan YSN, Sadyah NAC, et al. (2018). Mesenchymal stem cells accelerate liver regeneration in acute liver failure animal model. *Biomedical Research and Therapy*, 5(11), 2802-2810.
26. Bai L, Lennon DP, Caplan AI, et al. Hepatocyte growth factor mediates mesenchymal stem cell–induced recovery in multiple sclerosis models. *Nat Neurosci.* 2012;15(6):862-70.
27. Putra A, Ridwan FB, Putridewi AI, et al. The Role of TNF- $\alpha$  induced MSCs on Suppressive Inflammation by Increasing TGF- $\beta$  and IL-10. *Open Access Maced J Med Sci.* 2018;6(10):1779-1783.
28. Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol.* 2006;169(2):338-

## **BAB II**

# **ISOLASI DAN KULTUR SEL PUNCA**

### **Tujuan**

---

Setelah membaca bagian ini, diharapkan pembaca dapat memahami tentang prinsip dasar kultur, kultur sel primer, kondisi optimal kultur, media kultur, serum kultur, sistem buffer, karakteristik pola pertumbuhan sel, teknik dasar kultur, protokol isolasi MSC asal darah, prosedur isolasi-kultur MSC asal tali pusat, prosedur panen dan perhitungan sel.

*Kultur sel adalah salah satu cara untuk menghasilkan produk rekayasa sel berbasis riset. Hasil sel kultur adalah konsisten dan presisi. Terdapat 2 metode dalam isolasi dan kultur jaringan primer, yaitu teknik eksplan dan teknik disosiasi. Isolasi MSC asal darah tali pusat dengan sentrifuge bertingkat dengan ficoll, berdasarkan perbedaan gradien. Berbagai teknik kultur sel perlu dikuasai, mulai preparasi sampel, ruang kerja aseptis dalam laboratorium class 2, penggunaan beberapa protokol isolasi hingga panen sel dan cell coating. Cell hasil panen dapat digunakan untuk kepentingan studi/aplikasi klinis dan atau subkultur kembali.*

*Catatan penulis*

## **1. Latar belakang**

Kultur sel adalah salah satu sarana dalam mempelajari fisiologi dan biokimia sel termasuk sel punca, terkait metabolisme *aging*, efek obat/ herbal, senyawa toksik, mutagenesis hingga karsinogenesis. Sel kultur digunakan dalam *screening* dan pengembangan obat skala besar dalam memproduksi vaksin dan protein tertentu. Penelitian terkini melaporkan keterlibatan sel kultur sebagai terapi berbasis sel dalam berbagai penyakit metabolik dan atau degenerasi. Fakta diatas menunjukkan bahwa terjadi peningkatan penggunaan sel kultur pada dekade ini. Hal ini dimungkinkan karena umumnya hasil produk akhir sel kultur adalah konsisten pada setiap prosesnya sehingga memungkinkan mereproduksi kembali hasil secara presisi.

Studi *invivo* baik yang melibatkan hewan coba dan atau relawan manusia seringkali mendapatkan hasil yang berbeda. Perbedaan hasil ini disebabkan karena adanya variasi yang pada subjek penelitian terutamanya pengaruh faktor epigenetik, sekalipun telah dilakukan proses homogenisasi sebelumnya. Kultur sel menjadi salah satu konsep solusi dalam homogenisasi suatu penelitian maupun produksi rekayasa. Hal ini dimungkinkan karena kultur sel mampu

meminimalisir besarnya variasi yang terjadi selama proses penelitian. Kultur sel relatif mudah mengontrol *niche* sebagai faktor epigenetik yang berpengaruh pada subjek penelitian. Sisi lain kultur sel memungkinkan meniru kehidupan/ suasana yang terjadi in-vivo melalui pembuatan lingkungan *artificial* in-vitro.

Begitu pentingnya peranan kultur sel dalam berbagai bidang studi dan produk rekayasa, maka penulis terdorong untuk mengeksplorasi lebih lanjut mengenai prinsip dasar kultur sel yang menjelaskan berbagai faktor yang berpengaruh dalam sel kultur. Bab ini juga menjelaskan teknik dasar dalam isolasi dan kultur sel asal jaringan primer, termasuk protokol isolasi sel punca mesenkimal yang dilakukan dalam laboratorium kami dan akhirnya proses panen dan perhitungan sel untuk kepentingan aplikasi maupun subkultur.

## **2. Prinsip dasar kultur sel**

Berbagai studi terkini melaporkan bahwa terjadi penggunaan kultur dasar sel secara eksponensial, termasuk dalam hal teknik isolasi, metode kultur hingga karakterisasi. Hal ini menunjukkan bahwa penguasaan prinsip dasar kultur sel menjadi penting.

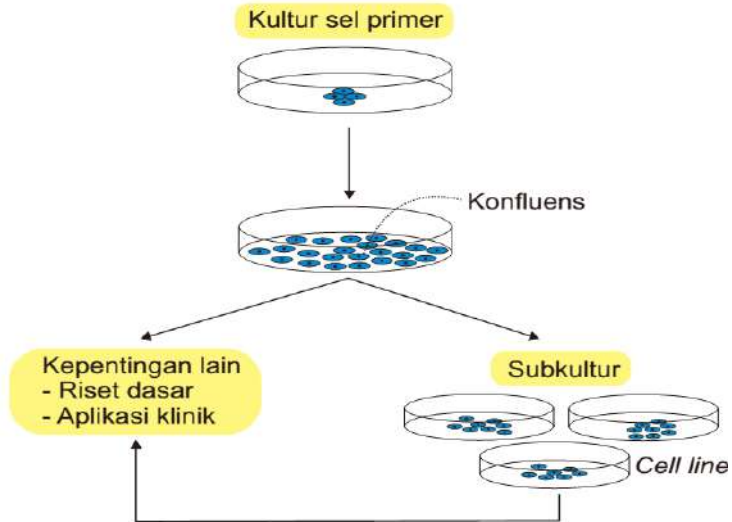
### **2.1 Pengertian kultur sel**

Kultur sel adalah cara atau teknik untuk mempropagasi (perkembangbiakan) sebuah sel secara in-vitro melalui penyemaian sel, termasuk sel punca pada tempat yang berisi medium dengan kondisi tertentu. Kultur sel dapat berupa sel primer dan atau *cell line* yang tumbuh dan proliferasi membentuk monolayer.

### **2.2 Subkultur**

Subkultur adalah proses pentransferan atau pemindahan sel kultur dari kultur sebelumnya yang telah mencapai konfluens 80% ke dalam media pertumbuhan baru, sehingga memungkinkan sel kultur tersebut berkembangbiakkembali. Subkultur dikaitkan dengan proses *passage* dan seleksi terhadap kandidat sel yang akan dilakukan

subkultur kembali, terutama terhadap kemampuan proliferasi. Kultur sel primer dan subkultur dijelaskan pada gambar 18 dibawah ini.



Gambar 18. Subkultur

Sel primer yang dikultur pada medium dengan kondisi tertentu akan tumbuh dan berkembang biak hingga konfluens 80%, sehingga dapat digunakan untuk kepentingan riset dasar atau aplikasi klinis di samping dilakukan subkultur kembali.

### 2.3 Manfaat sel kultur

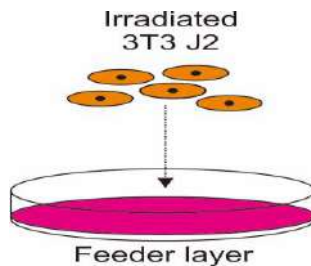
Kultur sel bertujuan untuk kepentingan berbagai penelitian dasardan atau klinik, baik bidang biologi molekuler, bioteknologi hingga aplikasi klinik. Hal ini terlihat pada pencapaian hasil ekspansi sel kultur yang terus meningkat di berbagai bidang molekuler seperti *tissue engineering* yang melahirkan konsep kloning dan teknologi *reprogrammingsel* yang melahirkan iPS yaitu rekayasa sel matur menjadi sel punca embrionik dengan menginduksi berbagai faktor transkripsi pada sel matur via lentivirus. Sel kultur juga dapat dimanfaatkan dalam terapi berbasis sel, termasuk transplantasi sel punca pada berbagai penyakit metabolik atau degenerasi.

## 2.4 Kultur sel terdiferensiasi

Sel terdiferensiasi memiliki kemampuan terbatas dalam berkembang biak, oleh karena itu tidak berkontribusi dalam menghasilkan turunan sel. Sekalipun demikian kultur sel terdiferensiasi juga dibutuhkan dalam menunjang kultur primer yaitu sebagai *feeder layer*, disamping untuk menjelaskan status diferensiasi suatu sel punca. Kultur sel terdiferensiasi sebagai *feeder layer* adalah penting untuk meningkatkan daya keterikatan sel pada disk kultur.

## 2.5 Feeder layer

*Feeder layer* adalah sel tertentu yang disemai pada lapisan permukaan *disk culture* dengan tujuan sebagai matriks penunjang bagi perlekatan dan proliferasi sel kultur. Sel yang biasa digunakan sebagai *feeder layer* adalah fibroblas dengan DNA yang telah dirusak sebelumnya baik dengan radiasi X-ray atau sinar gamma atau mitomisin-C. Sel fibroblas demikian ini tidak memungkinkan untuk berproliferasi kembali, namun masih mampu menghasilkan sekresi *growth factor* (fungsi metabolisme).



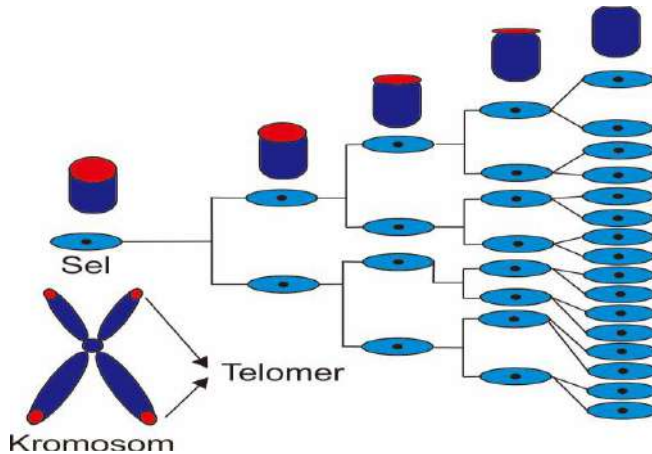
Gambar 19 Feeder layer

Sel fibroblast yang telah di radiasi disemai pada lapisan permukaan *disk culture* sebagai *feeder layer* sebagai matriks penunjang perlekatan dan proliferasi sel kultur.

## 2.6 Cell line

*Cell line* adalah setiap sel yang berasal dari subkultur sel primer dengan kemampuan replikasi terbatas. Secara umum

kemampuan pembelahan *cell line* akan menurun dan berhenti setelah melewati pembelahan 40-60 kali, sesuai teori hayflick, kemudian memasuki fase *senescence* yang ireversibel. Penurunan kemampuan pembelahan *cell line* terkait dengan pemendekan telomer yang terjadi setiap kali pembelahan.



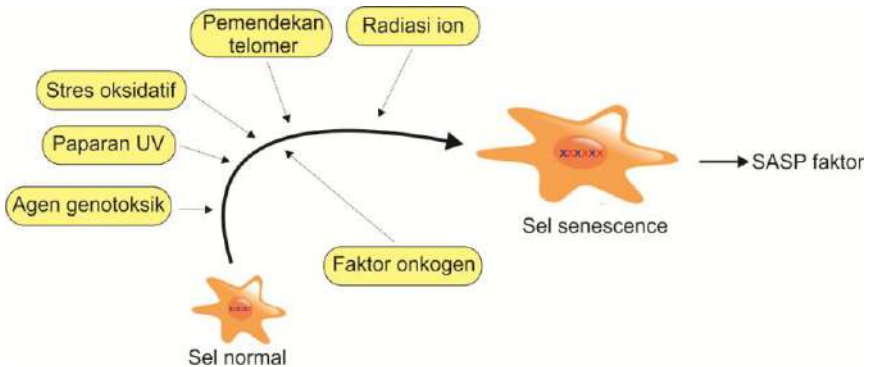
Gambar 20 Teori *hayflick* terkait *senescence*

Setiap sel yang membelah akan diikuti dengan pemendekan telomer, dan setelah pembelahan melewati 40-60 kali maka telomer akan habis. Hal ini akan memicu sel untuk memasuki fase *senescence* yang ireversibel

## 2.7 *Senescence*

*Senescence* adalah suatu keadaan dimana sel tidak lagi mampu melakukan pembelahan dan hal ini terjadi secara ireversibel. Berbagai kondisi fisiologis kultur yang tidak sesuai ikut memicu percepatan terjadinya *senescence*. Secara teoritis *senescence* dimediasi oleh pemendekan ujung telomer kromosom setiap kali pembelahan. Sel punca juga dapat mengalami *senescence* setelah memasuki fase  $G_0$  dalam jangka waktu yang lama atau ketika mengalami stres intraseluler/ ekstraseluler yang eksefis (berlebihan). Program *senescence* dimaksudkan untuk mengunci sel dalam laju siklus sel

agar tertahan dengan tujuan mencegah distribusi sinyal rusak pada turunannya, namun umumnya *senescence* berakhir dengan induksi program kematian secara apoptosis. Morfologi *senescence* dijelaskan pada gambar dibawah ini.



Gambar 21. Morfologi senescence

### 3. Kultur sel primer

Kultur primer mengandung campuran dari berbagai macam tipe sel sesuai dengan asal jaringan tersebut, sehingga diperlukan langkah seleksi untuk mendapatkan sel tertentu. Pembelahan sel yang terus-menerus, suatu saat akan memasuki tahapan dimana sel tidak lagi mampu melakukan pembelahan secara ireversibel dikenal sebagai sel *senescence*.

#### 3.1 Pengertian kultur sel primer

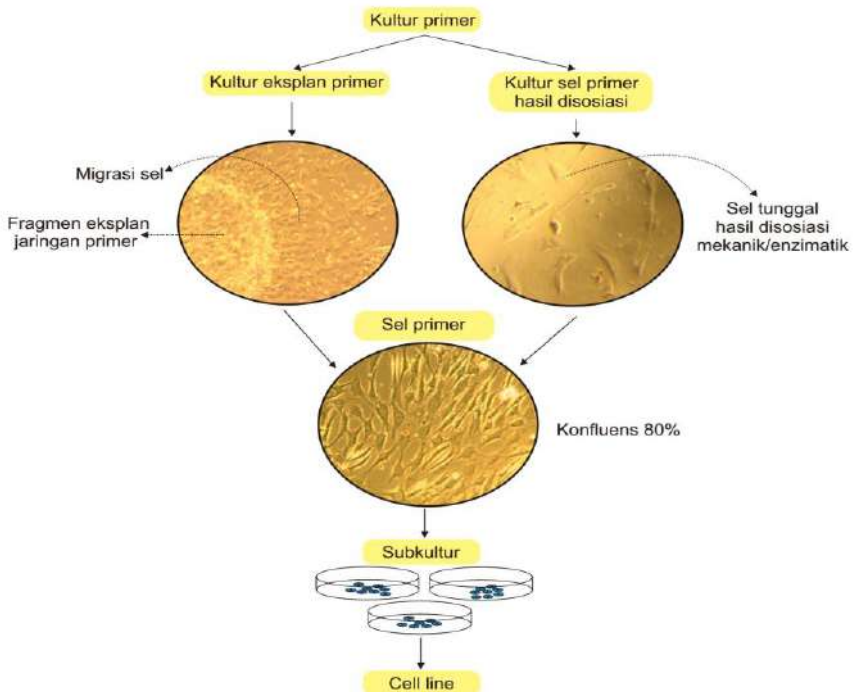
Kultur primer merupakan kultur sel yang didapat dari migrasi sel primer asal eksplan jaringan primer (potongan irisan kecil) dan atau sel primer hasil proses disosiasi mekanik/enzimatik. Sel primer yang dikultur pada kondisi tertentu akan mencapai kondisi konfluens, yaitu kondisi dimana sel mengisi seluruh permukaan ruangan disk kultur sehingga perlu dilakukan upaya pemindahan ke media lain yang dikenal sebagai proses panen sel (*harvest*) yang diikuti dengan subkultur (*passage*). Sel primer yang dihasilkan dari kultur eksplan

atau disosiasi mekanik/enzimatis akan menempel pada substrat solid dan terus berproliferasi membentuk monolayer. Sel kultur hasil *passage* kedua ini disebut sebagai *cell line*.

Secara teoritis isolasi dan kultur sel primer dapat dilakukan melalui 2 teknik dasar :

1. Teknik kultur eksplan jaringan
2. Teknik kultur disosiasi jaringan

Kultur primer dengan teknik eksplan dan disosiasi mekanik dijelaskan pada gambar di bawah ini.



Gambar 22. Kultur sel primer

Secara sistematis kultur primer terbagi atas 2, yaitu 1). Kultur primer eksplan, dimana sel primer berasal dari migrasi sisi luar fragmen eksplan, 2). Kultur sel primer hasil disosiasi mekanik/enzimatis, dimana sel berupa *single cell*. Sel primer yang tumbuh dan berkembang biak mencapai konfluens 80% kemudian dilakukan subkultur dan turunannya dikenal sebagai *cell line*.

### **3.2 Teknik kultur eksplan jaringan primer**

Kultur eksplan primer adalah kultur sel primer yang berasal dari migrasi sel asal sisi luar potongan kecil/ fragmen jaringan primer pada medium dengan kondisi tertentu. Sel primer ini akan terus tumbuh dan keluar mengisi seluruh permukaan disk/flask kultur hingga mencapai konfluens (memenuhi seluruh permukaan sel). Sel dengan kondisi konfluens 80% harus dilakukan proses subkultur. Proses subkultur dapat didahului dengan proses seleksi sel, yang didasarkan atas kemampuan sel dalam migrasi dan proliferasi.



Gambar 23. Teknik kultur eksplan jaringan primer

Teknik kultur eksplan primer dilakukan dengan cara melakukan pencacahan pada fragmen/ potongan kecil tali pusat yang telah dibersihkan sebelumnya termasuk ekstraksi vaskuler, yang kemudian diletakkan ke dalam disk dan diberikan medium lengkap.

### **3.3 Kultur sel primer disosiasi jaringan**

Kultur sel primer hasil disosiasi jaringan adalah kultur sel primer yang berasal dari proses disosiasi baik secara mekanik maupun enzimatik atau keduanya pada medium dan kondisi tertentu. Secara spesifik suspensi sel yang dihasilkan mengandung proporsi sel primer yang mampu melekat pada substrat kemudian tumbuh dan proliferasi membentuk monolayer. Sel primer dengan kemampuan proliferasi demikian kemudian diseleksi untuk disemai sebagai subkultur pertama seperti pada sel primer hasil kultur eksplan. Turunan sel yang dihasilkan dari kultur sel primer ini adalah *cell line*.

### **3.4 Seleksi sel primer**

Sel primer yang telah tumbuh dan berkembangbiak dengan baik hingga mencapai konfluens kemudian diseleksi untuk proses selanjutnya baik untuk kepentingan riset maupun subkultur. Seleksi sel primer hasil kultur eksplan didasarkan atas kemampuan sel tersebut dalam bermigrasi, sedangkan seleksi sel hasil proses subkultur atas kemampuan dalam proliferasi.

### **3.5 Perbedaan kultur eksplan dan kultur sel primer**

Secara teoritis fraksi sel yang diperoleh hasil proses disosiasi jaringan akan lebih banyak dan lebih cepat dibandingkan dengan hasil teknik eksplan. Sekalipun demikian proses disosiasi jaringan memerlukan teknik isolasi yang kompleks dan dibutuhkan akurasi optimasi yang cermat terutama terkait penggunaan enzim disosiator tertentu dan waktu inkubasi. Hal ini disebabkan karena adanya perbedaan karakteristik pada setiap jaringan, sehingga memerlukan perlakuan enzimatik disosiator yang juga berbeda pada tiap jenis jaringan (variasi respon enzimatik) dan ini berdampak pada masa inkubasi yang juga berbeda. Ketidaksesuaian aplikasi enzimatik pada jaringan target dan ketidaktepatan waktu inkubasi, akan berdampak pada kegagalan dalam mendapatkan sel primer. Kultur eksplan lebih disukai karena potensi mendapatkan sel primer jauh lebih mudah dan banyak dimana tiap potongan kecil fragmen jaringan dapat menghasilkan sel primer selama teknik dan kondisi isolasi terpenuhi. Sisi lain fragilitas sel primer paska disosiasi enzimatik juga tinggi sehingga berpotensi mengganggu pertumbuhan sel, dibandingkan dengan hasil eksplan yang relatif tidak ada.

## **4. Kondisi optimal kultur**

Pertumbuhan sel yang sempurna membutuhkan kondisi tertentu guna mempertahankan keberlangsungan fungsi metabolisme dan biologik sel secara stabil baik pada kultur primer maupun *cell linecontinuous*. Hal ini dilakukan dengan cara meniru kondisi fisiologis

jaringan in-vivo et in-situ yang kemudian diaplikasikan dalam kultur sel. secara teoritis faktor tersebut berupa substrat atau medium yang menyediakan nutrisi baik asam amino, karbohidrat, vitamin dan mineral di samping *nutrient essential* berupa *growth factor* dan hormonal. Faktor lain yang juga penting dalam menunjang kultur sel adalah konsentrasi O<sub>2</sub> dan atau CO<sub>2</sub>, di samping lingkungan psikokimia, berupa pH, tekanan osmotik dan temperatur. Secara spesifik semua faktor yang mempengaruhi kondisi optimum sel kultur dapat dibagi menjadi 2 yaitu :

1. Kondisi fisiologis kultur
2. Lingkungan mikroseluler kultur

#### **4.1 Kondisi fisiologis kultur**

Kondisi fisiologi kultur adalah kondisi kultur yang telah disesuaikan dengan kondisi in-vivo, sehingga sel kultur dapat beradaptasi dengan baik pada kondisi tersebut. Secara spesifik kondisi fisiologis selkultur memiliki 4 faktor, yaitu;

1. Suhu

Suhu yang diperlukan dalam kultur sel adalah suhu yang sesuai dengan fisiologi tubuh yaitu 37°C.

2. pH

pH yang digunakan dalam kultur sel adalah pH 7,2-7,4 (netral). Fenol merah biasanya ditambahkan dalam medium sebagai indikator pH, yaitu dengan memantau perubahan pH secara kolorimetri

3. Osmolaritas

Osmolaritas terkait dengan konsentrasi partikel yang terlarut dalam medium sel kultur.

4. Tekanan CO<sub>2</sub>

Tekanan CO<sub>2</sub> yang dibutuhkan dalam kultur adalah 5%.

#### **4.2 Lingkungan mikroseluler kultur**

Lingkungan mikroseluler kultur adalah kondisi lingkungan sekitar(*niche*) sel kultur berupa substratum yang menyerupai keadaan jaringan in-vivo. Secara spesifik substratum kultur berupa *feeder layer*

yang telah disemai pada permukaan disk kultur dan disuplementasi oleh medium kultur. Lingkungan mikroseluler kultur dapat dibagi menjadi 2, yaitu :

1. Disk kultur

Disk kultur merupakan permukaan tempat dimana sel kultur melekat dan tumbuh. Hal ini disebabkan karena permukaan disk tersebut telah dilapisi oleh *feeder layer* dengan matriks ekstraseluler baik kolagen, serum, laminin, gelatin dan atau fibronectin. Penggunaan tipe disk/ flask kultur harus disesuaikan dengan densitas sel yang akan disemai. Berdasarkan densitas sel maka Well/ flask/ disk dapat dibagi menjadi tabel di bawah ini.

Tabel 2. Well, flask dan disk

Well			
Deskripsi	Kapasitas maksimum sel	Volume medium (mL)	Pertumbuhan (cm <sup>2</sup> )
96-Well	0,32 x 10 <sup>5</sup>	0,1-0,2	0,32
48-Well	0,8 x 10 <sup>5</sup>	0,3-0,6	1
24-Well	1,9 x 10 <sup>5</sup>	0,5-1,2	1,88
12-Well	3,8 x 10 <sup>5</sup>	2,0-3,0	3,83

Flask			
Deskripsi	Kapasitas maksimum sel	Volume medium (mL)	Pertumbuhan (cm <sup>2</sup> )
T-25	2,5 x 10 <sup>6</sup>	5,0-10,0	25
T-75	7,5 x 10 <sup>6</sup>	15-25	75
T-150	15 x 10 <sup>6</sup>	30-50	150
T-175	17,5 x 10 <sup>6</sup>	35-60	175

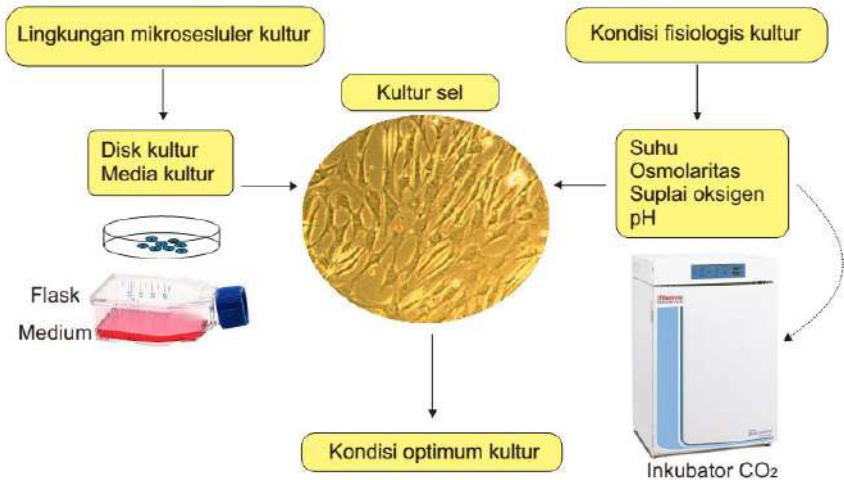
Disk			
Deskripsi	Kapasitas maksimum sel	Volume medium (mL)	Pertumbuhan (cm <sup>2</sup> )
35	0,8 x 10 <sup>6</sup>	1,0-2,0	8
60	2,1 x 10 <sup>6</sup>	4,0-5,0	21
100	5,5 x 10 <sup>6</sup>	10,0-12,0	55
150	14,8 x 10 <sup>6</sup>	28,0-32,0	148

2. Media kultur

Media kultur adalah medium tertentu yang menyediakan berbagai molekul nutrisi terlarut air sebagai sumber pertumbuhan dan penunjang aktifitas metabolisme sel. Berdasarkan kebutuhan utama

sel kultur, maka komponen media kultur dapat dibagi menjadi 3 yaitu :

- 1) Asam amino
- 2) Faktor pertumbuhan
- 3) Hormonal



Gambar 24. Kondisi optimal kultur

Sel kultur tumbuh secara optimum dipengaruhi oleh 2 faktor, yaitu 1) Kondisi fisiologis kultur berupa suhu, pH, osmolaritas dan suplai oksigen yang seluruhnya dikontrol melalui inkubator CO<sub>2</sub> 2) Kondisi lingkungan mikroseluler kultur berupa disk/flask dan media kultur

## 5. Media kultur

Kebutuhan sel kultur akan berbagai komponen nutrisi adalah bervariasi tergantung pada tipe dan jenis sel. Perbedaan ini memungkinkan untuk membuat formulasi media yang sesuai dengan sel kultur.

### 5.1 Pengertian media kultur

Media kultur sel adalah campuran kompleks berbagai komponen berupa asam amino, karbohidrat, vitamin, prekursor metabolisme, faktor pertumbuhan, hormon dan garam elektrolit.

Secara teoritis medium merupakan faktor penting dalam kultur sel dan jaringan karena komponen medium kultur merupakan *nutrient essential* bagi aktifitas metabolisme, pertumbuhan dan proliferasi sel.

## **5.2 Fungsi media kultur dalam buffer pH**

Media kultur juga berperan dalam menjaga pH dan osmolaritas sistem kultur di samping sebagai penyangga nutrisi esensial. Secara teoritis pH dipertahankan oleh satu atau dua sistem buffer baik melalui CO<sub>2</sub>/ natrium bikarbonat atau fosfat dan atau HEPES. Fenol merah sebagai indikator pH ditambahkan ke dalam medium untuk memantau adanya perubahan pH pada sel kultur secara kalorimetrik.

## **5.3 Klasifikasi medium**

Mengingat kompleksitas formulasi medium dan variasi karakteristik sel kultur, maka medium diklasifikasikan berdasarkan atas :

1. Komposisi *nutrient* :
  - 1) Medium berisi molekul *precursor* biosintetik anabolisme sel,
  - 2) Medium berisi molekul katabolik metabolisme energi,
  - 3) Medium berisi vitamin,
  - 4) Medium berisi ion elektrolit dengan katalitik, buffer pH dan osmolaritas.

2. Media kultur yang umum digunakan meliputi:

- 1) Medium EMEM

Medium *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM) adalah medium simpel yang sering difortifikasi dengan suplemen atau serum kadar tinggi. EMEM digunakan secara luas untuk kultur sel L dan HeLadan MSC. Medium ini mengandung larutan *earle's balanced salt*, asam amino non-esensial dan sodium piruvat.

- 2) Medium DMEM

Medium *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) adalah medium dengan kadar asam aminodua kali lebih tinggi

dibandingkan EMEM dan empat kali untuk kadar vitamin. Secara spesifik formulasi orisinal DMEM mengandung 1,000 mg/L glukosa dan 4,500 mg/L.

3) RPMI-1640

RPMI-1640 adalah medium yang digunakan secara luas terutama pada kultur sel dalam suspensi (limfosit darah perifer), HSC dan sel dengan pertumbuhan monolayer seperti sel MCF-7 kanker payudara.

4) Medium IMDM

Medium *Iscove's Modi ed Dulbecco's Medium* (IMDM) diformulasikan untuk pertumbuhan sel limfosit dan hibridoma.

## **6. Serum kultur**

Serum medium memiliki peran sentral dalam proses kultur sel. Hampir seluruh aktifitas proliferasi sel kultur disuplementasi oleh keberadaan serum dalam bentuk *foetal bovine serum* (FBS) dengan konsentrasi yang bervariasi 10-20%. Secara spesifik serum berfungsi sebagai :

1. Faktor hormonal

Serum mengandung berbagai hormonal penting yang mampu menstimulasi pertumbuhan dan proliferasi sel, di samping mempromosikan diferensiasi.

2. Protein pembawa

Serum mengandung beberapa protein pembawa untuk hormon (*transcortin*), mineral dan elektrolit (transferin) dan lipid (lipoprotein).

3. Faktor perlekatan dan penyebaran

Serum berperan sebagai faktor perlekatan bagi sel yang mulai tumbuh dan bertunas.

4. Faktor stabilisasi dan detoksifikasi

Serum merupakan faktor stabilisasi bagi sel dalam mempertahankan pH dengan cara menghambat aktifitas protease baik secara langsung melalui  $\alpha$ -antitrypsin or  $\alpha$ 2-macroglobulin atau

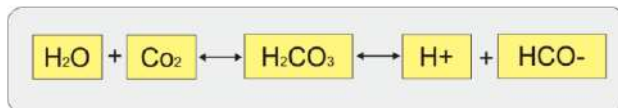
secara tidak langsung dengan *unspecific sink* (wastafel non spesifik). Serum juga berfungsi sebagai detoksifikasi terhadap molekul toksik lain.

## 7. Sistem buffer dan sodium bikarbonat

Sel memproduksi CO<sub>2</sub>, namun juga membutuhkan CO<sub>2</sub>, meskipun dalam jumlah sedikit untuk pertumbuhan dan kehidupan. CO<sub>2</sub> terlarut air akan diseimbangkan oleh ion bikarbonat. Hal ini dimanfaatkan pada banyak medium dengan memformulasikan reaksi CO<sub>2</sub>/ bikarbonat untuk buffer PH medium.

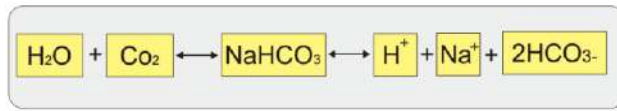
### 7.1 Pengertian buffer PH medium

Buffer PH medium sel kultur adalah larutan medium yang dapat mempertahankan PH tertentu pada medium dimana sel dikultur. Dasar teorinya adalah CO<sub>2</sub> merupakan molekul yang mudah larut ke dalam cairan, termasuk medium sehingga akan bereaksi dengan air membentuk asam karbonat dan H<sup>+</sup> yang berakibat PH medium menurun (asam) seperti reaksi dibawah ini:



### 7.2 Sodium bikarbonat dalam buffer PH medium

Sel kultur aktif melakukan fungsi metabolisme yang berkonsekuensi menghasilkan produk CO<sub>2</sub> lebih banyak. Hal ini akan berdampak pada pergeseran reaksi menunjukkan yang menghasilkan PH asam. Suplementasi sodium bikarbonat pada medium sel kultur akan mengeser reaksi kembali normal sehingga buffer PH medium menjadi optimum dengan range 7.2-7.4. Secara spesifik sodium bikarbonat meregulasi CO<sub>2</sub> membentuk Na<sup>+</sup> yang berakibat PH menjadi netral kembali, seperti reaksi berikut:

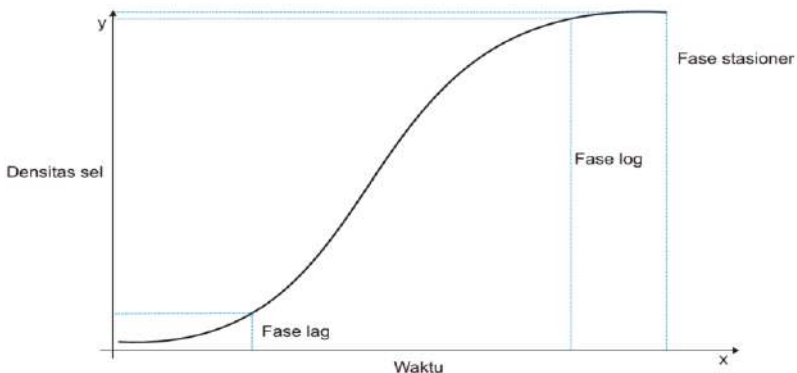


## 8. Karakteristik pola pertumbuhan sel

Pertumbuhan sel kultur memiliki karakteristik pola pertumbuhan tertentu yang dimulai dengan aktifitas adaptasi, kemudian tumbuh perlahan dan berlanjut dengan aktifitas proliferasi secara eksponensial serta berakhir dengan keadaan stasioner dimana terjadi penurunan pertumbuhan hingga terhenti. Oleh karena itu untuk menjaga sel kultur dalam densitas optimum pertumbuhan dan proliferasi maka sel kultur harus dilakukan subkultur (dipisahkan). Siklus sel pertumbuhan digambarkan sebagai grafik plot semi-logaritmik dengan menilai densitas sel dan waktu kultur. Secara spesifik kurva interval siklus pertumbuhan sel kultur terbagi atas 3 fase, yaitu :

1. Fase lag
2. Fase log
3. Fase stasioner

Ketiga fase di atas dijelaskan pada gambar di bawah ini.



Gambar 25. Fase lag, log dan stasioner dalam pertumbuhan

## **8.1 Fase lag (laten)**

Fase lag adalah periode pertama dalam kultur, dimana sel mulai beradaptasi dengan lingkungan kultur paska disemai kembali. Fase ini belum menunjukkan aktifitas pertumbuhan sel sehingga disebut periode laten. Faselag membutuhkan waktu hingga 48 jam, namun pada sel tertentu, termasuk punca lebih singkat yaitu 12-24 jam. Periode singkat ini memungkinkan sel kultur untuk *recovery* akibat proses tripsinasi dan merekonstruksi sitoskeleton serta mensekresi matrik untuk memfasilitasi perlekatan sel, disamping penyebaran. Lag phase akan dilanjutkan dengan log phase.

## **8.2 Fase log**

Fase log adalah periode dimana sel tumbuh dan proliferasi secara eksponensial. Sel pada periode ini mampu menduplikasi diri secara cepat dengan waktu yang dapat ditentukan, sehingga dikenal sebagai *doubling time*. Pertumbuhan sel kultur dalam periode ini dapat mencapai konfluens 80% sehingga sel memenuhi permukaan substrat yang tersedia dan menghabiskan banyak nutrisi. Ketika sel memenuhi seluruh substrat maka sel memasuki fase stasioner yang dapat menyebabkan reaksi sebaliknya. Oleh karena itu pada fase ini harus dilakukan proses subkultur.

## **8.3 Fase stasioner**

Fase plateu dimana sel kultur berhenti melakukan pertumbuhan dan proliferasi. Terdapat beberapa kemungkinan yang akan terjadi dalam fase stasioner ini, yaitu :

1. Aktifitas diferensiasi menjadi sel matur

Kondisi sel yang penuh sesak pada fase stasioner dapat memicu beberapa sel untuk berdiferensiasi menjadi sel matur yang spesifik.

2. Memasuki fase G0

Fase stasioner dapat menyebabkan beberapa sel keluar siklus sel menuju fase G0 sekalipun masih *viabile*.

Tidak disarankan untuk melakukan subkultur pada fase ini, disebabkan fraksi sel yang didapat dari fase ini pertumbuhannya lambat dan waktu *recovery* (lag fase) jauh lebih lama dibanding dengan subkultur pada fase log.

## **9. Teknik dasar kultur**

Biosafety merupakan disiplin dan sistem kontainmen untuk pencegahan terhadap mikroorganisme menular dan atau agen biologi toksik.

### **9.1 Prinsip biosafety**

Prinsip biosafety adalah melindungi peneliti/ pekerja laboratorium terhadap bahan biologi toksik dan menular dengan sistem kontainmen sistem laboratorium dasar, mulai teknik laboratoris yang tepat, peralatan keselamatan hingga proteksi terhadap mikroorganisme menular. Secara sistematis tingkat biosafety dibagi menjadi 4, sesuai dengan *Departement of health and human service US*, yaitu :

#### **1. BSL-1**

Laboratorium dengan proteksi dasar terhadap agen biologi/ bahan toksik yang berpotensi rendah dalam menyebabkan penyakit/ kesehatan manusia. Lab ini banyak digunakan dalam berbagai penelitian. Perbedaan dengan BSL-2 adalah belum menggunakan biosafety cabinet (BSC) kelas II dan sistem pengawasan ventilasi udara.

#### **2. BSL-2**

Laboratorium dengan proteksi menengah terhadap agen biologik/ bahan toksik yang cukup potensial dalam menyebabkan penyakit/ kesehatan manusia, misalnya bekerja dengan hepatitis-B, bakteri salmonella, dsb. Perbedaan dengan BSL-3 adalah belum menggunakan fasilitas udara antar ruang (*HEPA filter exhaust*) dan sistem pengawasan ventilasi udara.

### 3. BSL-3

Laboratorium dengan proteksi tinggi terhadap agen biologik/ bahan toksis yang berpotensi infeksius letal dalam menyebabkan kesehatan manusia, misalnya bekerja dengan *micobacterium tuberculossis* atau *avian influenza virus*. Perbedaan dengan BSL-4 adalah belum menggunakan ruang antara (ante room) yang dilengkapi air shower dan BSC kelas III.

### 4. BSL-4

Laboratorium dengan proteksi sangat tinggi terhadap agen yang berpotensi mengancam jiwa kehidupan.

## 9.2 Peralatan dasar sel kultur

Kultur sel menggunakan berbagai peralatan kultur dasar, diantaranya adalah :

#### 1. Biosafety cabinet, Incubator CO2



#### 2. Temperature centrifugation, waterbath, Refrigerator (2-8°C), freezer (-20°C dan -80°C) dan liquid nitrogen (-194°C)



3. Inverted microscope, automatic cell counter, Seperangkat mikropipet/ *serological* pipet dan sterilizer (autoclave)



### **9.3 Ruang lingkup kerja kultur sel**

Ruang lingkup kerja kultur sel adalah seluruh aspek alat dan bahan yang terlibat dalam proses kultur sel dan dilakukan dalam ruang kerja laboratorium aseptis dengan menggunakan biosafety cabinet (BSC). Isolasi sel punca dilakukan pada ruang lingkup kelas II. Secara teoritis ruang lingkup kerja kultur sel dibagi menjadi 3 kelas, yaitu :

1. Kelas I

Ruang lingkup kerja dengan proteksi personal dan lingkungan, namun belum/ tidak memproteksi material kultur terhadap potensi kontaminasi.

2. Kelas II

Ruang lingkup kerja dengan proteksi personal dan lingkungan di samping material yang berpotensi berbahaya. Kelas II dirancang untuk bekerja pada BSL level 2 dan 3 seperti pada kultur virus infeksius dan bahan karsinogenik.

3. Kelas III

Ruang lingkup kelas III didesain untuk bekerja pada BSL level 4 karena ruang lingkup kerja dapat memproteksi personal dan lingkungan material gas yang berpotensi membahayakan jiwa.

## 10. Protokol isolasi MSC asal darah

### 10.1 Konsep isolasi darah

Isolasi MSC asal darah tali pusat dan atau sumsum tulang didasarkan atas konsep sentrifugasi dengan perbedaan densitas sel yang dikenal sebagai *density gradient centrifugation*. Semua tahapan isolasi dan kultur dilakukan dalam biosafety cabinet (BSC) dan diinkubasi pada incubator CO<sub>2</sub> dengan p CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 37°C.

### 10.2 Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam isolasi MSC asal sumsum tulang adalah sebagai berikut :

1. *Conical tube* 5 mL yang berisi heparin
2. *Conical tube* 5 mL yang berisi *ficoll-paque density gradient*
3. *Conical tube* 15 mL dan 50 mL
4. Mikropipet 100-1000 µL dengan *blue tip*
5. Flask T-25 dan T-75
6. Fosfat buffer saline (PBS)
7. Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) – low glucose
8. Penicillin/streptomycin dan Fungizone
9. Fetal bovine serum (FBS)
10. Darah asal tali pusat atau sumsum tulang

### 10.3 Prosedur isolasi dan kultur MSC

#### 1. Preparasi *peripher blood mononuclear cell* (PBMC)

- 1) Siapkan *conical tube* 5 mL yang telah berisi darah asal tali pusat atau sumsum tulang, 5 mL yang berisi cairan PBS dan 5 mL yang berisi cairan ficoll,
- 2) Pembuatan medium komplit yang terdiri atas :
  - Medium DMEM low glucose
  - FBS 10-20%
  - L-glutamin 2nm
  - Antibiotik penicilin-streptomycin 100 u/mL
  - *Deksamethasone* (optional)

## 2. Isolasi PBMC

- 1) Homogenisasi darah dengan cara membolak-balikan *conical tube* yang berisi darah,



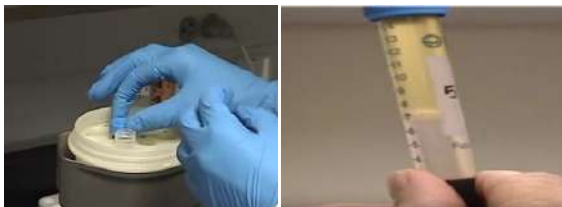
- 2) Transfer darah pada conical tube 50 mL dan dilusikan dengan cairan PBS 5 mL, kemudian dilakukan homogenisasi,



- 3) Masukkan darah yang telah terdilusi tersebut pada conical 15 mL yang telah berisi cairan *ficoll* 5 mL melalui dinding conical secara perlahan pada suhu kamar,



- 4) Dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 450-480 g selama 20-30 menit, hingga terbentuk *buffy coatlayer* yaitu lapisan putih berkabut di tengah, di antara 3 lapisan; lapisan paling bawah (eritrosit), lapisan tengah (*ficoll*) dan lapisan atas (plasma terdilusi),



- 5) Ambil lapisan *buffy coat* secara perlahan dengan menggunakan pipet steril dan transfer pada *conical* 50 mL,



- 6) Cuci suspensi *buffy coat* dengan cara mentransfer PBS ke dalam *conical* 50 mL yang telah berisi *buffy coat* dengan rasio 3:1 kemudian resuspensi hingga homogen, lalu sentrifugasi dengan kecepatan 450-480 g selama 10-15 menit hingga didapatkan supernatan dan *pellet*. Ulangi hingga 2 kali.



- 7) Buang supernatan hingga tersisa *pellet* lalu masukan medium komplet kemudian diresuspensi hingga homogen.



### **3. Kultur PBMC**

- 1) Masukkan suspensi sel ke dalam flask yang berisi medium komplet dengan komposisi FBS 10-20%, L-glutamin 2 nM *penicilin-streptomycin* 1% dan fungizone 0,5%, lalu monitor keadaan sel dengan menggunakan mikroskop *inverted*,
- 2) Inkubasikan flask ke dalam inkubator CO<sub>2</sub> pada p CO<sub>2</sub> 5% dengan temperatur 37°C selama beberapa hari.

#### **4. Seleksi MSC dan pemeliharaan**

- 1) Lakukan seleksi sel punca (MSC) pada PBMC di hari ke-3 hingga ke-5 inkubasi dengan cara membuang sel yang mengambang dan melayang dalam flask,
- 2) Monitor kandidat MSC dengan menggunakan mikroskop *inverted* berupa sel yang melekat pada permukaan flask dengan karakteristik lonjong seperti sel fibroblas,
- 3) Lakukan perawatan MSC dengan cara mengganti separuh medium komplit setiap 2-3 hari hingga sel tumbuh konfluens,
- 4) Memonitor dan mendeteksi kontaminasi yang terjadi dalam flask dengan cara visual melalui perubahan warna dari medium menjadi lebih gelap dan keruh, serta melalui mikroskop *inverted* untuk melihat keberadaan mikroba dalam flask,

#### **5. Panen MSC**

- 1) Panen MSC dilakukan ketika MSC telah mencapai konfluens 80% yang ditandai dengan keberadaan MSC dalam flask yang cukup padat,
- 2) Prosedur panen dijelaskan pada poin selanjutnya.

## **11. Prosedur isolasi-kultur MSC asal tali pusat**

### **11.1 Konsep isolasi MSC jaringan talipusat**

Jaringan tali pusat memiliki karakteristik yang unik dimana keberadaan MSC lebih banyak ditemukan pada jaringan *wharton jelly* yaitu bangunan dengan struktur seperti jelly. Isolasi MSC asal tali pusat dapat dilakukan dengan 2 teknik, yaitu :

#### 1. Teknik eksplan

Kultur eksplan menggunakan potongan fragmen kecil dari *warthon jelly* sebagai sumber sel (kandidat MSC).

#### 2. Teknik disosiasi mekanik/enzimatik

Kultur disosiasi mekanik/enzimatik menggunakan sel primer (kandidat MSC) hasil proses disosiasi secara mekanik dan atau enzimatik menggunakan enzim kolagenase dan atau tripsin.

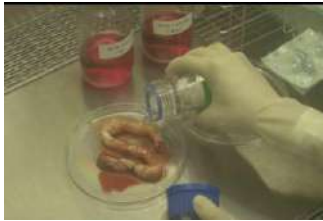
## 11.2 Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam isolasi MSC asal tali pusat adalah sebagai berikut :

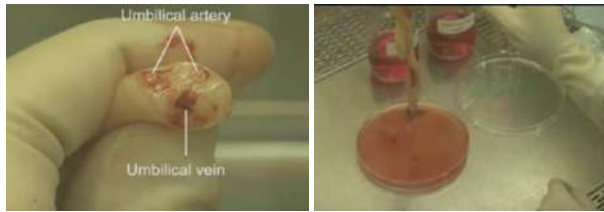
1. *Conical tube* 15 mL dan 50 mL
2. Mikropipet 100-1000  $\mu$ L dengan *blue tip*
3. Flask T-25 dan T-75
4. Phosfat buffer saline (PBS)
5.  $\alpha$ -modified eagle media ( $\alpha$ -MEM)
6. Penicillin/streptomycin dan Fungizone
7. Fetal bovine serum (FBS)
8. Petridisk
9. Gunting, scapel, forcep dan pinset
10. Tali pusat

## 11.3 Prosedur isolasi dan kultur MSC teknik eksplan

1. Preparasi isolasi dan kultur MSC dengan teknik eksplan
  - 1) Masukkan warthon jelly dalam *conical tube* 50 mL yang telah berisi cairan PBS dan antibiotik pen-strep 1% dan fungizone 0,25% dalam kondisi dingin. Proses dilakukan dengan steril,



- 2) Pembuatan medium komplit yang terdiri atas :
  - Medium  $\alpha$ -MEM
  - FBS 10-20%
  - L-glutamin 2nm
  - Antibiotik penicilin-streptomycin 100 u/mL
2. Isolasi MSC dengan teknik eksplan
  - 1) Tali pusat dipotong menjadi ukuran lebih kecil dengan panjang sekitar 4 cm, dicuci dengan cairan PBS 2-3 kali. Semua prosedur dilakukan dalam BSC secara steril,



- 2) Buang darah yang terjebak dalam pembuluh darah tali pusat secara menekan dengan menggunakan *curve forcep*, kemudian dicuci ulang hingga bersih,



- 3) Ekstraksi pembuluh darah tali pusat (arteri-vena) dengan cara membuat insisi horizontal pada permukaan eksternal jaringan menggunakan scapel steril, kemudian ambil pembuluh darah (setelah dilakukan disosiasi jaringan) menggunakan *forcep* dan dicuci dengan PBS hingga bersih,
- 4) Ekstraksi *warthon jelly* dengan menggunakan forcep dan gunting setelah dilakukan disosiasi jaringan, yaitu berupa jaringan yang lunak, mengandung hidrofis, seperti *jelly*, kemudian masukkan ke dalam disk dan cuci hingga bersih.
- 5) Potong, iris dan cacah *warthon jelly* menjadi fragmen kecil berukuran 1-3 mm menggunakan scapel dan gunting, kemudian cuci hingga bersih.



3. Kultur MSC asal *warthon jelly*

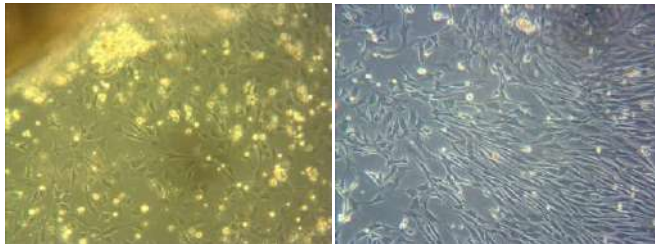
- 1) Transfer fragmen cacahan *warthon jelly* ke dalam disk/ flask dan susun secara proporsional agar tidak mengganggu pertumbuhan sel di hari selanjutnya,
- 2) Masukkan medium komplit ke dalam cacahan secara perlahan dan tidak berlebihan,

4. Pemeliharaan MSC

- 1) Monitor kandidat MSC dengan menggunakan mikroskop *inverted* berupa sel yang melekat pada permukaan flask dengan karakteristik lonjong seperti sel fibroblas,



- 2) Lakukan pemeliharaan MSC dengan cara mengganti separuh medium komplit setiap 2-3 hari hingga sel tumbuh konfluens,



- 3) Memonitor dan mendeteksi kontaminasi yang terjadi dalam flask dengan cara visual melalui perubahan warna dari medium menjadi lebih gelap dan keruh, serta melalui mikroskop *inverted* untuk melihat keberadaan mikroba dalam flask,

5. Panen MSC

- 1) Panen MSC dilakukan ketika MSC telah mencapai konfluens 80% yang ditandai dengan keberadaan MSC dalam flask yang cukup padat,
- 2) Prosedur panen dijelaskan pada poin selanjutnya.

## **12. Panen MSC**

Panen sel kultur merupakan aktifitas yang terjadi ketika sel telah mencapai konfluens 80%.

### **12.1 Konsep panen MSC**

Panen MSC merupakan aktifitas pelepasan sel kultur (MSC) yang melekat pada permukaan flask secara mekanik/ enzimatik pada kondisi tertentu. Secara spesifik dibutuhkan enzim tertentu dengan kemampuan litik terhadap substrat tempat sel kultur tersebut melekat. Secara spesifik enzim yang digunakan adalah tripsin, kolagenase.

### **12.2 Alat dan bahan**

Alat yang digunakan dalam panen MSC asal tali pusat adalah sebagai berikut :

1. *Conical tube* 15 mL dan 50 mL
2. Flask yang berisi MSC konfluens
3. Medium komplet
4. Mikropipet 100-1000  $\mu$ L dengan *blue tip*
5. Phosfat buffer saline (PBS)

### **12.3 Prosedur panen MSC**

1. Ambil Flask yang berisi sel kultur (MSC) dari incubator CO<sub>2</sub>, kemudian amati morfologis sel dan tanda kontaminasi dengan mikroskop inverted. Proses panen dapat dilanjutkan ketika populasi sel telah mencapai 80%. Seluruh proses dilakukan di dalam BSC.



2. Buang medium dalam flask menggunakan mikropipet hingga seluruh medium tidak tersisa,



3. Cuci flask yang berisi sel kultur menggunakan PBS dengan cara menggoyangkan flask secara perlahan dan dinamis kemudian dibuang, ulangi proses hingga 2-3 kali dan pastikan flask dalam keadaan bersih.



4. Masukkan tripsin-EDTA 0.25% sebanyak 800-1000umL ke dalam flask T25 yang telah bersih kemudian digoyang perlahan hingga merata, kemudian inkubasi dalam incubator CO<sub>2</sub> pada suhu 37°C dan p 5% CO<sub>2</sub> selama 5 menit.



5. Ambil flask yang telah diinkubasi tersebut dari inkubator CO<sub>2</sub> dan lakukan proses *tapping* untuk membantu pelepasan sel secara mekanik, kemudian amati di bawah mikroskop inverted untuk memastikan seluruh kultur sel sudah terlepas dari flask. Sel kultur yang telah terlepas ditandai dengan sel yang melayang dengan bentuk bulat.
6. Lakukan proses inaktivasi terhadap aktifitas tripsin dalam flask dengan cara memberi medium inaktivasi dengan formulasi 1:2, lalu ambil cairan yang berisi sel-trypsin-medium komplet dan pindahkan ke conical tube steril dan lakukan pembilasan ulang untuk memastikan tidak ada sel yang tersisa.



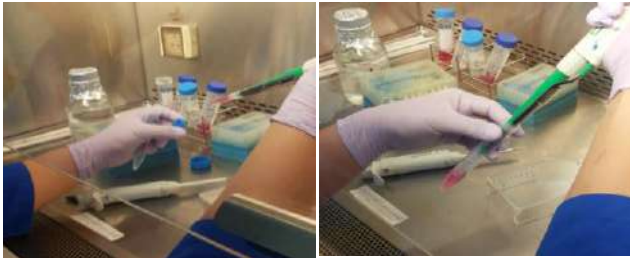
7. Lakukan sentrifugasi terhadap *conical* tube berisi sel-trypsin-medium komplet dengan kecepatan 1900 rpm selama 10 menit.



- Amati keberadaan *pellet* pada conical tube hasil sentrifugasi, kemudian buang supernatan hingga tersisa *pellet*.



- Cuci *pellet* dengan meresuspensi menggunakan cairan PBS, kemudian sentrifugasi dengan kecepatan 1900 rpm selama 10 menit hingga didapatkan *pellet*. Dilakukan perhitungan yang akan dijelaskan pada poin selanjutnya.



## **13. Perhitungan MSC (*Cell counting*)**

### **13.1 Konsep perhitungan sel**

Perhitungan sel dibutuhkan untuk mengestimasi jumlah sel yang terkandung dalam kultur dengan menggunakan hemositometer baik untuk kepentingan penelitian/ aplikasi klinis maupun dalam memutuskan disk atau flask baru yang sesuai dengan jumlah sel pada proses subkultur.

### 13.2 Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam perhitungan MSC asal tali pusat adalah sebagai berikut :

1. *Conical tube* 15 mL/ 50 mL yang berisi suspensi sel kultur
2. Mikropipet 100-1000  $\mu\text{L}$  dengan *blue tip*
3. Hemositometer/ *cell counter*
4. Tripan blue 0,4%

### 13.3 Prosedur perhitungan sel

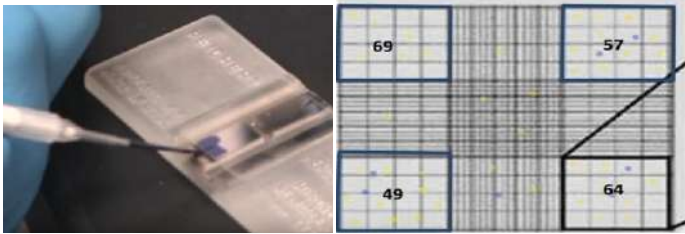
1. Ambil conical yang berisipellet hasil sentrifugasi dengan cara membuang supernatan. Saat yang sama siapkan dan bersihkan hemositometer, lalu letakkan pada mikroskop *inverted* dan tentukan 4 bilik hitung secara jelas. Semua proses dilakukan dalam BSC.



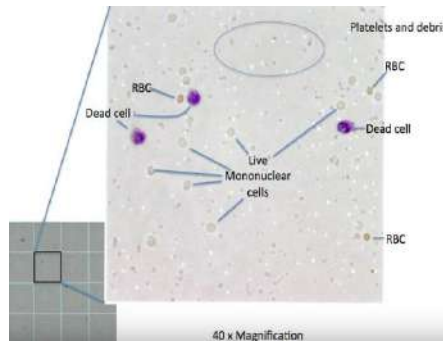
2. Masukkan PBS 1 mL ke dalam conical berisi *pellet* tersebut kemudian resuspensi hingga merata.
3. Ambil 10  $\mu\text{L}$  suspensi sel dan tambahkan 90  $\mu\text{L}$  *tryphan blue* 0,4% letakkan pada kertas film dan, kemudian resuspensi.



4. Masukkan suspensi sel dalam *tryphan blue* pada hemositometer dengan cara menyisipkan di bawah *deck glass* hemositometer hingga merata, kemudian hitung jumlah sel pada ke empat bilik di bawah mikroskop *inverted*.



5. Lakukan perhitungan sel dengan rumus  $\frac{\Sigma A+B+C+D}{4} \times 10^4 \times 10^n$   
 A,B,C dan D : ke empat bilik hitung,  
 n : jumlah pengenceran (dilusi)



Sel viabel tidak berwarna, sedangkan sel non-viabel berwarna biru (tercat oleh *trypan blue*). Sekalipun demikian, ketika perhitungan lebih dari waktu 5 menit, maka sel viabel pun akan mati sehingga berwarna biru.

## **Daftar pustaka**

1. Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells*.2007; 25:1384-92.
2. Kagami H, Agata H, Tojo A. Bone marrow stromal cells (bonemarrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for bonetissue engineering: basic science to clinical translation. *Int JBiochem Cell Biol*. 2011; 43:286-9.
3. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315–7.’
4. Arutyunyan I, Elchaninov A, Makarov A, Fatkhudinov T. Umbilical Cord as Prospective Source for Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy. *Stem Cells Int*. 2016;2016:6901286.
5. de Girolamo L, Lucarelli E, Alessandri G, et al. Mesenchymal stem/stromal cells: a new "cells as drugs" paradigm. Efficacy and critical aspects in cell therapy. *Curr Pharm Des*. 2013;19(13):2459-73.
6. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007;110(10): 3499-506.
7. Kassem M. Mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential clinical applications. *Cloning Stem Cells*. 2004;6(4): 369374.
8. Bouffi C, Bony C, Courties G, Jorgensen C, Noel D. IL-6 dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PloS One*. 2010;5(12): e14247.
9. Mei SH, Haitzma JJ, Dos Santos CC, Deng Y, Lai PF, et al. Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. *Am J RespirCrit Care Med*. 2010. 182(8): 1047-1057.
10. Putra A, Ridwan FB, Putridewi AI, et al. The Role of TNF- $\alpha$  induced MSCs on Suppressive Inflammation by Increasing TGF- $\beta$  and IL-10. *Open Access Maced J Med Sci*. 2018;6(10):1779-1783.

# **BAB III**

## **EPIGENETIK DAN FAKTOR TRANSKRIPSI: STEMNESS - REPROGRAMMING**

### **Tujuan**

---

Setelah membaca bagian ini, diharapkan pembaca mengerti tentang definisi *stemness* sel punca, faktor transkripsi, epigenetik, modifikasi DNA dan histon, *remodelling* kromatin, *non-coding* RNA, peran faktor transkripsi dalam epigenetik, gen promosi diferensiasi, *soluble molecule* ekstraseluler, *reprogramming*, iPS, SCNT Transdiferensiasi dan dediferensiasi.

*Konsep stemness didasarkan atas pandangan bahwa terdapat satu properti yang sama pada setiap jenis sel punca yaitu aktivitas stemness. Stemness sebagai parameter penting dalam menilai potensi suatu pembaharuan diri dengan melibatkan faktor transkripsi. Pembaharuan diri sel punca merupakan aktifitas sirkuit regulator faktor transkripsi Oct4, Sox2 dan Nanog yang mensupresi gen promosi diferensiasi GATA4, GATA6 dan Cdx2 serta PcG sebagai faktor epigenetik. Faktor ekstrinsik ikut terlibat aktifitas stemness melalui pelepasan soluble molekul LIF dan BMP untuk mensupresi diferensiasi, sebaliknya FGF mendorong diferensiasi. Aplikasi konsep stemness dalam bentuk teknik reprogramming dan transdiferensiasi. Reprogramming memungkinkan pembelahan sel dalam dua arah termasuk mengubah kembali sel matur/ terdiferensiasi (fibroblast) menjadi sel punca embrionik dikenal sebagai induce pluripotent stem cell (iPS).*

*Catatan penulis*

## **1. Latar belakang**

Konsep *stemness* berawal dari pemikiran bahwa sel punca yang berada dalam jaringan berbeda akan mengekspresikan karakter yang juga berbeda. Sisi lain setiap sel punca mampu meregenerasi jaringan yang bukan asalnya. Hal ini mengesankan bahwa terdapat properti sel punca yang dapat dipertukarkan satu dengan lainnya, yang bersifat universal. Berbagai penelitian terkini melaporkan bahwa properti tersebut adalah ekspresi protein tertentu membentuk pola *stemness*. Secara spesifik protein tersebut berupa faktor transkripsi Oct4, Sox2, Klf4, c-myc, OSKM dan Nanog yang membentuk sirkuit regulator gen *stemness*. Aktivitas sirkuit regulator *stemness* ini akan memicu peningkatan proses pembaharuan diri sel punca dan saat yang sama mensupresi gen promosi diferensiasi Gata6 dan Cdx2. Sisi lain potensi *stemness* juga dipengaruhi oleh faktor epigenetik melalui protein PcG dan *soluble molecule* BMP dan LIF yang disekresi sel punca secara autokrin.

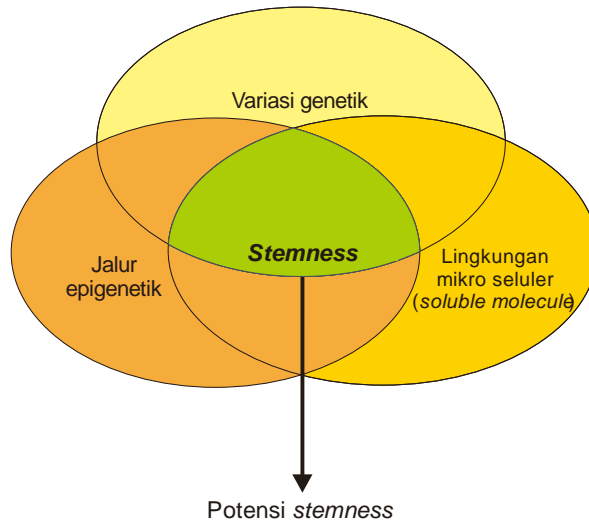
Penelitian ontogenesis sebelumnya mengungkapkan bahwa arah nasib suatu sel adalah berjalan searah, sehingga program diferensiasi berjalan dari sel punca menuju sel matur bukan sebaliknya. Sekalipun demikian hasil penelitian terkini melaporkan bahwa faktor transkripsi yang terekspresi secara kuat dalam suatu sel akan berdampak pada peningkatan potensi *stemness* pluripoten sel tersebut. Teori ini membuktikan bahwa arah ontogenesis dapat dirubah melalui induksi serangkaian faktor transkripsi dan proses epigenetik. Hal ini memungkinkan untuk melakukan program ulang terhadap sel matur menjadi sel punca pluripoten, dikenal sebagai *reprogramming*. Secara spesifik induksi faktor transkripsi Oct4, Sox2, Klf4 dan c-myc, OSKM mampu memprogram ulang sel fibroblas menjadi sel punca embrionik, yang dikenal sebagai iPS (*induce pluripotent stem cells*).

Lebih lanjut, pengenalan berbagai teknik *reprogramming* dan transdiferensiasi sebagai rekayasa molekuler dibutuhkan sebagai bentuk aplikasi teori potensi *stemness*. Pemahaman yang baik terkait protein faktor transkripsi, gen promosi diferensiasi, protein epigenetik dan *soluble molecule* menjadi hal krusial dalam *reprogramming* suatu sel. Mengingat begitu pentingnya potensi *stemness* dalam rekayasa seluler maka, perlu dilakukan pemahaman mendasar terkait faktor transkripsi, mulai terminologi, klasifikasi dan pembaharuan diri dan prinsip *reprogramming*.

## **2. *Stemness* sel punca**

Sel punca harus membuat pilihan apakah melakukan pembaharuan diri atau diferensiasi paska terpapar faktor ekstrinsik. Hal ini tergantung pada properti *stemness* yang dimiliki oleh sel punca, yaitu pola ekspresi gen pembaharuan diri dalam bentuk faktor transkripsi pluripoten yang terintegrasi dengan gen promosi diferensiasi, protein epigenetik dan *soluble molecule*. Peningkatan ekspresi gen pembaharuan diri akan berkorelasi dengan peningkatan jumlah sel punca yang berdampak pada peningkatan potensi *stemness*.

Sekalipun potensi *stemness* sel punca embrionik pluripoten jauh lebih kuat dibandingkan sel punca dewasa multipoten, namun pada keduanya masih memiliki kesamaan pola *stemness*.



Gambar 26. *Stemness* sel punca

Terdapat properti yang sama antara populasi sel punca yaitu pola ekspresi gen yang berupa faktor transkripsi pluripoten, jalur epigenetik dan lingkungan mikroseluler yang berkaitan dengan potensi *stemness*. Potensi *stemness* merupakan akumulasi aktivitas pembaharuan diri dan supresi gen promosi diferensiasi.

## 2.1 Pengertian *stemness*

*Stemness* adalah properti sel punca berupa potensi pluripoten dalam memperbaharui diri dengantetap mempertahankan status tidak diferensiasi. Secara spesifik properti ini berupa pola ekspresi gen pluripoten yang membentuk sirkuit regulator *stemness*. Sirkuit *stemness* ini berupa protein faktor transkripsi pluripoten yang terintegrasi dengan protein epigenetik, gen promosi diferensiasi dan *soluble molecule* sebagai berikut. Sel punca dikatakan poten ketika mampu melakukan aktivitas pembaharuan diri sekalipun *niche* didominasi oleh faktor diferensiasi. Secara spesifik suatu sel punca

dikatakan *stemness* ketika mampu memperbaharui diri secara terus menerus dengan mempertahankan status tidak berdiferensiasi hingga propagasi ke 40-50. Potensi *stemness* suatu sel punca akan menurun secara signifikan seiring dengan diferensiasi menjadi sel matur.

## **2.2 Regulasi *stemness***

Regulasi *stemness* menentukan arah pembelahan sel punca, apakah menuju proses pembaharuan diri dan atau diferensiasi. Secara spesifik regulasi *stemness* melalui supresi jalur diferensiasi dan mendorong peningkatan aktivitas pembaharuan diri. Properti *stemness* pluripoten membentuk sirkuit regulator faktor transkripsi yang terdiri atas Oct4, Sox2 dan Nanog. Sirkuit regulator ini terintegrasi dengan faktor transkripsi lain yaitu Klf4 dan Ronin. Sisi lain faktor epigenetik *Polycomb family G* (PcG) dan faktor promosi diferensiasi Gata6 dan Cdx2 serta faktor *soluble molecule* BMP, LIF dan FGF ikut terlibat dalam regulasi *stemness*.

Secara sistematis faktor *stemness* pluripoten dibagi menjadi 4 kelompok utama, yaitu:

1. Faktor transkripsi pluripoten utama:
  1. Oct4
  2. Sox2
  3. Nanog
- Faktor transkripsi pluripoten penunjang:
  1. Klf4
  2. Ronin
2. Faktor epigenetik:

*Polycomb family G* (PcG),
3. Faktor gen promosi diferensiasi :
  1. Gata6
  2. Cdx2
4. Faktor *soluble molecule* pluripoten utama:
  1. BMP
  2. LIF

3. Wnt

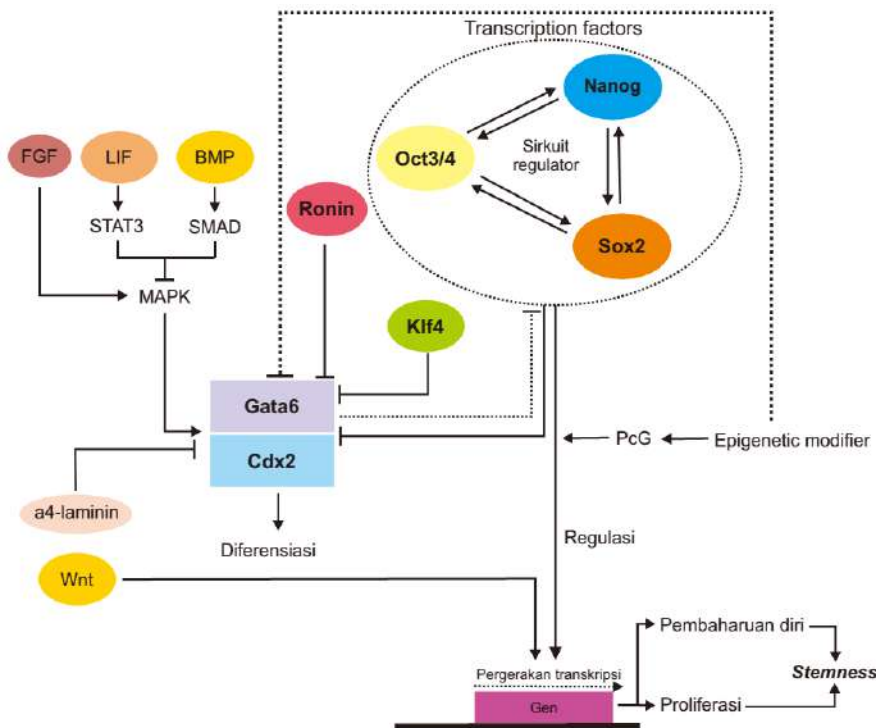
Faktor *soluble molecule* pluripoten penunjang:

1. a4-laminin

Faktor *soluble molecule* diferensiasi utama

1. FGF

Keterlibatan 4 faktor *stemness* dalam meregulasi pluripoten dijelaskan dalam gambar 25 dibawah ini.



Gambar 27. Regulasi *stemness*

Aktivasi faktor transkripsi utama Oct4, Sox2 dan Nanog membentuk sirkuit regulator untuk mempertahankan pluripoten, disamping mensupresi gen terkait promosi diferensiasi Gata6 dan Cdx2. Sisi lain faktor transkripsilain Klf4 dan Ronin juga ikut mensupresi gen promosi diferensiasi. Faktor epigenetik juga ikut mempertahankan pluripotensi melalui pelepasan protein PcG, yang bersama dengan trithorax memodulasi ekspresi gen *stemness* melalui modifikasi

histon. Sebaliknya aktivitas diferensiasi berjalan ketika Ronin dan Nanog di proteolisis (inaktif) oleh Caspase-3 dan atau paska stimulasi *soluble molecule* FGF yang mengaktifasi jalur proliferasi MAPK, sebaliknya stimulasi solubele molekul LIF dan BMP justru meningkatkan aktivitas pluripotensi.

### **3. Faktor transkripsi**

#### **3.1. Pengertian faktor transkripsi**

Faktor transkripsi *stemness* adalah protein Oct4, Sox2, Nanog, Klf4 yang berperan dalam mengontrol laju transkripsi genetik DNA ke mRNA dengan cara mengikat sekuens DNA tertentu terkait gen yang mempertahankan pluripotent, disamping mensupresi gen promosi diferensiasi.

#### **3.2. Peran faktor transkripsi**

##### **1. Oct4**

Oct4 adalah protein faktor transkripsi yang berperan penting dalam mempertahankan pluripoten sel punca embrionik dan sel punca dewasa. Ekspresi protein Oct4 meningkat pada *inner cell mass* embrionik, baik pada organogenesis *in vivo* atau dalam kultur *in vitro*.

##### **2. Sox2**

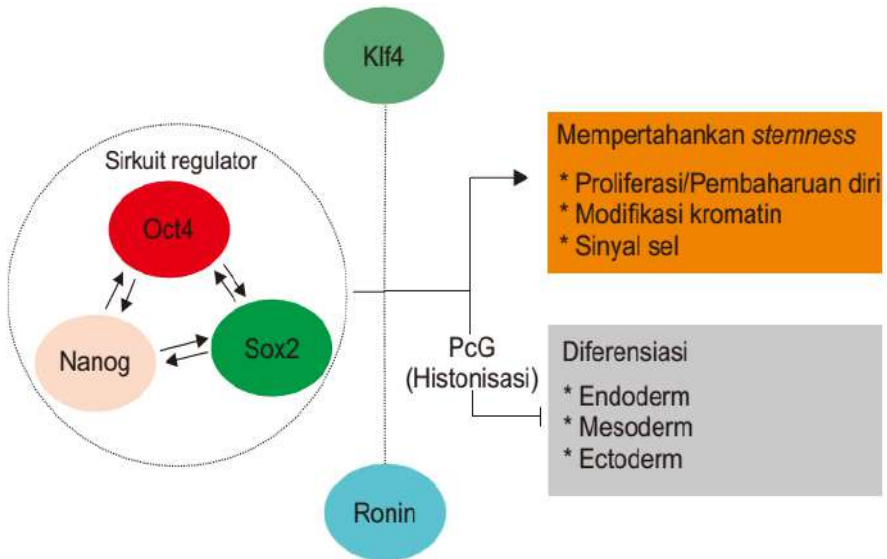
Sox2 merupakan protein faktor transkripsi yang dibutuhkan dalam mempertahankan *stemness* sel punca pluripoten melalui korporasi protein Oct4. Secara spesifik protein Sox2 mengaktifasi ekspresi sejumlah protein regulator pluripoten, termasuk Oct4 dan Nanog baik pada *in vivo* maupun *in vitro*.

##### **3. Nanog**

Nanog adalah protein faktor transkripsi yang juga dibutuhkan dalam mempertahankan keadaan pluripoten sel punca. Ekspresi Nanog secara berlebihan dapat memotong kebutuhan *stemness* akan LIF (studi *in vitro*), sehingga tetap mampu mempertahankan pluripotensi. Difisiensi Nanog menyebabkan sel punca cenderung

berdiferensiasi spontan, meskipun demikian Nanog tidak mutlak diperlukan menjaga pluripotensi pada kondisi kultur yang baik.

Peranan sirkuit regulator dan faktor transkripsi lain dalam mempertahankan *stemness* dijelaskan dalam gambar 26 dibawah ini.



Gambar 28. Peran faktor transkripsi *stemness*

Aktivasi faktor transkripsi pluripoten utama Oct4, Sox2, Nanog membentuk sirkuit regulator. Faktor transkripsi lain Ronin dan Klf4 mendorong sel punca mempertahankan *stemness* melalui aktivitas pembaharuan diri/proliferasi maupun *signalling cell*. Saat yang sama faktor transkripsi juga menghambat diferensiasi melalui PcG (proses epigenetik), disamping mensupresi gen promosi diferensiasi Gata6 dan Cdx2 lewat mekanisme sirkuit regulator faktor transkripsi

#### 4. Ronin

Faktor transkripsi Ronin juga mempertahankan pluripoten dengan cara mensupresi diferensiasi secara langsung melalui pengikatan dan supresi gen penginduksi diferensiasi Gata6 dan Cdx2. Hal sebaliknya diferensiasi terjadi ketika Ronin dan Nanog diinaktivasikan secara proses proteolisis oleh Caspase-3.

Ekspresifaktor transkripsi Ronin yang berlebihan juga dapat mempertahankan pluripotensi sekalipun tanpa dukungan LIF atau Oct4.

#### 5. Klf4

*Krupple-like family of transcription factor* (Klf4) adalah protein pengikat DNA yang berperan dalam meregulasi ekspresi gen sirkuit regulator utama *stemness* Oct4, Sox2, dan Nanog. Secara spesifik regulasi ini tergantung pada area promotor dan atau korporasi faktor transkripsi lain.

Secara spesifik mekanisme molekuler Klf4 adalah:

##### 1. Mengaktifasi area promotor iNOS

Hal ini berlangsung ketika terjadi koorporasi dengan Nf-kB

##### 2. Mengaktifasi area promotor p21

Hal ini berlangsung ketika terjadi koorporasi dengan p53, yang berlanjut dengan aktifasi p21. p21 kemudian mensupresi cyclin D1 dan B1 sehingga siklus sel tertahan, sehingga menyebabkan hambatan proses proliferasi ke arah diferensiasi.

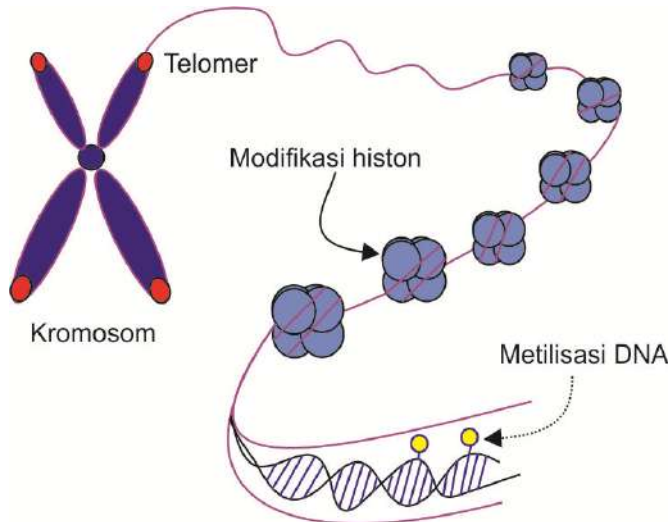
## 4. Epigenetik

Epigenetik merupakan proses yang terjadi diluar DNA namun mempengaruhi ekspresi dan aktivitas gen sehingga dapat menyebabkan perubahan fenotipe suatu sel baik karakter maupun morfologi. Hal ini dapat dipicu oleh perubahan *niche* (lingkungan mikroseluler) yang dramatis dan secara terus-menerus.

### 4.1 Pengertian epigenetik

Epigenetik adalah perubahan fenotip suatu sel yang diturunkan namun tanpa disertai perubahan sekuen DNA. Hal ini menunjukkan bahwa fenotip sel yang berubah bukan akibat perubahan sekuen gen, namun akibat proses diluar genetik. Perubahan fenotipe ini melibatkan metilisasi DNA, mikro-RNA, modifikasi histon, *small/non-coding* RNA, dan *remodeling kromatin*. Sekalipun demikian sekwen DNA tetap utuh (tidak berubah).

Pengertian epigenetik dijelaskan dalam gambar 29 dibawah ini.



Gambar 29. Epigenetik

Perubahan fenotipe terjadi bukan didalam sekwen DNA, namun terjadi diluar DNA, baik melalui mikro-RNA, modifikasi histon, *small/ non-coding RNA*, dan *remodeling kromatin*.

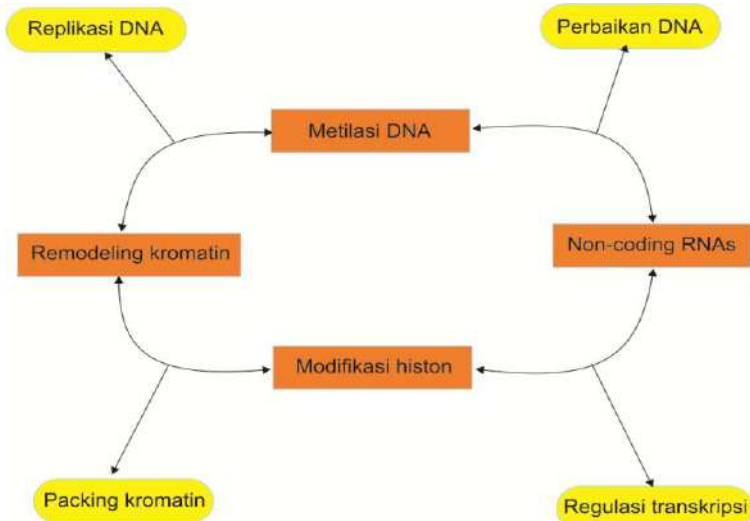
## 4.2 Konsep molekuler epigenetik

Secara konseptual molekuler, proses epigenetik tidak terjadi pada sekwen DNA namun diluar DNA. Untuk memudahkan pembahasan mekanisme molekuler tiap proses epigenetik akan dibahas dalam sub-bab sendiri dibawah.

Sekalipun demikian secara garis besar konsep mekanisme molekuler epigenetik dibagi menjadi :

1. Modifikasi DNA post-translasi
2. Modifikasi histon,
3. Modifikasi struktur kromatin,
4. *Non-coding RNA (micro-RNA)*

Secara sistematis konsep molekuler epigenetik dijelaskan dalam gambar dibawah ini.



Gambar 30. Konsep molekuler epigenetik

Perubahan epigenetik terjadi diluar DNA melalui mekanisme : (1) Modifikasi DNA post-tranlasi yang berdampak pada proses replikasi, (2) Modifikasi histon yang berdampak pada proses regulasi transkripsi, (3) *Remodeling* kromatin yang berdampak pada proses *packing* kromatin dan (4) *Non-coding* RNA yang berpengaruh pada perbaikan DNA.

## 5. Modifikasi DNA

Modifikasi DNA post-translasi dapat terjadi baik secara asetilasi, deasetilasi, metilasi, maupun demetilasi terutama pada residu lisin.

### 5.1 Pengertian modifikasi DNA

Modifikasi DNA post-tranlasi adalah suatu proses dimana sekelompok gugus metil berikatan pada molekul DNA sehingga aktivitas segmen DNA berubah namun sekuen urutan DNA tetap. Proses ini dapat terjadi secara hipermetilasi untuk membuat *gene silents* atau dengan hipometilasi. Kedua hal ini menyebabkan

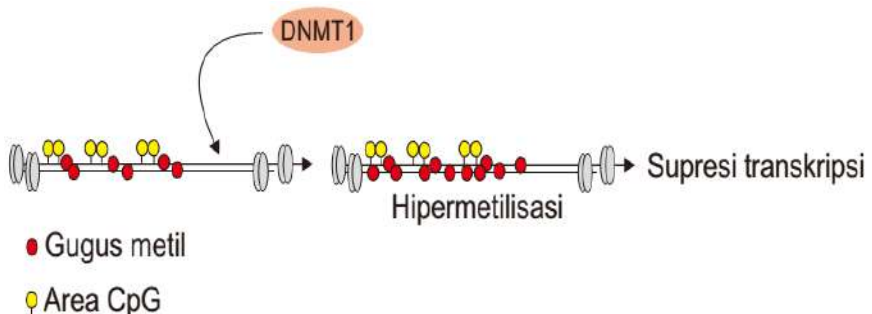
ekspresi gen terganggu (tersupresi).

## 5.2 Mekanisme molekuler modifikasi DNA

Secara spesifik mekanisme molekuler modifikasi DNA dapat terjadi secara metilasi pada area promotor genterutama pulau promotor CpG (sitosin). Metilasi pada area ini dapat mensupresi transkripsi, tergantung pada luas area metilasi dan seberapa besar metilasi pada sekuen DNA. Tahapan molekuler modifikasi DNA adalah sebagai berikut:

1. Proses membutuhkan *DNA methyltransferase-1* (DNMT-1)
2. Terjadi pada area promoter gen (sitosin dinukleotida CpG)
3. Enzim DNMT-1 memfasilitasi pengikatan gugusan metil pada area promoter gen, berfungsi sebagai demetilasi DNA
4. Terjadi tambahan gugusan metil pada sekwen DNA sehingga terjadi hipermetilisasi
5. Fungsi transkripsi gen terganggu (tersupresi)

Modifikasi DNA dijelaskan pada gambar dibawah ini.



Gambar 31. Modifikasi DNA

DNMTmelakukan dimetilasi DNA pada area sitosin dinukleotida CpG. Terjadi metilasi pada area promotor gen tersebut hingga hipermetilisasi yang berakibat pada supresi proses transkripsi.

## 5.3 Peran modifikasi DNA dalam studi dan klinis

Hasil penelitian melaporkan bahwa modifikasi DNA berperan dalam perkembangan sel, *genomic imprinting*, inaktivasi kromosom X, represi elemen *transposable*, penuaan dan karsinogenesis.

## 6. Modifikasi histon

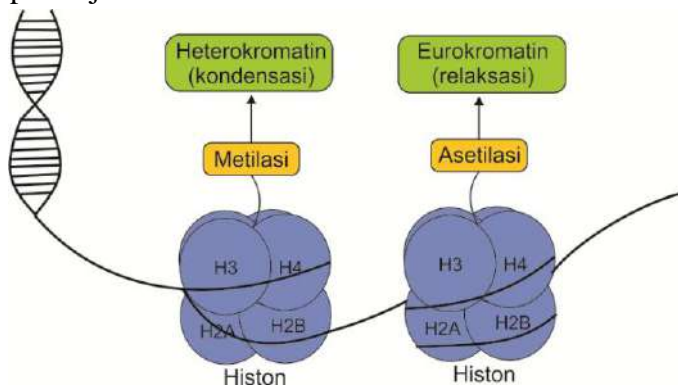
Modifikasi histon dapat menyebabkan aktivitas yang beragam mulai dari aktivasi atau inaktivasi transkripsi, kerusakan DNA, perbaikan DNA dan kromosom *packing*.

### 6.1 Pengertian histon

Histon adalah protein yang berperan dalam mengondensasi atau memadatkan DNA sehingga dapat membungkus DNA ke dalam kromosom secara baik. Secara spesifik histon membungkus DNA menjadi struktur nukleosom sehingga molekul DNA dapat masuk ke dalam nukleus. Setiap nukleosom memiliki 2 sub unit, yang terdiri atas H2A, H2B, H3 dan H4.

### 6.2 Pengertian modifikasi histon

Modifikasi histon adalah proses post-translasi yang ikut menentukan ekspresi suatu gen. Proses modifikasi histon dengan cara merubah struktur kromatin atau memodifikasi histon. Modifikasi histon dapat terjadi secara metilasi histon dan asetilasi histon.



Gambar 32 Modifikasi histon

Modifikasi histon dapat terjadi secara metilasi dan asetilasi. Metilasi dapat menyebabkan heterokromatin, sedangkan asetilasi menyebabkan eurokromatin.

### **6.3 Mekanisme molekuler modifikasi histon**

Secara molekuler modifikasi histon terjadi secara:

1. Metilisasi histon

Metilisasi histon terjadi dengan mentransfer gugusan 1-3 grup metil *S-adenosyl-L-methionine* pada residu arginin atau lisin dari protein histon menggunakan enzim *histone methyl transferase* (HMT).

2. Asetilasi histon

Asetilasi histon terkait dengan struktur kromatin yang terbuka sehingga memungkinkan untuk mengakses protein faktor transkripsi yang berimplikasi pada peningkatan ekspresi gen. Asetilasi H3 sebagian besar terjadi pada area promotor terkait gen enhancer dan promotor. Enzim yang bertanggung jawab pada asetilasi ini adalah histon asetil transferase (HAT) dan histon deasetilase (meregulasi asetil *histon tail*).

## **7. Remodeling kromatin**

*Remodeling* kromatin berperan sentral dalam meregulasi ekspresi gen dengan menyiapkan akses secara dinamik terhadap mesin transkripsi. *Remodeling* kromatin berperan sentral dalam berbagai proses biologis terutama pada perakitan dan pemisahan kromosom disamping replikasi DNA dan repair. Sisi lain *remodeling* kromatin juga berperan dalam pluripoten sel punca embrionik.

### **7.1 Pengertian *remodeling* kromatin**

Remodeling kromatin adalah modifikasi dinamik dari arsitektur kromatin sehingga memungkinkan mengakses DNA yang terkondensasi terutama area regulasi transkripsi sehingga mampu mengontrol ekspresi gen secara aktif.

### **7.2 Mekanisme molekuler *remodeling* kromatin**

Secara prinsip molekuler *remodeling* kromatin terjadi secara:

1. *Covalent histone modification*

Modifikasi histon kovalen menggunakan enzim HAT,

deasetilisasi dan metil transferase.

2. Komplek *remodeling* kromatin ATP dependent  
Pembentukan kompleks ini dapat bergerak memasuki *nucleosome* atau rejeksi atau restrukturisasi *nucleosome*.

## **8. *Non-coding* RNA**

*Non-coding* RNA adalah molekul RNA fungsional yang ditranskripsikan DNA namun tidak ditranslasikan menjadi protein. *Non coding RNA* berkontribusi dalam menginduksi berbagai penyakit kanker dan alzheimer.

Secara teoritis *non-coding* RNA dapat diklasifikasikan menjadi 3 bagian, yaitu :

1. *MicroRNA* (miRNA)
2. *Short interfering* RNA (siRNA)
3. *Piwi-interacting* RNA (piRNA)

### **8.1 *MicroRNA***

*miRNA* umumnya terikat pada target spesifik mRNA dengan suatu sekwen komplementer sebagai penginduksi terhadap pemotongan/ degradasi atau blok dari proses translasi protein. Hal ini merupakan mekanisme *feedback* yang melibatkan metilasi kromosom.

### **8.2 *siRNA***

Secara fungsional siRNA mirip dengan miRNA yaitu memediasi *post-transcriptional gene silencing* (PTGS) sebagai akibat dari proses degradasi mRNA. siRNA juga mampu menginduksi pembentukan *heterochromatin* melalui pembentukan kompleks *RNA-induced transcriptional silencing* (RITS) dan ketika mengikat siRNA akan mempromosi metilisasi H3K9 dan kondensasi kromatin.

### **8.3 *piRNA***

piRNA dikenal karena interaksinya dengan family protein piwi. Fungsi primer molekul RNA ini adalah dalam regulasi kromatin dan supresi aktivitas transposon dalam sel somatik dan sel embrionik.

Secara spesifik piRNA berperan sebagai anti-sense dalam mengekspresikan target transposon dan kemudian memotong transposon. Pemotongan ini menghasilkan piRNA tambahan yang kemudian mentarget dan memotong kembali transposon. Siklus ini terus menerus berulang hingga menghasilkan piRNA secara berlebihan yang dapat meningkatkan *transposon silencing*.

## 9. Peran faktor transkripsi dalam epigenetik

Faktor transkripsi pluripoten adalah master dalam aktivitas gen target pluripoten. Sekalipun demikian dalam realisasinya aktivitas faktor transkripsi ini ditentukan oleh aksesibilitas faktor transkripsi tersebut terhadap gen target. Akses aksesibilitas gen target menjadi sulit atau sebaliknya sangat ditentukan oleh proses epigenetik baik melalui modifikasi DNA, modifikasi histon, *remodeling* kromatin dan atau *non-coding* RNA.

### 9.1 Peran faktor transkripsi dalam modifikasi histon

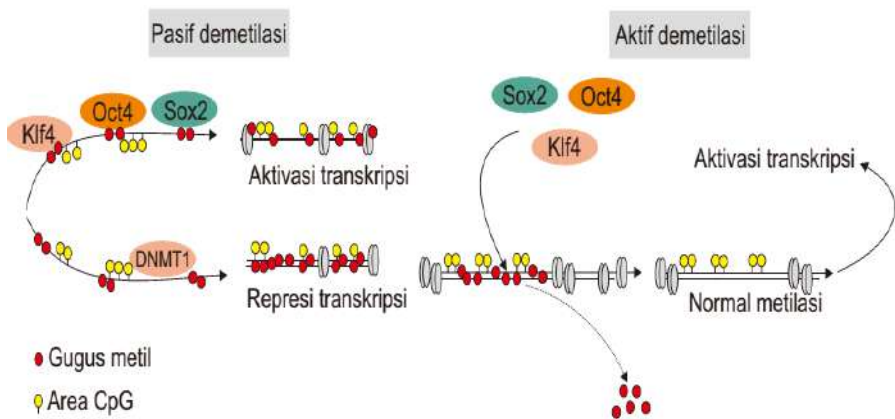
Protein faktor transkripsi dan atau protein faktor supresi direkrut untuk mengaktifkan atau mensupresi transkripsi sehingga berdampak pada ekspresi gen. Trimetilasi residu lisin-9 dan lisin-27 dari histone-H3 (H3K9 dan H3K27) memiliki fungsi representatif, sedangkan asetilasi H3K4me3 dan H3K9 (H3K9ac) dikaitkan dengan aktivasi gen

Tabel 3. Modifikasi histon dan pengaruh terhadap ekspresi gen

Modification	Histone					
	H3K4	H3K9	H3K27	H3K79	H2AR3	H4R3
Monomethylation	Activation	Activation	Activation	Activation		
Dimethylation		Repression	Repression	Activation		
Trimethylation	Activation	Repression	Repression	Activation Repression		
Acetylation		Activation			Repression	Repression

## 9.2 Peran faktor transkripsi dalam modifikasi DNA

Modifikasi DNA via metilisasi berakibat pada hipermetilisasi DNA. Keadaan ini menyebabkan proses transkripsi tersupresi yang berakibat pada ekspresi gen terganggu. Faktor transkripsi Sox2, Oct4, Nanog dan Klf4 berperan penting dalam melepas gugusan metil (demetilisasi) baik secara aktif maupun secara pasif pada sekwen DNA yang mengalami hipermetilisasi (modifikasi DNA). Dengan demikian faktor transkripsi akan mengaktifasi proses transkripsi kembali, seperti dijelaskan pada gambar 29 dibawah ini.



Gambar 33. Peran faktor transkripsi dalam demetilisasi. Pemberian faktor transkripsi Sox2, Oct4 dan Klf4 pada area CpG *single strand* DNA yang mengalami hipermetilisasi menyebabkan gugusan metil terlepas (demetilisasi) secara pasif sehingga terjadi aktivasi transkripsi kembali. Pemberian faktor transkripsi pada area CpG *double strand* yang hipermetilisasi dapat menyebabkan demetilisasi secara aktif sehingga terjadi aktivasi transkripsi.

## 9.3 Peran PcG dalam pluripoten

*Polycomb family* (PcG) merupakan protein yang berperan dalam mensupresi gen diferensiasi dengan memodulasi ekspresi banyak gen terutama melalui modifikasi protein histon. Kompleks *polycomb* melakukan trimetilasi histone H3 pada lisin 27 (H3K27)

kemudian membentuk kompleks yang mempromosi pepadatan kromatin. Protein *trithoax* mencegah represi *polycomb* dengan metilisasi histone H3 di lisin 4 (H3K4) dan promosi transkripsi dengan merekrut enzim *remodeling* nukleosom dan asetone histon.

## **10. Gen promosi diferensiasi**

Gata6 merupakan faktor transkripsi yang dibutuhkan dalam diferensiasi endoderm viseral. Gata6 diekspresikan di distal epitel pada perkembangan paru. Kehilangan Gata6 menyebabkan kehilangan kontrol dalam diferensiasi dan peningkatan sinyal Wnt, yang dapat menyebabkan tampilan jaringan seperti dewasa sebelum waktunya.

Secara spesifik gen promosi diferensiasi terdiri atas:

1. Cdx2
2. Gata4/6

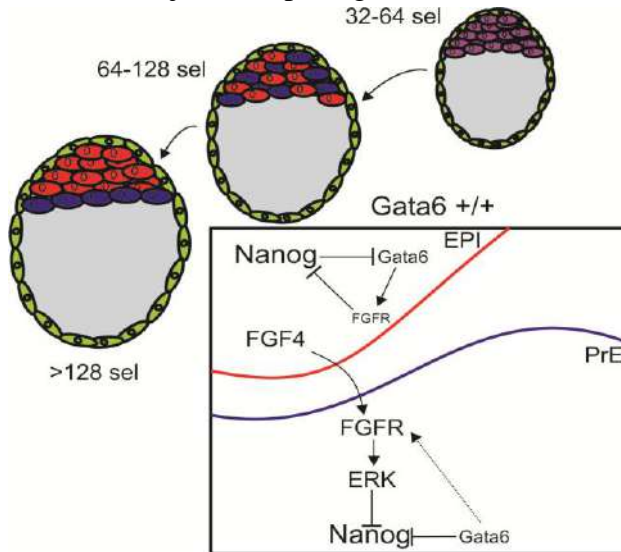
### **10.1 Cdx2**

Cdx2 adalah protein faktor transkripsi yang dikode oleh gen Cdx2 yang berperan penting dalam promosi diferensiasi. Ekspresi Cdx2 dihambat oleh protein Grb2 paska pengikatan reseptor *growth factor* (GF). Cdx2 diekspresikan dalam TE pada awal embrio sehingga menjadi penting dalam pembentukan TE yang benar. Cdx2 diasumsikan sebagai gen master diferensiasi untuk TE.

### **10.2 Gata 4/6**

Gata4/6 adalah faktor transkripsi keluarga *small family of zinc finger* yang dikode oleh gen Gata6 dengan fungsi sebagai pemicu utama diferensiasi seluler melalui penghambatan faktor transkripsi Nanog dan mendorong pengikatan ligan FGF4 pada reseptor FGFR. Gata6 diekspresikan di awal embriogenesis dan mampu melokalisasi sel yang berasal dari endoderm dan mesoderm. Secara spesifik Gata6 berperan dalam meregulasi perkembangan gastrointestinal paru dan jantung.

Protein Gata6 dijelaskan pada gambar 30 dibawah ini.



Gambar 34. Gata6

Gata6 diekspresikan di awal embriogenesis dengan fungsi memicu diferensiasi dengan menghambat faktor transkripsi Nanog pada nukleus. Sisi lain Gata6 juga mendorong pengikatan molekul ligan FGF pada reseptor FGFR sehingga terjadi aktivasi jalur MAPK.

## 11. Soluble molecule ekstraseluler

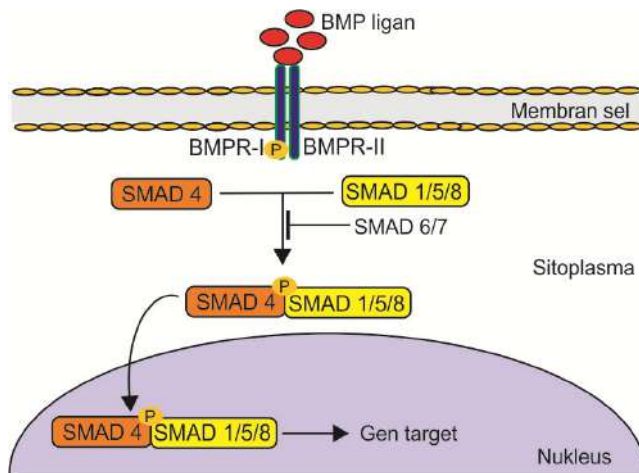
*Soluble molecule* adalah protein kecil terlarut air yang dilepas secara parakrin/ autokrin oleh berbagai sel/ komponen matriks sekitar dengan tujuan mempertahankan ekspresi berbagai protein faktor transkripsi *stemness*. Secara sistematis dibagi menjadi:

1. BMP
2. LIF
3. Molekul  $\alpha 4$ -laminin
4. FGF
5. Wnt

### 11.1 Molekul BMP

*Bone morphogenetic protein* (BMPs) adalah kelompok *growth factor* yang juga dapat berfungsi sebagai sitokin dan metabologen. Sekalipun demikian BMP pada awalnya diidentifikasi berdasarkan atas kemampuannya dalam menginduksi pembentukan tulang dan cartilage. Seiring dengan waktu BPM juga diketahui berperan sentral sebagai sinyal morphogenik dan ikut serta merancang perkembangan morfologi jaringan jantung, sistem syaraf dan kartilagea. Sisi lain BMP berperan dalam menghambat jalur proliferasi MAPK (diferensiasi sel punca) melalui sinyal transduksi SMAD. Secara spesifik jalur sinyal BMP dimulai dengan pengikatan ligan molekul BMP pada reseptor Bmpr, sehingga menimbulkan sinyal transduksi yang menyebabkan hambatan pada MAPK, sehingga mendorong aktifitas pembaharuan diri sel punca (*stemness*)

Jalur molekul BMP dijelaskan pada gambar di bawah ini.



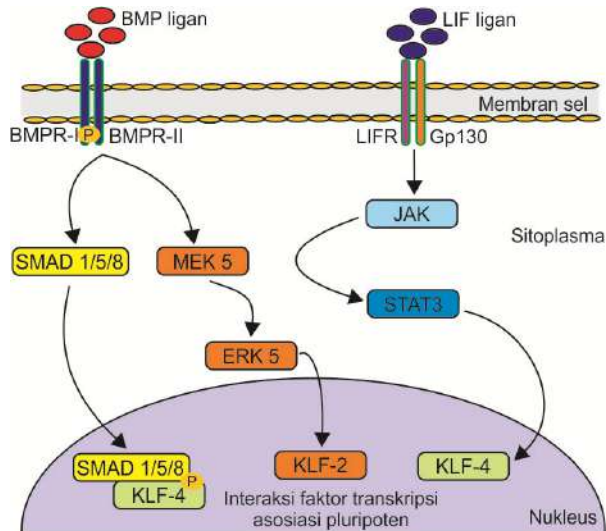
Gambar 35. BMP

BMP merupakan *soluble molecule* yang mampu menghambat jalur MAPK (jalur diferensiasi sel punca) melalui aktivasi jalur SMAD.

## 11.2 LIF

LIF termasuk anggota famili sitokine IL-6, yang bekerja dengan mengikat reseptor heterodimerik (terdiri atas reseptor Lif dan gp130). LIF berperan dalam mensupresi jalur diferensiasi, sehingga dapat dikelompokkan dalam protein potensi *stemness*. Secara spesifik pengikatan LIF pada reseptor LIF-R sel embrionik akan mengaktivasi jalur kanonikal *janus kinase signal transducer and activator of transcription* (Jak/Stat) yang berakibat pada supresi MAPK (jalur diferensiasi) sehingga memperkuat sel embrionik dalam mempertahankan status pluripoten. Secara spesifik target akhir STAT3 adalah gen c-Myc, disamping hambatan MAPK sehingga LIF meningkatkan aktivitas proliferasi MSC, disamping hambatan apoptosis (ketika starvasi serum) dan hambatan diferensiasi kondrogenik dan adipogenik. Pemberian sitokine IL-6 dapat mempertahankan status *stemness* MSC.

Jalur molekul LIF dijelaskan pada gambar di bawah ini.



Gambar 36. LIF

Lif menghambat jalur proliferasi MAPK via jalur STAT3, dengan target gen c-Myc dan Klf4 sehingga menghambat diferensiasi dan ikut mempertahankan status *stemness* (aktivitas pembaharuan diri)

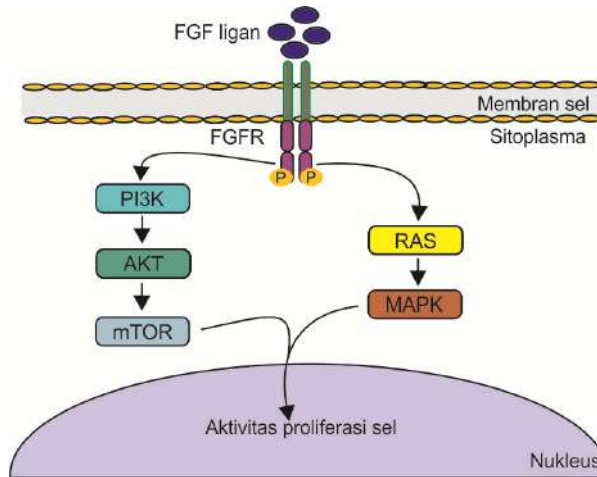
### **11.3 Molekul $\alpha$ 4-laminin**

$\alpha$ 4-laminin adalah molekul protein matriks ekstraseluler yang disekresi oleh komponen matriks ekstraseluler sekitar sel punca dengan fungsi untuk mempertahankan ekspresi berbagai faktor transkripsi stemness.  $\alpha$ 4-laminin berperan dalam meregulasi stemness sel punca, termasuk MSC dengan cara meningkatkan aktivitas proliferasi dan menghambat diferensiasi menjadi sel osteoblast, kondrosit dan atau adiposit. Molekul ini ditemukan secara berlebihan dalam stromal sumsum tulang. Molekul  $\alpha$ 4-laminin yang disintesis matriks ekstraseluler juga ikut meregulasi stemness sel punca dengan meningkatkan aktivitas proliferasi dan menghambat diferensiasi.

### **11.4 FGF**

FGF adalah molekul *growth factor* (sub-famili FGF) yang disekresi sel aktif yang berperan sebagai mitogen poten dalam proliferasi dan diferensiasi. Molekul FGF bekerja dengan cara mengikat reseptor FGFR sel target yang mengandung heparin proteoglikan (afinitas tinggi molekul angiogenik), kemudian memicu kaskade transduksi sinyal yang berdampak pada banyak fungsi dan tipe sel mulai diferensiasi, proliferasi, mitogenik-angiogenesis, pluripoten, sehingga dikenal sebagai *promiscuous growth factor*. Secara spesifik ligan FGF mengikat reseptor FGFR, kemudian memicu kaskade transduksi sinyal MAPK, sehingga menyebabkan aktivitas proliferasi ke arah diferensiasi.

Jalur molekuler FGF dijelaskan pada gambar dibawah ini.



Gambar 37. Jalur FGF

FGF termasuk *soluble molecule* yang berperan memicu proliferasi diferensiasi melalui jalur MAPK dan mTOR, sehingga aktifitas pembaharuan diri terhambat.

## 11.5 Wnt

Wnt merupakan molekul protein yang berperan penting dalam jalur sinyal proliferasi sel punca dan mampu mensupresi diferensiasi menjadi osteogenik. Hasil penelitian melaporkan bahwa jalur signaling Wnt terutama melalui Wnt3a, mempromosikan proliferasi MSC dan menekan diferensiasi menjadi osteogenik. Wnt dan  $\alpha$ -laminin ikut mempengaruhi faktor transkripsi sel punca. Molekul protein matriks  $\alpha$ -laminin yang disekresi komponen matriks sekitar sel punca juga ikut berperan dalam mempertahankan ekspresi berbagai faktor transkripsi *stemness*.

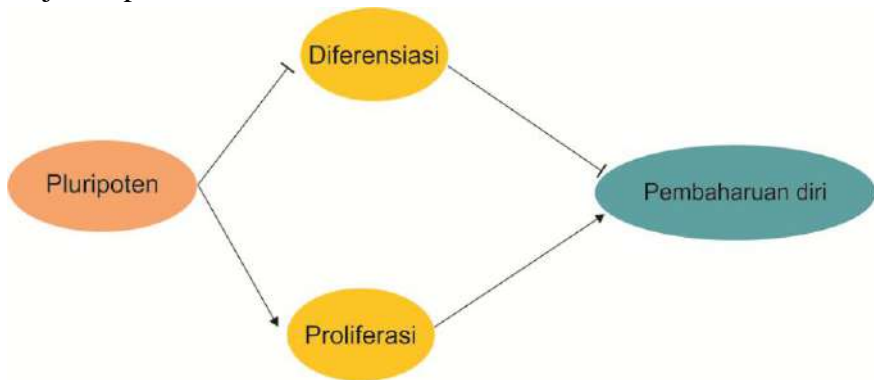
## 12. Faktor transkripsi dalam pluripoten

Pluripoten merupakan upaya mempertahankan stabilitas pembaruan diri melalui pencegahan proses diferensiasi dan peningkatan aktivitas proliferasi. Upaya ini melibatkan protein faktor

transkripsi Oct3/4, Sox2 dan Nanog. Pluripoten memungkinkan mempertahankan tingkat ekspresi berbagai gen yang terlibat dalam aktivitas *stemness* secara stabil.

## 12.1 Pengertian potensi pluripoten

Secara spesifik potensi pluripoten sel embrionik adalah kemampuan sel punca embrionik dalam mempertahankan aktivitas pembaharuan diri pada sel turunannya dengan cara mendorong sel embrionik tersebut memasuki jalur proliferasi, namun mencegah menjalani proses diferensiasi.



Gambar 38. Konsep pluripoten

Pluripoten dipertahankan dengan cara menghambat diferensiasi dan mendorong proliferasi sehingga meningkatkan pembaharuan diri.

## 12.2 Peran Oct3/4 dalam pluripoten

Oct3/4 sebagai faktor transkripsi famili POU (*homeodomain*) yang dikodekan Pou5f1. Ekspresi Oct3/4 *wildtype* kurang dari 50% akan mendorong sel embrionik berdiferensiasi menjadi TE, sedangkan meningkatkan ekspresi hingga 150% atau lebih justru memicu diferensiasi menjadi *PrE like cells*. Oleh karena itu, untuk mempertahankan aktivitas pluripotensi maka kadar ekspresi Oct3/4 *wild type* antara 50%- 150%.

Secara spesifik peranan Oct3/4 dalam pluripoten adalah :

1. Fase awal *blastocyst* : Oct3/4 meningkatkan ekspresi Cdx2

Tahap *blastocyst* organogenesis menghasilkan 2 bagian, yaitu lapisan luar yang berkembang menjadi trofektoderm (TE) sementara lapisan dalam membentuk *inner mass cell* (IMC) yang berisi sel embrionik pluripoten. Oct3/4 diekspresikan secara berlebihan oleh sel primitif endoderm (PrE), yaitu hasil pembentukan IMC tahap akhir *blastocyst* namun tidak dalam TE. Supresi Oct3/4 akan meningkatkan ekspresi Cdx2 (pemicu diferensiasi *trofektoderm*) sehingga sel embrionik berdiferensiasi sepanjang garis turunan *trofektodermal*.

2. Fase akhir *blastocyst*: Oct 3/4 mempertahankan pluripoten dan mencegah diferensiasi

Secara spesifik Oct3/4 berperan sebagai penjaga gerbang sel embrionik (*gatekeeper*) dalam:

- 1) Mempertahankan potensi pluripoten

Oct 3/4 yang diekspresikan di fase akhir *blastocyst* berfungsi mendorong sel pluripoten berdiferensiasi menjadi sel primitif *endoderm-like*. Over ekspresi Oct3/4 menyebabkan supresi ekspresi Cdx2, sehingga mencegah diferensiasi.

- 2) Mencegah diferensiasi *trofektoderm*

Oct3/4 berinteraksi langsung pada Cdx2, membentuk kompleks *repressor* (penekan) yang mengganggu autoregulasi protein sehingga menimbulkan *reciprocal inhibition system* (pengaturan fungsi timbal balik). Interaksi ini secara spesifik menghambat ekspresi Cdx2 sehingga menghambat proses diferensiasi *trofektoderm*.

### **12.3 Peran Oct3/4 dalam proses epigenetik**

Secara spesifik protein faktor transkripsi Oct3/4 berperan dalam meregulasi modifikasi histon (*histone demethylase*) gen *Jmjd1a* yaitu domain jumonji yang mengandung 1A dan *Jmjd2c*, yang pada gilirannya akan mengatur ekspresi gen *Tcl1* dan *Nanog*, sehingga berkontribusi pada proliferasi sel dan stabilisasi pluripoten.

## **12.4 Peran Sox2 dalam pluripoten**

Sox2 menempati posisi penting dalam mempertahankan pluripotensi jaringan embrionik. Sox2 bekerja sama dengan Oct3/4 dalam mengaktifkan gen target Oct3/4. Sel embrionik yang mengandung situs pengikatan Oct3/4 dan Sox2 diidentifikasi dalam beberapa gen, diantaranya Fgf4, osteopontin, Utf1, Fbxo15, Nanog dan Lefty1.

Secara spesifik peran Sox2 dalam pluripoten adalah :

1. Fase awal *blastocyst*: Sox2 mempertahankan pluripoten

Sox2 diekspresikan dalam sel germinal, ICM embrio awal, dan jaringan saraf. *knockout* Sox2 diawal embrio, seperti halnya Oct3/4 maka potensi pluripoten menjadi hilang pada tahap ICM. Embrio *Sox2-null* segera mati setelah implantasi dan *knockdown* Sox2.

2. Sox2 dalam pertahankan pluripoten dan mencegah diferensiasi

Sox2 sangat penting dalam mempertahankan pluripoten. Sox2 bersama Oct3/4 berikatan pada regio *enhancer* gen Fgf4 yang secara khusus diekspresikan dalam sel embrionik pluripoten. Oct4 dan Sox2 berperan secara kooperatif untuk mengikat DNA pada situs komposit Oct-Sox. Sox2 berperan dalam pembaharui diri tidak hanya pengikatan *global enhancer* komposit Oct/Sox, tetapi lebih pada pengontrolan terhadap ekspresi faktor transkripsi seperti Nr2f2 dan Nr5a2 yang mengatur ekspresi Oct4.

## **12.5 Peran Nanog dalam pluripoten**

Nanog adalah faktor transkripsi *homeobox* NK-2 kelas yang diekspresikan oleh seluruh sel pluripotent ICM. Ekspresi Nanog sebagian diatur oleh Oct3/4 dan Sox2, anggota keluarga Sox (kotak HMG terkait SRY). Nanog awalnya diidentifikasi sebagai *regulator* utama pluripoten karena ketika diekspresikan berlebihan mampu memperbarui diri secara mandiri (tidak tergantung LIF).

Secara spesifik peranan Nanog dalam pluripotensi adalah :

1. Nanog mempertahankan pluripoten dan mencegah diferensiasi

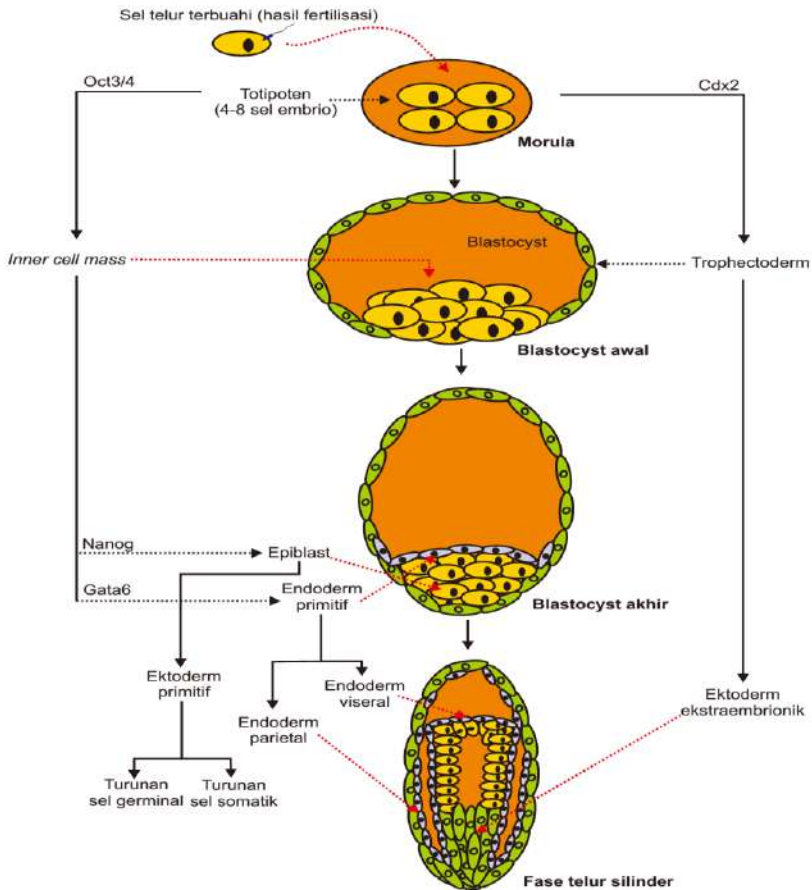
Nanog sebagai penjaga gerbang untuk mencegah sel embrionik berdiferensiasi menjadi endoderm primitif. Nanog juga memblokir diferensiasi neuron akibat pambuangan *protein bone morphogenetic* (BMP) dan LIF dari kultur bebas serum. Nanog merupakan kandidat baik pluripoten dengan menekan Gata-6. Sel embrionik dengan *Nanog-null* akan mudah berdiferensiasi menjadi sel *endoderm like* parietal positif Gata6.

2. Nanog dalam LIF

Ekspresi Nanog yang berlebihan dapat mempertahankan pluripoten meskipun tanpa LIF. Ekspresi Nanog sintetik dapat memblokir diferensiasi sel embrionik menjadi sel endoderm primitif (diinduksi penarikan LIF) atau pembentukan tubuh embrioid (EB), yaitu struktur seperti bola yang terbentuk oleh sel embrionik dalam kultur (meniru tahap embriogenesis silinder-telur). Nanog juga mampu membalikkan mesoderm spesifik dengan mengkode faktor transkripsi T-box mesoderm spesifik. Faktor ini secara langsung mengaktifkan ekspresi Nanog, menunjukkan bahwa umpan balik negatif terlibat dalam keseimbangan antara pembaruan diri dan diferensiasi mesodermal.

3. Nanog dalam *reprogramming*

Nanog berperan dalam *reprogramming* dengan meningkatkan efisiensi proses *reprogramming* nukleus sel somatik menjadi sel embrionik pluripoten. Sel hibrid yang terbentuk dalam *reprogramming* adalah akibat fusi antara sel embrionik dan somatik paska pemberian Nanog, terutama dengan kombinasi Oct4, Sox2 dan lin28.

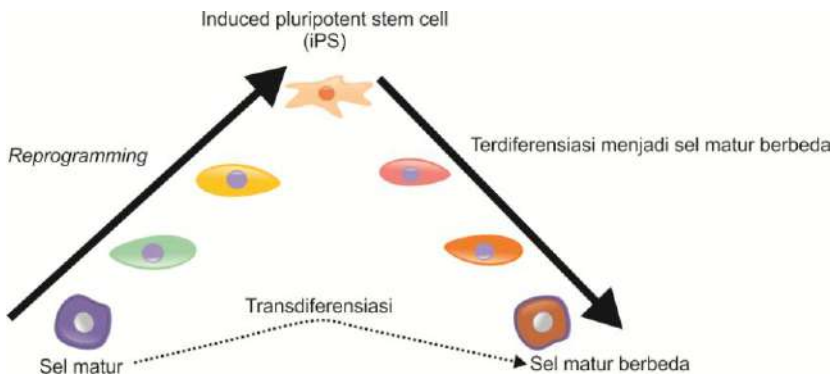


Gambar 39. Pluripotensi sel punca embrionik

Penghambatan aktivitas Stat3 dan ekspresi berlebih dari Oct3/4 menstimulasi sel embrionik berdiferensiasi menjadi sel primitif *endoderm like*. Ini didukung oleh bukti bahwa 'efek overdosis' Oct3/4 pada diferensiasi sel embrionik tidak memerlukan aktivitas pengikatan DNA Oct3/4. Gen target dari kompleks khusus ini biasanya akan mencegah sel embrionik berdiferensiasi menjadi endoderm primitif dengan menekan faktor pemicu, Gata6.

### 13. *Reprogramming*

Berbagai teori ontogenesis sebelumnya menyebutkan bahwa nasib suatu sel yang menjalani program diferensiasi adalah searah dan bersifat ireversibel. Hal ini menunjukkan bahwa arah diferensiasi terjadi secara hierarki adalah searah, yaitu dimulai dari sel punca terus ke sel progenitor yang berakhir dengan sel matur dan tidak dapat terjadi sebaliknya. Dogma ini berubah sejak didapatkannya sel punca embrionik yang berasal dari sel matur oleh Tuan Yamanaka dengan cara menginduksi faktor transkripsi Oct4, Sox2, Klf4 dan c-myc, OSKM. Secara spesifik aktivasi faktor transkripsi mampu mengubah fenotip sel matur kembali menjadi embrionik dengan mengikatkan ekspresi gen pembaharuan diri dan supresi gen promosi diferensiasi. Faktor transkripsi ini berperan penting dalam menjaga potensi *stemness* suatu sel punca. *Reprogramming* dijelaskan dalam gambar dibawah ini.



Gambar 40. *Reprogramming* iPS

*Reprogramming* yang dilakukan dengan menginduksi sel matur menjadi sel matur lain (memicu potensi berdiferensiasi) disebut dengan transdiferensiasi. *Reprogramming* yang dilakukan dengan mengubah sel matur menjadi sel punca embrionik disebut iPS.

#### 13.1 Pengertian *reprogramming*

*Reprograming* (program ulang) adalah upaya mengubah kembali fenotip dan genotip suatu sel terdiferensiasi (matur) menjadi

bentuk imatur yaitu sel embrionik pluripoten. Fenotip yang berubah adalah ukuran, bentuk, potensi membran, aktivitas metabolik hingga respon terhadap sinyal. Perubahan fenotip sebagian besar akibat proses modifikasi post-tranlasi/modifikasi terkontrol (proses epigenetik) terhadap ekspresi gen. Proses *reprogramming* memakan waktu sedangkan transdiferensiasi lebih cepat dan efisien. *Reprogramming* menggunakan faktor transkripsi Oct4, Sox2, Klf4 dan c-myc (OSKM) dalam mengubah sel fibroblas matur menjadi sel punca embrionik pluripoten, dikenal sebagai *induce pluripotent stem cell* (iPS). Peneliti lain mengganti c-Myc dan Klf4 dengan Nanog dan Lin28. Beberapa protokol kemudian dibuat menggunakan dua atau tiga faktor transkripsi atau dengan penambahan *small soluble molecule*. Semua metode tersebut memiliki efisiensi *reprogramming* yang berbeda yaitu antara 0,00001 - 1% .

### **13.2 Pengertian plastisitas sel**

Plastisitas sel adalah kemampuan suatu sel untuk merubah nasibnya. Pendekatan ini dengan cara mengintroduksi gen Oct4, Sox2, Klf4 dan c-myc (OSKM) ke dalam sel fibroblast matur melalui infeksi sehingga sel matur tersebut direprogram kembali menjadi sel dengan status pluripoten. Sekalipun demikian sel ini juga dapat dilakukan proses diferensiasi kembali yaitu menjadi berbagai sel matur (sel lapisan germinal). Peristiwa plastisitas sel biasanya diikuti dengan diferensiasi menjadi sel matur, sehingga merupakan bagian dari proses transdiferensiasi.

### **13.3 Teknik *reprogramming***

Teknik *reprogramming* memungkinkan mengubah kembali fenotip dan genotip sel terdiferensiasi (matur) menjadi bentuk yang sebelumnya dan bahkan dapat diubah menjadi sel punca. Transdiferensiasi tidak membawa resiko tinggi dalam karsinogenesis dibandingkan program *reprogramming*. Hal ini disebabkan karena perubahan langsung sel ke sel tidak memerlukan waktu seperti dalam

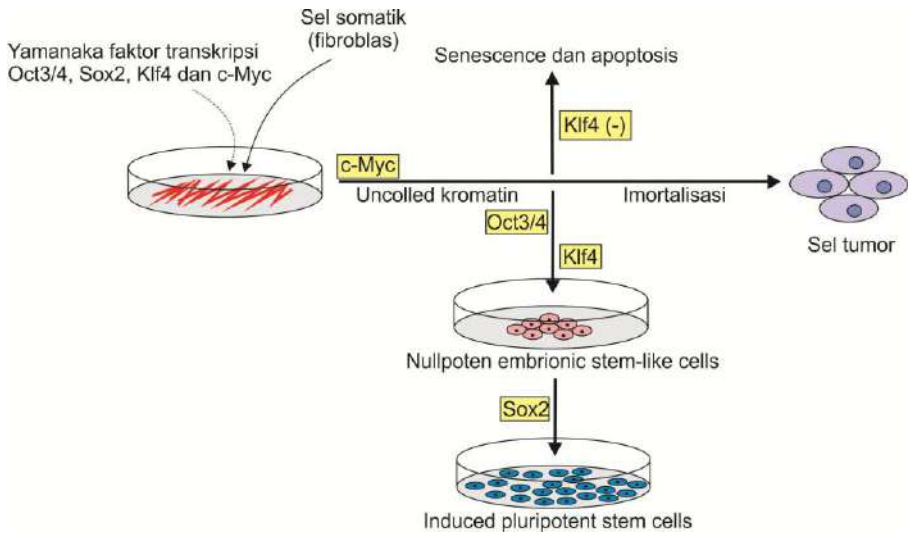
teknik introduksi faktor transkripsi, dimana terjadi status pluripoten *intermediate* dan seterusnya sehingga berpotensi tumorigenik. Sel transdiferensiasi umumnya dikultur invitro dalam waktu yang lebih pendek daripada sel iPS, oleh karena itu peluang akumulasi untuk mutasi genetik kecil. Serupa dengan *reprogramming*, dalam transdiferensiasi dimana induksi terjadi terutama dengan penginduksian transgen. Gen ini biasanya merupakan faktor transkripsi yang menentukan nasib dari sel target. Secara sistematis teknik ini dibagi menjadi 4 yaitu:

1. Introduksi faktor transkripsi reprogramming : iPS
2. *Somatic cell nuclear transfer* (SCNT)
3. *Cell fusion*
4. Transdiferensiasi

## **14. Introduksi faktor transkripsi (iPS)**

Pendekatan *reprogramming* ini dilakukan dengan cara menggunakan virus integrasi atau non virus integrasi. Pendekatan virus integrasi dilakukan dengan cara mengintroduksi 4 protein faktor transkripsi secara injeksi yaitu: Oct4, Sox2, Klf4 dan c-myc (hasil temuan Mr Yamanaka) sebagai faktor *reprogramming* ke dalam sel fibroblast murin sehingga sel tersebut direprogram kembali menjadi sel punca pluripoten. Protein tersebut sekarang telah dibuat dalam bentuk *cocktail* OSKM. Peneliti lain mengganti 2 molekul terakhir dengan Nanog dan Lin untuk menyempurnakan fungsi. Kelemahan *reprogramming* iPS adalah memunculkan tumor teratoma ketika sel iPS ini ditransplantasikan pada mencit dengan defisiensi imun. Oleh karena itu harus dipastikan ketika yang akan ditransplantasikan adalah sel iPS, maka dipastikan bahwa sel matur tersebut telah homogen dan tidak terkontaminasi dengan sisa turunan iPS dan tidak terjadi reaktivasi transgen yang dapat memicu tumorigenik.

Teknik iPS dijelaskan pada gambar dibawah ini.



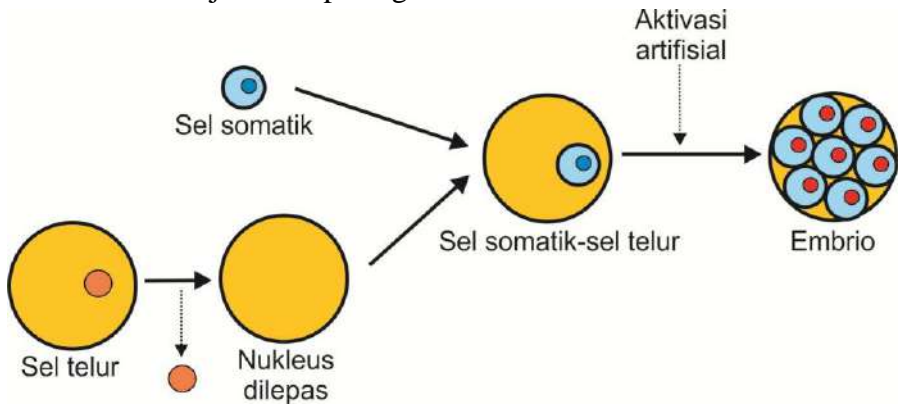
Gambar 40. iPS

iPS sebagai sel punca embrionik pluripoten hasil induksi sel somatik (fibroblas matur) oleh faktor transkripsi Oct3/4, Klf4, Sox2 dan c-Myc via lentivirus. Secara spesifik proses dimulai dengan pemberian c-Myc, kemudian Oct3/4 lalu Klf4 dan akhirnya Sox2. Sisi lain kekurangan Klf4 akan membuat sel tersebut menjadi senescence dan apoptosis

## 15. *Somatic cell nuclear transfer (SCNT)*

SCNT, dikenal sebagai "kloning" yaitu suatu teknik pentransferan nukleus sel somatik ke dalam oosit yang tidak dibuahi dan enukleasi (nukleus oosit telah dibuang), yang kemudian lingkungan sitoplasma oosit melakukan *reprogramming* (program ulang) terhadap nukleus sel somatik baru yang ditransfer sehingga terjadi aktivasi berbagai jalur pengembangan embrio.

SCNT dijelaskan pada gambar dibawah ini.



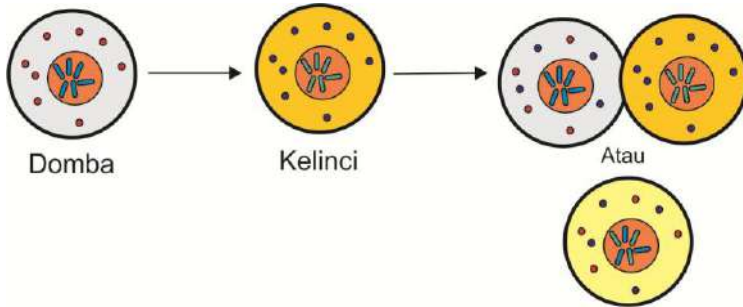
Gambar 41. SCNT

SCNT merupakan pembuatan artifisial embrio dengan cara mentransfer nukleus somatik pada sel telur yang telah dilakukan enukleasi (pembuangan inti), sehingga terjadi integrasi dan pembentukan embrio baru. SCNT dikenal dengan teknik kloning.

## 16. *Cell fusion*

*Cell fusion* adalah suatu keadaan dimana sel somatik dipadukan dengan sel punca embrionik dan memaparkannya pada lingkungan *reprogramming* (program ulang). Metode ini menggunakan sel murine dan manusia. Metode alternatif untuk menginduksi fusi sel termasuk elektrofusi dan fusi yang disebabkan oleh virus Sendai. Kedua metode ini telah menunjukkan harapan, meskipun studi komparatif menemukan PEG sebagai penginduksi fusi superior karena dapat dicapai menggunakan sel induk embrionik manusia, tanpa kebutuhan khusus untuk oosit, itu membuat fusi sel memprogram ulang alternatif yang praktis dan etis menarik untuk aplikasi obat regeneratif. Namun, setelah fusi, sel hibrid yang dihasilkan mengandung bahan asam nukleat dari sel somatik dan sel induk embrionik yang digunakan. Karena faktor nuklir kemungkinan terlibat dalam proses pemrograman ulang oleh fusi sel, pengangkatan sel punca.

Fusi sel dijelaskan pada gambar dibawah ini.



Gambar 42 Fusi sel

Fusi sel merupakan hasil dari perpaduan antar dua sel yang berbeda, termasuk sel punca dengan sel target yang menghasilkan sel baru sebagai chimera.

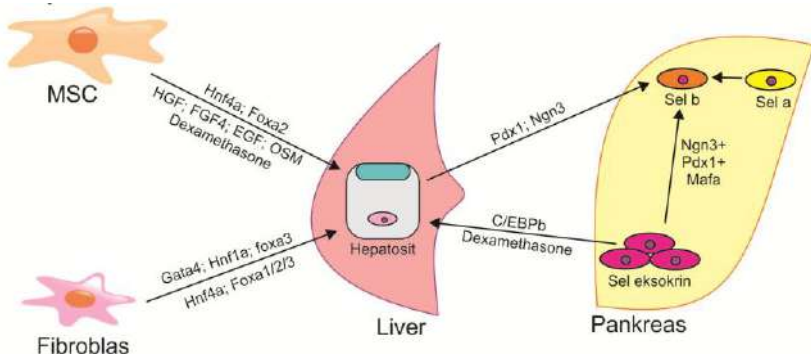
## 17. Transdiferensiasi

Upaya lain dalam menghasilkan tipe sel terdiferensiasi adalah menggunakan transdiferensiasi. Penyuntikan satu cDNA dapat merubah fibroblas menjadi mioblas. Sebagaimana *reprogramming*, karakteristik vektor untuk mengeskpresikan transgen juga dapat memicu kanker akibat mutasi insersi atau reaktivasi transgen in-vivo. Sebagai alternatif untuk menurunkan resiko kanker maka penghantaran gen menggunakan non-virus integrasi, diantaranya vektor excisable dan vektor episomeal. Transdiferensiasi melibatkan proses epigenetik dan oleh karena itu mungkin mengalami abnormalitas epigenetik yang sama, sehingga menjadi predisposisi sel membentuk tumor. Teknik transdiferensiasi lebih dahulu dideskripsikan namun kini *reprogramming* lebih banyak dikembangkan.

### 17.1 Pengertian transdiferensiasi

Transdiferensiasi adalah kemampuan sel punca untuk mengubah sel yang telah terdiferensiasi sebelumnya menjadi bentuk sel yang lebih spesifik. Hal ini dimungkinkan karena sel punca

memiliki kemampuan berintegrasi dan mengubah fenotipe sel yang telah terdiferensiasi sebelumnya. Sebagai contoh sel pankreas dapat berubah menjadi sel liver atau sel- $\alpha$  (exokrin) pankreas menjadi sel- $\beta$  dengan mengintroduksi 3 faktor transkripsi pada perkembangan embrionik pankreas. Transdiferensiasi juga dilakukan pada human fibroblast menjadi sel kardiak dan human fibroblas menjadi sel korneal limbus. Transdiferensiasi dijelaskan pada gambar dibawah ini.



Gambar 43. Transdiferensiasi

Sel punca memiliki kemampuan mengubah sel yang telah terdiferensiasi menjadi sel bentuk lain yang dikenal sebagai transdiferensiasi. Contohnya merubah sel eksokrin menjadi sel beta pankreas.

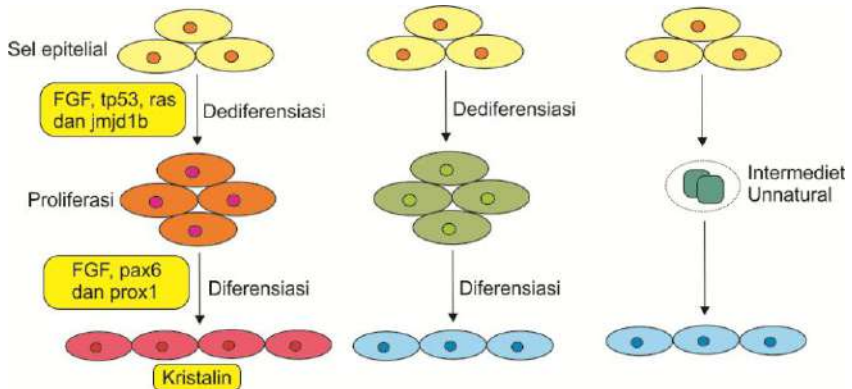
## 17.2 Tahapan transdiferensiasi

Beberapa protokol transdiferensiasi meliputi langkah dediferensiasi, namun sel ini tidak dapat kembali menjadi pluripoten, oleh karena itu potensi pembentukan tumor pada transdiferensiasi adalah rendah. Proses transdiferensiasi dalam banyak kasus terjadi dalam satu langkah, namun pada kasus lain juga dapat melalui status intermediate. Sebagai contoh adalah sebelum sel B lengkap transdiferensiasi menjadi sel makrofag maka sel ini mengekspresikan kedua gen spesifik yaitu sel B dan makrofag dalam konsentrasi rendah. Hal lain juga terjadi status dediferensiasi selama proses transdiferensiasi, namun hal ini tidak natural dan tidak stabil terutama

saat dikultur status dediferensiasi akan hilang. Berbeda dengan sel iPS yang dapat dikultur tanpa kehilangan potensi pluripotensi.

## 18. Dediferensiasi

Dediferensiasi adalah suatu proses dimana sebagian atau seluruh sel yang telah terdiferensiasi mengalami kehilangan properti dan karakteristik diferensiasi sehingga sel matur tersebut kembali ke status sebelumnya yang kurang/ belum terdiferensiasi dan bahkan dapat kembali menjadi sel punca kembali. Dediferensiasi dijelaskan pada gambar dibawah ini.



Gambar 44. Dedifirensiasi

Dedifirensiasi merupakan sel yang kehilangan kemampuan diferensiasi akibat stimulasi sinyal Ras dan pRB.

## Daftar pustaka

1. Fuchs E, Chen T. A matter of life and death: self-renewal in stem cells. *EMBO Rep.* 2012;14(1):39-48.
2. Schmidt R, Plath K. The roles of the reprogramming factors Oct4, Sox2 and Klf4 in resetting the somatic cell epigenome during induced pluripotent stem cell generation. *Genome Biol.* 2012;13(10):251. Published 2012 Oct 22. doi:10.1186/gb-2012-13-10-251
3. Saunders A, Faiola F, Wang J. Concise review: pursuing self-renewal and pluripotency with the stem cell factor Nanog. *Stem Cells.* 2013;31(7):1227-36.
4. Leychkis Y, Munzer SR, Richardson JL. What is stemness? Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences. 2009;40(3):312–320.
5. Kashyap V, Rezende NC, Scotland KB, et al. Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs. *Stem Cells Dev.* 2009;18(7):1093-108.
6. Shi G, Jin Y. Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency. *Stem Cell Res Ther.* 2010;1(5):39.
7. Zhang S, Cui W. Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World J Stem Cells.* 2014;6(3):305-11.
8. Silva J, Nichols J, Theunissen TW, et al. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell.* 2009;138(4):722-37.
9. Seifert BA, Dejosez M, Zwaka TP. Ronin influences the DNA damage response in pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* 2017;23:98-104.
10. Barros SP, Offenbacher S. Epigenetics: connecting environment and genotype to phenotype and disease. *J Dent Res.* 2009;88(5):400-8.
11. Jin B, Li Y, Robertson KD. DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy?. *Genes Cancer.* 2011;2(6):607-17.
12. Stewart MD, Li J, Wong J. Relationship between histone H3 lysine 9 methylation, transcription repression, and heterochromatin protein 1 recruitment. *Mol Cell Biol.* 2005;25(7):2525-38.
13. Schuettengruber, Bernd et al. Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting. *Cell.* 2017;171(1):34 – 57.
14. Rayon T, Menchero S, Rollán I, et al. Distinct mechanisms regulate Cdx2 expression in the blastocyst and in trophoblast stem cells. *Sci Rep.* 2016;6:27139. Published 2016 Jun 3. doi:10.1038/srep27139

15. Gattazzo F, Urciuolo A, Bonaldo P. Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. *BiochimBiophysActa*. 2014;1840(8):2506-19.
16. Malaval, L. , Liu, F. , Vernallis, A. B. and Aubin, J. E. (2005), GP130/OSMR is the only LIF/IL- 6 family receptor complex to promote osteoblast differentiation of calvaria progenitors. *J. Cell. Physiol.*, 204: 585-593.
17. Peng KY, Liu YH, Li YW, Yen BL, Yen ML. Extracellular matrix protein laminin enhances mesenchymal stem cell (MSC) paracrine function through  $\alpha\beta3/CD61$  integrin to reduce cardiomyocyte apoptosis. *J Cell Mol Med*. 2017;21(8):1572-1583.
18. Putra A, Pertiwi D, Milla M, Indrayani U, Jannah D, Sahariyani M, Trisnadi S, Wibowo J. Hypoxia-preconditioned MSCs Have Superior Effect in Ameliorating Renal Function on Acute Renal Failure Animal Model. *Open Access Maced J Med Sci* [Internet]. 30Jan.2019 [cited 23Feb.2019];7(3):305-10.

# **BAB IV**

## **KONSEP SINYAL TRANSDUKSI**

### **RESEPTOR-LIGAN**

#### **Tujuan**

---

Setelah membaca bagian ini, diharapkan pembaca memahami teori tentang ligan, reseptor, aktivasi reseptor, protein-G, reseptor terkait transmitter-ion *channel*, cAMP, sinyal transduksi dan respon sel terhadap sinyal

*Setiap sel mampu berkomunikasi dengan menggunakan small molecule, dikenal sebagai ligan (molekul pembawa sinyal). Molekul ligan baru berfungsi ketika berikatan dengan reseptor. Pengikatan ligan dan reseptor merupakan konsep lock and key, dimana ligan kompatibel akan mengikat reseptor yang sesuai. Karakteristik molekul ligan dan niche juga mempengaruhi kualitas komunikasi sel.*

*Molekul ligan hidrofilik (tertarik air) maka akan berikatan dengan reseptor permukaan membran, sedangkan molekul ligan hidrofobik (tidak tertarik air) akan difusi langsung menuju sitoplasma untuk mengikat reseptor nukleus. Komunikasi sel dimulai ketika molekul ligan berinteraksi dengan reseptor sel target, dilanjutkan dengan pembentukan sinyal transduksi menuju nukleus untuk menimbulkan respon sel.*

*Catatan penulis*

## **1. Latar belakang**

Secara prinsip komunikasi seluler dimulai dengan terikatnya ligan (substansi pembawa sinyal) pada reseptor yang sesuai (protein penerima sinyal). Kemampuan setiap sel untuk menerima sinyal dan meresponnya secara benar adalah konsep dasar dalam aktivitas seluler baik aktifitas pertumbuhan, pembelahan, apoptosis, reparasi maupun regulasi sistem imun. Dengan demikian interaksi ligan-reseptor merupakan bentuk awal dari suatu komunikasi seluler. Ligan adalah molekul sinyal yang bekerja optimum pada konsentrasi rendah  $<10^{-8}M$ . Setiap molekul ligan memiliki cara yang berbeda dalam berikatan dengan reseptor. Molekul ligan yang bersifat hidrofilik (tertarik dengan air) terhadap membran lipid bilayer maka akan berikatan dengan reseptor pada permukaan membran, sedangkan molekul ligan yang bersifat hidrofobik (tidak tertarik dengan air) maka akan berdifusi secara langsung melewati membran lipid bilayer.

Sinyal tingkat sitoplasmik merupakan sinyal transduksi sebagai lanjutan sinyal membran yang secara kaskade terus bergerak menuju nukleus. Interaksi ligan-reseptor tidak langsung menimbulkan

respon intraseluler, tetapi melalui proses fosforilasi reseptor yang dapat mengaktifasi kaskade jalur transduksi. Sinyal transduksi pada akhirnya membentuk jalinan sirkuit kompleks yang terintegrasi dan terinterkoneksi satu dengan lain menuju proses homeostasis.

## **2. Ligan sinyal**

Secara spesifik komunikasi baru akan terjadi ketika ligan *small molecule* berikatan dengan reseptor yang sesuai (reseptor permukaan membran atau intraseluler) dan kemudian menyebabkan fosforilasi reseptor (aktifasi). Hal ini mengesankan bahwa ligan molekul berperan sebagai molekul *first messenger*.

### **2.1 Pengertian ligan**

Ligan merupakan *small molecule* baik berupa peptida atau non peptida yang secara spesifik dapat mengikat molekul reseptor sehingga berperan sebagai sinyal komunikasi antar sel. Ligan disekresi oleh berbagai sel termasuk sel punca dengan karakter dan fungsi yang beragam tergantung pada sel pensyekresinya. Sekalipun demikian pada keadaan tertentu molekul ligan juga dapat berfungsi berlawanan dengan sebelumnya, yaitu ketika *niche* sel tersebut berubah secara drastis. Hal ini menjelaskan mengapa satu jenis sel dapat mensekresi molekul ligan dengan fungsi yang berbeda, yaitu satu sisi berfungsi sebagai stimulasi namun sisi lain sebagai inhibisi. Hal ini dikenal sebagai teori polarisasi sel yang sangat dipengaruhi oleh *niche*. Sisi lain jumlah konsentrasi molekul ligan juga ikut mempengaruhi hasil akhir (respon sel target).

### **2.2 Klasifikasi molekul ligan berdasarkan difusi**

Sebagian besar molekul ligan berfungsi sebagai molekul sinyal komunikasi dengan cara mengikat molekul ligan tersebut melalui reseptor permukaan atau secara langsung berdifusi melewati membran lipid bilayer. Difusi merupakan pergerakan suatu molekul dari area konsentrasi tinggi ke konsentrasi yang lebih rendah secara pasif. Hal ini menunjukkan bahwa molekul ligan yang berbeda dengan

komponen membran lipid bilayer akan berdifusi secara langsung, sedangkan yang sesuai dengan membrane lipid bilayer akan terikat pada reseptor. Berdasarkan hal tersebut maka molekul ligan diklasifikasikan menjadi 2 macam:

1. Ligan non-difusi (hidrofilik)

Molekul ligan yang berikatan dengan reseptor permukaan membran yaitu:

1) Ligan peptida

1. FSH
2. LH
3. Gonadotropin

2) Neurotransmitter

1. Ligan asetikolin
2. Ligan serotonin

2. Ligan difusi (hidrofobik)

Molekul yang berdifusi melewati membran menuju sitoplasma untuk mengikat reseptor nukleus

1) Molekul sinyal gas

1. CO<sub>2</sub> dan O<sub>2</sub>
2. Nitrit oksida

2) Hormon steroid

1. Hormon estradiol
2. Hormon progesteron
3. Hormon testoteron
4. Pheromone

3) Vitamin D dan asam retinoid

4) Tiroksin

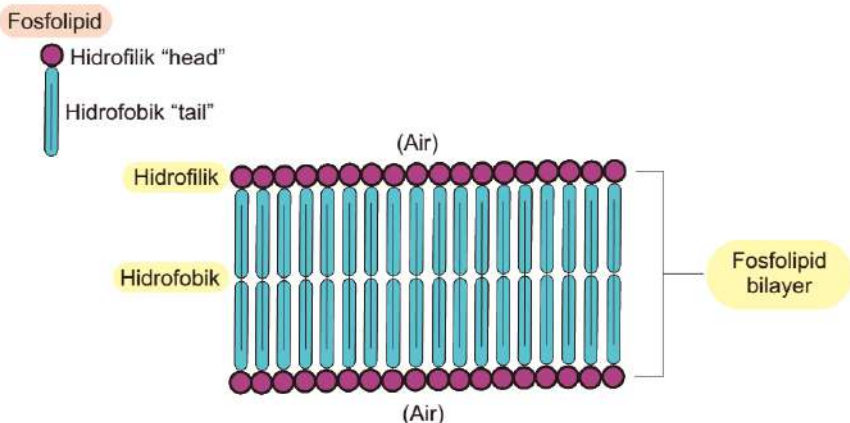
### **2.3 Membran lipid bilayer**

Struktur dasar membran sel adalah lipid bilayer yang tersusun atas protein transmembran dengan karakteristik *amphipatic* yaitu memiliki regio hidrofobik (non-polar dan tidak tertarik air) dan hidrophilik (polar dan tertarik air). Regio hidrofobik berada

didalam membran lipid bilayer yang kemudian berinteraksi regio hidropilik melalui ekor hidrophobik molekul lipid. Regio hidrophobik terasingkan dari air dan berada dalam membran, sebaliknya regio hidrophilik terekspos air pada dua sisi membran (luar dan dalam membran).

Terdapat protein membran sitosol yang terintegrasi dalam lipid bilayer hingga terekspos keluar permukaan membran baik melalui *amphipathic  $\alpha$  helix* atau melalui rantai lipid yang terikat secara kovalen (berupa rantai asam lemak). Penempelan kovalen protein lipid pada lapisan bilayer luar ini akan membantu melokalisasi protein *water-soluble molecule* (ekstraseluler) pada membran sel dan selanjutnya mengarahkan/ menghantarkannya menuju protein intraseluler sitosol (misalnya protein *phosphatidylinositol*). Protein lipid yang menempel ini dikenal sebagai struktur reseptor. Komunikasi terjadi ketika molekul ligan menempel pada reseptor permukaan membran ekstraseluler, kemudian dihantarkan menuju sitolasma melauai molekul *phosphatidylinositol* yang berada dalam lapisan membran intraseluler.

Membran bilayer diterangkan pada gambar dibawah ini.



Gambar 45. Membran bilayer

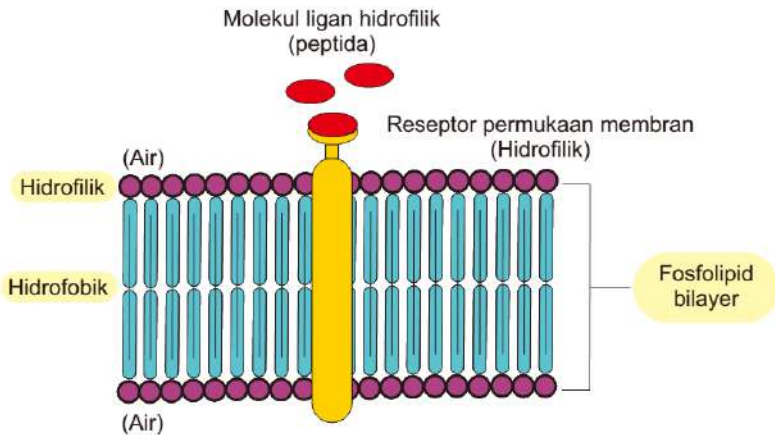
Struktur membran sel berupa lipid bilayer, terdiri atas regio hidrophobik yang berada didalam membran lipid bilayer dan

hidrofilik yang berada pada dua sisi membran (luar dan dalam membran). Regio hidrofobik berinteraksi dengan regio hidropilik melalui ekor hidrofobikmolekul lipid.

## 2.4 Molekul ligan terikat reseptor membran (non-difusi)

Ligan-non difusi adalah sekelompok molekul ligan yang dalam menginduksi sinyal komunikasi intraseluler tidak berdifusi pada membran lipid bilayer, namun dengan cara mengikat reseptor permukaan membran sel. Ikatan ligan-reseptor tersebut akan menghasilkan fosforilasi protein intraseluler yang secara kaskade mengaktifasi protein substrat efektor sitoplasmik hingga membentuk sinyal transduksi menuju nukleus untuk menimbulkan respon sel.

Molekul ligan non-difusi dijelaskan pada gambar dibawah ini.



Gambar 46. Molekul ligan hidrofilik

Molekul ligan hidrofilik mengikat reseptor permukaan membran yang bersifat hidrofilik.

Kelompok molekul ligan-non difusi (hidrofilik) adalah:

1. Peptida
  - 1) FSH
  - 2) LH
  - 3) Gonadotropin
2. Neurotransmitter
  - 1) Ligan asetikolin
  - 2) Ligan serotonin

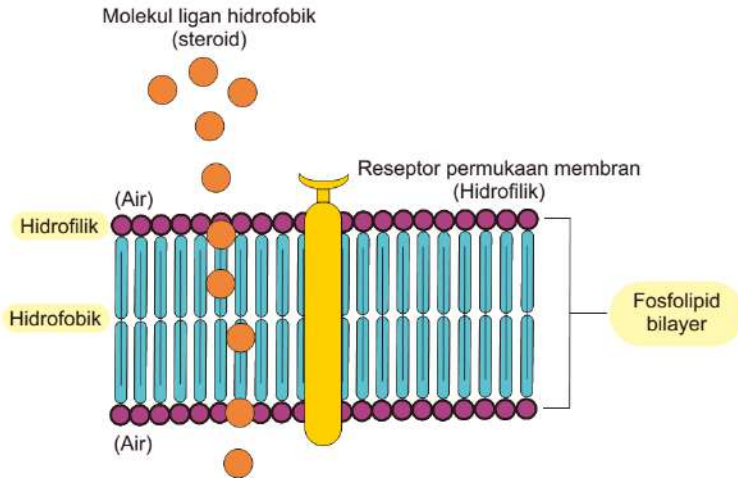
## **2.5 Molekul ligan-difusi**

Ligan-difusi adalah sekelompok molekul ligan yang dalam menginduksi sinyal komunikasi intraseluler terjadi secara langsung dengan berdifusi melalui membran lipid bilayer, hingga kemudian mengikat reseptor intraseluler. Hal ini disebabkan karena molekul ligan tersebut bersifat hidrofobik (tidak tertarik air dan non-polar). Sisi lain permukaan luar membran bilayer bersifat hidrofilik sehingga tidak memungkinkan bagi molekul ligan hidrophobik untuk mengikat reseptor permukaan membran yang bersifat hidropilik. Keadaan ini menyebabkan molekul ligan tersebut berdifusi secara langsung melewati membran lipid bilayer, kemudian mengikat reseptor intraseluler untuk mengaktifkannya.

Secara spesifik molekul ligan hidrofobik dibagi menjadi:

1. Hormon steroid
  - 1) Hormon estradiol
  - 2) Hormon progesteron
  - 3) Hormon testoteron
  - 4) Pheromone
2. Vitamin D dan asam retinoid
3. Tiroksin
4. Molekul sinyal gas
  - 1) Gas CO<sub>2</sub> dan O<sub>2</sub>
  - 2) Gas nitrit oksida

Molekul ligan difusi (hidrofobik) dijelaskan pada gambar 47 dibawah ini.



Gambar 47. Molekul ligan difusi

Molekul ligan hidrofobik tidak memungkinkan berikatan dengan berbagai reseptor permukaan membran yang bersifat hidrofilik sehingga molekul hidrofobik ini melakukan difusi langsung melewati membran lipid bilayer menuju reseptor intraseluler di sitoplasma.

## 2.6 Ligan peptida

Ligan peptide adalah *small* molekul kelompok protein yang dapat berikatan dengan reseptor permukaan sel dalam menginduksi sinyal komunikasi. Reseptor yang diikat oleh ligan ini diantaranya adalah reseptor tirosin kinase. Peptida adalah protein ligan yang berperan sebagai molekul komunikator ketika berikatan dengan reseptor. Sinyal komunikasi baru berfungsi ketika ligan peptide berikatan pada reseptor yang sesuai dengannya. Reseptor yang biasa digunakan adalah reseptor terkait protein G.

## **2.7 Neurotransmitter**

Molekul hidrofilik ini secara fisik tidak melintasi lapisan fosfolipid bilayer untuk memulai perubahan intraseluler (seperti hormon steroid), namun menggunakan ion  $\text{Ca}^{2+}$  atau cAMP, sebagai *second messenger* sedangkan neurotransmitter sendiri *first messenger*. Cara demikian memungkinkan sinyal ekstraseluler diperbanyak secara intraseluler sehingga menghasilkan sinyal transduksi. Ligan memiliki cara berbeda dalam mempengaruhi sel target dan hal ini terkait dengan reseptor sel tertentu.

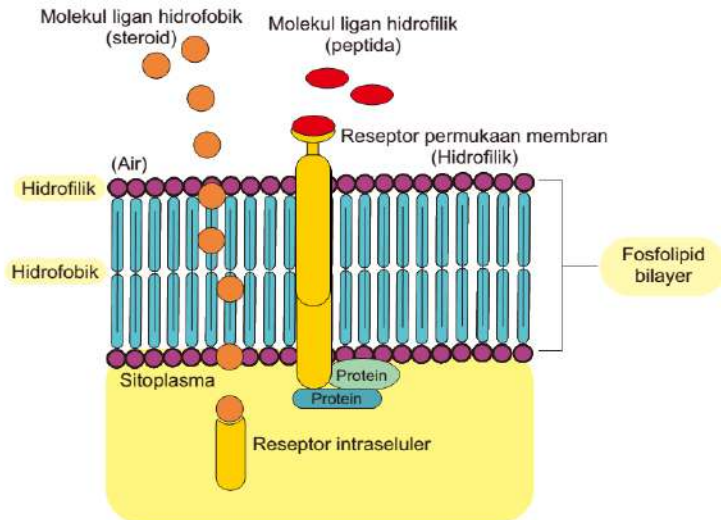
## **3. Reseptor**

Reseptor berperan untuk mendeteksi dan merespon berbagai stimulus baik berupa ligan kimia maupun fisik. Reseptor akan mempersepsikan molekul ligan yang telah diikatnya sebagai sinyal informasi, yang kemudianditansduksi menuju protein intaseluler hingga berakhir dengan respon seluler. Karakteristik reseptor umumnya berupa protein membran plasma, yang terekspresi secara selektif pada permukaan sel tertentu dan bersifat spesifik, diperkirakan terdapat dua puluh macam reseptor spesifik yang dapat mengikat berbagai macam ligan. Spesifisitas reseptor penting diketahui terutama ketika ingin diketahui molekul ligan yang akan diikatnya, karena reseptor ini hanya dapat berinteraksi dengan ligan tertentu saja, yang kompatibel dengan struktur reseptor itu sendiri.

### **3.1. Pengertian reseptor**

Reseptor adalah sekelompok molekul protein kelas tertentu yang diekspresikan secara selektif pada permukaan membran sel dan atau intraseluler dengan fungsi mengikat molekul ligan yang sesuai. Secara spesifik pengikatan ligan terjadi pada area tertentu suatu reseptor yang dikenal sebagai situs pengikatan ligan-reseptor.

Reseptor pengikat ligan dijelaskan pada gambar di bawah ini.



Gambar 48. Reseptor pengikat ligan

Secara teoritis reseptor tersusun atas sekelompok molekul protein yang diekspresikan pada permukaan membran sel dan atau intraseluler. Ligan hidrofobik (terlarut dalam lipid) akan langsung berdifusi ke dalam membran intraseluler untuk mengikat reseptor intraseluler, sebaliknya ligan yang hidrofilik akan mengikat reseptor yang berada pada permukaan membran.

### 3.2. Karakteristik reseptor

Secara spesifik reseptor memiliki karakteristik tertentu, yaitu:

1. Bersifat spesifik “konsep *lock and key*”

Setiap reseptor bersifat spesifik sehingga hanya dapat berinteraksi dengan ligan yang kompatibel dengan reseptor itu sendiri. Konsep ligan-reseptor dikenal sebagai konsep “*lock and key*”. Spesifisitas reseptor penting diketahui terutama ketika ingin mengetahui molekul ligan yang akan diikatnya. Setiap reseptor memiliki kemampuan mengikat ligan tertentu yang sesuai, yaitu:

- 1) Molekul ligan ekstraseluler hidrofilik (polar dan tertarik air) akan diikat oleh reseptor permukaan membran plasma (lipid bilayer)
- 2) Molekul ligan ekstraseluler hidrofobik (non-polar dan tidak tertarik air) akan berdifusi langsung melewati membran lipid bilayer untuk mengikat reseptor intraseluler dalam sitoplasma.
- 3) Molekul ligan tertentu yang dihasilkan akibat perubahan ionik atau stimulasi fisik pada permukaan membran dapat mengikat reseptor membran.

## **4. Aktivasi reseptor**

Secara teoritis reseptor suatu sel dalam keadaan inaktif terkonformasi sebagai bentuk formasi kimia yang statis.

### **4.1 Perubahan konformasi reseptor**

Perubahan konformasi reseptor adalah suatu keadaan dimana struktur kimia suatu reseptor sel berubah akibat stimulasi molekul ligan pada situs pengikatan reseptor. Perubahan konformasi reseptor ini menyebabkan fosforilasi reseptor menuju domain intraseluler sehingga reseptor menjadi aktif. Perubahan konformasi reseptor berupa:

#### **1. Perubahan langsung dalam reseptor**

Perubahan langsung dalam reseptor adalah suatu keadaan dimana pengikatan ligan-reseptor menyebabkan reseptor terkonformasi secara langsung sehingga terbentuk sinyal transduksi yang secara kaskade akan mengaktifasi berbagai protein sitoplasma. Contoh: reseptor *seven-helix*.

#### **2. Perubahan tidak langsung dalam reseptor**

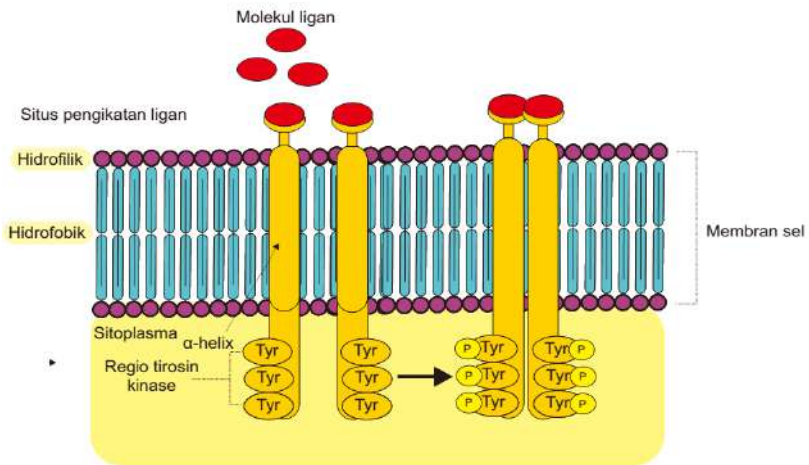
##### **1) Sebelum dimerisasi reseptor**

Suatu keadaan dimana reseptor mengalami konformasi paska ikatan ligan-reseptor sebelum reseptor tersebut mengalami dimerisasi. Hal ini menunjukkan bahwa aktivasi reseptor tersebut tidak melalui

proses dimerisasi kedua reseptor terlebih dahulu. Contoh: reseptor sitokin.

2) Setelah dimerisasi reseptor

Suatu keadaan dimana reseptor mengalami konformasi paska ikatan ligan-reseptor setelah reseptor tersebut mengalami dimerisasi. Hal ini menunjukkan bahwa aktivasi reseptor terjadi setelah kedua reseptor tersebut mengalami dimerisasi. Contohnya : reseptor tiroksin kinase (RTK).



Gambar 49. Aktivasi reseptor

Pengikatan ligan-reseptor menyebabkan reseptor terkonformasi yang ditandai dengan fosforilasi reseptor transmembran menuju intraseluler sehingga terbentuk sinyal transduksi.

## 4.2 Klasifikasi reseptor

Bedasarkan struktur dan ikatan fungsional ligan-reseptor, maka superfamili reseptor dibedakan menjadi 3 kelompok utama, yaitu :

1. Reseptor terkait enzim
2. Reseptor terkait protein G
3. Reseptor terkait *transmitter-ion channel*

### 4.3 Reseptor terkait enzim

Reseptor terkait enzim adalah protein membran dengan dua domain utama yaitu domain katalitik *single-transmembrane segment* (1-TMS) dan domain ekstraseluler. Domain katalitik berada di intraseluler dengan fungsi sebagai katalisis enzim tirosin kinase atau *guanylyl cyclase*, sedangkan domain ekstraseluler berada diluar membran lipid bilayer dan memiliki situs pengenalan ligan 1-TMS. Molekul 1-TMS adalah protein dengan sebuah segmen *transmembrane* dengan domain globular substansial. Secara spesifik reseptor terkait enzim terdiri atas 6 super famili, yaitu :

- 1) Reseptor tirosin kinase
- 2) Reseptor terkait tirosin kinase
- 3) Reseptor *like-tyrosine phosphatases*
- 4) Reseptor *serine/threonine kinases*
- 5) Reseptor *guanylyl cyclases*
- 6) Reseptor *histidine-kinase-associated receptors*.

### 4.4 Reseptor terkait protein-G

Reseptor terkait protein G merupakan protein membran integral yang memiliki 7 segmen (helical) transmembran dengan situs pengenalan ekstraseluler untuk mengikat ligan dan situs pengenalan intraseluler untuk protein pengikat GTP (*GTP-binding protein*).

### 4.5 Reseptor terkait *transmitter-ion channel*

Reseptor terkait *transmitter-ion channel* dikenal juga sebagai *transmitter-gated ion channel* atau reseptor ionotropik. Reseptor terkait *transmitter-ion channel* yaitu reseptor seven-helix yang tersusun atas asosiasi subunit protein, dimana tiap asosiasi mengandung beberapa segmen transmembran. Struktur reseptor ini merupakan saluran ion gerbang bagi ligan (*ligand-gated ion channels*) yang akan terbuka ketika terjadi pengikatan ligan spesifik. Sebagai contoh ligan saluran ion ini adalah *neurotransmitters*.

## 5. Protein-G dan reseptor

Protein G dalam keadaan normal berada pada status inaktif, terikat pada *guanosin difosfat* (GDP) dan menjadi aktif ketika berikatan dengan *guanosin trifosfat* (GTP).

### 5.1 Pengertian protein G

Protein G adalah famili *guanine nucleotide-binding protein* yang berperan sebagai saklar molekul intraseluler dengan fungsi mentransmisikan sinyal ekstraseluler ke dalam intraseluler. Protein G mengandung 3 subunit heterotrimer yang tertanam dalam membran intraseluler, yaitu:

1. Sub unit- $\alpha$  (45 to 47 kD)  
Subunit- $\alpha$  dapat mengikat GDP atau GTP dan memiliki aktivitas intrinsik GTPase lambat.
2. Subunit  $\beta$  (35 kD)
3. Subunit  $\gamma$  (7 to 9 kD)

### 5.2 Aktivasi protein-G

Aktivitas protein-G berdasarkan atas kemampuannya dalam mengikat dan mengganti GDP dengan GTP sehingga protein-G menjadi aktif atau menghidrolisis GTP menjadi GDP sehingga protein-G menjadi inaktif. Protein-G dalam keadaan normal adalah inaktif, dimana kompleks subunit  $\alpha\beta\gamma$  protein-G terikat pada situs nukleotide GDP. Aktivasi protein-G terjadi melalui tahapan sebagai berikut:

1. Pengikatan molekul ligan (hormon) pada reseptor terkait protein-G

Pengikatan hormon *acetilcolin* pada reseptor terkait protein-G menyebabkan perubahan konformasi reseptor terkait protein-G yang kemudian secara kaskade mengaktifasi rangkaian protein efektor berikutnya.

2. Pengikatan GDP menjadi GTP

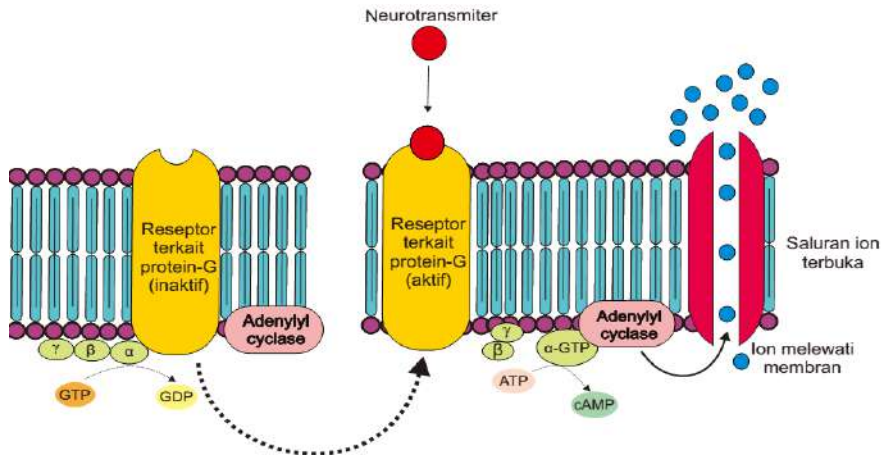
Reseptor yang terkonformasi akan menginduksi (katalisis) pergantian GDP yang ada pada subunit- $\alpha$  (komponen enzimatik) protein-G dengan GTP sehingga subunit- $\alpha$  protein-G menjadi aktif.

3. Aktivasi *adenylyl cyclase*

Subunit- $\alpha$  protein-G aktif akan berdisosiasi dari subunit- $\beta$  dan  $\gamma$  protein-G, yang kemudian mengikat *adenylyl cyclase* (enzim). Hal ini mengakibatkan enzim *adenylyl cyclase* menjadi aktif sehingga berperan sebagai *intracellular messenger*.

4. Modulasi pembukaan saluran ion

*Adenylyl cyclase* yang teraktivasi mampu memodulasi pembukaan saluran ion sehingga ion ekstraseluler dapat melewati saluran ion tersebut menuju intraseluler. Keberadaan ion intraseluler akan memicu rangkaian aktivasi jalur sinyal transduksi sitoplasmik sehingga menghasilkan respon sel.



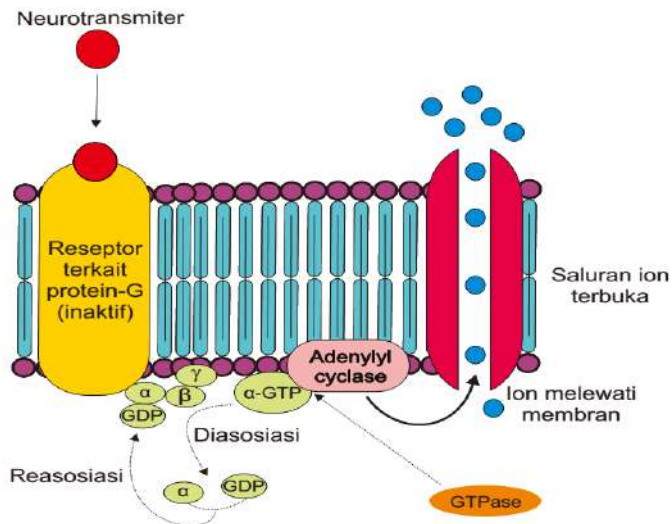
Gambar 50. Aktifasi protein-G

Protein-G dalam keadaan normal inaktif, dimana kompleks subunit  $\alpha\beta\gamma$  protein-G terikat pada GDP. Aktifasi protein-G terjadi melalui pengikatan ligan hormon pada reseptor yang menyebabkan perubahan konformasi reseptor sehingga mampu mengganti GDP pada subunit- $\alpha$  dengan GTP dan menjadi aktif. Subunit- $\alpha$  protein-G aktif akan berdisosiasi dari subunit- $\beta\gamma$  yang kemudian mengikat dan

mengaktifkan *adenylyl cyclase*. *Adenylyl cyclase* teraktifasi akan memodulasi pembukaan saluran ion sehingga ion ekstraseluler dapat melewatinya. Hal ini akan memicu jalur sinyal transduksi sitoplasmik untuk menghasilkan respon sel.

### 5.3 Inaktivasi protein G

Molekul GDP yang berikatan pada subunit- $\alpha$  protein-G akan menyebabkan protein-G menjadi inaktif, sebaliknya ketika GDP digantikan dengan molekul GTP protein-G menjadi aktif. Ikatan GTP subunit- $\alpha$  protein-G yang telah terikat pada *adenylyl cyclase* akan terhidrolisis oleh aktifitas GTPase intrinsik. Secara spesifik GTPase aktif akan mendorong subunit- $\alpha$  GTP terdisosiasi dari *adenylyl cyclase* yang berakibat subunit  $\beta$  dan  $\gamma$  protein-G kembali melakukan reasosiasi dengan subunit- $\alpha$  sehingga membentuk kompleks G  $\alpha\beta\gamma$  *heterotrimeric* yang inaktif.



Gambar 51. Inaktivasi protein-G

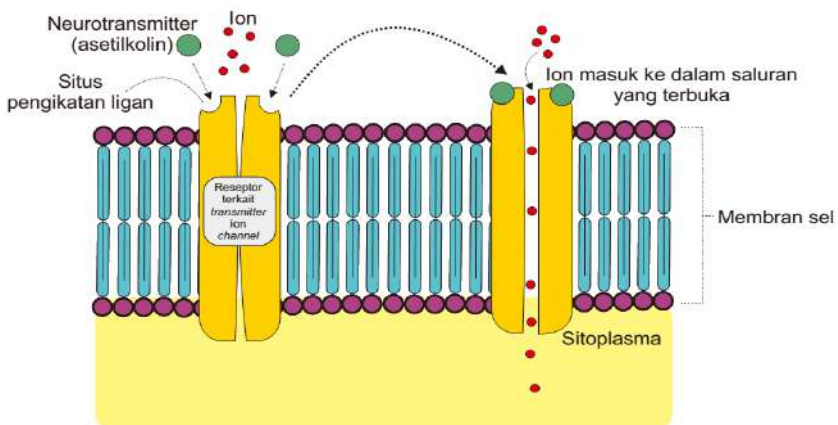
Aktifitas GTPase akan menghidrolisis ikatan subunit- $\alpha$ -GTP-*adenylyl cyclase*, sehingga mendorong subunit- $\alpha$  GTP terdisosiasi dari *adenylyl cyclase* yang berakibat subunit- $\alpha$  berasosiasi kembali dengan subunit- $\beta$  sehingga membentuk kompleks G  $\alpha\beta\gamma$  *heterotrimeric* yang menyebabkan protein-G inaktif.

## 6. Reseptor terkait *transmitter-ion channel*

Reseptor terkait *transmitter-ion channel* yaitu reseptor *seven-helix* yang tersusun atas asosiasi subunit protein, dimana tiap asosiasi mengandung beberapa segmen transmembran. Struktur reseptor ini berupa saluran ion yang merupakan pintu gerbang bagi ligan (*ligand-gated ion channels*). Saluran ini akan terbuka ketika terjadi pengikatan ligan tertentu pada reseptor terkait *transmitter-ion channel*. Salah satu contoh ligan saluran ion adalah molekul *neurotransmitters*.

### 6.1 Mekanisme pembukaan gerbang saluran ion

Saluran ion dalam reseptor terkait *transmitter-ion channel* pada kondisi normal adalah inaktif yaitu dalam posisi tertutup. Saluran ion ini baru akan terbuka ketika reseptor (protein transmembran) tersebut berikatan secara aktif dengan ligan neurotransmitter (*enabling signal*). Gerbang saluran ion yang terbuka menyebabkan ion memasuki saluran dan terus bergerak menuju sitoplasma. Perubahan konsentrasi ion menimbulkan respon seluler.



Gambar 52. Reseptor terkait *transmitter-ion channel*

Aktivasi reseptor terkait *transmitter-ion channel* dimulai dengan terikatnya acetilkolin (transmitter) pada situs pengikatan ligan-reseptor terkait *transmitter-ion channel*, yang menyebabkan terbukanya saluran ion sehingga memungkinkan ion memasuki saluran ion menuju sitoplasma untuk menimbulkan respon seluler.

## **7. *Second messenger*(cAMP)**

Aktivasi *second messenger* dapat memicu perubahan fisiologis seperti proliferasi, diferensiasi, migrasi, survival dan apoptosis dengan cara memicu kaskade transduksi sinyal intraseluler. Sistem pensinyalan *second messenger* ini secara kaskade kinase multi siklik bergabung menuju hilir untuk memperkuat sinyal *first messenger*.

### **7.1 Pengertian *second messenger***

*Second messenger* adalah molekul pensinyal intraseluler yang dilepaskan sel sebagai respon terhadap paparan molekul pensinyal sebelumnya (*first messenger*) yang berada di ekstraseluler. Proses *second messenger* dimulai dengan terikatnya molekul ligan (hormon) dengan reseptor permukaan membran.

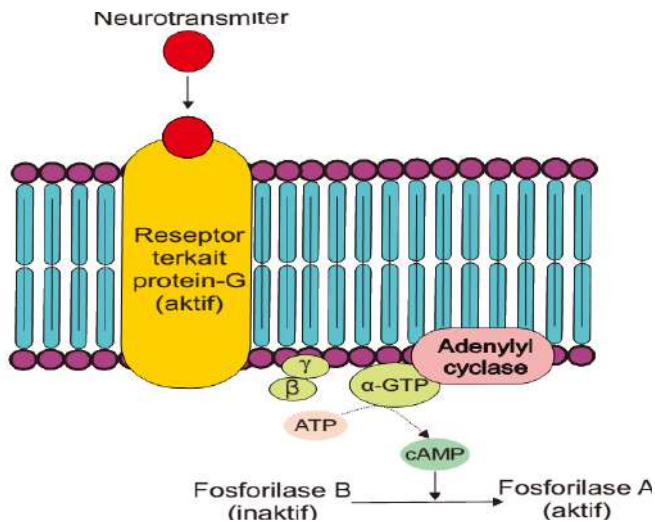
Secara sistematis *second messenger* terbagi menjadi 5 kelompok, yaitu:

1. cAMP
2. cGMP
3. inositol *trisphosphate*
4. *diacylglycerol*
5. kalsium.

### **7.2 Pengertian cyclic AMP**

cAMP (*adenosine 3',5'-cyclic monophosphate*) adalah substansi kimia hasil sintesis enzim *adenylyl cyclase* (enzim yang terikat membran) yang memerlukan ATP (*ATP-dependent enzyme*) sebagai proses aktivasi. Enzim *adenylyl cyclase* ini diaktivasi oleh protein-G (GTP-binding proteins) sehingga mampu mengikat ATP. Pelepasan cAMP akan memicu proses fosforilasi berbagai protein jalur transduksi sitoplasma untuk menimbulkan respon seluler. Sisi lain cAMP sendiri dapat dihidrolisis/ digradasi oleh enzim *soluble fosfodiesterase* menjadi bentuk inaktif. Aktivasi sinyal transduksi intraseluler tidak terjadi secara langsung pasca interaksi reseptor-

hormon membran, namun melibatkan peran protein-G melalui pelepasan cAMP yang disintesis oleh *adenylyl cyclase*. Hal ini menunjukkan bahwa cAMP merupakan *second messenger* bagi protein intraseluler lainnya.



Gambar 53. cAMP

Hormon sebagai *first messenger signaling* dan cAMP sebagai *second messenger signaling*. Model *second messenger signaling* memungkinkan efek intraseluler (proses aktif) tanpa dirinya memasuki sel, namun cukup menggunakan cAMP sebagai *second messenger*. *Adenylyl cyclase* bukan diaktivasi oleh kompleks reseptor-hormonal secara langsung, melainkan kompleks hormonal-reseptor ini menstimulasi protein *GTP-binding* (protein G). Protein G aktif kemudian mengaktivasi *adenylyl cyclase*.

Tabel 4. *Second messenger* intrasel

Second messenger intraseluler			
No	Messenger	Sumber	Efek
1	-	<i>Adenylyl cyclase</i>	Aktivasi protein kinase
2	cGMP	<i>Guanylyl cyclase</i>	Aktivasi protein kinase, Regulasi ion channel, Regulasi
3	Ca <sup>2+</sup>	Ion channels di RE dan Membran plasma	Aktivasi protein kinase, Aktifasi Ca <sup>2+</sup> - termodulasi protein
4	IP <sub>3</sub>	PLC action on PI	Aktivasi channel Ca <sup>2+</sup>
5	DAG	PLC action on PI	Aktivasi protein kinase C
6	Phosphatidic acid	Komponen membran dan produk PLD	Aktivasi Ca <sup>2+</sup> channels, Menghambat adenylyl cyclase
7	Ceramide	Aktivitas PLC di sphingomyelin	Aktivasi protein kinase
8	Nitric oxide (NO)	NO synthase	Aktivasi guanylyl cyclase, Relaksasi otot polos
9	Cyclic ADP-ribose	cADP-ribose synthase	Aktivasi Ca <sup>2+</sup> channel

## 8. Sinyal transduksi

Tahapan awal pembentukan sinyal transduksi ditandai dengan terikatnya molekul ligan pada reseptor membran. Karakteristik ligan yang akan berikatan pada reseptor penting untuk dikenali, karena dapat menentukan jalur sinyal transduksi. Struktur dan properti kimia suatu ligan akan mengikat reseptor yang sesuai. Informasi metabolik dibawa sebagai sinyal ligan yang akan diikat oleh reseptor membran atau berdifusi menuju nukleus untuk memodulasi transkripsi.

### 8.1 Pengertian sinyal transduksi

Sinyal transduksi adalah sinyal komunikasi kaskade intraseluler yang terjadi pasca berikatannya ligan-reseptor. Sinyal ligan-reseptor intraseluler mampu mengaktifasi serangkaian reaksi biokimia secara kaskade dengan tujuan merubah protein sinyal inaktif menjadi aktif. Rangkaian proses molekuler ini kemudian membentuk pola tertentu yang dikenal sebagai *signal transduction pathway*. Secara prinsip aktifasi sinyal transduksi menggunakan 2 reaksi kimia yaitu fosforilasi enzimatik dan penggunaan *second messenger* GTP.

## **8.2 Tahapan sinyal transduksi**

Sirkuit sinyal seluler melibatkan banyak jalur yang terjadi secara bertahap. Secara spesifik pengikatan ligan-reseptor membran tidak langsung menimbulkan respon seluler, namun berjalan bertahap dimulai dengan fosforilasi reseptor, aktivasi jalur sinyal transduksi sitoplasmik secara kaskade menuju nukleus yang kemudian memicu respon seluler baik pergerakan siklus sel (proliferasi), diferensiasi, apoptosis dan sebagainya. Secara sistematis tahapan sinyal transduksi dibagi menjadi 4 bagian utama:

1. Transfer sinyal ke dalam sel

Aktivasi protein intraseluler paska ikatan ligan-reseptor adalah tahapan awal dalam inisiasi sinyal transduksi. Inisiasi pembentukan sinyal transduksi tergantung pada karakteristik ligan. Ligan steroid (molekul difusi) melalui 2 cara yaitu dengan cara mengikat reseptor sitoplasmik (setelah difusi membran) atau secara langsung mempengaruhi proses transkripsi. Ligan non-steroid/ protein peptida (non-difusi) dengan cara mengikat molekul ligan tersebut pada reseptor permukaan membran.

2. Amplikasi sinyal sitoplasmik

Amplikasi sinyal merupakan tahapan proses penguatan sinyal tingkat sitoplasmik. Proses ini menggunakan *second messenger*, baik berupa *cyclic AMP* maupun *Inositol Triphosphate*. Karakteristik *second messenger* adalah molekul kecil, *water soluble*, non-protein, tersebar diseluruh sel melalui difusi.

3. Modulasi protein efektor

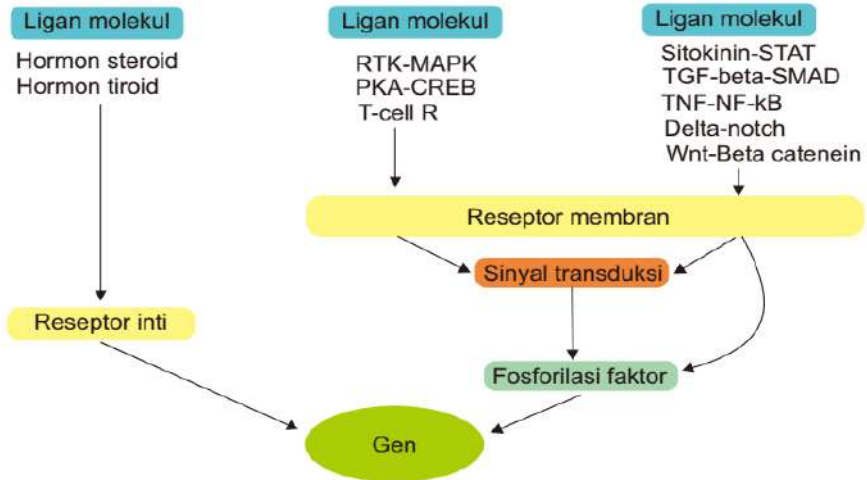
Modulasi protein efektor adalah proses aktivasi protein sinyal sitoplasmik menggunakan protein aktif secara kaskade berantai.

4. Respon seluler

Respon seluler adalah aktifitas seluler, baik fisiologik maupun patologik paska stimulasi kompleks protein sinyal transduksi ke dalam nukleus yang memicu proses transkripsi. Secara spesifik dimulai dengan aktivasi faktor transkripsi yang menstimulasi area

promoter suatu gen (sesuai dengan sinyal ligan). Dengan demikian area promotor gen lebih responsif terhadap stimulasi ligan sinyal yang mengikat reseptor sebelumnya.

Proses kaskade sinyal transduksi yang melibatkan berbagai molekul ligan dijelaskan pada gambar dibawah ini.



Gambar 54. Tiga jalur sinyal transduksi seluler

Inisiasi pembentukan sinyal transduksi melalui tiga jalur yaitu (1) ligan steroid proses difusi menuju intraseluler untuk mengikat reseptor nukleus untuk mempengaruhi proses transkripsi. (2) Ligan molekul non steroid (kelompok peptida) melalui pengikatan pada reseptor membran kemudian mengaktifasi sinyal transduksi menuju nukleus untuk proses transkripsi (3) ligan molekul lain melalui reseptor membran kemudian mengaktifasi sinyal transduksi atau secara langsung mempengaruhi proses transkripsi.

## 9. Respon sel terhadap sinyal

Respon intraseluler paska interaksi molekul sinyal ligan-reseptor intraseluler adalah berbeda tergantung pada jenis molekul ligan dan karakteristik reseptor. Secara spesifik hal ini terlihat ketika sebuah molekul ligan non-permeabel terhadap membran sel reseptor

berikatan, maka akan terjadi aktivasi protein reseptor setempat, dengan cara perubahan formasi struktur protein tersebut. Perubahan ini memiliki implikasi seluler yang berbeda tergantung pada karakter molekul ligan dan jenis reseptor.

Respon intraseluler terhadap sinyal tingkat membran dibagi 2 macam:

1. Respon tidak langsung

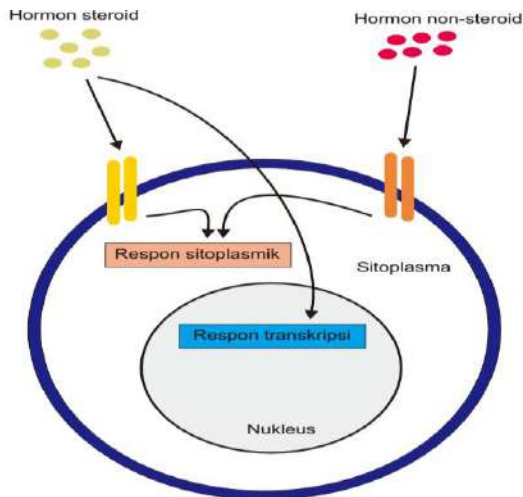
Respon tidak langsung merupakan respon intraseluler jenis lambat paska pengikatan molekul ligan-reseptor. Hal ini bertujuan untuk mengontrol ekspresi gen secara ketat. Secara spesifik proses dimulai paska pengikatan molekul ligan-reseptor hingga terbentuk kompleks ligan-reseptor teraktivasi. Proses selanjutnya melibatkan aktivasi banyak protein substrat dengan tujuan saling mengaktivasi protein efektor lain (enzim) secara berantai membentuk jalur sirkuit sinyal transduksi sitoplasmik hingga kemudian memasuki nukleus. Respon nukleus terhadap sinyal transduksi adalah aktivasi proses transkripsi sesuai dengan perintah sinyal ligan sebelumnya. Hal ini akan menimbulkan respon seluler. Dengan demikian interaksi ligan-sinyal ini dapat meregulasi aktivitas gen tertentu, sehingga terjadi perubahan aktivitas fisiologi suatu sel.

2. Respon langsung

Respon langsung adalah suatu respon molekul ligan intraseluler yang bersifat langsung dan cepat. Hal ini terkait aktivasi langsung pada protein fungsional (enzim) dalam sel target. Hal ini terlihat pada molekul ligan terkait gas nitrat oksida (NO), yaitu gas tidak berwarna yang dapat bersifat sebagai radikal bebas. Gas NO berperan sebagai molekul sinyal gas, sehingga juga dikenal sebagai *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF). Molekul EDRF (hasil biosintesis dari L-arginin, oksigen dan NADPH oleh enzim nitric oxide synthase (NOS) secara endogenous. Secara spesifik molekul EDRF sangat reaktif (lifetime hanya beberapa detik) sehingga mampu melewati membran nukleus secara bebas sebagai molekul sinyal yang

dapat menimbulkan respon relaksasi otot polos, sehingga menimbulkan respon vasodilatasi pembuluh darah secara cepat.

Respon seluler terhadap sinyal dijelaskan dalam gambar 55 dibawah ini



Gambar 55. Respon transkripsi

## **Daftar pustaka**

1. Uings IJ, Farrow SN. Cell receptors and cell signalling. *JClinPathol - MolPathol*. 2000;53(6):295–9.
2. Robertson JL. The lipid bilayer membrane and its protein constituents. *J Gen Physiol*. 2018;150(11):1472–83.
3. Hoffmann C, Zürn A, Bünemann M, Lohse MJ. Conformational changes in G-protein-coupled receptors- The quest for functionally selective conformations is open. *Br J Pharmacol*. 2008;153(SUPPL. 1):358–66.
4. Vivekanand P, Rebay I. Intersection of Signal Transduction Pathways and Development. *Annu Rev Genet*. 2006;40(1):139–57.

# **BAB V**

## **MODEL KOMUNIKASI SEL PUNCA PARAKRIN**

### **Tujuan**

---

Setelah membaca bagian ini, diharapkan pembaca mengerti tentang konsep komunikasi seluler, model komunikasi sel, parakrin, autokrin, endokrin, *gap junction* dan konsep parakrin sel punca

*Komunikasi sel dimulai dengan pengikatan molekul ligan pada reseptor sel. Ligan sebagai molekul sinyal, sedangkan reseptor sebagai molekul protein penerima sinyal, sehingga ikatan ligan-reseptor akan menimbulkan respon sel target. Tiap molekul ligan memiliki cara yang berbeda dalam mengikat reseptor dan hal ini sangat menentukan efek yang dihasilkan. Terdapat 4 model komunikasi yaitu parakrin, autokrin, intrakrin dan endokrin. Parakrin adalah komunikasi sel jarak dekat, autokrin adalah komunikasi dengan dirinya, sedangkan endokrin dengan sel jarak jauh. Autokrin merupakan kontrol terhadap homeostasis mikro-seluler. Gap junction adalah bentuk komunikasi antar dua sel secara kontak fisik langsung*

*Catatan penulis*

## **1. Latar belakang**

Setiap organisme baik uniseluler maupun multi seluler harus mampu berinteraksi dalam aktivitas kehidupan dasar dengan tujuan mencapai keadaan homeostasis. Interaksi ini merupakan bentuk komunikasi molekuler antar sel, yang diperankan oleh protein sinyal aktif hasil ekspresi gen suatu sel. Komunikasi seluler terjadi melalui pelepasan pesan tertentu, tergantung pada karakteristik sel dan *niche*-nya. Protein sinyal yang disekresikan dapat berbeda, bahkan dalam satu jenis sel yang sama sekalipun. Hal ini yang menjelaskan mengapa suatu sel dengan fungsi eksitasi, namun di waktu lain berfungsi sebagai inhibisi.

Pencapaian homeostasis terus dilakukan dengan cara setiap sinyal yang memicu aktifitas seluler akan diikuti dengan kemunculan sinyal inhibisi. Proses tersebut membentuk sirkuit sinyal kompleks yang terintegrasi dan inter-koneksi dimulai melalui pengikatan reseptor ligan yang berlanjut dengan sinyal transduksi dan berakhir dengan ekspresi gen tertentu. Hal ini menuju keadaan keseimbangan ditingkat mikro-seluler yang menentukan stabilitas genomik suatu sel. Ekspresi protein yang salah akibat mutasi genetik atau akibat proses

epigenetik menyebabkan disharmonisasi sirkuit sinyal, yang memunculkan gangguan komunikasi seluler pada berbagai penyakit. Oleh karenanya pemahaman bentuk dan tipe komunikasi seluler dan model komunikasi sebagai satu kesatuan komponen sirkuit dirasa penting untuk dibahas.

## **2. Konsep komunikasi seluler**

Peranan ligan dan reseptor adalah penting dalam memulai proses komunikasi. Komunikasi seluler diinisiasi oleh pelepasan molekul tertentu yang berperan sebagai sebagai ligan.

### **2.1 Komunikasi seluler**

Komunikasi seluler adalah suatu cara sel dalam mempengaruhi sel target melalui pelepasan molekul ligan tertentu yang mampu mengikat reseptor. Ligan sebagai molekul sinyal, sedangkan reseptor sebagai molekul protein penerima sinyal. Secara spesifik molekul ligan hanya mengikat reseptor sel target yang sesuai dengan karakteristiknya. Hal ini menunjukkan bahwa kesesuaian karakter antara ligan-reseptor menjadi sentral dalam komunikasi sel.

### **2.2 Karakter ligan-reseptor dalam komunikasi sel**

Karakteristik molekul ligan akan mempengaruhi cara ligan dalam mengikat suatu reseptor. Struktur reseptor sendiri adalah unik, dimana lapisan luar berupa membran hidrofilik yang berarti tidak akan merespon terhadap molekul ligan dengan struktur larut dalam lipid, sedangkan membran lapisan dalam berupa hidrofobik yang bersifat sebaliknya.

Secara sistematis karakter molekul ligan dibagi menjadi 2 macam, yaitu:

1. Ligan dengan karakter larut dalam lemak
2. Ligan dengan karakter larut dalam air

### **2.3 Ligan dengan karakter larut dalam lemak**

Ligan dengan karakter larut dalam lemak (hidrofobik) akan langsung berdifusi ke dalam sitoplasma untuk mengikat reseptor intra seluler sehingga membentuk kompleks ligan-reseptor. Komplek ini mampu translokasi ke dalam nukleus untuk mengikat elemen DNA gen target sehingga menimbulkan respon seluler, berupa ekspresi protein tertentu.

Secara spesifik molekul ligan hidrofobik dibagi menjadi:

1. Hormon steroid
  - 1) Hormon estradiol
  - 2) Hormon progesteron
  - 3) Hormon testoteron
  - 4) Pheromone
2. Vitamin D dan asam retinoid
3. Tiroksin
4. Molekul sinyal gas
  - 1) Gas CO<sub>2</sub> dan O<sub>2</sub>
  - 2) Gas nitrit oksida

### **2.4 Ligan dengan karakter larut dalam air**

Ligan dengan karakter larut dalam air akan berikatan pada reseptor permukaan membran sel. Hal ini disebabkan karena permukaan luar membran sel juga hidrofilik (tertarik dengan air), sehingga memungkinkan molekul ligan tersebut mengikat reseptor permukaan membran sel.

Secara spesifik molekul ligan hidrofilik dibagi menjadi:

1. Hormon peptide
  - 1) FSH
  - 2) LH
  - 3) Gonadotropin.
2. Asam amino
3. Neurotransmitter
  - 1) Ligan asetikolin

2) Ligan serotonin

### 3. Model komunikasi sel

Secara garis besar komunikasi antar sel terjadi melalui 3 model, yaitu:

1. Model komunikasi langsung

Komunikasi langsung adalah model komunikasi antar sel yang sangat berdekatan melalui pelepasan ion/ *small molecule* pada saluran khusus antar sel (*gap junction*) yang dibangun oleh protein *connexin*. Secara spesifik *gap junction* memungkinkan sinyal ion (listrik) atau *small molecule* (kimia) yang dilepas sel untuk memasuki sitoplasma sel target sehingga menimbulkan respon seluler. Secara spesifik model komunikasi ini berupa sinap.

2. Model komunikasi jarak dekat

Komunikasi jarak dekat adalah model komunikasi antar sel yang berdekatan melalui pelepasan molekul ligan ekstraseluler yang akan berikatan dengan reseptor sel target. Secara spesifik komunikasi ini dibagi menjadi 2, yaitu:

1) Parakrin

2) Autokrin

3. Model komunikasi jarak jauh

Komunikasi jarak jauh adalah komunikasi antar sel yang berjauhan melalui pelepasan sinyal listrik/ kimia (hormon/ neurohormon) via sel saraf dan atau aliran darah. Secara spesifik model komunikasi ini berupa endokrin.

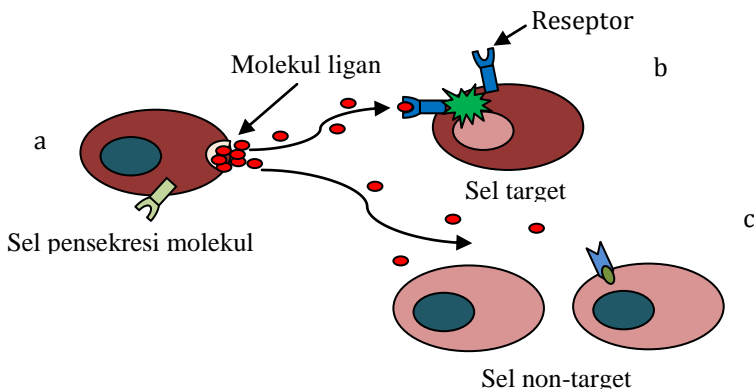
### 4. Parakrin

Parakrin adalah salah satu bentuk komunikasi interseluler jarak dekat, dimana sel mensekresikan beberapa molekul komunikator sebagai ligan yang akan mengikat reseptor sel target yang sesuai. Komplek ikatan ligan-reseptor ini akan mengaktivasi

jalur transduksi sitoplasmik secara kaskade hingga memasuki nukleus dengan target transkripsi gen tertentu. Hal ini menyebabkan ekspresi protein tertentu yang mempengaruhi status metabolik sel target tersebut. Karakteristik parakrin menunjukkan bahwa sel dipersepsikan mampu mengeluarkan efek biologik dengan melepas berbagai faktor yang dapat menstimulasi jaringan sekitarnya. Secara spesifik molekul parakrin dapat menstimulasi :

1. sel punca endogenous aktif
2. mensupresi apoptosis sel sekitar
3. *remodelling* matrik ekstraseluler
4. proses angiogenesis.

Sinyal parakrin dijelaskan dalam gambar dibawah ini



Gambar 56. Sinyal parakrin

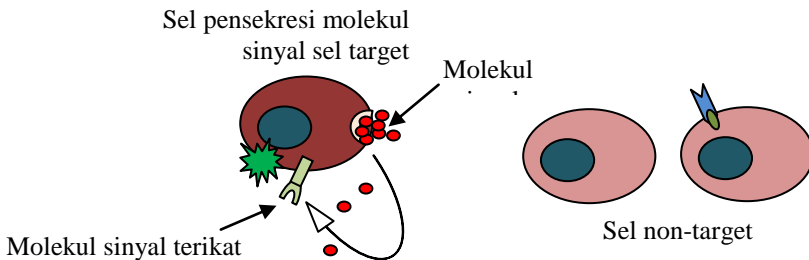
(a). Molekul ligan yang disekresi sel menuju ke-reseptor sel target (karakteristik molekul reseptor sesuai). (b) Ikatan antara molekul sinyal sesuai reseptor sel target, menyebabkan sel target menjadi aktif. (c) Tidak terjadi komunikasi antar sel non-target, disebabkan karena tidak ada reseptor atau reseptor tidak sesuai dengan molekul sinyal.

## 5. Autokrin

Autokrin adalah bentuk komunikasi intraseluler yang unik, karena sebagian substansi molekul ligan yang telah disekresikan ke ekstraseluler namun digunakan kembali oleh sel tersebut dengan

mengikatnya pada reseptor sendiri. Hal ini menyebabkan ligan yang dihasilkan disamping mempengaruhi sel target juga akan mempengaruhi aktivitas dirinya. Komunikasi autokrin merupakan bentuk kontrol terhadap homeostasis mikro-seluler, yang berfungsi untuk memastikan komunikasi sel dalam keadaan normal. Sel mensekresi sinyal eksitasi secara berlebihan, maka saat yang sama sel tersebut juga akan mensekresikan sinyal inhibisi yang dapat diikat oleh reseptornya sendiri, sehingga terjadi keseimbangan homeostasis. Malignansi adalah salah bentuk disregulasi dari sistem autokrin.

Sinyal autokrin dijelaskan dalam gambar 45 dibawah ini



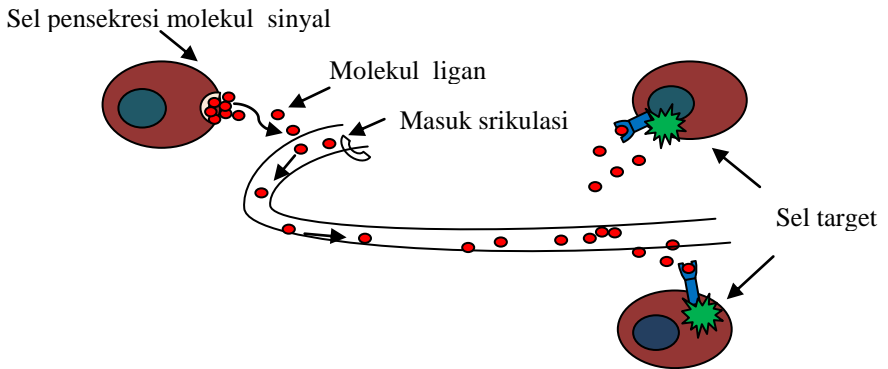
Gambar 57. Sinyal autokrin

Molekul ligan yang disekresi sel berikatan dengan reseptor sel sendiri, sehingga sel tersebut menjadi target.

## 6. Endokrin

Endokrin adalah bentuk komunikasi intraseluler jarak jauh, dimana sel mensekresikan molekul ligan yang dapat memasuki sistem sirkulasi menuju sel target berjarak jauh hingga kemudian berikatan dan menimbulkan respon seluler. Model komunikasi ini banyak digunakan oleh hormonal, sebagai contoh insulin yang dihasilkan sel  $\beta$  pancreas, akan bergerak jauh memasuki sirkulasi darah untuk berikatan dengan seluruh sel tubuh dengan target metabolisme glukosa.

Sinyal endokrin dijelaskan dalam gambar dibawah ini



Gambar 58. Sinyal endokrin

Molekul ligan yang disekresi sel, bergerak memasuki sistem sirkulasi tubuh dan berikatan dengan reseptor sel target yang letaknya jauh.

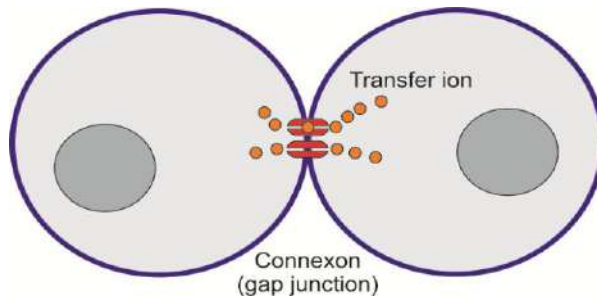
## 7. Model sinap (*gap junction*)

Beberapa komunikasi antar sel memerlukan kontak antar sel, diantaranya adalah membentuk *gap junction* yang dapat menghubungkan sitoplasma suatu sel dengan sel sebelahnya. *Gap junction* adalah struktur sel yang terspesialisasi dimana membrane membentuk saluran junction yang berhubungan dengan membrane sitoplasma sel sekitar.

### 7.1 Pengertian *gap junction*

Model *gap junction* adalah suatu model komunikasi sel secara langsung melalui koneksi saluran khusus antar sel, dikenal sebagai *gap junction*. Saluran *gap junction* memungkinkan terjadi pertukaran molekul sinyal intraseluler seperti  $\text{Ca}^{2+}$  dan cyclic AMP, sehingga mampu mengaktifasi sel target. Sekalipun demikian makromolekul seperti protein atau asam nukleat tidak dapat melalui saluran tersebut. Secara spesifik *gap junction* adalah suatu saluran yang terbentuk antara dua sel, dimana antara sitoplasma sel satu dan sel sekitarnya

saling terhubung, yang dikenal sebagai *communicating junction*, yang dijelaskan dalam gambar di bawah ini.



Gambar 59. *Gap junction*

Gap junction saluran yang terbentuk antar dua sel melalui sitoplasma sehingga terkoneksi antar dua sel tersebut dan memungkinkan pertukaran molekul sinyal intraseluler yang berakibat pada hantaran sinyal komunikasi.

## 7.2 Karakteristik *gap junction*

Karakteristik *gap junction* adalah pembentukan saluran yang saling terhubung antar sitoplasma seluler membentuk bangunan silinder dengan sebuah pori disentral dan menonjol melewati membran sel berdekatan lalu berintraksi membentuk *gap junction*. Hal ini disebabkan interaksi 6 protein connexin (*connexon*) yang membentuk pori *connexon*. Interaksi ini untuk memastikan bahwa komunikasi terjadi secara efisien tanpa harus kehilangan molekul atau terlepasnya molekul atau ion pada cairan ekstraseluler.

## 7.3 Peranan *gap junction*

Komunikasi *gap junction* terjadi pada banyak jaringan tubuh dan berperan sentral pada beberapa organ terutama dalam:

### 1. Sel otot jantung

Kontraksi otot jantung memerlukan koordinasi yang tepat antar sel agar terjadi secara teratur. Hal ini dilakukan melalui kontrol pengeluaran ion (molekul ligan) via *gap junction*. *Gap junction* antara sel otot jantung yang berdekatan ini memungkinkan

penyebaran dan propagasi potensial aksi dari regio *pacemaker* jantung untuk menyebar, sehingga kontraksi jantung selalu dalam terkordinasi.

2. Sel otak

Transfer sinyal dalam otak memerlukan ketepatan dan keberaturan sinyal transmitter via *gap junction*. Hilangnya *gap junction* pada sel otak memperlihatkan penurunan densitas (kepadatan) sel otak.

3. Sel retina dan sel kulit

Kedua sel ini menggunakan *gap junction* diduga terkait dengan proliferasi dan diferensiasi.

## **8. Konsep parakrin sel punca**

Secara konseptual parakrin adalah bentuk komunikasi antar sel dan atau matriks sekitarnya dimana molekul sinyal tertentu yang dilepas sel terutama sel radang dan MSC dapat mempengaruhi sel target atau matriks sekitarnya, baik berupa aktivasi maupun inhibisi. Dengan demikian parakrinisasi bertujuan untuk memicu aktivasi, inhibisi, diferensiasi dan atau proliferasi.

### **8.1 Fakta dasar teori parakrin MSC**

Konsep dan teori parakrin MSC secara cermat diamati dari berbagai hasil penelitian tersebut dibawah ini, dimana terjadi berbagai hasil penelitian yang tidak sesuai dengan konsep diferensiasi sel punca:

#### **1. Injeksi MSC langsung pada infark miokard**

1) Kecepatan sembuh lebih cepat dibandingkan teori regenerasi

Penelitian pada model hewan coba dengan infark jantung, yang melaporkan bahwa terjadi efek klinis berupa perbaikan fungsi jantung dan pencegahan terjadinya ventricular remodeling dalam waktu kurang dari 72 jam post injeksi. Sementara proses diferensiasi membutuhkan waktu lebih lama.

2) MSC tidak berdiferensiasi pada area cedera

MSC tidak mampu berdiferensiasi menjadi kardiomyosit dalam kondisi fisiologis *in vivo*, sekalipun MSC diinjeksikan secara langsung di area infark jantung.

3) MSC supresi inflamasi dan regenerasi

Penelitian lain menunjukkan bahwa terjadi efek antiinflamasi dan pengurangan ukuran infark miokard paska injeksi MSC

**2. Injeksi MSC secara IV**

Sebagian besar MSC terjebak dalam paru dan hati sebagai emboli dan hanya sebagian kecil saja yang berhasil memasuki area cedera ketika dilakukan injeksi MSC secara IV.

**3. Injeksi GF MSC *in vitro***

Pemberian *conditonal medium* mampu meningkatkan pemulihan kultur kardiomyosit yang iskemik *in vitro*.

**4. Injeksi MSC secara IM**

MSC mampu meningkatkan pemendekan fraksional, kecepatan miosit dan kapiler, sisi lain apoptosis dan fibrosis ditekan

**5. Topikal lem fibrin dengan MSC pada *spinal cord injury***

MSC meningkatkan regenerasi *spinal cord*, namun tidak ditemukan marker hMSC yang berdiferensiasi menjadi neuron tikus.

Kesemua fakta diatas menunjukkan bahwa terdapat mekanisme lain dalam meregenerasi jaringan cedera selain melalui diferensiasi, yaitu melalui parakrinisasi. Hal ini diperkuat dengan beberapa penelitian yang menunjukkan bahwa terjadi peningkatan ekspresi sel progenitor atau sel punca endogenous paska pemberian MSC.

**8.2 Molekul parakrin MSC**

Parakrinisasi MSC adalah suatu keadaan dimana MSC mensekresi berbagai molekul tertentu terkait dengan proses regenerasi. Secara teoritis molekul parakrin MSC dibagi menjadi:

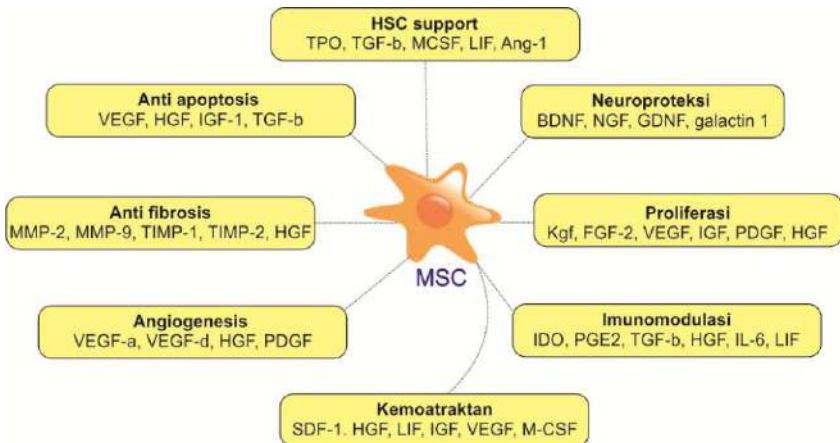
1. Molekul anti-inflamatori

MSC paska terpapar molekul inflamasi  $TNF\alpha$ , IL-1 dan  $IFN\gamma$  maka akan melepas berbagai molekul anti-inflamasi, yaitu:

1) IL-10

- 2) TGF
  - 3) IL-1ra
  - 4) TSG-6
2. Molekul pro-regenerasi:
- Sebagai bentuk respon inflamasi yang terkendali maka MSC merespon dengan melepas berbagai molekul pro-regenerasi, yaitu:
- 1) Molekul angiogenesis
    1. VEGF
    2. FGF-2
    3. Ang-1
  - 2) Molekul proliferasi dan diferensiasi
    1. PDGF
    2. IGF-1
  - 3) Molekul kemoatraktan
    1. HGF
    2. VEGF

Molekul parakrin dijelaskan dalam gambar



Gambar 60. Molekul parakrin MSC

### **8.3 Aplikasi molekul parakrin MSC**

Molekul yang disekresi MSC dapat bervariasi tergantung pada jenis dan lamanya stimulasi. Secara spesifik aplikasi molekul parakrin MSC berupa:

#### **1. Pemicu aktifitas sel in-vitro**

##### 1) Aktivitas *stemness*

Molekul yang dilepas MSC pada keadaan tertentu (hipoksik) dapat memicu aktivitas *stemness* sehingga turunan yang dihasilkan tetap memiliki karakteristik seperti induk.

##### 2) Aktivitas diferensiasi

Molekul yang dilepas MSC pada keadaan tertentu (stimulasi mediator inflamasi) dapat memicu diferensiasi menjadi berbagai sel spesifik.

#### **2. Pembuatan conditional medium**

Molekul yang dilepas MSC pada kondisi tertentu (hipoksik) berada dalam medium, yang dikenal sebagai *conditional* medium (CM). Secara spesifik CM berisi berbagai molekul aktif yang dapat berperan penting dalam proses regenerasi dan atau imunoregulasi (imunosupresi) yang berguna pada penelitian in-vitro maupun klinik.

#### **3. Pemicu aktifitas sel In-vivo:**

##### 1) Aktivasi sel punca endogenous

Molekul yang dilepas MSC mampu mengaktivasi sel punca endogenous untuk mensekresi berbagai molekul aktif dan atau diferensiasi menjadi sel matur sesuai dengan *niche* dalam upaya meregenerasi jaringan cedera. Hal ini penting dalam merestorasi berbagai kerusakan jaringan akibat penyakit degeneratif atau penyakit klinik lainnya.

##### 2) Aktivitas imunoregulasi

Molekul yang dilepas MSC mampu mensupresi berbagai aktivitas sel radang sekitarnya menuju fase homeostatis sehingga berperan sebagai imunoregulasi proses inflamasi. Hal ini penting karena inflamasi yang terkendali akan mendorong fase proliferasi

lebih dini sehingga terjadi akselerasi proses penyembuhan.

3) Aktivitas neovaskularisasi

VEGF dan FGF-2 berperan dalam mengatur sel endotel dalam proliferasi, migrasi, hingga pembentukan tabung pembuluh darah. Percobaan pada kelinci dengan kaki belakang yang mengalami iskemia memberikan hasil yang bagus. Hal lain Ang-1 juga berperan sebagai pemicu penyebaran sel endotel sebagai langkah awal neovaskularisasi. Faktor yang merangsang pertumbuhan dan motilitas sel endotel adalah HGF dimana pada tikus dengan myocard infark memberikan hasil yang baik. Peran HGF adalah mengaktifasi ras-ERK1/2 dan p38 MAPK sekaligus jalur PI3K/Akt. Jalur PI3K/Akt dan MAPK diaktifkan pula oleh sekresi TGF- $\alpha$  dan VEGF yang dirangsang oleh TGF- $\beta$ . MSC juga mengeluarkan kemoatraktan yaitu MCP-1 yang berfungsi juga untuk meningkatkan permeabilitas vaskuler sekaligus meningkatkan pengeluaran VEGF. Kemoatraktan lain yang dipicu oleh kemampuan parakrin MSC adalah SDF-1 $\alpha$  yang berperan sebagai kemoatraktan sel progenitor dan penting untuk migrasi, adhesi, homing, dan rekrutmen dari stem cell endogen. Kemampuan homing dan migrasi dari MSC diaktifkan oleh reseptor G protein (CXCR4)

## **Daftar pustaka**

1. Müller E, Wang W, Qiao W, Bornhäuser M, Zandstra PW, Werner C, et al. Distinguishing autocrine and paracrine signals in hematopoietic stem cell culture using a biofunctional microcavity platform. *Sci Rep* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016;6(March):1–12.
2. Gressner OA. Intracrine Signaling Mechanisms of Activin A and TGF- $\beta$ . *Vitam Horm*. 2011;85:59–77.
3. Evans WH, Martin PEM. Gap junctions: Structure and function (review). *Mol Membr Biol*. 2002;19(2):121–36.
4. Yelick PC, Zhang W. Mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Princ Pract*. 2012;1416(Cmc):10-1-10-4.
5. Liang X, Ding Y, Zhang Y, Tse H-F, Lian Q. Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy: Current Status and Perspectives. *Cell Transplant* [Internet]. 2014;23(9):1045–59.

# **BAB VI**

## **JALUR MOLEKULER**

### **PROLIFERASI SEL PUNCA**

#### **Tujuan**

---

Setelah membaca bagian ini, diharapkan pembaca mengerti tentang sirkuit molekuler proliferasi sel punca, jalur proliferasi sel punca, jalur sinyal transduksi PI3K/Akt, reseptor cMET, IGF-1, NF- $\kappa$ B, aktivasi mTOR, jalur BMP/ SMAD, LIF/ STAT3, sinyal proliferasi embrionik, *notch*, Wnt, *sonic hedgehog*, proliferasi RTK: FGF/ MAPK dan protein integrin: non ikatan ligan-reseptor

*Secara sistematis jalur proliferasi dapat dibagi menjadi tiga tahap, dimulai dengan terikatnya ligan pada reseptor, dikenal sebagai sinyal proliferasi tingkat membran, dilanjutkan dengan pembentukan sinyal transduksi sitoplasmik, sebagai sinyal proliferasi sitoplasmik, dan akhirnya transduksi menuju nukleus, dikenal sebagai sinyal proliferasi nukleus. Sinyal proliferasi asal ekstrinsik dan intrinsik yang over-eksitasi akan mengalami sinyal inhibisi sebagai kontrol seluler baik pada ekstraseluler, membran, sitoplasmik maupun nukleus dengan tujuan untuk memastikan bahwa sinyal eksitasi post transduksi sitoplasmik tersebut layak diteruskan ke nukleus secara periodik dan berkesinambungan demi mencapai keseimbangan homeostasis.*

*Catatan penulis*

## **1. Latar belakang**

Setiap sel punca memiliki kesamaan dalam meregulasi jalur proliferasi, siklus sel, reparasi DNA dan proses apoptosis/ penuaan. Terlepas dari asal sel punca dan potensi diferensiasi, setiap sel punca akan menentukan arah pergerakan proliferasi pasca terpapar stimulasi ekstrinsik. Arah pergerakan ini dapat berupa pembelahan secara pembaharuan diri atau diferensiasi. Sisi lain sel punca juga dapat memasuki periode *quiescence* atau *senescence* pada kondisi tertentu. Aktivitas proliferasi sel punca diregulasi mulai dari tingkat reseptor, tingkat sitoplasmik dan tingkat nukleus, dengan melibatkan jalur RTK/MAPK untuk jalur diferensiasi dan jalur jalur *G-protein couple receptor* GPCR/PI3K, BMP-R/SMAD dan LIF-R/STAT3 dalam pembaharuan diri. Secara spesifik jalur pembaharuan diri membentuk sirkuit regulator dengan melibatkan faktor transkripsi pluripoten sebagai aktivitas sentral yang berintegrasi dengan *soluble molecule* BMP dan LIF serta jalur diferensiasi/ pembaharuan diri.

Sel punca mampu mempertahankan keberadaannya dalam jumlah tertentu dalam suatu jaringan sebagai upaya homeostatis. Hal

ini ditunjukkan dengan dihasilkannya minimal satu sel punca identik dengan induk setiap kali pembelahan termasuk dalam pembelahan (asimetris). Turunan identik digambarkan dengan adanya kesamaan fenotip dan pola ekspresi gen antar keduanya. Berbagai jalur sinyal proliferasi molekuler ini pada akhirnya membentuk berbagai jalinan sirkuit sinyal yang rumit dan kompleks, saling terintegrasi dan terinterkoneksi satu dengan lainnya, menuju proses “homeostasis”.

Mengingat begitu pentingnya peranan sel punca dalam menjaga homeostatis maka perlu dilakukan pemahaman mendasar terkait mekanisme proliferasi dalam membentuk sirkuit regulator, mulai definisi, jalur diferensiasi, jalur pembaharuan diri, kontrol seluler dalam sinyal proliferasi, mekanisme *feedback* negatif dan jalur sinyal proliferasi embrionik.

## **2. Sirkuit molekuler proliferasi sel punca**

Sel punca embrionik membelah secara simetris setiap 12 jam dengan upaya memperbaharui diri. Pembelahan ini melibatkan interaksi berbagai jalur proliferasi dengan molekul ligan protein (*soluble molecule*) sebagai stimulator awal yang kemudian mengikat dan mengaktivasi reseptor sehingga terbentuk kompleks ligan-reseptor yang berlanjut dengan pembentukan sirkuit regulator dengan melibatkan faktor transkripsi pluripoten dan faktor co-transkripsi.

### **2.1 Pengertian sirkuit regulator proliferasi sel punca**

Sirkuit proliferasi sel punca adalah sirkuit yang meregulasi proliferasi sel punca yang melibatkan interaksi berbagai molekul/jalur mulai faktor transkripsi pluripoten, faktor co-transkripsi, *soluble molecule* dan jalur proliferasi. Sirkuit regulator ini mendorong sel punca memasuki siklus sel baik secara langsung maupun tidak langsung yang berakibat pada peningkatan aktivitas pembaharuan diri.

## **2.2 Pengertian faktor transkripsi pluripoten**

Faktor transkripsi pluripoten adalah protein Oct4/Sox2/Nanog yang berperan mengontrol laju transkripsi genetik DNA ke mRNA dengan cara mengikat sekuens DNA terkait gen dengan potensi *stemness* ke arah jalur pembaharuan diri.

## **2.3 Pengertian faktor co/transkripsi**

Faktor co/transkripsi adalah berbagai protein spesifik yang ikut terlibat membantu mengontrol laju transkripsi genetik terkait gen pemeliharaan jalur pembaharuan diri. Protein tersebut adalah Utf1, Sall4, Eras, Tcf1, b-Myc, c-Myc.

## **2.4 Pengertian Soluble molecule**

*Soluble molecule* merupakan molekul protein yang dilepas oleh berbagai sel/ komponen matriks sekitar secara parakrin atau autokrin dengan tujuan mempertahankan proliferasi. *Soluble molecule* BMP dan LIF merupakan menginduksi jalur pembaharuan diri, sedangkan FGF ke arah diferensiasi.

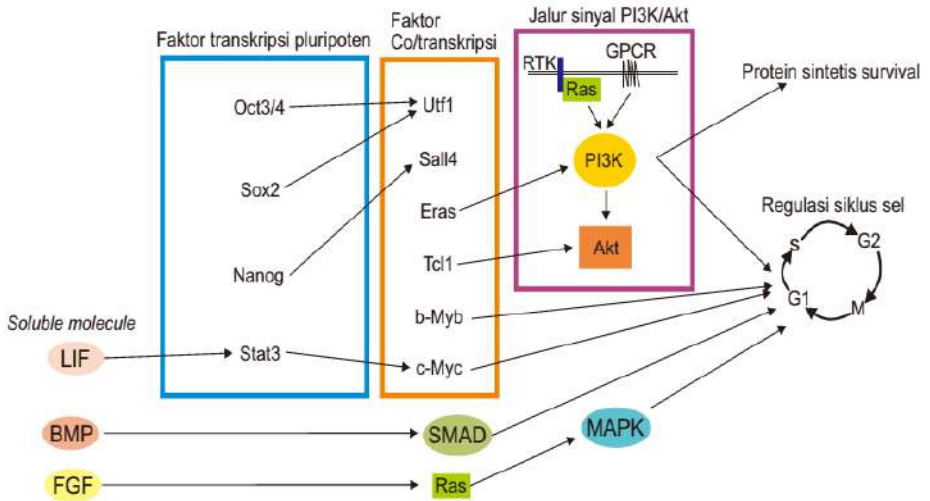
## **2.5 Pengertian jalur proliferasi sirkuit proliferasi**

Jalur sirkuit proliferasi adalah jalur proliferasi yang melibatkan jalur *fibroblast growth factor*-reseptor tiroksin kinase (FGF-RTK)/MAPK dalam diferensiasi dan jalur *G-protein couple receptor* (GPCR)/(Phosphatidylinositol-3phosphatase kinase) PI3K, BMP-R/SMAD dan LIF-R/STAT3 dalam proses pembaharuan diri.

## **2.6 Mekanisme sirkuit regulator proliferasi**

Regulasi sirkuit regulator proliferasi sel punca dimulai dengan pelepasan protein faktor transkripsi pluripoten Oct3/4, Sox2 dan Nanog (sirkuit regulator pluripoten) yang berakibat pada ekspresi protein faktor transkripsi (co-transkripsi) Utf1 dan Sall4 untuk proliferasi, di samping Eras dan Tcf1 yang memicu jalur sinyal

PI3K/Akt serta protein b-Myc dan c-Myc untuk regulasi siklus sel. Mekanisme tersebut dapat dijelaskan gambar di bawah ini.



Gambar 61. Faktor co/transkripsi pluripotensi

Pelepasan faktor transkripsi pluripoten Oct3/4, Sox2 dan Nanog (sirkuit regulator pluripoten) yang berakibat pada ekspresi protein faktor transkripsi (co-transkripsi) Utf1 dan Sall4 untuk proliferasi, di samping Eras dan Tcl1 yang memicu jalur sinyal PI3K/Akt serta protein b-Myc dan c-Myc untuk regulasi siklus sel.

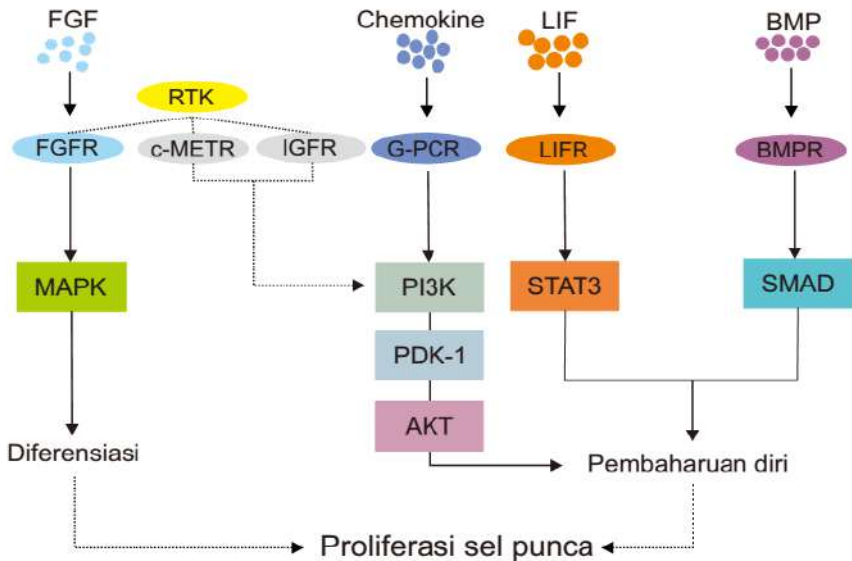
### 3. Jalur proliferasi sel punca

Sebagian besar sel punca embrionik berada dalam fase S siklus sel, sehingga transisi G<sub>1</sub>-S siklus sel berkontribusi besar dalam mempertahankan pluripotensi. Hal ini melibatkan interaksi berbagai jalur proliferasi baik kearah perbaharuan diri maupun diferensiasi yang kemudian membentuk sirkuit regulator.

#### 3.1 Pengertian jalur proliferasi sel punca

Jalur proliferasi merupakan serangkaian sinyal kaskade yang dimulai dari stimulasi ligan-reseptor kemudian membentuk serial sinyal transduksi menuju nukleus dengan target berupa aktivitas pembelahan sel baik perbaharuan diri maupun diferensiasi. Aktivitas

proliferasi sel diregulasi secara ketat dan interkoneksi satu dengan lainnya. Secara spesifik jalur proliferasi arah diferensiasi melalui jalur RTK/MAPK untuk diferensiasi, sedangkan untuk pembaharuan diri menggunakan jalur GPCR/PI3K, BMP-R/SMAD dan LIF-R/STAT3.



Gambar 62. Proliferasi sel punca

Aktivitas proliferasi sel diregulasi mulai dari tingkat reseptor, tingkat sitoplasmik dan tingkat nukleus. Jalur proliferasi sel punca melibatkan jalur RTK/MAPK untuk jalur diferensiasi, sedangkan untuk jalur pembaharuan diri menggunakan jalur *G-protein couple receptor* GPCR/PI3K, BMP-R/SMAD dan LIF-R/STAT3.

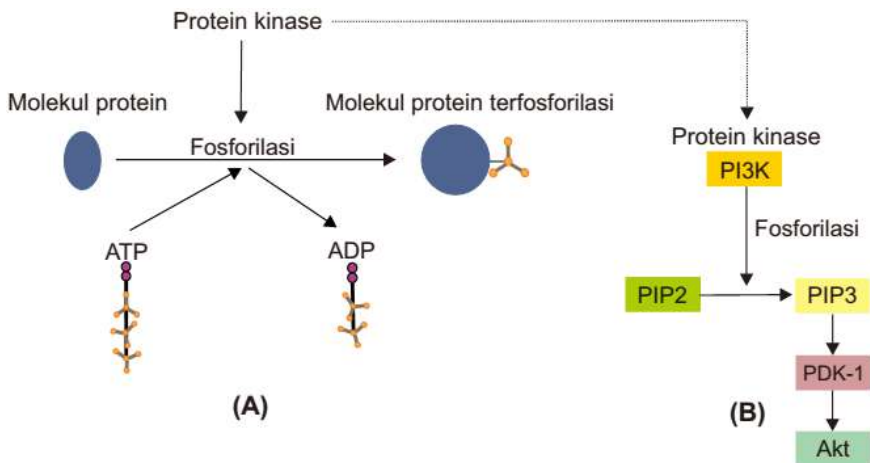
#### 4. Jalur sinyal transduksi PI3K/Akt

Sinyal transduksi adalah sinyal intraseluler yang terjadi secara kaskade berantai didalam sel. Hal ini adalah akibat dari stimulasi kompleks sinyal ligan-reseptor intraseluler, yang mampu mengaktifkan serangkaian reaksi biokimia secara berantai didalam sel, dengan tujuan merubah suatu protein sinyal inaktif menjadi bentuk protein sinyal aktif, secara kaskade. Rangkaian proses molekuler ini

membentuk pola tertentu yang dikenal sebagai *signal transduction pathway*, salah satunya adalah jalur sinyal transduksi PI3K/Akt.

#### 4.1 Pengertian PI3K

*Phosphatidylinositol-3-phosphatasekinase* (PI3K) adalah famili enzim kinase yang berperan sebagai transduksi sinyal intraseluler melalui proses fosforilasi PIP2 menjadi PIP3, berakibat pada pembentukan *phosphoinositide dependent kinase-1* (PDK-1) yang dapat menginduksi Akt. Sinyal transduksi adalah serangkaian transmisi sinyal kimia berupa fosforilasi molekuler yang dapat menimbulkan respon seluler. Proses fosforilasi molekuler ini dikatalisis oleh protein kinase. Secara spesifik protein kinase adalah enzim yang memodifikasi molekul protein dengan menambahkan gugus fosfat terutama ATP sehingga menjadi molekul protein terfosforilasi (aktif). Jalur PI3K (protein kinase) dijelaskan pada gambar dibawah ini.



Gambar 63. PI3K dan fosforilasi

(A) Menunjukkan proses fosforilasi oleh protein kinase. Protein kinase mengkatalisis molekul protein menjadi protein terfosforilasi

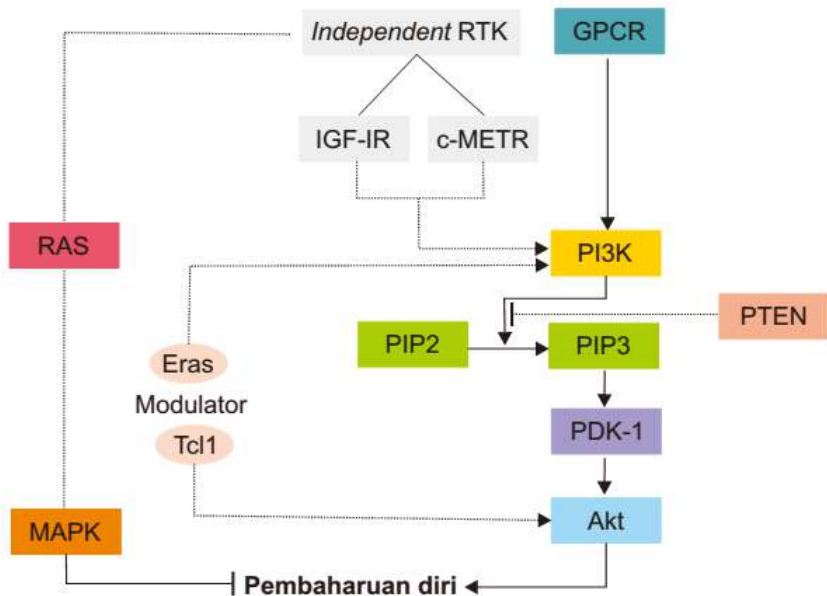
dengan menambahkan gugus fosfat ATP. (B) menunjukkan fosforilasi oleh PI3K (protein kinase). PI3K mengkatalis *phosphatidylinositol*-(3,4) *biphosphatase* (PIP2) menjadi *Phosphatidylinositol*-(3,4,5) *triphosphatase* (PIP3).

## **4.2 Struktur dan tipe PI3K**

PI3K merupakan protein kinaseterkait dengan membran plasma, yang terdiri atas 3 sub unit, yaitu 2 subunit regulator (P85 dan P55) dan satu unit katalitik (P110). Berdasarkan struktur dan fungsi, PI3K terbagi menjadi 3 kelompok yaitu PI3K kelas 1, 2 dan 3. PI3K kelas 1 merupakan jalur *downstream* dari aktivasi *independent* RTK dengan fungsi memfosforilasi PIP2 menjadi PIP3.

## **4.3 Mekanisme kerja PI3K dalam proliferasi**

Aktivitas proliferasi kearah perbaharuan diri ditentukan oleh berbagai jalur terutama PI3K. Aktivasi PI3K terjadi melalui dua jalur utama, yaitu jalur GPCR dan jalur *independent* RTK yaitu IGF-IR dan c-MET reseptor, namun jalur GPCR lebih dominan. Sisi lain jalur RTK juga mendorong proses diferensiasi terutama melalui jalur MAPK. Secara spesifik aktivasi jalur PI3K (paska stimulasi GPCR dan atau *independent* RTK) menyebabkan pembuangan area katalitik PI3K sehingga area regulator P85 dan P55 menjadi aktif. Aktivasi area regulator ini menyebabkan katalisisasi (fosforilasi) PIP2 menjadi PIP3. PIP3 terfosforilasi akan mengikat PH domain yang berakibat pada pembentukan PDK-1. PDK-1 sebagai turunan protein kinase akan mengikat domain *pleckstrin hemology* dari banyak protein intraseluler dan mengaktifkannya, terutama protein Akt. Akt terfosforilasi mengaktifasi sinyal intraseluler yang mendorong aktivitas proliferasi menuju pembaharuan diri.



Gambar 64. Independent RTK dan modulator

IGF-IR dan c-METR merupakan turunan dari independent RTK dimana dapat menginduksi PI3K menuju pembentukan PDK-1, kemudian mengaktifasi Akt sehingga terjadi proses Pembaharuan diri. Sisi lain independent RTK dapat juga berperan sebagai penghambat pembaharuan diri melalui jalur MAPK. Modulator Eras berkontribusi dalam aktivasi PI3K dan Tcl1 menginduksi jalur Akt. PTEN mendegradasi proses fosforilasi PIP2 menjadi PIP3 sehingga menghambat PI3K.

#### 4.4 Modulator jalur sinyal transduksi PI3K

Terdapat 2 modulator jalur PI3K/Akt yang secara khusus diekspresikan dalam sel embrionik yaitu: (seperti gambar 32)

##### 1. Eras

Eras secara konstitutif mengkode bentuk aktif *Ras-family small GTPase*, yaitu suatu protein yang dapat mengaktifasi PI3K/Akt untuk memicu aktivitas proliferasi.

## **2. Tc11**

Tc11 berkerja dengan mendukung kerja Akt aktif melalui pembentukan kompleks heterodimerik stabil (Tc11-Akt) sehingga memicu aktivitas proliferasi. Sel embrionik dengan *knockdown* Tc11 akan menginduksi diferensiasi dan mensupresi pembaharuan diri.

### **4.5 PTEN sebagai mekanisme kontrol jalur PI3K/Akt**

Antagonis jalur utama PI3K adalah fosfatase dan tensin homolog (PTEN). PTEN adalah protein *supressor tumor gen* yang mengkode regulator negatif terhadap PI3K, dengan demikian PTEN menghambat jalur PI3K/ Akt. Secara spesifik PTEN fosfatase menetralkan PI3K, dengan cara mendegradasi produknya yaitu PIP3. Oleh karenanya ketika terjadi mutasi PTEN, maka akan terjadi amplikasi sinyal PI3K, yang membuat sel proliferasi terus menerus dan promosi tumorogenesis.

## **5. Reseptor c-MET**

Reseptor c-MET sebagai salah satu RTK independen juga ikut berperan aktivitas proliferasi kearah pembaharuan diri via jalur PI3K. Hal ini terlihat dalam perkembangan embrionik dan organogenesis, disamping penyembuhan luka, sedangkan ligan untuk reseptor MET adalah HGF. Sel punca kanker juga mengekspresikan MET secara signifikan sehingga memungkinkan sel kanker menyebar metastasis secara masif.

### **5.1 Pengertian reseptor c-MET**

Reseptor c-MET adalah protein kinase yang juga ikut dalam aktivitas proliferasi kearah pembaharuan diri dengan mengaktivasi jalur PI3K. Reseptor c-MET dikode gen MET (termasuk dalam kelompok RTK) yang juga dikenal sebagai *hepatosit growth factor receptor* (HGFR). MET diekspresikan oleh sel epitel, sedangkan HGF pada sel mesenkimal. Secara spesifik MET diekspresikan berlebihan oleh sel punca dan progenitor secara autokrin sehingga terjadi

proliferasi masif pada embriogenesis, dan memungkinkan sel ini meregenerasi jaringan rusak.

## **5.2 Mekanisme kerja c-MET dalam proliferasi**

Reseptor c-MET bekerja dengan mengaktifasi jalur PI3K. Sekali HGF mengikat reseptor c-MET maka terjadidimerisasi dan katalisasi reseptor MET kinase, yang dapat memicu transfosforilasi tirosin Tyr 1234 dan Tyr 12345 (aktif). Kedua tirosin aktif ini merupakan situs *docking* multisubtrat intraseluler MET bagi berbagai sinyal transduser. Secara spesifik *situs docking* c-MET berinteraksi dengan banyak sinyal transduser intraseluler yaitu:

### 1. Secara langsung

Situs *docking* intraseluler MET secara langsung direkrut dan berinteraksi dengan berbagai sinyal transduser GRB2, SHC, SRC dan subunit regulator p85 (bagian PI3K). Aktivasi sinyal GRB2 menyebabkan Ras aktif yang secara kaskade berlanjut dengan aktivasi jalur MAPK sehingga mendorong proliferasi kearah diferensiasi.

### 2. Secara tidak langsung

Secara tidak langsung situs *docking* intraseluler MET berinteraksi dengan GAB<sub>1</sub> sebagai koordinator respon sel. GABA<sub>1</sub> mengkoordinasikan situs *docking* intraseluler MET dengan berbagai molekul aviditas tinggi namun afinitas rendah. GAB<sub>1</sub> yang berinteraksi dengan MET menyebabkan GAB1 terfosforilasi (aktif) sehingga merekrut sinyal transduksi fosfolipase C  $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ), p85 PI3K dan SHP2 yang berakibat pada proliferasi kearah pembaharuan diri.

## **5.3 Sinyal transduksi paska interaksi c-MET**

Interaksi situs *docking* MET intraseluler (MET kinase terfosforilasi) dengan berbagai sinyal transduksi secara langsung maupun tak langsung menyebabkan aktivasi berbagai jalur sinyal transduksi, yaitu:

### 1. Jalur RAS

Interaksi situs *docking* MET intra seluler dengan sinyal jalur RAS secara kaskade akan mengaktifasi MAPK hingga menghasilkan

sinyal proliferasi dan proses morfogenesis. Hal ini terlihat ketika ligan penstimulasi reseptor independen RTK adalah HGF. HGF berbeda dengan mitogen lain, dimana HGF mampu mengaktivasi RAS secara berkelanjutan dan memperpanjang aktivitas MAPK seperti pada gambar 33.

## 2. Jalur PI3K

Interaksi situs *docking* MET intra seluler dengan subunit regulator p85 PI3K menyebabkan :

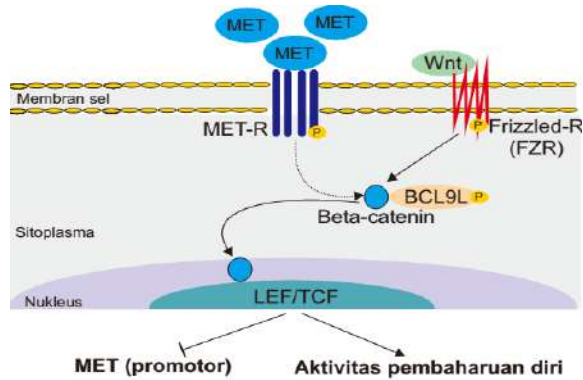
- 1) Aktivasi sinyal jalur GRB2 (secara tidak langsung) kemudian *downstream* menuju jalur RAS yang secara kaskade berlanjut aktivasi MAPK hingga menghasilkan proliferasi kearah diferensiasi
- 2) Rekrutmen protein sinyal (secara langsung) menuju situs *docking* multifungsi. Protein sinyal yang direkrut tersebut berupa; PLC- $\gamma$ , SHP2 dan GRB2.

Aktivasi jalur PI3K juga memicu AKT aktif yang menghasilkan sinyal transduksi untuk survival. Sisi lain aktivasi PI3K terkait *remodeling* adhesi ke matriks ekstraseluler sehingga menghasilkan motilitas sel dan rekrutmen transduser lokal (reorganisasi sitoskeletal) seperti RAC1 dan PAK seperti pada gambar 33.

## 3. Jalur beta-catenin

Interaksi situs *docking* MET intraseluler dengan jalur beta-catenin (komponen penting jalur sinyal Wnt) menghasilkan regulasi transkripsi berbagai gen terutama pembaharuan diri. Wnt adalah molekul sinyal yang dapat translokasi kedalam nukleus setelah beta-catenin teraktivasi (paska interaksi MET). TCF/LEF merupakan co/aktivator transkripsi dari suatu faktor transkripsi

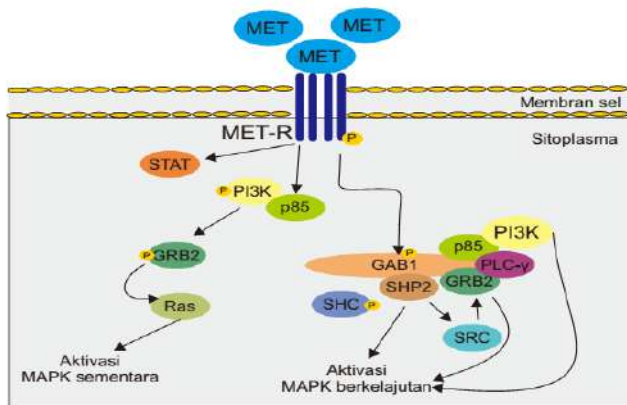
Interaksi MET dan beta-catenin dijelaskan pada gambar dibawah ini.



Gambar 65. Interaksi MET dengan jalur beta-catenin Molekul ligan Wnt mengikat reseptor Fz sehingga mengaktifasi beta-catenin yang kemudian translokasi menuju nukleus dan berikatan pada LEF/TCF untuk proses transkripsi (aktifitas pembaharuan diri).

#### 4. Jalur STAT,

Interaksi situs *docking* MET intraseluler dengan domain SH2 mengaktifasi faktor transkripsi STAT-3 sehingga memicu aktivasi jalur STAT dan bersamaan aktivasi MAPK berkelanjutan menghasilkan morfogenesis seperti pada gambar di bawah ini.

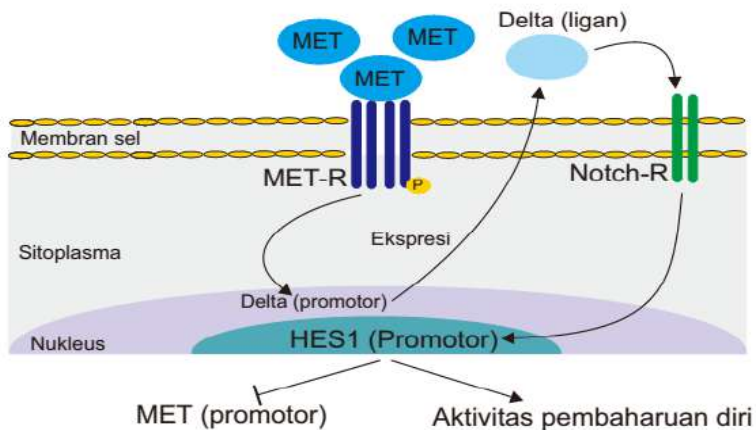


Gambar 66. Interaksi MET dengan jalur RAS dan STAT

MET/HGF mengikat reseptor c-MET memicu transfosforilasi tirosin Tyr 1234 dan Tyr 12345 (aktif), sebagai situs *docking* multisubtrat intraseluler MET untuk sinyal transduser secara langsung : GRB2 dan subunit regulator p85 (bagian PI3K). Aktivasi sinyal GRB2 menyebabkan Ras aktif yang kemudian mengaktifasi jalur MAPK secara sementara. Sisi lain secara tidak langsung situs *docking* intraseluler MET berinteraksi dengan GAB<sub>1</sub>. GAB1 terfosforilasi (aktif) merekrut sinyal transduksi fosfolipase C  $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ), p85 PI3K dan SHP2 yang berakibat pada aktivasi MAPK secara terus-menerus yang berakhir dengan proliferasi.

### 5. Jalur Notch

Interaksi berbagai sinyal dengan situs *docking* MET intraseluler menghasilkan MET kinase terfosforilasi (aktif), yang mampu mengaktifasi area promotor untuk transkripsi protein Delta. Protein delta yang dihasilkan berfungsi sebagai molekul ligan. Ligan ini akan berikatan dengan reseptor notch sehingga mengaktifasi jalur pembaharuan diri.



Gambar 67. Interaksi MET dengan jalur sinyal notch

Ligan delta hasil ekspresi jalur MET akan mengikat reseptor notch yang kemudian translokasi ke nukleus pada area promotor HES1 untuk proses transkripsi protein pembaharuan diri.

## **6. *Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)***

IGF-1 diproduksi terutama oleh sel hati (hormon endokrin) dan jaringan target secara parakrine/ autokrin. Produksi IGF-1 distimulasi GF dan dapat terhambat oleh kurang gizi, ketidakpekaan hormon pertumbuhan, kurangnya reseptor hormon pertumbuhan, atau kegagalan jalur pensinyalan pasca reseptor GH termasuk SHP2 dan STAT5B. IGF-1 diproduksi sepanjang hidup dan tingkat produksi IGF-1 tertinggi terjadi selama percepatan pertumbuhan pubertas. Analog sintetik IGF-1 yaitu mecasermin digunakan untuk pengobatan kegagalan pertumbuhan.

### **6.1 Pengertian IGF-1**

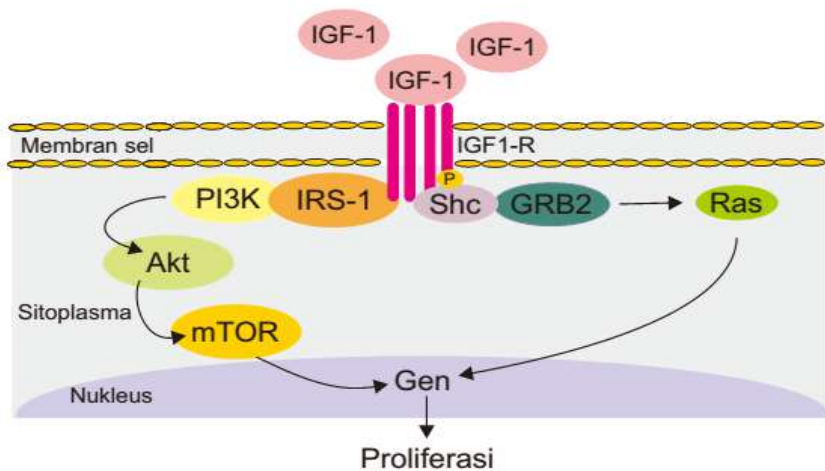
IGF-1 merupakan molekul protein yang dikode gen IGF-1 dengan fungsi sistemik dalam hal proliferasi sel terutama merangsang pertumbuhan jaringan/ organ dan anabolik. IGF-1 juga dikenal sebagai somatomedin C. IGF-1 merupakan *growth factor* dengan struktur molekul mirip insulin yang mengikat reseptor IGF-1 (IGF-1R) dan reseptor insulin. Reseptor IGF-1 merupakan reseptor fisiologis karena reseptor ini mampu mengikat IGF-1 dengan afinitas lebih tinggi dari pada reseptor insulin yaitu 10 kali potensi insulin.

### **6.2 Mekanisme kerja IGF-1**

IGF-1 mengikat dua reseptor permukaan sel RTK, yaitu reseptor IGF-1 (IGF1R) dan reseptor insulin. IGF-1 lebih dominan mengikat reseptor IGF-1 (IGF-1R) yang terekspresi pada permukaan berbagai tipe sel jaringan. Kompleks IGF-1/ IGF-1R kemudian menginisiasi sinyal transduksi intraseluler terutama protein AKT. IGF-1 adalah salah satu aktivator kuat jalur sinyal PI3K/AKT yang merupakan stimulator pertumbuhan dan proliferasi serta inhibisi apoptosis. IGF-1 secara sistemik merangsang pertumbuhan jaringan/ organ dengan promosi proliferasi sel, terutama otot rangka, tulang rawan, tulang, hati, ginjal, saraf, kulit, hematopoietik, dan sel paru-

paru. Sisi lain IGF-1 juga mengatur sintesis DNA seluler (seperti efek insulin).

Secara spesifik IGF-1 bekerja sebagai mediator utama dari efek *growth hormone* (hormon pertumbuhan) yang dibuat oleh kelenjar hipofisis anterior. *Growth hormone* ini dilepas ke aliran darah untuk merangsang pertumbuhan dan proliferasi sel, terutama sel hati agar mampu menghasilkan IGF-1.



Gambar 68. Mekanisme kerja IGF-1

IGF-1 mengikat reseptor IGF-1R (reseptor RTK) yang kemudian mengaktifasi jalur Ras dan jalur PI3K yang berakibat pada aktivitas gen proliferasi.

## 7. Jalur Akt

Akt (*v-Akt murine thymoma*), dikenal sebagai PKB (protein kinase-B) adalah sebuah serine/ threonine (suatu enzim kinase) yang memfosforilasi group OH dari serine/ threonine. Akt terlibat dalam meregulasi berbagai respon biologis. Akt terlibat kuat dalam jalur survival seluler, dengan cara menghambat proses apoptosis. Diregulasi jalur PI3K/Akt sering dikaitkan dengan manifestasi berbagai penyakit

seperti kanker dan diabetes tipe II. Aktivasi Akt dapat mempertahankan aktivitas pembaharuan diri sel embrionik sekalipun tanpa adanya Lif.

## **7.1 Pengertian jalur Akt**

Akt adalah protein serin/ threonin kinase yang direkrut situs *docking* fosfoinositida (PDK-1) sehingga menjadi jalur PI3K/Akt aktif, yaitu jalur transduksi sinyal tiroksin kinase yang teraktivasi (terfosforilasi) oleh PDK-1, hasil proses fosforilasi PIP2 menjadi PIP3. Akt terfosforilasi (aktif) akan menginduksi (fosforilasi) sinyal intraseluler untuk survival dan pertumbuhan sel. Dengan demikian jalur PI3K/ Akt merupakan jalur transduksi sinyal yang melibatkan jalur PI3K dan Akt.

## **7.2 Mekanisme kerja Akt**

Stimulasi *growth factor* menyebabkan aktivasi reseptor independen RTK atau GPCR), menyebabkan fosforilasi lipid membran plasma PIP2 menjadi PIP3 (*second messenger*). PIP3 teraktivasi (terfosforilasi) menyebabkan pembentukan PDK-1 yang dapat menginduksi Akt. Akt aktif akan regulasi aktivitas sinyal dibawahnya (mediasi respon hilir) sebanyak 100 substrat berbeda yang mengarah efek:

1. Akt menghambat *glycogen syntase kinase 3* (GSK-3)

GSK-3 adalah protein yang menghambat siklin D1. Cyclin D merupakan akselerator perpindahan siklus sel dari fase G1 ke S. Akt menghambatan GSK-3 sehingga siklin D1 menjadi aktif. Siklin D aktif menyebabkan peningkatan translasi protein proliferasi.

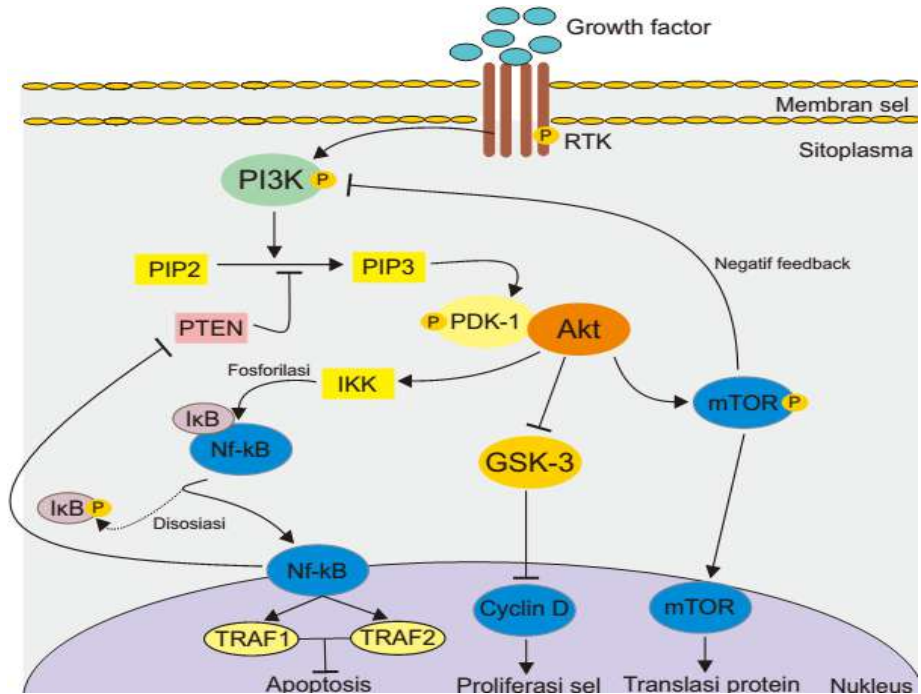
2. Akt menginduksi jalur nuklear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)

NF- $\kappa$ B merupakan faktor transkripsi yang pada keadaan normal terikat dengan inhibitor  $\kappa$ B sehingga inaktif. Akt mengkativasi NF- $\kappa$ B melalui aktivasi I $\kappa$ B kinase (IKK) sehingga inhibitor  $\kappa$ B terlepas dan NF- $\kappa$ B masuk dalam nukleus mentranskripsi protein proliferasi dan inhibisi apoptosis. Secara spesifik aktivasi

faktor transkripsi NFκB oleh Akt aktif (terfosforilasi) maka akan menyebabkan regulasi perixome proliferator-activated receptor delta agonis (PPARβ/δ) dan TNF-α yang dapat mensupresi ekspresi PTEN.

3. Akt mengaktivasi *mammalian target of rapamycin* (mTOR)

Akt juga mengaktivasi sinyal *downstream* utama protein translasi untuk pertumbuhan sel Protein. mTOR dibedakan menjadi 2 yaitu TORc1 dan TORc2. Inhibisi mTOR dengan obat rapamycin pada beberapa sel tertentu, menyebabkan hilangnya *feedback* negatif, berakibat meningkatnya aktivasi PI3K.



Gambar 69. Mekanisme Akt terhadap Nf-κB, mTOR dan GSK-3

Aktivasi reseptor independen RTK atau GPCR, menyebabkan fosforilasi PIP2 menjadi PIP3, menyebabkan pembentukan PDK-1 yang kemudian menginduksi Akt. Akt teraktivasi menghambat GSK-3 yang dapat meningkatkan siklin D1 sehingga terjadi proliferasi sel. Akt teraktivasi mampu menginduksi NF-κB yang menyebabkan pelepasan TRAF1 dan TRAF2 sehingga berakibat pada

penghambatan apoptosis. Sisi lain NF- $\kappa$ B juga menghambat PTEN yang berakibat pada peningkatan aktivasi PI3K. Akt teraktivasi juga dapat mengaktifasi mTOR yang berakibat pada translasi protein pertumbuhan, disamping secara *feedback* negatif dapat menghambat PI3K.

## **8. NF- $\kappa$ B**

Struktur NF- $\kappa$ B adalah heterodimer (antara protein Rel dan p50) dalam keadaan inaktif pada sitosol. NF- $\kappa$ B termasuk protein yang tidak membutuhkan protein lain dalam aktivitas transkripsi primer, sehingga termasuk kelompok "*rapid-acting molecule*".

### **8.1 Pengertian NF- $\kappa$ B dalam Akt**

NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) adalah sebuah protein kompleks yang berperan sebagai faktor transkripsi (pengontrol transkripsi DNA). NF- $\kappa$ B dalam keadaan normal inaktif pada area sitosol, yaitu terikat erat oleh protein inhibitor (I $\kappa$ B) sehingga membentuk kompleks NF- $\kappa$ B. Kompleks protein inhibitor ini menutupi area *nuclear localization signals* (NLS) sehingga proses transkripsi berbagai protein tidak terjadi.

### **8.2 Aktivasi NF- $\kappa$ B**

Stimulasi molekul ligan ekstraseluler berupa IL-1, TNF- $\alpha$  dan LPS serta radiasi ionisasi dapat memfosforilasi reseptor yang dapat menginduksi enzim I $\kappa$ B kinase (IKK). Sisi lain molekul Akt aktif dan Ros juga dapat mengaktifasi IKK. IKK yang teraktivasi menyebabkan fosforilasi protein I $\kappa$ B- $\alpha$ , yang berakibat pada terdisosiasinya I $\kappa$ B $\alpha$  dari NF- $\kappa$ B, sehingga NF- $\kappa$ B bebas dan aktif. NF- $\kappa$ B aktif kemudian translokasi menuju nukleus dan mengikat sekuens spesifik DNA pada situs *response elements* (RE). Sisi lain NF- $\kappa$ B juga dapat menginhibisi PTEN yang dapat berakibat pada peningkatan jalur PI3K sehingga terjadi proliferasi. NF- $\kappa$ B yang berikatan pada situs

RE menyebabkan transkripsi dan translasi protein tertentu dengan respon sebagai berikut:

1. NFκB mensintesis protein inflamasi

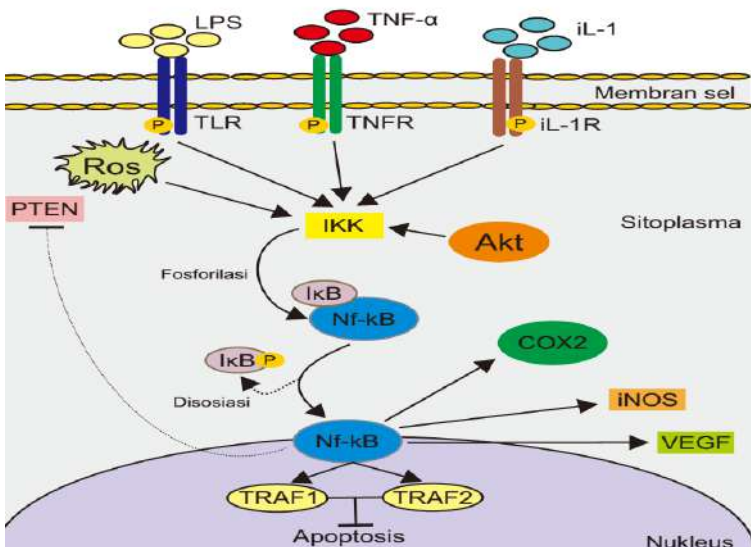
NFκB berperan dalam sintesis protein inflamasi dan imun sel makrofag terutama mendorong makrofag aktif mengekspresikan sitokin proinflamasi (TNF-α, IL-12, COX2 dan *inducible nitric oxide synthase* (iNOS)).

2. NF-κB menghambat apoptosis

NF-κB menginhibisi proses apoptosis dengan cara meningkatkan transkripsi protein anti-apoptosis TRAF1 dan TRAF2.

3. Proliferasi seluler dan survival.

NF-κB menghambat PTEN yang dapat berakibat pada peningkatan jalur PI3K sehingga terjadi proliferasi. NF-κB juga mentranskripsi dan mentranslasi protein VEGF yang berperan penting dalam angiogenesis dan proliferasi fibroblas. Aktivasi NF-κB dijelaskan pada gambar dibawah ini.



Gambar 70. Aktivasi NF-κB

IL-1, TNF-α, LPS dan radiasi ionisasi memfosforilasi reseptor sehingga menginduksi enzim IKK. Sisi lain IKK juga dipengaruhi

oleh Akt aktif dan Ros. IKK teraktifasi memfosforilasi protein I $\kappa$ B- $\alpha$  sehingga I $\kappa$ B $\alpha$  terdisosiasi dari NF- $\kappa$ B, kemudian bebas dan aktif. NF- $\kappa$ B aktif translokasi ke nukleus mengikat situs RE yang berakibat pada sintesis sitokin proinflamasi TNF- $\alpha$ , IL-12, COX2 dan iNOS, sintesis TRAF1 dan TRAF2 yang berakibat penghambatan apoptosis dan peningkatan aktifitas proliferasi seluler dan survival melalui ekspresi VEGF, di samping NF- $\kappa$ B sendiri menghambat PTEN (antagonis jalur PI3K).

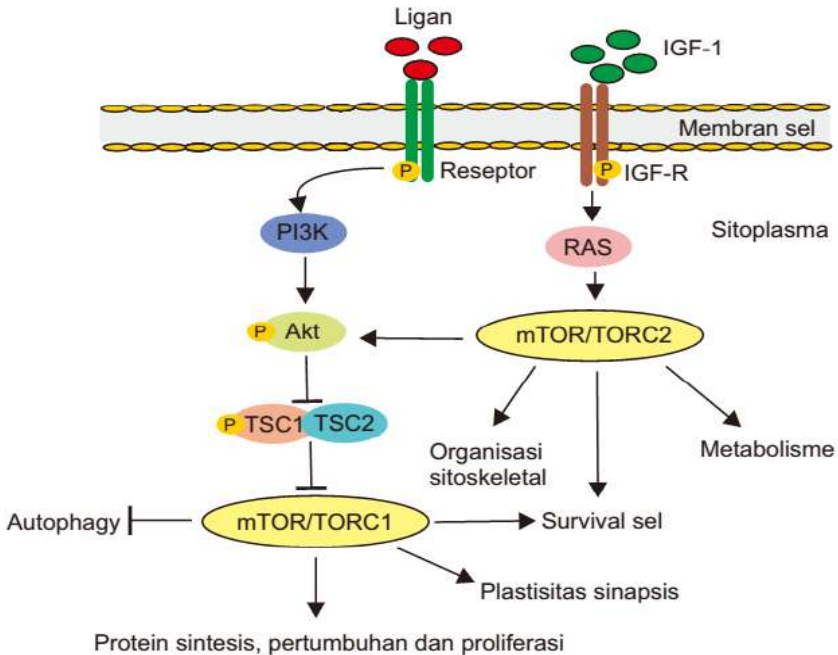
## **9. Aktivasi mTOR**

Aktivasi mTOR mengakibatkan *feedback* negatif, melalui inhibisi *signaling* PI3K. Pada beberapa penelitian, inhibisi mTOR dengan obat rapamycin pada beberapa sel tertentu, menyebabkan hilangnya *feedback* negatif, berakibat meningkatnya aktivasi PI3K, sehingga terjadi proliferasi sel terus menerus. Dengan demikian gangguan pada mekanisme *feedback* negatif dan aktivitas *signalling* proliferasi berkontribusi besar dalam perkembangan terjadinya proses onkogenesis, dimulai dari signal external GF-GFR merubah molekul protein kinase menjadi *signaling* transduksi aktif, hingga menginduksi rangkaian kimia tertentu dalam proses replikasi DNA, dan diakhiri dengan pembelahan sel. Aktivasi mTOR dijelaskan pada gambar di bawah ini.

### **9.1 Pengertian mTOR**

Jalur mTOR merupakan regulasi sentral dari metabolisme dan fisiologis serta regulasi berbagai organ terutama liver, otot dan berbagai jaringan lemak dan otak. Regulasi mTOR terkait dengan penyakit obesitasi, depresi hingga kanker. Rapamycin menghambat mTOR dengan cara berasosiasi dengan reseptor FKBP-12 intraseluler sehingga kompleks pengikatan FKBP-rapamycin (FRB) dapat mengikat secara langsung area FRB dari domain mTOR. Hal ini berakibat pada hambatan aktivitas mTOR. mTOR adalah famili protein kinase anggota dari PI3K-*related* kinase yang dikode oleh gen mTOR. mTOR berperan sebagai komponen inti dari 2 protein

kompleks yang berbeda, kompleks mTOR 1 dan mTOR 2 yang meregulasi proses seluler yang berbeda. mTOR 1 berperan sebagai protein kinase *serine/trionine* yang meregulasi proliferasi, survival, pertumbuhan, motilitas, autophagy dan transkripsi sel. mTOR 2 berperan sebagai protein kinase tirosin dalam aktivasi reseptor insulin dan reseptor IGF-1 terutama dalam sitoskeleton aktin.



Gambar 71. Aktivasi mTOR

Aktivasi mTOR terjadi akibat pengikatan *soluble molecule* TGF-1 pada reseptor TGFR melalui jalur Ras. mTor teraktivasi memicu jalur Akt, mengaktivasi metabolisme, organisasi sitoskeletal dan aktivitas survival sel.

## 10. Jalur BMP/SMAD

BMP terlibat dalam banyak proses seluler baik pada jaringan dewasa maupun pada perkembangan embrio seperti pada proses proliferasi, diferensiasi, apoptosisi dan beberapa fungsi seluler lainnya.

## 10.1 Pengetian jalur BMP/SMAD

BMP adalah anggota super famili TGF- $\beta$ . BMP akan mengikat BMPR2 berdampak pada proliferasi sel termasuk osteogenesis, embriogenesis dan proliferasi sel. Sekalipun demikian untuk mentransmisikan sinyal BMP (super famili TGF- $\beta$ ) menuju nukleus membutuhkan protein intraseluler SMAD. SMAD terbagi menjadi SMAD1, SMAD2, SMAD5, SMAD7 dan SMAD9.

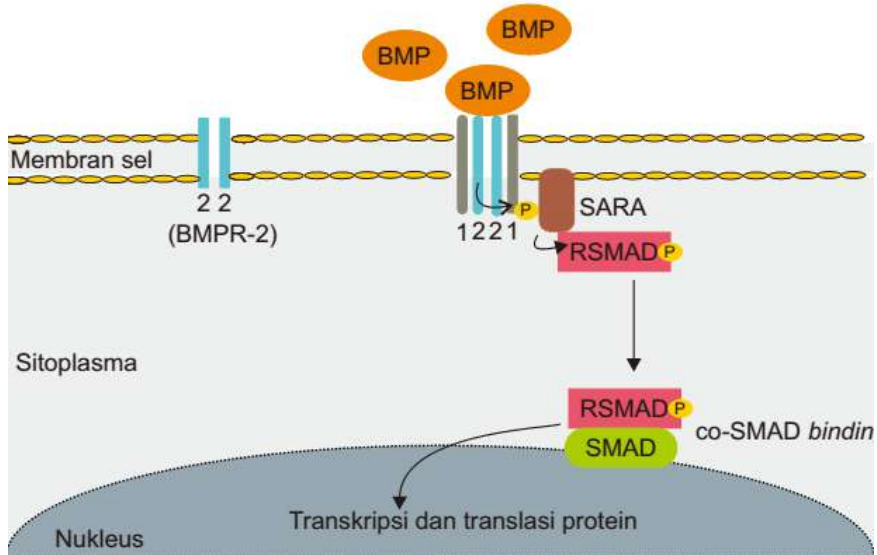
Secara sistematis super famili TGF- $\beta$  yang terdiri atas kelompok protein ligan:

1. BMP,
  2. Growth and differentiation (GDF)
  3. Aktivin (aktivin a, b dan ab)
- Famili TGF- $\beta$  1,2,3

## 10.2 Mekanisme jalur BMP/SMAD

Mekanisme jalur BMP/ SMAD dimulai dengan terikatnya ligan BMP (super famili TGF- $\beta$ ) pada reseptor dimer BMPR (tipe 2) kemudian merekrut reseptor dimer lain (tipe 1) sehingga terjadi kompleks heterotetramik BMP-bMPR-1/2 (kompleks ligan reseptor), yang dikenal sebagai reseptor *serine-threonine kinase*. Secara spesifik reseptor tipe-1 terdiri atas serial *serine-glycin*, sedangkan reseptor tipe-2 mampu memfosforilasi residu *serine* dari reseptor tipe 1 yang mengakibatkan aktivasi. Aktivasi reseptor tipe 1 yang terfosforilasi akan mengaktifasi SARA (SMAD *anchor for reseptor activation*). SARA kemudian merekrut reseptor SMAD (RSMAD). RSMAD yang terfosforilasi memiliki afinitas tinggi terhadap co-SMAD (SMAD lainnya) sehingga terjadi pembentukan kompleks co-SMAD *binding*. Kompleks RSMAD/co-SMAD akan memasuki nukleus dan berikatan dengan area promotor transkripsi sehingga menimbulkan transkripsi dan translasi protein.

Mekanisme jalur BMP/SMAD dijelaskan pada gambar dibawah ini.



Gambar 72. Mekanisme jalur BMP/SMAD

Aktivasi reseptor tipe 1 yang terfosforilasi akan mengaktivasi SARA (*SMAD anchor for reseptor activation*). SARA kemudian merekrut reseptor SMAD (RSMAD) sehingga terfosforilasi. Hal ini mengakibatkan terjadinya pembentukan kompleks *co-SMAD binding* dimana menimbulkan transkripsi dan translasi protein di nukleus.

## 11. Jalur LIF/STAT3

### 11.1 Pengertian jalur LIF/STAT3

LIF adalah interlekin kelas 6 yang mempengaruhi pertumbuhan sel dengan cara menghambat jalur diferensiasi. Pembuangan LIF dalam kultur sel punca dapat menyebabkan pembelahan ke arah diferensiasi.

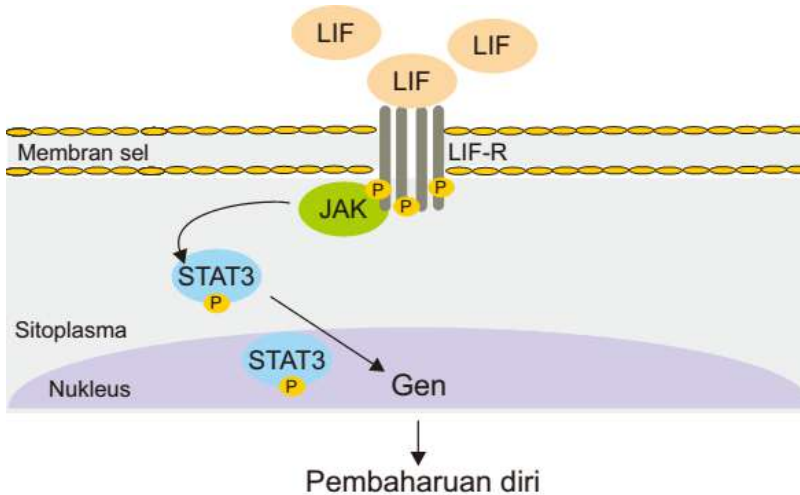
### 11.2 Pengertian STAT3

STAT3 adalah faktor transkripsi yang dikode gen STAT3 sebagai respon terhadap stimulus dari sitokine IL6 atau *epidermal*

*growth factor* (EGF). Aktivasi STAT3 diperlukan untuk pembaharuan diri sel punca embrionik, oleh karena itu LIF dibutuhkan untuk mempertahankan status non-diferensiasi dari sel punca. Sisi lain STAT3 juga esensial untuk diferensiasi sel T helper 17 (TH17) yang berimplikasi pada penyakit autoimun.

### 11.3 Mekanisme jalur LIF/STAT3

LIF mengikat LIFR yang kemudian mengaktivasi jalur sinyal transduksi *janus kinase* (JAK). JAK yang teraktivasi akan melakukan fosforilasi merekrut *signal transducer and activator of transcription* (STAT3). STAT3 translokasi menuju nukleus yang berperan sebagai faktor transkripsi pluripoten.



Gambar 73. Mekanisme jalur LIF/STAT3

LIF termasuk *soluble molecule* yang dapat mengikat reseptor LIFR, sehingga mengaktivasi STAT3 dan kemudian translokasi menuju nukleus untuk mentranskripsi gen terkait pembaharuan diri yang diperkuat dengan hambatan pada jalur MAPK.

## 12. Jalur sinyal proliferasi embrionik

Mekanisme pembaharuan diri sel punca terkait erat dengan kerja protein faktor transkripsi yang membentuk sirkuit regulator.

Protein sirkuit ini menentukan arah pembelahan sel punca, apakah menuju proses pembaharuan diri atau berdiferensiasi. Secara prinsip sirkuit regulator stemness ini berupa peningkatkan gen perbaharui diri dan penekanan gen diferensiasi. Secara spesifik jalur utama pengaturan sinyal sel punca berupa:

1. Jalur sinyal Notch
2. Jalur sinyal Wnt
3. Jalur Hedgehog (Hh)

### **13. Jalur *notch***

*Notch* merupakan jalur sinyal penting dalam memicu proses pembaharuan diri sel punca. Secara spesifik jalur sinyal *notch* berperan penting dalam komunikasi *cell-cell* terutama dalam regulasi perkembangan embriogenesis. Aktifasi jalur sinyal *notch* merupakan hasil ekuilibritas kuantitatif proses induksi dan inhibisi proses pembaharuan diri. Sebagai contoh aktifasi sinyal *notch* mampu mempromosi proses pembaharuan diri sel punca neural, namun sisi lain justru mendorong diferensiasi sel glial. Jalur *notch* sistem sinyal yang terkonservasi pada banyak organisme. Terdapat 4 reseptor *notch* yaitu *notch 1*, *2*, *3* dan *4*. Reseptor *notch* adalah protein trans membrane *single-pass*. *Notch* dan banyak ligannya adalah protein trans membrane sehingga sel yang mengekspresikan ligan *Notch* harus berdekatan dengan sel.

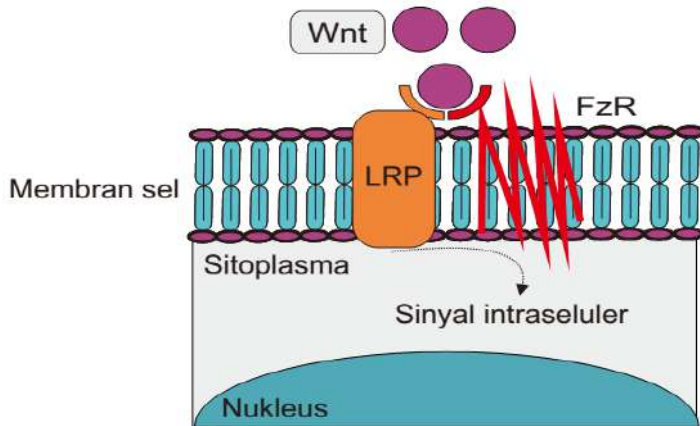
### **14. Jalur Wnt**

Jalur sinyal Wnt menggunakan komunikasi parakrin atau autokrin. Jalur sinyal Wnt pertama kali diidentifikasi peranannya dalam karsinogenesis dan perkembangan embrionik. Proses embrionik memerlukan pembentukan jaringan yang tepat dan hal ini juga terkait dengan sinyal Wnt. Aktifasi sinyal Wnt melalui jalur *canonical*, yaitu b-catenin dapat mendorong proses pembaharuan diri

HSC, MSC, NSC, sel punca epidermal dan sel punca intestinal. Sekalipun demikian sinyal Wnt tidak terlalu penting dalam promosi pembaharuan diri HSC, hal ini ditunjukkan dengan delesi b-catenin HSC tidak berpengaruh pada kemampuan HSC dalam pembaharuan diri.

### 14.1 Pengertian jalur Wnt

Jalur sinyal Wnt adalah sekelompok jalur sinyal transduksi yang dimulai dengan protein yang meneruskan sinyal intra seluler menuju nuklues. Wnt *Wingless/ Integrated*. Aktivasi jalur Wnt dimulai dengan pengikatan ligan protein-Wnt ke reseptor keluarga *Frizzled*. Sinyal Wnt dimulai ketika protein Wnt berikatan dengan reseptor family *Frizzled* (Fz) pada domain N-terminal ekstra-seluler yang kaya sistein. (Fz). Reseptor Fz adalah reseptor membran plasma yang membentuk reseptor famili terkait protein-G, dikenal *G-protein coupled receptors*(GPCRs). Co-reseptor, yaitu protein *lipoprotein receptor-related protein* (LRP-5/6), yaitu kelompok reseptor tirosin kinase (RTK), dan ROR2. Wnt dan reseptor dijelaskan pada gambar di bawah ini



Gambar 74. Wnt dan reseptor

Aktifasi jalur Wnt dimulai dengan pengikatan ligan protein-Wnt pada reseptor family *Frizzled* (Fz) di areadomain N-terminal ekstra-seluler

yang kaya sistein yaitu reseptor membran plasma yang membentuk GPCR. Pengikatan ini membutuhkan LRP5/6 sebagai co-reseptor.

## **14.2 Klasifikasi jalur Wnt**

Jalur aktivasi Wnt secara umum melibatkan  $\beta$ -catenin, sehingga tanpa melibatkan Wnt  $\beta$ -catenin tidak akan terakumulasi dalam sitoplasma dan menimbulkan sinyal di nukleus. Sekalipun demikian terdapat jalur sinyal Wnt yang tidak tergantung pada  $\beta$ -catenin.

Secara spesifik terdapat tiga jalur sinyal Wnt yang telah dikarakterisasi yaitu:

### **1. Jalur Wnt *canonical***

Aktivasi jalur Wnt *canonical* menyebabkan regulasi transkripsi gen dan secara *negative* diregulasi oleh gen *spermatogenesis associated serine rich* (SPATS-1)

### **2. Jalur *non-canonical* planar cell polarity**

Jalur ini meregulasi sitoskeleton yang berperan dalam morfologi bentuk sel.

### **3. Jalur *non-canonical* Wnt / Calcium**

Jalur ini mengatur kalsium dalam sel.

Perbedaan ketiga jalur Wnt tersebut adalah keterlibatannya protein  $\beta$  catenin, dimana jalur *canonical* menggunakan  $\beta$ -catenin secara dependen, sedangkan jalur *non-canonical* secara independen.

Secara praktis jalur Wnt dapat dibagi menjadi 2 yaitu:

1. Jalur *canonical*
2. Jalur *non-canonical*

## **14.3 Mekanisme jalur *canonical*-Wnt**

Sekali reseptor teraktivasi, sinyal dikirim ke fosfoprotein *Disheveled* (Dsh), yang berada di sitoplasma. Sinyal ini ditransmisikan melalui interaksi langsung antara Fz dan Dsh. Domain yang berbeda ini penting karena setelah Dsh, sinyal Wnt dapat

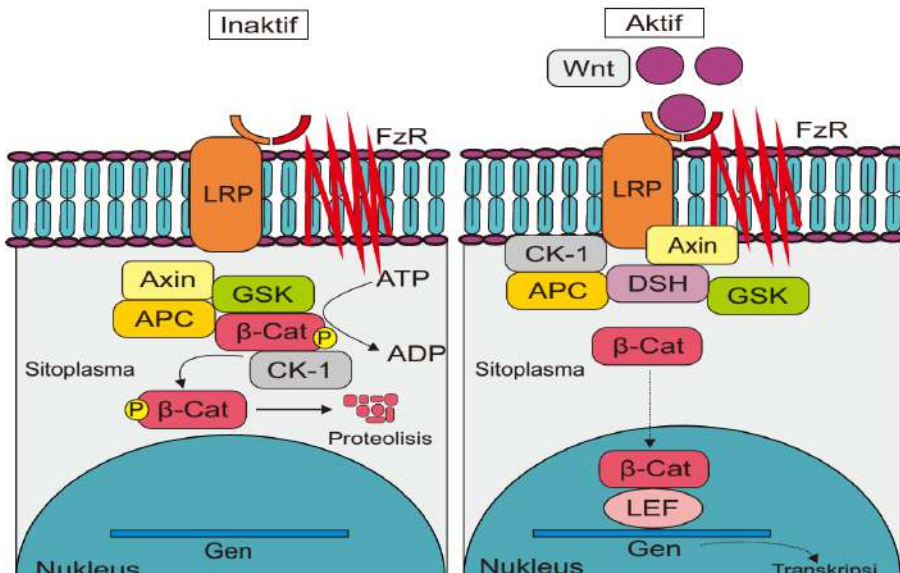
bercabang menjadi beberapa jalur dan setiap jalur berinteraksi dengan kombinasi yang berbeda dari ketiga domain tersebut. Jalur *canonical* Wnt, dikenal sebagai jalur Wnt/  $\beta$ -catenin adalah jalur Wnt yang dapat menyebabkan  $\beta$ -catenin terakumulasi dalam sitoplasma yang kemudian translokasi menuju nukleus berperan sebagai co-aktivator transkripsional faktor transkripsi yang termasuk family TCF/ LEF. Terdapat kompleks protein destruksi yang akan mendegradasi protein  $\beta$ -catenin yang memasuki sitoplasma, sehingga kompleks protein ini harus dinaktivasi terlebih dahulu. Kompleks protein destruksi ini mendegradasi  $\beta$ -catenin dengan mentargetnya pada proses ubiquinisasi yang selanjutnya akan mengirimkan pada proteasome untuk dilakukan digesti.

Kompleks protein destruksi adalah:

1. Axin
2. *Adenomatosis polyposis coli*
3. Protein *phosphatase 2A* (PP2A)
4. *Glycogen synthase kinase-3* (GSK3)
5. *Casein kinase 1 $\alpha$*  (CK1 $\alpha$ )

Sekali WNT mengikat reseptor Fz dan LRP5/6 maka kompleks protein menjadi inaktif (terganggu) disebabkan karena Wnt menyebabkan translokasi dari Wnt regulator negatif, Axin dan terjadi destruksi kompleks pada membran plasma. Fosforilasi protein lain dalam destruksi kompleks selanjutnya mengikat Axin pada reseptor LRP5/6 area sitoplasmik. Axin di defosforilasi. Dsh kemudian menjadi aktif melalui fosforilasi dan domain DIX dan PDZ menghambat aktivitas GSK3. Hal ini memungkinkan  $\beta$ -catenin terakumulasi dan terlokalisasi pada nukleus yang selanjutnya menginduksi respon seluler melalui transduksi gen sepanjang TCF/LEF (T-cell factor/ limfoid enhancing factor).  $\beta$ -catenin kemudian merekrut co-aktivator transkripsi lain seperti BCL9, Pyopus dan Parafibromin/ hyrax.

Aktifasi jalur Wnt dijelaskan pada gambar dibawah ini.



Gambar 75. Aktifasi jalur Wnt

Aktifasi jalur Wnt/ $\beta$ -catenin dimulai dengan pengikatan Wnt pada reseptor Fz dan LPR5/6 yang berakibat terganggunya (inaktif) kompleks protein destruksi  $\beta$ -catenin (Axin, APC, PP2A, GSK3 dan CK1 $\alpha$ ). Hal ini menyebabkan  $\beta$ -catenin terakumulasi dalam sitoplasma yang kemudian translokasi menuju nukleus sebagai ko-aktivator transkripsional faktor transkripsi TCF/ LEF yang dapat menginduksi respon seluler.

## 15. Jalur *sonic hedgehog* (Hh)

Jalur *hedgehog* (Hh) berperan penting dalam proses embriogenesis, dimana bagian berbeda dari embrio memiliki konsentrasi protein sinyal Hh yang berbeda. Jalur Hh juga berperan pada mempertahankan sel punca dewasa dan proses regenerasi jaringan dewasa. Gangguan sinyal Hh dikaitkan dengan kemunculan beberapa kanker terutama karsinoma sel basal. Tikus dengan *knockout* Hh menyebabkan organ otak, kerangka, otot, saluran pencernaan dan paru, gagal berkembang dengan benar.

### **15.1. Pengertian jalur Hh**

Jalur *hedgehog signaling* adalah salah satu jalur utama yang mengontrol tahapan perkembangan embrionik berupa sinyal transmisi yang diperlukan sel embrionik untuk berdiferensiasi dengan tepat. Jalur Hh juga terlibat dalam proses homeostasis dan regenerasi jaringan, disamping embriogenesis. Hal ini mengesankan bahwa jalur Hh terlibat selama rentang waktu kehidupan organisme mulai perkembangan embrionik hingga pasca natal. Hh berasal dari nama molekul sinyal antar sel (ligan polipeptida) yang ditemukan dalam larva lalat buah genus *Drosophila* yang tidak memiliki gen Hh ternyata menyerupai *hedgehog*, yaitu larva yang pendek dan berduri. Hh merupakan salah satu produk gen untuk polaritas segmen *Drosophila*, sehingga terlibat dalam penetapan dasar embriogenesis dan metamorfosis lalat. Mamalia memiliki tiga homolog *Hedgehog*, yaitu Desert (DHH), India (IHH), dan Sonic (SHH), namun SHH yang paling baik dipelajari.

### **15.2. Mekanisme kerja Hh**

Penjelasan mekanisme molekuler sinyal Hh akan meningkatkan pemahaman mendasar tentang sinyal Hh dan perkembangan evolusioner. Jalur sinyal Hh dimulai dengan pengikatan ligan Hh pada reseptor *Patched 1* (Ptch1), yaitu protein 12-pass transmembran yang secara topografi mirip transporter. Proses ini difasilitasi oleh beberapa protein asesoris, termasuk Boc (Bioregional Cdon-binding protein), Cdon (*cell-adhesion molecule-related*), dan Gas1 (*growth arrest specific-1*). Sekaipun demikian fungsi protein asesoris ini tumpang tindih.

Secara spesifik pengikatan Hh ke Ptch1 akan mengurangi kemampuan merepresi Ptch1 pada *Smoothed* (Smo), yaitu protein 7-pass trans membran kemudian memicu serial kaskade sinyal *downstream* dari Smo. Protein lipidated Hh telah meningkatkan aktivitas pensinyalan dan tidak jelas bagaimana modifikasi lipid menganugerahkan properti yang begitu penting. Aktivasi *sonic*

*hedgehog* mampu mempromosikan proses pembaharuan diri HSC, MSC, NSC dan sel punca epidermal, melalui mekanisme BMP-4 dependen. Rutesinyal TGF- $\beta$ / BMP melalui SMAD merupakan penghambatan paling potent dari proses pembaharuan diri HSC, namun peranannya dalam sel punca dewasa lainnya masih harus terus dipelajari.

Sirkuit regulator faktor transkripsi distabilkan dalam regulasi positif dan negatif, untuk mempertahankan pola ekspresi gen yang akan menentukan fenotip. Perubahan kecil pada beberapa komponen sirkuit memicu transisi dinamis dari sirkuit faktor transkripsi satu kelainnya. Model sirkuit Boolean random adalah cara pemodelan sirkuit yang terdiri dari beberapa faktor yang memiliki banyak input dalam sistem kompleks.

## **16. Jalur proliferasi RTK: FGF/MAPK**

### **16.1 Pengertian jalur sinyal RTK**

Jalur RTK adalah jalur utama proliferasi ke arah diferensiasi melalui aktivasi reseptor trans-membran-ligan yang berlanjut ke jalur sinyal transduksi MAPK/PI3K hingga menuju nukleus untuk menimbulkan respon seluler.

### **16.2 Jalur sinyal RTK**

Secara spesifik mekanisme jalur RTK dapat dibagi menjadi 3 bagian utama, yaitu :

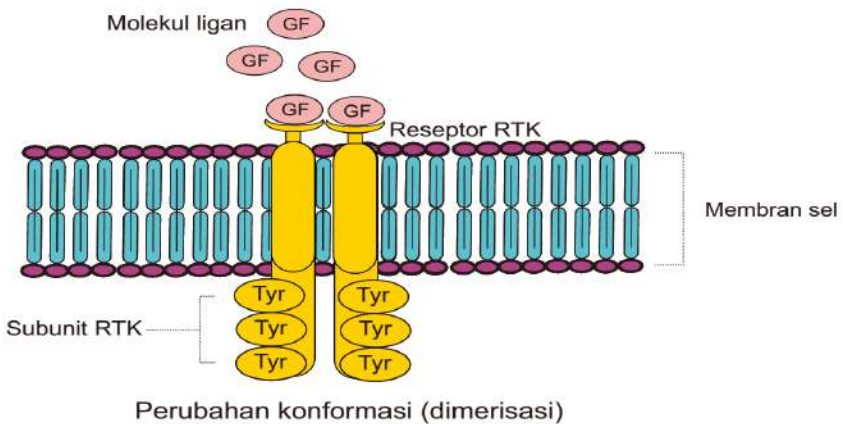
1. Tingkat membran
2. Tingkat sitoplasma
3. Tingkat nukleus

### **16.3 Mekanisme jalur sinyal RTK tingkat membran**

Reseptor RTK dalam keadaan normal adalah inaktif berupa monomer polipeptida. Aktivasi reseptor akan memicu jalur sinyal RTK tingkat membran yang dimulai dengan :

1. Terikatnya ligan GF pada reseptor RTK

*Growth factor* (GF) merupakan molekul protein ligan (*enabling signal*) yang berfungsi sebagai faktor pertumbuhan sel. Berikatannya ligan GF pada reseptor RTK menyebabkan kedua subunit reseptor RTK bergabung dan mengalami dimerisasi (perubahan konformasi). Terikatnya ligan GF pada reseptor RTK dijelaskan pada gambar dibawah ini.

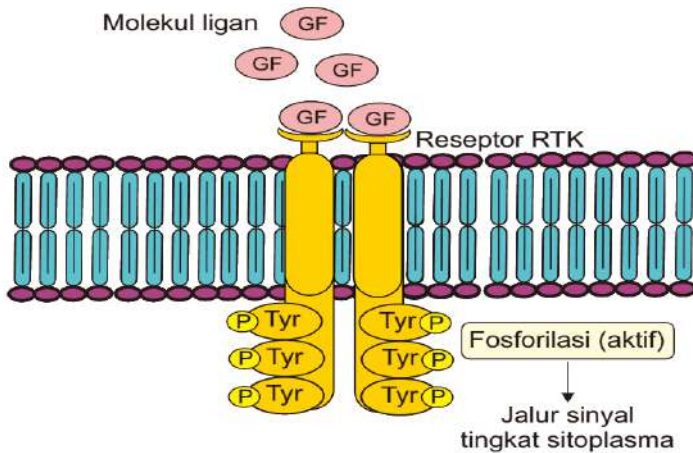


Gambar 76. Terikatnya GF pada reseptor RTK

2. Dimerisasi RTK

Dimerisasi reseptor merupakan proses aktivasi reseptor RTK paska terikat ligan, yaitu berupa autofosforisasi atau transfosforilasi pada kedua reseptor domain spesifik tirosin kinase residue (*activation loop*). Autofosforilasi menyebabkan pembentukan tirosin terfosforilasi atau fosfotirosin (tirosin aktif) yang berfungsi sebagai media untuk rekrutmen protein lain (aktivasi protein).

Dimerisasi RTK dijelaskan pada gambar dibawah ini.

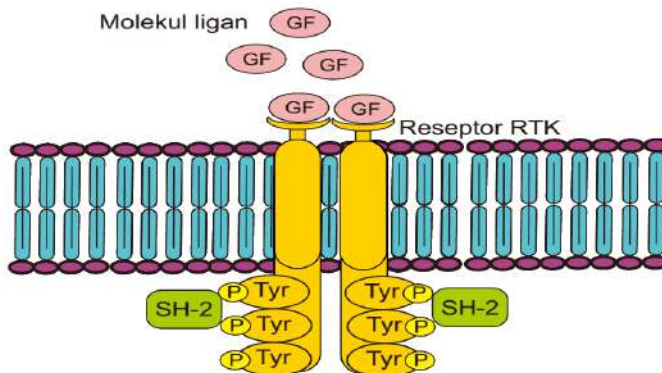


Gambar 77. Dimerisasi RTK

## 16.4 Mekanisme jalur sinyal RTK tingkat sitoplasmik

### 1. Fosfotirosin protein SH2 domain (*Src homology-2*).

Secara teoritis tirosin kinase memiliki area pengikatan spesifik SH2, sisi lain SH2 merupakan kelompok protein yang dapat mengenali tirosin terfosforilasi. Hal ini menyebabkan terikatnya fosfotirosin pada SH2 yang kemudian terjadi autofosforilasi tirosin (tirosin teraktifasi). Pengikatan fosfotirosin pada SH2 dijelaskan pada gambar di bawah ini.



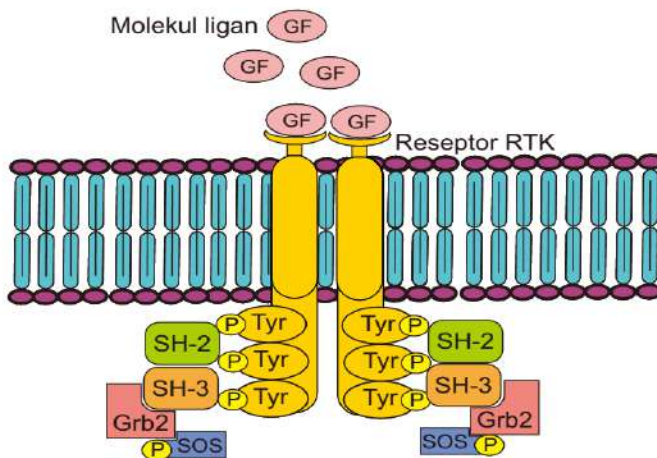
Gambar 78. Pengikatan SH-2 pada fosfotirosin

2. Fosfotirosin protein SH3 domain (untaian SOS kaya *proline*).

Fosforilasi protein SH3 (gen GFR: *photoreceptor no seven in eye*) menyebabkan protein tersebut terfosforilasi (aktif). Secara teoritis protein Grb2 (*growth reseptor binding-2*) terikat erat pada *guanyl nucleotide release protein* (GNRP) kelompok protein SOS.

3. Pembentukan kompleksprotein SOS-Grb2 aktif

Fosfotirosin protein SH3 menyebabkan tirosin yang terfosforilasi tersebut berikatan SOS (*son of sevenless*) sehingga secara otomatis juga akan berikatan dengan protein Grb2 yang kemudian membentuk kompleks protein SOS-Grb2 teraktifasi. Pembentukan kompleks protein SOS-Grb2 aktif dijelaskan pada gambar di bawah ini.

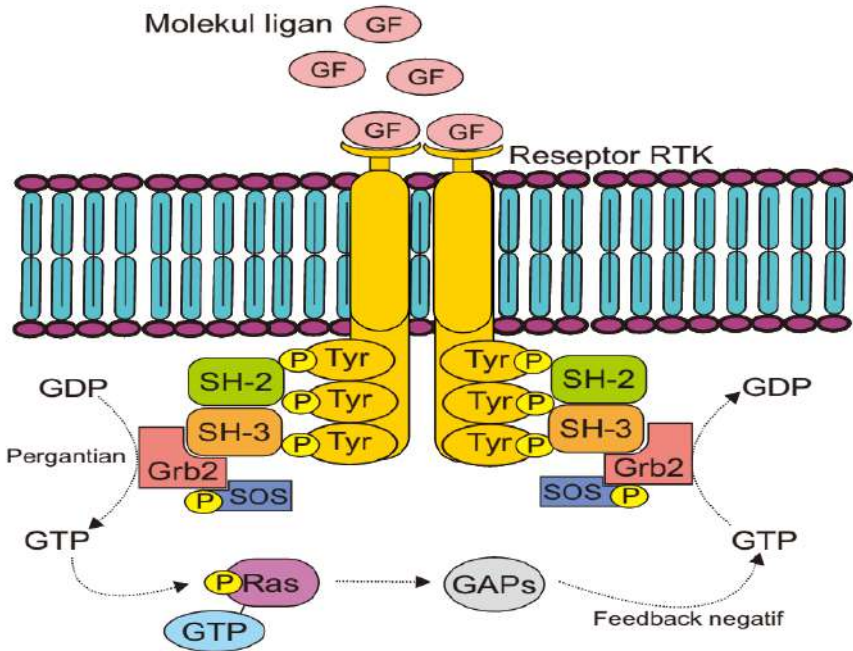


Gambar 79. Ikatan SOS-Gbr2-SH3

4. Aktifasi protein Ras

Komplek protein SOS-Grb-2 yang teraktifasi menyebabkan posisi GDP diganti dengan GTP pada protein G (Ras). Hal ini mengakibatkan Ras terfosforilasi dan menjadi aktif. Sisi lain Ras teraktifasi juga dapat mengaktifasi *small GTPase* (GAPs) yang mampu memecah GTP, sehingga protein Ras kembali menjadi bentuk

inaktif (mekanisme feedback negatif; GAPs sebagai kontrol intraseluler/ rem terhadap sinyal transduksi yang berlebihan). Aktifasi protein Ras dijelaskan pada gambar di bawah ini.



Gambar 80. Aktifasi protein Ras

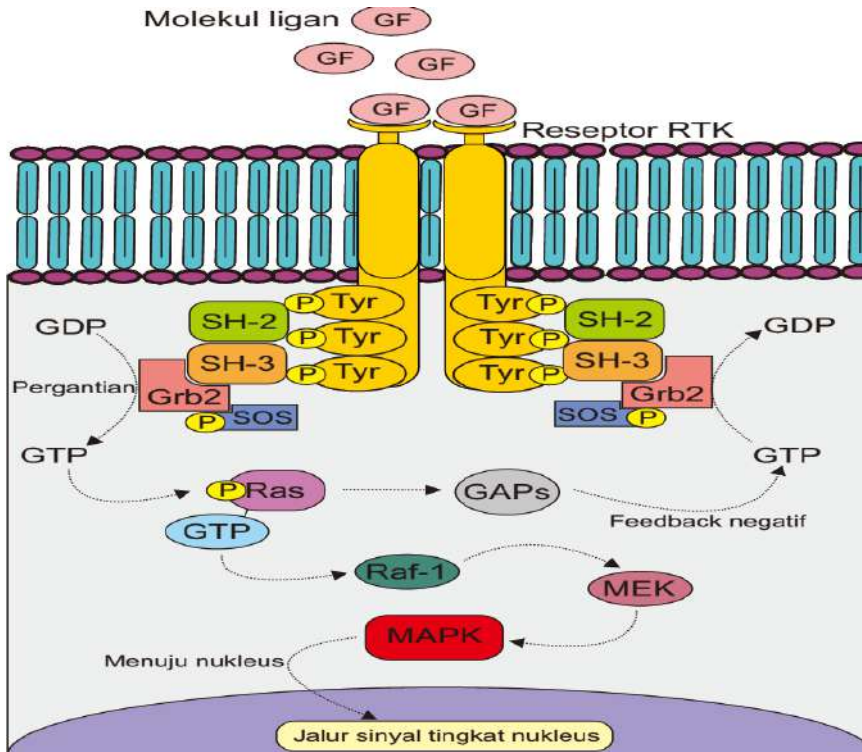
### 5. Aktivasi Raf-1

Protein Ras teraktifasi secara kaskade akan mengaktifasi protein kinase seluler lainnya, yaitu protein Raf-1.

### 6. Protein Raf-1 dan kompleks MAPK

Protein Raf-1 teraktifasi secara kaskade akan mengaktifasi protein kinase seluler berikutnya, yaitu protein MEK sehingga membentuk kompleks MAPK yang mampu memasuki nukleus untuk mengaktifasi faktor transkripsi.

Aktifasi MAPK dijelaskan pada gambar dibawah ini.



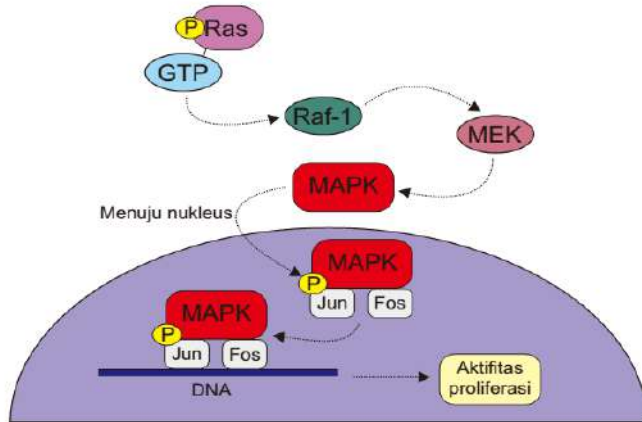
Gambar 81. Aktivasi MAPK

## 16.5 Mekanisme jalur sinyal RTK tingkat nukleus

### 1. Aktivasi faktor transkripsi jun-fos

Kompleks MAPK teraktivasi akan memasuki nukleus yang kemudian mengaktifasi protein faktor transkripsi yaitu jun dan fos. Aktivasi protein ini merupakan akhir dari proses kaskade sinyal transduksi. Fosforilasi jun dan fos akan mengikat sekuens DNA yang mempengaruhi ekspresi gen terkait akselerator laju siklus sel terutama aktifitas proliferasi, diantaranya protein siklin.

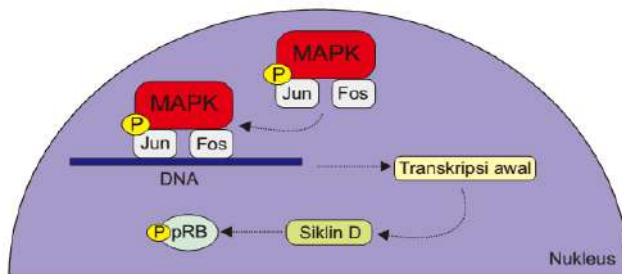
Aktifasi faktor transkripsi jun-fos dijelaskan pada gambar dibawah ini.



Gambar 82. Aktifasi faktor transkripsi jun-fos

## 2. Fosforilasi pRB

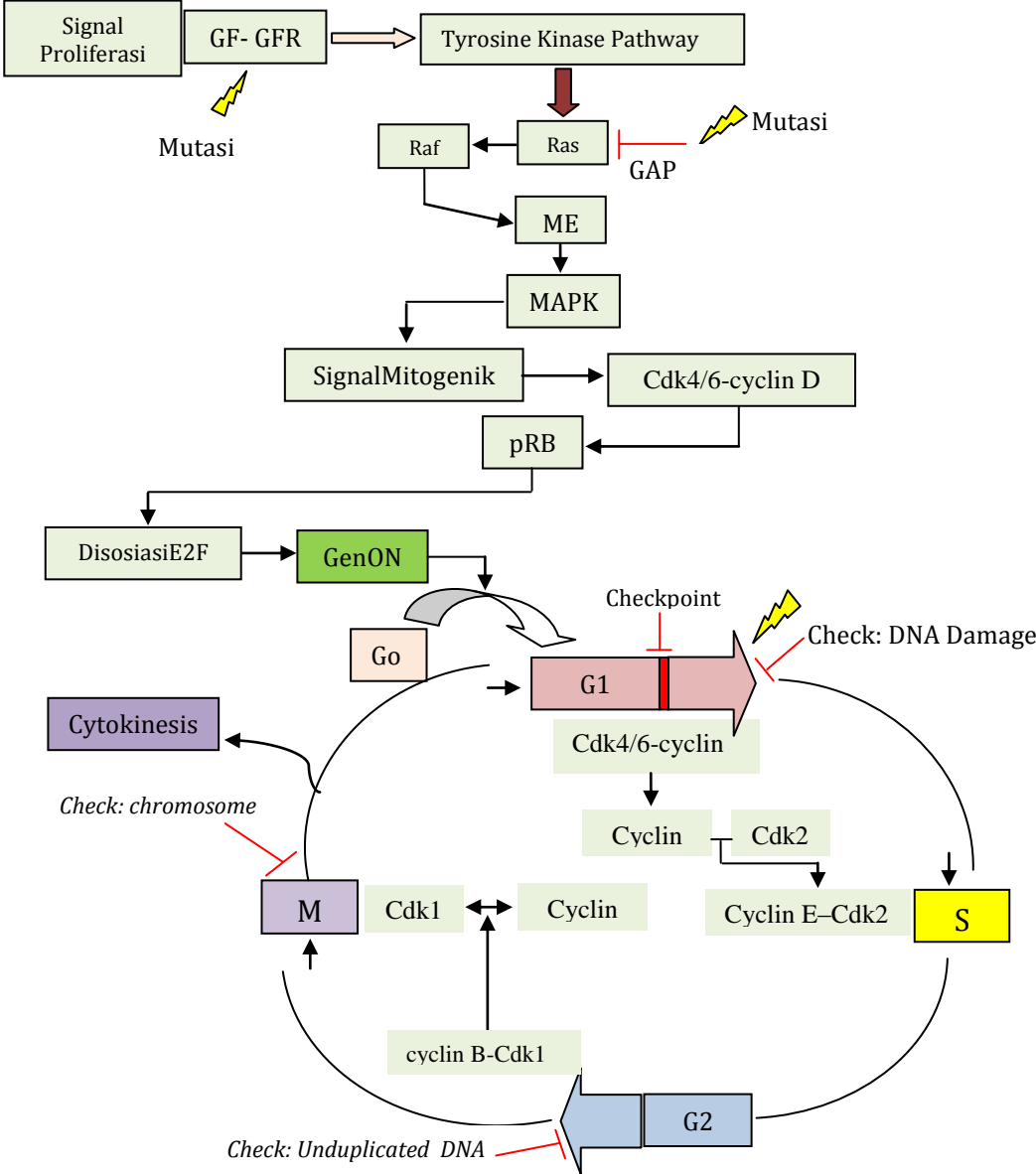
Protein siklin yang pertama ditranskripsi adalah siklin D yang bekerja pada fase G1 akhir siklus sel sehingga mampu memfosforilasi pRB yang berakibat pada laju pergerakan siklus sel. Fosforilasi pRB dijelaskan pada gambar dibawah ini.



Gambar 83. Fosforilasi pRB

### 16.6 Sirkuit jalur proliferasi: RTK-transduksi-nukleus

Jalur proliferasi dimulai pada tingkat reseptor, berlanjut sitoplasmik dan berakhir di nukleus, seperti digambarkan dibawah ini.



Gambar 84. Sinyal transduksi dan siklus sel

Sinyal transduksi dimulai dengan berikatannya ligan (*enabling signal*) misalnya growth factor (GF) pada situs pengikatan reseptor-ligan dari reseptor tyrosine kinase (RTK). Hal ini mengakibatkan dimerisasi reseptor (reseptor aktif) yang selanjutnya terjadi reaksi fosforilasi terhadap beberapa protein substrat, menghasilkan sinyal transduksi Ras-Raf-MEK-MAPK secara bertingkat dalam sitoplasma (*intra cellular signaling pathways*). Beberapa mutasi genetik pada molekul GF-GFR, berpotensi menjadi onkogen aktif, seperti terlihat dalam gambar berwarna garis kuning, Pada gambar terlihat garis kuning, (mutasi pada GAPs).

## **17. Jalur protein integrin: non ikatan ligan-reseptor**

Jalur protein integrin adalah jalur inisiasi sinyal melalui protein integrin, yaitu suatu protein yang dapat mengikat substrat (ligan) dalam matriks ekstraseluler dalam memunculkan sinyal transduksi. Interaksi antara substratum dengan protein integrin adalah unik, oleh karena kemunculan sinyal transduksi intraseluler terjadi, tanpa melalui pengikatan ligan pada reseptor ekstrasel dan intrasel. Keadaan ini dimungkinkan karena struktur protein integrin adalah penghubung antara seluler dengan matrik ekstraseluler sekitarnya. Secara sistematis komunikasi sinyal adalah hasil interaksi awal sebuah ikatan suatu molekul ligan dengan sebuah reseptor sel yang sesuai. Ikatan ligan-reseptor ini memiliki tujuan akhir berupa target sel. Setiap molekul ligan memiliki cara yang berbeda dalam mempengaruhi sel target dan oleh karenanya kemampuan molekul ligan dalam berikatan pada berbagai reseptor baik reseptor ekstrasel maupun intrasel menjadi hal penting untuk diketahui.

## **Daftar pustaka**

1. Heasley LE, Petersen BE. Signalling in stem cells. *EMBO Rep.* 2004;5(3):241–4.
2. Tsai C-C, Hung S-C. Functional roles of pluripotency transcription factors in mesenchymal stem cells. *Cell Cycle* [Internet]. 2012;11(20):3711–2.
3. Chen X, Ye S, Ying QL. Stem cell maintenance by manipulating signaling pathways: Past, current and future. *BMB Rep.* 2015;48(12):668–76.
4. Organ SL, Tsao M. An overview of the c-MET signaling pathway. *Ther Adv Med Oncol An.* 2011;7–20.
5. Lis K. [Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and growth hormone (hGH) as the markers of osteoarthritis]. *Chir Narzadow Ruchu Ortop Pol* [Internet]. 2001;73(1):49–52.
6. Hemmings BA RD. PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(9):3–5.
7. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(6):1–10.
8. Zarogoulidis P, Lampaki S, Francis Turner J, Huang H, Kakolyris S, Syrigos K, et al. mTOR pathway: A current, up-to-date mini-review. *Oncol Lett.* 2014;8(6):2367–70.
9. Orlova V V., Chuva de Sousa Lopes S, Valdimarsdottir G. BMP-SMAD signaling: From pluripotent stem cells to cardiovascular commitment. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;27:55–63.
10. Dahéron L, Opitz SL, Zaehres H, Lensch WM, Andrews PW, Itskovitz-eldor J, et al. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of hESCs. *Stem Cells.* 2004;22:770–8.
11. Chiba S. Concise Review: Notch Signaling in Stem Cell Systems. *Stem Cells* [Internet]. 2006;24(11):2437–47.
12. Katoh M, Katoh M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res.* 2007;13(14):4042–5.
13. Campbell V, Copland M. Hedgehog signaling in cancer stem cells: A focus on hematological cancers. *Stem Cells Cloning Adv Appl.* 2015;8:27–38.
14. Lanner F, Rossant J. The role of FGF/Erk signaling in pluripotent cells. *Dev Adv Dev Biol stem cell.* 2010;9(4):387–8.
15. Duronio RJ, Xiong Y. Signaling pathways that control cell proliferation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(3):1–12.

16. Van Dyke W, Maddow B. Integrin Structure , Activation , and Interactions. In 2011. p. 1–15.

## **BAB VII**

# **SIKLUS SEL PUNCA**

### **Tujuan**

---

Setelah membaca bab ini, diharapkan pembaca mengerti tentang siklus sel punca, meliputi siklus sel, Cdk, Siklin, fase G1, pRB, Fase S, fase G2, fase mitosis, sitokinesis, akurasi kontrol sinyal proliferasi, kontrol sinyal intrinsik dan ekstrinsik proliferasi

*Laju pergerakan siklus sel dimulai sesaat setelah sinyal transduksi mitogenik (MAPK-ERK) memasuki nukleus di fase G<sub>1</sub> awal yang ditandai dengan sintesis protein siklin D (non-stabil). Fase G<sub>1</sub> tengah dimulai dengan terikatnya siklin D dengan protein p21/p27 dan Cdk4 sehingga membentuk kompleks sinyal Cdk4-siklin D-p21/p27. Fase G<sub>1</sub> akhir kompleks sinyal tersebut dilakukan checkpoint sebagai moleculer gate untuk memasuki fase S. Secara spesifik kompleks sinyal Cdk4-siklin D-p21/p27 mampu melepas ikatan pRbE2F-DP (pRB terikat E2F-DP (promotor target DNA) pada keadaan normal sehingga tidak mampu mentranskripsi). E2F-DP yang terlepas menyebabkan peningkatan regulasi berbagai faktor transkripsi protein proliferasi dan progresi siklus sel sehingga siklus sel bergerak menuju fase selanjutnya (fase S).*

*Catatan penulis*

## **1. Latar belakang**

Siklus sel secara umum melibatkan tiga tahapan: interfase, mitotik (M) dan sitokinesis. Tahapan interfase memerlukan waktu paling lama dan nutrisi, karena pada fase ini terjadi pertumbuhan sel disamping replikasi. Secara spesifik tahapan interfase dibagi menjadi fase G<sub>1</sub>, S dan G<sub>2</sub>. Fase G<sub>1</sub> terbagi atas G<sub>1</sub> awal, G<sub>1</sub> tengah dan G<sub>1</sub> akhir dimana fase G<sub>1</sub> awal merupakan inisiator awal bagi sinyal transduksi MAPK-ERK dalam memulai siklus sel terutama dengan mensintesis siklin D (akselerator utama perpindahan fase G<sub>1</sub> ke S). Fase G<sub>1</sub> akhir merupakan hal penting karena pada fase ini terjadi pengecekan sinyal (area checkpoint) untuk menuju ke fase sintesis. Secara spesifik melalui pelepasan protein pRB yang terikat pada E2F-DP sehingga siklus sel berpindah pada fase S. Fase S ditandai dengan replikasi DNA setelah melalui proses checkpoint terhadap kerusakan DNA yang kemudian berlanjut ke fase G<sub>2</sub>.

Fase mitosis merupakan tahapan dimana terjadi pemisahan kromosom sehingga memungkinkan untuk berlanjut pada fase akhir

siklus sel yaitu fase sitokenesis. Fase sitokenesis ini ditandai dengan terpisahnya sitoplasma secara sempurna sehingga menjadi dua turunan sel baru. Secara morfologis berbagai tahapan interfase sulit dibedakan, namun secara molekuler dapat dibedakan karena setiap fasenya memiliki serangkaian proses molekuler khusus yang berbeda satu dan lainnya. Secara umum molekuler yang digunakannya dalam fase ini adalah kelompok protein siklin-Cdk, faktor transkripsi dan protein inhibisi kinase.

Konsekuensi pergerakan siklus sel adalah pembentukan sel baru yang dibutuhkan dalam proses regenerasi namun hal ini juga memerlukan mekanisme kontrol untuk memastikan bahwa pembelahan sel tersebut terjadi secara tepat, dikenal sebagai *checkpoint* siklus sel, disamping protein supresor gen lainnya (p53-p21). Upaya molekuler tersebut dilakukan untuk menjaga keseimbangan seluler, termasuk ketika terjadi kerusakan tingkat DNA.

## **2. Siklus sel**

Siklus sel mengarah pada pembelahan sel dan duplikasi DNA dalam menghasilkan sel turunan. Terdapat suatu keadaan dimana sel tidak melakukan pembelahan sementara (berhenti membelah). Sel tersebut memasuki fase  $G_0$  yang dikenal sebagai quiescence (inaktif) atau keadaan diam yang reversibel.

### **2.1 Pengertian siklus sel**

Siklus sel merupakan serangkaian tahapan yang akan dilalui sel secara aktif dalam melakukan proses pembelahan dan replikasi DNA untuk menghasilkan dua turunan sel, sehingga juga dikenal sebagai siklus pembelahan.

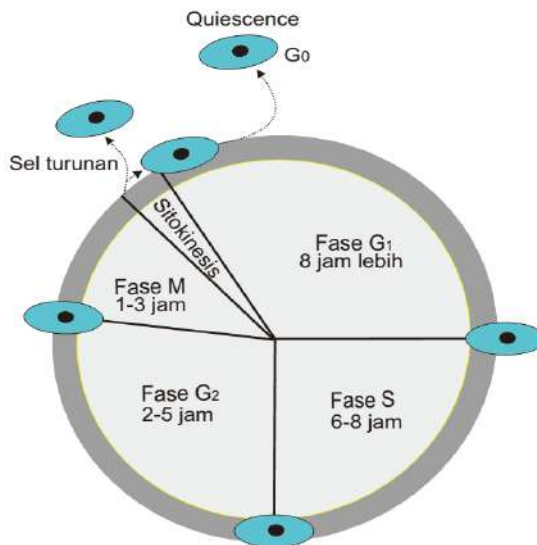
### **2.2 Tahapan siklus sel**

Siklus sel terdiri atas 4 tahapan yang berbeda yaitu fase  $G_1$ , S (sintesis),  $G_2$  dan M. Secara spesifik fase  $G_1$ , S dan  $G_2$  dikenal sebagai tahapan interfase, sedangkan fase M (mitosis/ meiosis)

tersusun atas tahapan kariokinesis dan sitokinesis. Kariokinesis merupakan bagian dari tahapan pembelahan sel dimana terjadi pemisahan kromosom, sedangkan pada sitokinesis terjadi pembelahan sitoplasma secara sempurna sehingga menjadi dua turunan sel.

Secara sistematis tahapan ini dimulai dengan:

1. Fase G<sub>1</sub> (gap<sub>1</sub>)
2. Fase S (sintesis)
3. G<sub>2</sub> (gap 2)
4. M (mitosis)



Gambar 85. Siklus sel

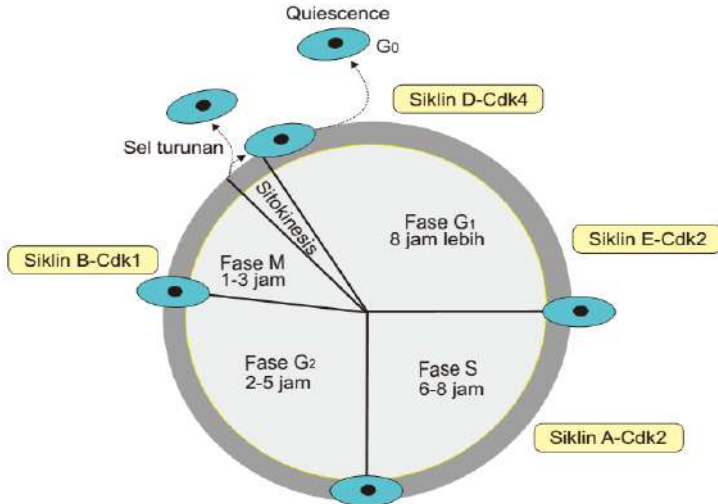
Siklus sel terdiri atas 4 fase yaitu fase G<sub>1</sub>, S (sintesis), G<sub>2</sub> dan M (mitosis). Fase M terdiri atas kariokinesis dan sitokinesis. Pemisahan kromosom pada fase kariokinesis sedangkan pembelahan sel menjadi dua turunan sel pada sitokinesis.

### 2.3 Molekuler siklus sel

Secara molekuler terdapat berbagai faktor yang ikut berperan dalam meregulasi siklus sel, diantaranya adalah:

1. Cyclin dependen kinase (Cdk) - Cyclin

2. Faktor transkripsi dan protease spesifik lainnya
3. Protein inhibitor kinase spesifik



Gambar 86. Molekuler siklus sel

Secara molekuler siklus sel melibatkan interaksi siklin D-Cdk4 pada fase G<sub>1</sub> akhir, siklin E-Cdk2 pada fase G<sub>1</sub>-S, siklin A-Cdk2 dan Siklin B-Cdk1 pada fase M.

### 3. *Cyclin dependent kinase (Cdk)*

Protein Cdk berperan penting dalam regulasi siklus sel.

#### 3.1 Pengertian Cdk

Cdk adalah famili protein *serine/ threonine* kinase dengan berat molekul 34-40 kDa (*small protein*) yang dalam beraktifitas tergantung pada protein siklin (subunit regulator non-katalitik). Cdk menjadi aktif ketika berikatan dengan siklin. Cdk aktif akan memodifikasi protein lain (target) melalui penambahan gugusan fosfat pada rantai samping, sehingga protein target terfosforilasi dan menjadi aktif. Peran cyclin begitu penting dalam aktivasi Cdk sehingga tanpa siklin aktivitas CDKs tidak akan terjadi (tidak ada aktifasi protein target).

## **3.2 Klasifikasi Cdk berdasarkan Cyclin**

Sel manusia memiliki lebih dari 10 protein kinase Cdk yang bekerja pada tahapan siklus sel, namun secara umum terdapat 4 Cdk yang berperan penting dalam siklus sel, yaitu:

### **1. Cdk1**

Cdk1 adalah protein kinase yang berperan penting pada fase M siklus sel dengan cara mengikat siklin B. Cdk1 juga dikenal sebagai *cdc2 (cell division cycle 2)* atau p34.

### **2. Cdk2**

Cdk2 adalah protein kinase yang berperan penting pada transisi fase  $G_1/S$  siklus sel dengan cara mengikat siklin E

### **3. Cdk3**

Cdk3 adalah protein kinase yang berperan penting pada fase  $G_0$  siklus sel dengan cara mengikat siklin C

### **4. Cdk4**

Cdk4 adalah protein kinase yang berperan penting dalam fase  $G_1$  siklus sel dengan cara mengikat siklin D. Cdk4 juga dikenal sebagai Cdk4/6 dengan fungsi untuk memastikan/ mendorong sinyal proliferasi yang diterima fase  $G_1$  dapat diteruskan ke fase S.

## **4. Siklin**

### **4.1 Pengertian siklin**

Siklin adalah famili protein yang berperan penting dalam mengontrol progresi sel pada setiap tahapan siklus sel dengan cara mengikat Cdk tertentu sehingga membentuk kompleks Cdk-siklin. Kadar siklin dalam tiap tahapan siklus sel selalu dalam keadaan fluktuasi secara siklik, yaitu meningkat diawal ekspresi namun menurun diakhir, akibat proses degradasi via jalur proteosom yang dimediasi ubiquitin

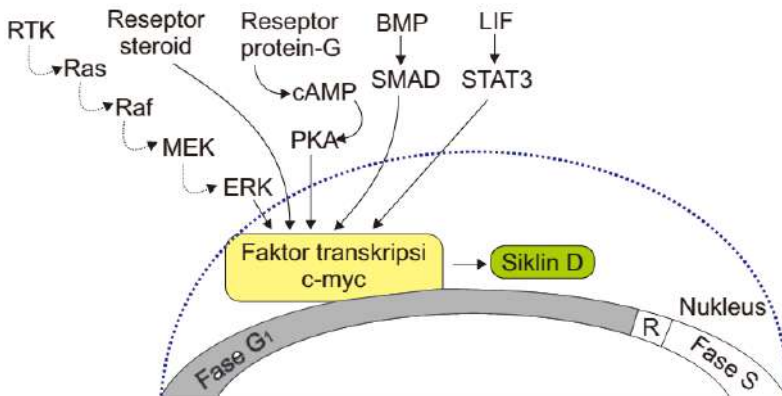
## 4.2 Klasifikasi Cyclin

*Cyclin* dapat dibagi menjadi 5 kelas berdasarkan atas kerjanya pada tiap tahapan fase siklus sel, yaitu:

1. Siklin C yang bekerja pada fase Go siklus sel
2. Siklin D yang bekerja pada fase G1 siklus sel
3. Siklin E yang bekerja pada fase G1/S siklus sel
4. Siklin A yang bekerja pada fase G2 siklus sel
5. Siklin B yang bekerja pada fase M siklus sel

## 5. Fase G<sub>1</sub>

Pergerakan dan laju siklus sel dimulai paska pengikatan ligan-reseptor RTK, maupun integrin yang selanjutnya menginisiasi serangkaian kaskade sinyal transduksi proliferasi. Aktivasi jalur kompleks MAPK-ERK atau jalur PI3K/ Akt (jalur diferensiasi), BMP/ SMAD dan LIF/ STAT3 (jalur perbaharuan diri) akan memasuki nukleus untuk memulai siklus sel.



Gambar 87. Sintesis siklin D (Fase G<sub>1</sub>)

Sintesis siklin D dimulai paska pengikatan ligan-reseptor RTK atau ligan-reseptor steroid atau ligan-reseptor protein-G atau BMP-SMAD dan atau LIF-STAT3 yang selanjutnya menginisiasi serangkaian kaskade sinyal transduksi menuju nukleus berupa aktifitas transkripsi gen c-myc yang menghasilkan siklin D.

## **5.1 Pengertian fase G<sub>1</sub>**

Fase G<sub>1</sub> (fase gap 1) adalah fase pertama dalam siklus sel yang ditandai dengan perkembangan sel (ukuran sel) dan sintesis mRNA/protein histon (untuk fase S berikutnya). Sekali ukuran sel sesuai dan sintesis protein selesai maka sel akan memasuki fase selanjutnya yaitu fase S. Secara spesifik fase G<sub>1</sub> dibagi menjadi 3 tahapan, yaitu:

1. Fase G<sub>1</sub> awal
2. Fase G<sub>1</sub> tengah
3. Fase G<sub>1</sub> akhir

## **5.2 Fase G<sub>1</sub> awal: sintesis siklin-D (nonstabil)**

Proses siklus sel dimulai dengan mentranskripsi siklin D difase G<sub>1</sub> awal paska sinyal mitogenik (jalur MAPK-ERK) memasuki nukleus yang kemudian mensintesis faktor transkripsi siklin-D. Protein siklin-D adalah protein akselerator perpindahan dari fase G<sub>1</sub> ke S siklus sel, sehingga dapat memicu laju siklus sel. Sekalipun demikian, siklin D yang dibuat nukleus masih dalam keadaan sangat tidak stabil dan waktu paruhnya singkat (sekitar 10 menit). Hal ini menyebabkan siklin-D tidak akan pernah terakumulasi dalam jumlah cukup pada fase G<sub>1</sub> awal sehingga tidak memungkinkan untuk berikatan dengan Cdk4/6.

## **5.3 Fase G<sub>1</sub> tengah: ikatan CDK4/6-siklin D-p21/p27**

Siklin yang non-stabil pada fase G<sub>1</sub> awal perlu distabilkan pada fase G<sub>1</sub> tengah. Upaya penstabilan siklin-D dilakukan dengan mengekspresikan siklin D ke sitoplasma agar dapat berikatan dengan p21 atau p27 (protein co-faktor positif siklin-D terhadap Cdk4/6). Pengikatan siklin dengan p21 atau p27 menyebabkan siklin-D stabil sehingga mudah berikatan dengan CDK4/6. Hal ini menyebabkan pembentukan kompleks protein aktif yaitu Cdk4/6-siklin D-p21 atau Cdk4/6-siklin D-p27.

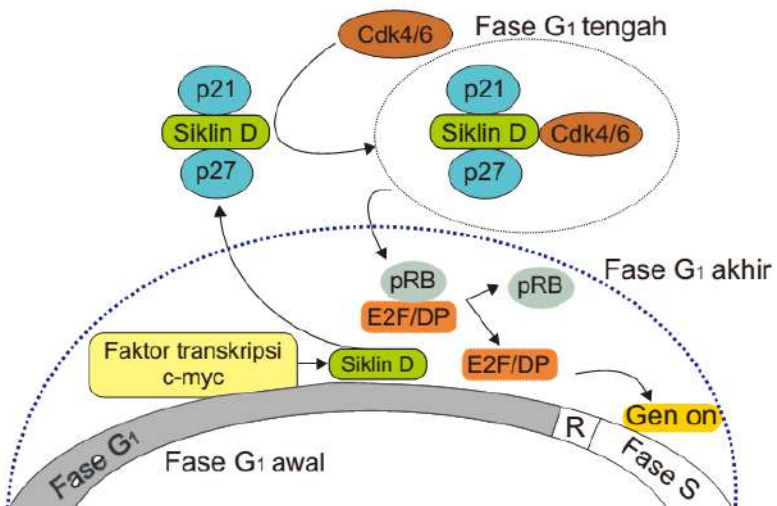
Komplek protein aktif ini berfungsi sebagai:

1. Upaya peningkatkan perakitan Cdk4/6-siklin D-p21 atau Cdk4/6-siklin D-p27 selanjutnya.

- Upaya pendorong agar Cdk4/6-siklin D mudah memasuki nukleus sehingga mampu memicu fosforilasi (aktivasi) protein pRb.

#### 5.4 Fase G<sub>1</sub>akhir: fosforilasi pRb

Fase G<sub>1</sub> akhir merupakan fase terpenting dalam fase G<sub>1</sub>, karena pada fase ini terdapat area *restriction-point* (*moleculer gate*) dimana setiap sinyal mitogenik yang masuk nukleus akan dilakukan *checkpoint*. Secara spesifik area *checkpoint* ini menentukan apakah sinyal mitogenik telah sesuai dan layak diteruskan ke fase selanjutnya (fase S) atau harus dihambat, karena sinyal tersebut berpotensi merusak atau menimbulkan mutasi.



Gambar 88. Fase G<sub>1</sub>

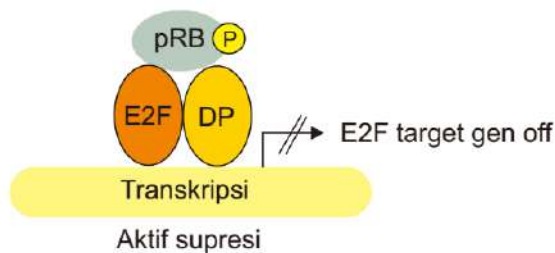
Siklin D yang disintesis pada fase G<sub>1</sub> awal tidak stabil oleh karena itu diekspresikan ke sitoplasma agar berikatan dengan p21 atau p27 sehingga menjadi stabil. Siklin D-p21-p27 kemudian berikatan dengan CDK4/6 membentuk kompleks Cdk4/6-siklinD-p21/p27 yang dapat memfosforilasi ikatan pRB-E2F/DP sehingga E2F/DP terlepas mengakibatkan transkripsi protein terkait replikasi DNA (gen menjadi *on*).

## 6. pRB siklus sel

Protein pRB (*retinoblastoma protein*) dalam keadaan normal terikat secara kuat (aktif) pada *E2F-promoter binding protein-dimerization partner* (E2F-DP) sehingga membentuk kompleks trimer pRb-E2F-DP yang dapat mencegah laju progresi siklus sel. E2F-DP adalah protein faktor transkripsi famili E2F yang dibutuhkan dalam proses replikasi DNA pada fase S. Oleh karena itu dibutuhkan upaya pelepasan pRB dari kompleks protein pRb-E2F-Dp1 tersebut, dengan cara fosforilasi pRB sehingga pRB menjadi inaktif dan terlepas.

### 6.1 Pengertian pRB

pRB adalah protein *suppressor* tumor yang berperan membatasi sel dalam mereplikasi DNA dengan cara mengikat area E2F-DP (faktor transkripsi famili E2F untuk situs gen promotor proliferasi dan perkembangan siklus sel). Pengikatan pRB pada E2F-DP menyebabkan status E2F-DP inaktif. Posisi E2F-DP inaktif tidak memungkinkan perpindahan fase  $G_1$  ke S sehingga tidak terjadi progresi siklus sel dengan demikian pRB berperan sebagai molekul kontrol terhadap *gate*  $G_1$  yang menghambat laju progres siklus sel sehingga dapat mencegah pertumbuhan sel berlebihan.



Gambar 89. pRB

pRB dalam keadaan normal mengikat area E2F-DP (faktor transkripsi untuk situs gen promotor proliferasi dan perkembangan siklus sel). Pengikatan pRB pada E2F-DP menyebabkan E2F-DP inaktif sehingga transkripsi gen target tidak terjadi (*gene off*).

## 6.2 Pengikatan pRB pada E2F-DP

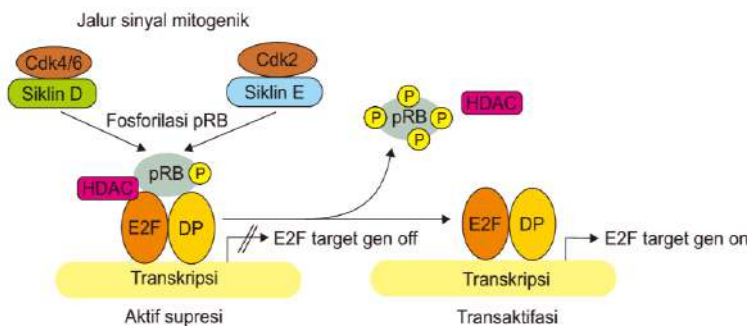
Pengikatan pRB pada E2F-DP menyebabkan situs gen promotor proliferasi dan siklus sel terikat dan inaktif sehingga terjadi penurunan regulasi berbagai protein faktor transkripsi dibutuhkan dalam replikasi DNA seperti MCMs, RPA34, DBF4, RFCp37 dan RFCp140. Penurunan regulasi faktor transkripsi menyebabkan penurunan faktor transkripsi E2F yang secara simultan menghambat replikasi DNA, sehingga mencegah perpindahan siklus sel dari fase G<sub>1</sub> ke S. Proses ini *reversible*, ketika terjadi fosforilasi pRB menjadi inaktif dan terlepas sehingga transkripsi berjalan kembali.

## 6.3 Mekansime aktivasi pRB aktivasi (*gen on*)

Fosforilasi pRB paska induksi sinyal kompleks Cdk4/6-siklin D-p21/27 fase G<sub>1</sub> menyebabkan sel siap membelah. Secara sistematis proses aktivasi pRB sebagai berikut :

1. Fosforilasi protein pRb.

Fosforilasi protein pRB terjadi ketika kompleks protein Cdk4/6-siklin D-p21/27 aktif memasuki nukleus di fase G<sub>1</sub> akhir. pRB terfosforilasi akan menarik enzim histon *deacetylase* (HDAC) ke kromatin hingga terlepas dan terjadi disosiasi kompleks pRb-E2F-DP1, yang berakhir dengan terlepasnya E2F/DP1 dari ikatan pRb. E2F/DP1 bebas berfungsi sebagai faktor transkripsi.



Gambar 90. Fosforilasi pRB/E2F-DP

Fosforilasi protein pRB terjadi ketika kompleks protein aktif Cdk4/6-siklin D atau Cdk2-siklin E (paska stimulasi sinyal mitogenik)

memasuki nukleus. pRB yang terfosforilasi akan menarik enzim histon *deacetylase* (HDAC) sehingga terjadi disosiasi kompleks pRB-E2F-DP1, berakibat terlepasnya E2F/DP1. E2F/DP1 bebas berperan sebagai transaktivasi faktor transkripsi yang menyebabkan *gene on*.

## 2. Transkripsi protein regulator: *gene on state*

pRB yang terlepas akibat fosforilasi menyebabkan E2F/DP1 bebas dan aktif berperan sebagai faktor transkripsi poten untuk promosi ekspresi gen terutama proliferasi (gen dalam *on state*), sehingga mampu melakukan *up-regulation* protein-protein yang dibutuhkan pada fase S (sintesis DNA). Hal ini menyebabkan siklus sel bergerak, termasuk sel yang dalam posisi Go akan memasuki siklus sel kembali. Ekspresi proteksi yang dihasilkan adalah :

- 1) DNA polymerase 1
  - 2) Accessory factor dan Enzim yg mensintesis precursors nucleotida
  - 3) Protein yang mempromote progresifitas siklus sel selanjutnya (siklin E, siklin A dan Cdk1)
- ## 3. Transisi fase G1 ke dalam fase S siklus sel.

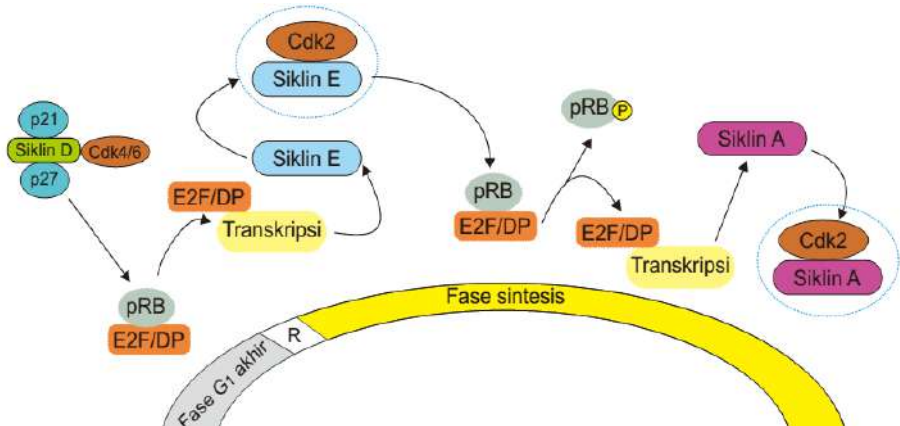
Sebelum terjadi fosforilasi protein pRB, maka siklus sel secara fungsional berada dalam fase G<sub>0</sub>, sehingga tidak ada aktivitas pergerakan dari siklus sel sama sekali. Hal ini dikenal sebagai *gene under off state*. Fosforilasi yang terjadi protein pRB, menyebabkan transisi fase Go kedalam fase G1, melewati G1 kontrol sebagai *restriction point* atau *moleculer gate*.

# 7. Fase S

## 7.1 Pengertian fase S

Fase S (fase sintesis) adalah suatu tahapan dalam siklus sel antara fase G1 dan G2 dimana DNA direplikasi. Sintesis DNA dalam fase S ini membutuhkan siklin E, yang dibuat di fase G1 tengah (paska kompleks CDk4/6-siklin D terbentuk).

Protein siklin E membutuhkan co-faktor positif Cdk2. Interaksi Cdk2-siklin E menginisiasi terjadinya replikasi DNA.



Gambar 91. Peranan Cdk2-siklin E pada Fase S

Kompleks Cdk4/6-siklin D yang memfosforilasi ikatan pRB-E2F/DP di fase G<sub>1</sub> akhir menyebabkan E2F/DP bebas yang kemudian mentranskripsi siklin E. Protein siklin E berikatan dengan Cdk2 yang kemudian memfosforilasi ikatan pRB-E2F/DP sehingga menyebabkan E2F bebas. E2F bebas kemudian mentranskripsi siklin A yang akan berikatan dengan Cdk2 sehingga mentranskripsi berbagai protein yang dibutuhkan dalam sintesis DNA.

## 7.2 Deteksi DNA damage: checkpoint

Selama sintesis DNA sel akan melakukan cek keseluruhan bentuk abnormalitas genom, terutama terhadap kerusakan DNA. Replikasi genome merupakan hal penting dalam keberhasilan pembelahan sel dan oleh karena itu proses ini diatur secara ketat. Sekali terdeteksi kerusakan DNA maka akan teraktivasi jalur *checkpointcanonical* yang berakibat pada penundaan progresi siklus sel lebih lanjut, namun ketika DNA terduplikasimaka sel akan segera memasuki fase-G<sub>2</sub> dan mulai sintesis protein untuk mitosis. Secara spesifik terdapat 3 jalur checkpoint yaitu:

1. Checkpoint replikasi

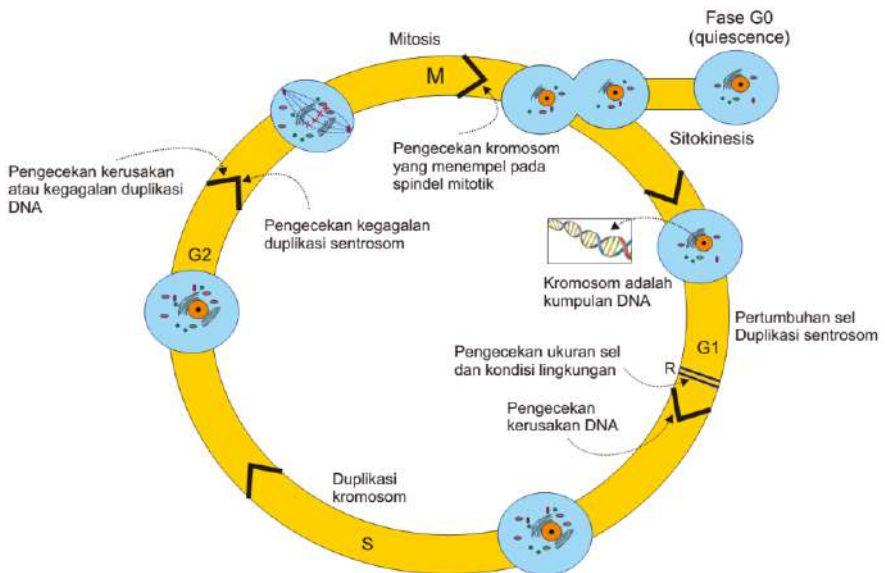
Jalur ini untuk mendeteksi *replication fork* yang terhenti, dengan mengintegrasikan sinyal asal *ATR interacting protein* (ATRIP) dan RAD17. Sekali jalur ini aktif maka akan ditingkatkan biosintesis *nucleotide* untuk meningkatkan ketersediaan NTP dalam membantu *replication fork* yang terhenti.

2. *Checkpoint* fase S-M

Jalur ini untuk memblokir mitosis hingga seluruh genom selesai diduplikasikan dengan sempurna. Hal ini melalui hambatan kompleks siklin B-Cdk1 (secara gradual terakumulasi sepanjang siklus sel terutama untuk promosi masuk fase mitosis).

3. *Checkpoint* fase S

Jalur ini untuk mendeteksi *double strand break* (DSB) yaitu deteksi kerusakan untaian ganda DNA melalui aktivasi ATR dan ATM kinase. Sisi lain jalur ini juga memfasilitasi reparasi DNA. ATR dan ATM aktif akan menghentikan progresi siklus sel dengan promosi degradasi CDC25A (phosphatase yang dapat membuang residu phopotase inhibitori dari CDK).



Gambar 92. *Checkpoint*

## **8. Fase G<sub>2</sub> : Cdk-1 cyclin B**

### **8.1 Pengertian G<sub>2</sub>**

Fase G<sub>2</sub> adalah suatu tahapan dari siklus sel dimana terjadi pertumbuhan cepat sel dan sintesis protein untuk preparasi memasuki fase selanjutnya (mitosis). Beberapa tipe sel dan kanker justru tidak memerlukan fase G<sub>2</sub> ini karena proses berjalan secara langsung dari replikasi DNA menuju mitosis tanpa melewati fase G<sub>2</sub>. Fase G<sub>2</sub> dimulai ketika terdapat siklin B yang kemudian mengikat Cdk-1 sehingga menjadi siklin B-Cdk1 yang kemudian mempromosikan fase G<sub>2</sub> masuk kedalam fase M.

### **8.2 Deteksi kerusakan DNA G<sub>2</sub>/M**

*Checkpoint* kerusakan DNA G<sub>2</sub>/M merupakan penundaan sel dalam G<sub>2</sub> sebelum memasuki mitosis sebagai respon atas stress genotoksik (radiasi UV, oksidative stress dan agen interkalasi DNA) baik melalui pola p53-dependen maupun p53-independent. Secara spesifik sinyal DNA damage menyebabkan aktivasi factor transkripsi p53. Cdk-1 secara langsung dihambat oleh 3 target transkripsi p53 yaitu p21, Gadd45 dan 14-3-3 $\alpha$ . Sekali siklin B1-Cdk1 terisolasi dalam nuklues oleh p21 maka menjadi inaktif, sebaliknya ketika terisolasi dalam sitoplasma oleh 14-3-3 $\alpha$  maka menjadi aktif. Sementara Gadd45 mengganggu pengikatan siklin B1 dan Cdk1 melalui interaksi langsung dengan CDK1.

## **9. Fase mitosis**

Secara prinsip siklus sel dibagi menjadi 2 tahapan:

1. Fase mitosis
2. Fase sitokinesis

### **9.1 Pengertian mitosis**

Mitosis adalah suatu periode pembelahan sel dengan tujuan menduplikasi semua komponen penting sel turunan terutama set kromosom, sehingga memungkinkan setiap calon sel turunan

menerima salinan seluruh genom identik dengan induk. Proses diawali dengan mensalinan dan mensintesis set kromosom (DNA) secara tepat sepanjang initial kromosom, hingga pemisahan kromosom menjadi dua bagian serupa (kromatid) dengan kandungan DNA sama dan berakhir dengan terbentuknya kromosom identik. Kromosom sel periode interfase umumnya tersusun atas untaian DNA difus, sehingga tidak terlihat dibawah mikroskop cahaya, namun ketika memasuki fase M maka untai DNA yang telah bereplikasi sebelumnya pada fase S tampak sebagai kromosom yang mengalami kondensasi berupa:

1. Untaian panjang DNA secara bertahap mengkerut dan menebal.
2. Terbentuk *spindle mitotic* (struktur sitoskeletal), tersusun atas mikrotubuli yang melekat pada kromosom, sehingga secara fisik memudahkan menarik hingga memisahkannya kedalam sel turunan.

## **9.2 Tahapan mitosis**

Secara sistematis mitosis dibagi menjadi 5 tahapan yang secara berurutan yaitu:

1. Profase

Kromosom yang telah bereplikasi sebelumnya mengalami kondensasi dan *spindle mitotic* mulai dirakit diluar nukleus.

2. Prometafase

Membran nukleus mulai melebur dan hancur sehingga memungkinkan terjadi kontak antara *spindle mitotic* dengan kromosom.

3. Metafase

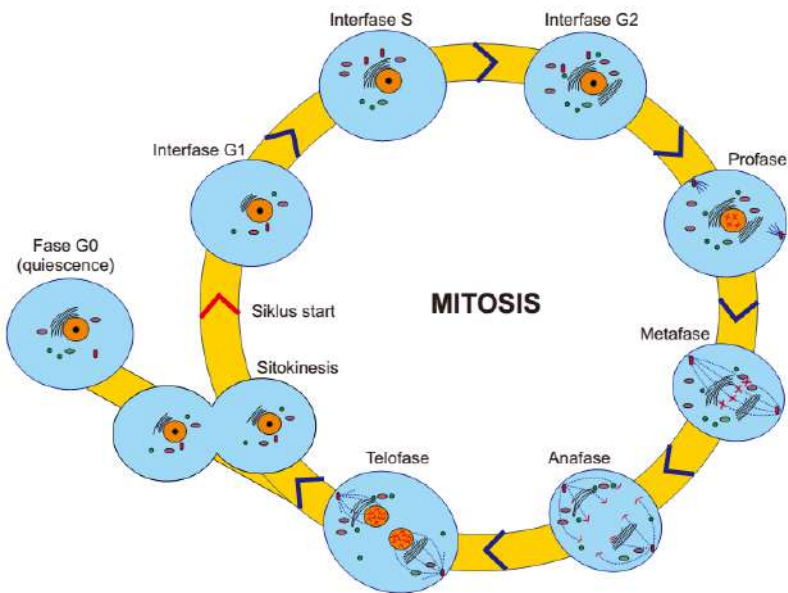
Seluruh kromosom bergerak dan berkumpul dipusat *spindle mitotic* sehingga tampak sebagai *equatorial plate*.

4. Anafase

Kromosom terpisah menjadi 2 bagian dan tertarik pada sisi berlawanan sel.

5. Telofase

Perakitan kembali membran inti disekitar dua set kromosom yang telah terpisah hingga terbentuk dua nukleus. Terbentuknya dua nukleus baru menandakan akhir dari proses mitosis, dimana kromosom mengalami dekondensasi dan seluruh gen transkripsi mulai berfungsi, sedangkan seluruh sisa lainnya digunakan sel dalam pembelahan menjadi dua sel.



Gambar 93. Fase mitosis dan sitokinesis

Siklus sel dimulai dengan sinyal melewati area retriksi G1 akhir, berlanjut ke fase S, G2 kemudian memasuki fase mitosis. Fase mitosis dimulai dengan profase yang ditandai dengan kondensasi kromosom dilanjutkan dengan prometafase berupa menyatunya membran nukleus (kontak *spindle mitotic*-kromosom). Metafase khas ditandai dengan *spindle mitotic* berkumpul dipusat seperti *equatorial plate*. Anafase ditandai dengan terpisah kromosom pada sisi berlawanan sel dan telofase berupa perakitan membran inti (terbentuk dua nukleus). Fase mitosis berlanjut pada sitokinesis yang ditandai dengan pembelahan sel menjadi dua sel turunan identik.

## **10. Sitokinesis**

Sitokinesis adalah suatu fitur kedua fase mitosis dimana terjadi distribusi membran sel, sitoskeleton, organela, dan protein terlarut lainnya pada dua sel turunan. Secara fisik ditandai dengan pembelahan sel menjadi dua sel turunan identik berupa pengkerutan membran sel masing-masing kedalam. Hal ini disebabkan adanya cincin kontraksi (struktur sitoskeleton) yang menegang dengan arah pengkerutan sesuai tarikan *spindle mitotic* (menarik kromosom) kesisi berlawanan sel. Tarikan kontraksi terus menerus semakin mengencang hingga menjepit sel menjadi dua bagian sel, dengan cara demikian terbentuk dua sel turunan yang identik dan memastikan setiap sel turunan mengandung satu nukleus. Cincin kontraksi tersusun atas tipe molekul filament yaitu filament aktin dan miosin yang saling memendek untuk menghasilkan kekuatan pengencangan. Kekuatan yang dihasilkan cukup kuat untuk membengkokkan jarum halus yang diinsersi dalam sel. Struktur ini sementara yang secara bertahap semakin mengecil ketika proses sitokinesis berlanjut hingga sel secara lengkap terbelah menjadi dua.

## **11. Akurasi kontrol sinyal proliferasi**

Sistem sirkuit sinyal seluler selalu menuju tahapan homeostasis seluler secara terus menerus dengan tujuan stabilisasi sinyal. Setiap kali sinyal proliferasi meningkat akan diikuti dengan mekanisme kontrol, terutama ketika terjadi sinyal yang berlebihan dan menyimpang dari fisiologis.

### **11.1 Pengertian akurasi kontrol sinyal proliferasi**

Salah satu ciri adanya kehidupan adalah munculnya aktivitas proliferasi sel. Suatu sel dikatakan berproliferasi dengan normal bila sel tersebut mampu mempertahankan dan mengontrol dinamika proliferasi secara tepat. Dinamika tersebut berupa keberadaan signal proliferasi dan sinyal inhibisi secara simultan dan terus-menerus

dilakukan dalam rangka menjaga homeostasis subseluler. Dengan demikian menentukan apakah signal proliferasi ini layak diteruskan memasuki siklus sel, atau ditunda sementara sambil dilakukan perbaikan, dan atau mentrigger kematian sel secara apoptosis, ketika perbaikan DNA gagal dilakukan merupakan fungsi terpenting dari sistem *signalling*.

## **11.2 Kontrol sinyal intrinsik-ekstrinsik**

Kontrol sinyal proliferasi merupakan upaya seluler dalam memastikan bahwa sinyal mitogenik yang memasuki tahapan siklus sel dalam nukleus masih dalam batas layak untuk diteruskan. Kontrol sinyal proliferasi tersebut baik terhadap sinyal eksternal mitogenik (matriks ekstraseluler) maupun sinyal internal mitogenik. Keadaan ini menyebabkan setiap sel akan mengerti kapan harus memasuki siklus sel, berproliferasi, berdiferensiasi, direparasi dan sebagainya. Secara sistematis mekanisme kontrol sinyal seluler dilakukan dengan 2 cara:

1. Kontrol intrinsik
2. Kontrol ekstrinsik

## **12. Kontrol sinyal intrinsik: *Checkpoint***

*Checkpoint* berperan strategis dalam menjaga stabilitas genomik, karena hampir seluruh penyakit keganasan dimulai dari kondisi instabilitas genomik, yang berpotensi menjadi mutasi genetik, dan epigenetik. Fungsi *checkpoint* dalam deteksi kerusakan akan diikuti dengan langkah selanjutnya, berupa penahanan kelanjutan siklus sel sampai kerusakan selesai diperbaiki.

### **12.1 Pengertian *checkpoint* sinyal proliferasi**

*Checkpoint* sinyal proliferasi adalah suatu pemeriksaan terhadap kelayakan sinyal intrinsik (mitogenik) yang sedang memasuki tahapan siklus sel untuk memastikan bahwa integritas DNA tidak terganggu. Keberadaan *checkpoint* dalam siklus sel dapat diketahui pada penelitian *in vitro* kultur sel, dengan cara membuat

media kultur dalam keadaan defisiensi asam amino, serum atau fosfat. Keadaan ini menyebabkan pertumbuhan sel tersebut terhenti pada fase G1 siklus sel, namun ketika defisiensi tersebut direstorasi, maka sel kultur tersebut melanjutkan kembali memasuki fase S. Hal membuktikan bahwa terdapat area *checkpoint* (pengecekan) pada fase G1 siklus sel.

## **12.2 Checkpoint tiap fase siklus sel**

Sinyal intrinsik mitogenik yang datang memasuki siklus sel akan melewati serangkaian *checkpoint* (pos pengecekan) tiap fase siklus sel. Tingkat akurasi *checkpoints* sangatlah presisi, baik dalam hal pelepasan sinyal *growth-promoting* untuk melanjutkan ke-siklus sel berikutnya, maupun dalam perintah inhibisi sinyal. Pemantauan sinyal mitogenik dilakukan tergantung pada tiap fase dalam siklus sel. Monitor di fase S dilakukan terhadap sekwen DNA namun ketika pada fase M dilakukan terhadap kesesuaian ukuran sel. Secara spesifik checkpoint tiap fase dibagi menjadi:

### 1. Check point fase G0-G1: Pemastian kelayakan sinyal

Area checkpoint akan memastikan bahwa sinyal yang masuk dan diterima tersebut adalah kompaktable dengan struktur protein sinyal sehingga bisa diteruskan ke fase siklus sel selanjutnya. Secara spesifik sel dalam fase G0 yang kemudian mendapatkan sinyal proliferasi yang cukup kuat untuk melewati fase G1, maka sebelum memasuki selanjutnya yaitu fase S, sel tersebut harus membuat keputusan terutama pada G1 akhir. Titik di fase G1 akhir dimana sel tersebut membuat keputusan memasuki fase S dikenal sebagai *restriction point*

### 2. Check point fase G2: Deteksi kerusakan DNA

Area *Check point* G2 akhir berfungsi dalam mendeteksi setiap kerusakan DNA sub seluler yang terjadi atau terhadap duplikasi DNA. Fungsi deteksi ini sangat penting dalam menjaga integritas dan stabilitas genomik. Setiap area DNA yang terdeteksi kerusakan akan

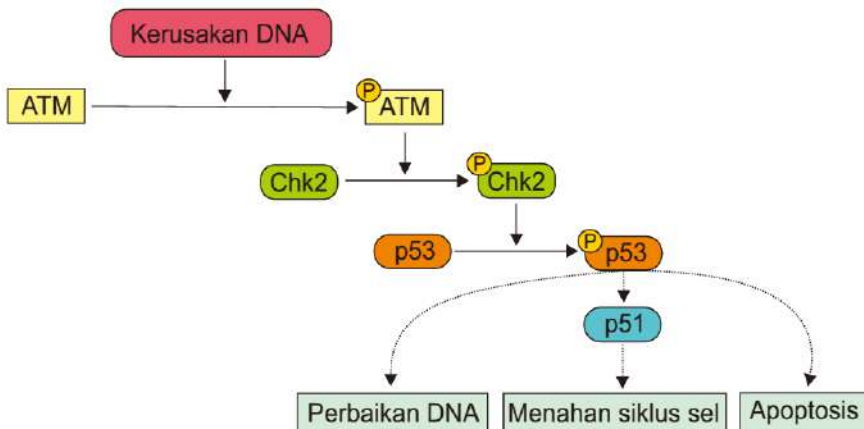
dikuti dengan langkah penahanan kelanjutan siklus sel hingga terjadi reparasi.

3. Check point fase M: *Checking* kondisi kromosom

Area *checkpoint* terakhir terjadi fase M dengan tujuan mengecek apakah kromosom telah menempel pada *spindle mitotic* atau belum. Dengan demikian ketika semua fungsi *checkpoint* bekerja dengan baik maka sulit bagi normal sel untuk berubah menjadi bentuk malignansi.

### 12.3 Keterlibatan molekul ATM dan p53-p21

Terdapat banyak molekul protein yang terlibat ketika terjadi kerusakan DNA, diantaranya ATM, p53, p21, dan DNA repair seperti sajian dalam gambar dibawah ini



Gambar 94. Keterlibatan molekul ATM dan p53-p21

### 13. Kontrol sinyal ekstrinsik proliferasi

Seperti yang sudah dikaji sebelumnya, konsep homeostasis harus selalu terjadi dalam kondisi apapun, demi keseimbangan fisiologis seluler sendiri. Ketika signal proliferasi menguat dan berlanjut dengan pembelahan sel, maka secara sistematis akan terjadi upaya penyeimbangan terhadap fungsi seluler tersebut, yang dilakukan dengan cara menghambat keberlanjutan siklus sel.

### **13.1 Pengertian kontrol sinyal ekstrinsik**

Kontrol sinyal mitogenik ekstrinsik adalah upaya pengendalian terhadap semua sinyal mitogenik ekstrinsik yang memasuki sel menuju keadaan yang layak dan stabil. Aktivitas kontrol tersebut melibatkan banyak molekul sinyal dan berbagai jalur terutama proliferasi.

### **13.2 Mekanisme kontrol sinyal ekstrinsik**

Secara spesifik aktifitas kontrol sinyal mitogenik ekstrinsik dilakukan dengan cara:

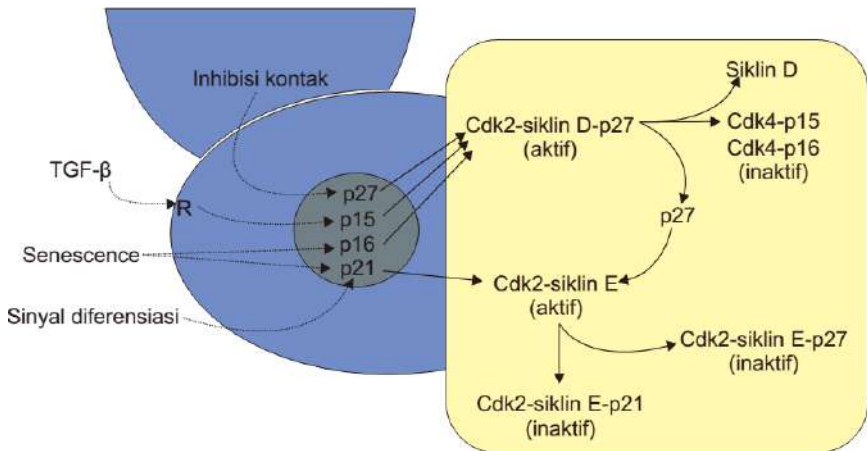
#### 1. Peningkatan ekspresi TGF- $\beta$ –kontrol eksternal

TGF- $\beta$  (*Transforming growth faktor- $\beta$* ) adalah protein yang berperan sentral dalam diferensiasi dan morfogenesis. Secara spesifik TGF-  $\beta$  yang berikatan dengan reseptor serin/ threonin kinase, menyebabkan induksi ekspresi protein p15 (*Cdk-inhibiting/ Ink4b*). Aktifasi p15 mengakibatkan inaktivasi kompleks *Cdk4-cyclin D-p27* sehingga p27 terlepas. Protein p27 yang bebas tersebut akan segera berikatan dengan *Cdk2-Cyclin E* aktif dinukleus, berakibat terbentuk kompleks *Cdk2-Cyclin E-p27* inaktif, sehingga terjadi inhibisi keberlanjutan siklus sel.

#### 2. Peningkatan ekspresi p27 – kontrol eksternal

Kontrol eksternal ini terjadi akibat sel sekitar terdesak oleh proliferasi sel patologis yang berlebihan (*contact inhibition*). Sel yang terdesak tersebut mengekspresikan p27, selanjutnya memicu berikatannya dengan *Cdk2-Cyclin E* aktif dinukleus menjadi kompleks *Cdk2-CyclinE-p27* yang inaktif. Akibatnya terjadi inhibisi keberlanjutan siklus sel. Oleh karenanya proliferasi sel kanker semestinya dapat dihambat, manakala *niche*-nya atau *micro-environment* turut diperbaiki, dengan harapan sel sekitar mampu mengekspresikan p27 ketika terjadi proliferasi berlebihan dari sel patologis.

Kontrol eksternal sinyaling seperti dalam gambar dibawah ini.



Gambar 95. Kontrol eksternal *signalling*

### 13.3 Kontrol feedback negatif: GTPase

Mekanisme *feedback* negatif adalah bagian dari konsep homeostasis, yang normalnya berfungsi dalam mengurangi/memperkecil kekuatan *signalling* yang terjadi dalam sirkuit intraseluler, dalam rangka menyeimbangkan proses subseluler demi mencapai keadaan homeostatis. Oleh karena itu efek dari *feedback mechanisms* menyebabkan peningkatan signalling proliferasi. Hal ini terjadi melalui GTPase - aktivasi onkoprotein ras.

GTPase bekerja sebagai sebuah mekanisme *feedback* negatif intrinsik (sebagai rem), untuk memastikan bahwa transmisi signal proliferasi aktif dalam batasan seimbang dan tidak berlebihan. Hal ini dilakukan dengan melakukan pemecahan GTP menjadi bentuk tidak aktif, yaitu GDP dalam proses signaling transduksi. Akibatnya signaling transduksi melemah-hilang, proliferasi sel terhenti. Jadi sesungguhnya efek onkogenik yang ditimbul bukanlah akibat hiperaktivasi signalling Ras, akan tetapi berasal dari mutasi onkogenik aktivitas GTPase.

### **13.4 Akurasi keputusan molekuler**

Akurasi keputusan molekuler terhadap signal yang diterima sangatlah penting dalam menentukan keberlanjutan proliferasi suatu sel normal. Keputusan molekuler dibuat ketika signal proliferasi tersebut melewati berbagai fungsi kontrol subseluler, baik secara internal berupa “area checkpoint” maupun secara eksternal berupa kontrol lingkungan mikro-ekstraseluler. Oleh karena itu sulit bagi suatu sel untuk menyimpang dari aturan sistem signalling ini, selama keadaan genomik dan epigentik bekerja normal. Sel kanker mampu menaifkan semua sistem kontrol ini, terus-menerus berproliferasi dan mempertahankannya, tanpa adanya hambatan yang berarti, menunjukkan adanya gangguan dalam sistem tersebut.

## **Daftar Pustaka**

1. Alao JP. The regulation of cyclin D1 degradation: Roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Mol Cancer*. 2007;6:1–16.
2. Camins A, Pizarro JG, Folch J. Cyclin-Dependent Kinases. *Brenner's Encycl Genet* Second Ed. 2013;15(6):260–6.
3. Ewens KG, Bhatti TR, Moran KA, Richards-Yutz J, Shields CL, Eagle RC, et al. Phosphorylation of pRb: mechanism for RB pathway inactivation in MYCN-amplified retinoblastoma. *Cancer Med*. 2017;6(3):619–30.
4. Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression. *Oncogene*. 2006;25(38):5220–7.
5. Narasimha AM, Kaulich M, Shapiro GS, Choi YJ, Sicinski P, Dowdy SF. Cyclin D activates the Rb tumor suppressor by mono-phosphorylation. *Elife*. 2014;2014(3):1–21.
6. Machida YJ, Dutta A. Cellular checkpoint mechanisms monitoring proper initiation of DNA replication. *J Biol Chem*. 2005;280(8):6253–6.
7. Jang SH, Kim A-R, Park N-H, Park JW, Han I-S. DRG2 Regulates G2/M Progression via the Cyclin B1-Cdk1 Complex. *Mol Cells* [Internet]. 2016;39(9):699–704.
8. Huang SS, Huang JS. TGF- $\beta$  control of cell proliferation. *J Cell Biochem*. 2005;96(3):447–62.
9. Abbastabar M, Kheyrollah M, Azizian K, Bagherlou N, Tehrani SS, Maniati M, et al. Multiple functions of p27 in cell cycle, apoptosis, epigenetic modification and transcriptional regulation for the control of cell growth: A double-edged sword protein. *DNA Repair (Amst)* [Internet]. Elsevier; 2018;69(July):63–72.

## **BAB VIII**

# **KONSEP DAN TERMINOLOGI MESENCHYMAL STEM CELL**

### **Tujuan**

---

Setelah membaca bagian ini diharapkan pembaca dapat memahami tentang *milestone* MSC, terminologi MSC, marker molekuler MSC, tinjauan definisi MSC ke depan, evolusi MSC, molekuler MSC, konsep evolusi MSC, konsep MSC terkini, sumber sel punca, MSC dalam regenerasi dan restorasi, imunoregulasi MSC, konsep *homing* MSC dan fusi MSC dalam reparasi dan regenerasi

*Mesenchymal stem cell (MSC) adalah sel punca multipoten yang dapat berdiferensiasi menjadi berbagai tipe sel. MSC memiliki kemampuan dalam diferensiasi, fusi, transdiferensiasi dan eksosom, hingga konsep parakrin. Sisi lain MSC juga memiliki potensi sebagai anti-inflamatori dan potensi imun-privilege dan secara spesifik MSC juga memiliki karakteristik seperti sel leukosit, sehingga mampu mendeteksi molekul sinyal cedera (SDF-1, TNF $\alpha$ , IL-1 dan IFN $\gamma$ ) sehingga mampu migrasi ke area cedera (fenomena homing). Secara molekuler MSC mengekspresikan marker CD29+/ CD44+/ CD73+/ CD90+/ CD105+/ CD106+ dan CD166+ dan tidak mengekspresikan CD11b/ CD14/ CD31/ CD34 atau CD45. MSC tidak mengekspresikan HLAII sehingga potensi rejeksi dalam tubuh adalah rendah. Hal lain MSC memiliki stabilitas kromosom, sehingga potensi menimbulkan tumor teratoma adalah rendah.*

*Catatan penulis*

## **1. Latar belakang**

*Mesenchymal stem cell (MSC) adalah sel punca multipoten yang dapat berdiferensiasi menjadi berbagai tipe sel, termasuk sel adiposit, osteoblas, kondrosit, neuronal, miosit,  $\beta$ -pankreas. MSC pada awalnya diidentifikasi oleh Tuan Friedenstein sebagai subpopulasi sel sumsum tulang dengan potensi osteogenik dan mampu melekat pada plastik. MSC juga memperlihatkan kemampuan sebagai anti-inflamatori dan memiliki potensi *imun-privilege*. Hal ini terlihat dengan berbagai laporan penelitian yang menyebutkan bahwa MSC mampu meregulasi respon imun dalam berbagai penyakit, termasuk penyakit autoimun. Sekalipun demikian tidak ada marker spesifik dan unik dalam mengidentifikasi MSC, disamping itu karakteristik yang ada kurang konsisten beberapa literatur yang ada.*

*Diversitas karakteristik MSC ini dapat dijelaskan dengan*

perbedaan sumber asal MSC, dimana MSC dapat diperoleh dari berbagai sumber, mulai jaringan solid hingga non-solid. Sisi lain perbedaan teknik isolasi dan kondisi kultur pada berbagai laboratorium juga ikut mempengaruhi variasi MSC. Hal ini membutuhkan standar yang jelas dan kuat diantara kelompok peneliti sel punca, terutama grup MSC. Beberapa konsensus yang ada terkait dengan karakteristik MSC masih menimbulkan konflik data. Sekalipun demikian secara umum terdapat konsensus terkait MSC, yaitu tidak mengekspresikan marker permukaan endotelial atau hematopoietik seperti CD11b, CD14, CD31, CD34 atau CD45, namun mengekspresikan CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106 dan CD166.

Berbagai laporan penelitian menyebutkan bahwa terjadi peningkatan penelitian terkait MSC secara eksponensial. MSC memberikan harapan yang menjanjikan dalam menyembuhkan berbagai penyakit terminal. Potensi diferensiasi dalam *multilineage end-stage cell*, disamping fusi dan transdiferensiasi MSC pada kasus infark miokard, kegagalan liver akut, sirosis hepatitis, penyembuhan luka hingga gangguan autoimun telah dilaporkan. Sisi lain MSC memiliki kromosom yang lebih stabil dan kecenderungan untuk membentuk tumor dan teratoma jauh lebih rendah dibanding dengan sel punca embrionik atau iPS.

Mengingat peranan penting MSC dalam meregenerasi berbagai kerusakan jaringan dan meregulasi sistem imunitas, namun sisi lain adanya diversitas karakter MSC, maka pengetahuan mendasar terkait MSC perlu dipahami. Oleh karena itu penulis mengeksplorasi MSC dari sisi terminologi dengan melihat dari berbagai aspek, mulai karakter minimum, molekuler marker hingga konsep parakrin MSC. Penulis juga membahas sumber asal jaringan MSC dan potensi MSC terkait sumber dan pada akhirnya penulis membahas konsep molekuler regenerasi dan imunoregulasi MSC terkait beberapa penyakit klinis.

## **2. Milestone MSC**

### **2.1 MSC sebagai klonogenik : CFU-F**

Pemahaman MSC dimulai ketika tahun 1968 Friedenstein menemukan subpopulasi sel non-hematopoetik asal sumsum tulang tikus dan babi yang dapat membentuk koloni sel (klonogenik) ketika dikultur dan melekat pada plastik. Keberadaan sel klonogenik diantara populasi sel sumsum tulang tersebut dideteksi sebagai *colony-forming unit-fibroblas* (CFU-F). Secara spesifik CFU-F adalah sekelompok sel yang secara morfologi seperti fibroblas, namun sel ini dapat membentuk koloni.

### **2.2 MSC sebagai sel stromal**

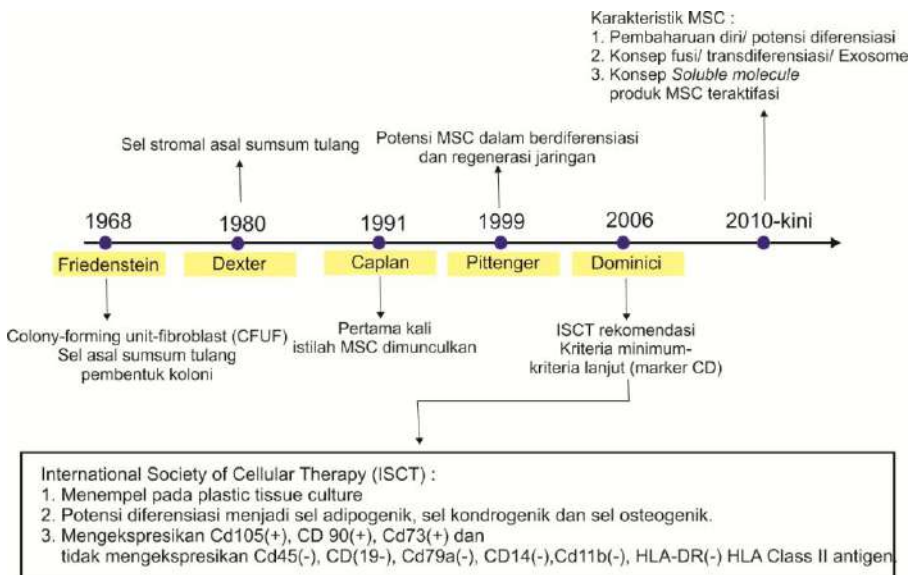
Dinamika penelitian MSC yang tinggi terutama terkait dalam hal identifikasi mendorong Dexter tahun 1980 melakukan eksplorasi keberadaan MSC. Hasil penelitian beliau menyebutkan bahwa MSC adalah populasi sel yang serupa dengan sel stromal sumsum tulang dan dapat melekat pada disk kultur serta mampu menunjang hematopoiesis. Hasil penelitian ini mendorong munculnya rasa penasaran terkait potensi spesifik MSC.

### **2.3 MSC sebagai sel berkemampuan diferensiasi**

Konsep MSC sebagai sel yang mampu berdiferensiasi didasarkan atas penelitian Caplan tahun 1991, yang dikenal sebagai proposal Caplan's. Hipotesis Caplan's menyebutkan bahwa MSC adalah sekelompok sel yang memiliki potensi berdiferensiasi menjadi semua sel turunan mesodermal. Sekalipun demikian eksistensi MSC sebagai sel dengan potensi diferensiasi *multilineage* baru ditemukan dibelakang hari, yaitu tahun 1999 oleh Pettinger. Penelitian ini kemudian memicu banyak studi terkait peranan MSC dalam memediasi proses degenerasi berbagai jaringan. Sisi lain penelitian ini memicu para peneliti untuk mengeksplorasi lebih jauh terhadap karakter molekuler spesifik MSC.

## 2.4 MSC berdasarkan kriteria ISCT 2006

Perkembangan dan penelitian MSC yang tinggi mendorong para peneliti untuk membuat batasan dan definisi secara spesifik terhadap MSC. Berbagai definisi terkait polarisasi MSC bermunculan, salah satunya adalah definisi yang dibuat Howritz tahun 2005 yang menyebutkan bahwa tidak semua *mesencymal stromal cell* adalah sel punca, disebabkan karena metode dan pendekatan yang digunakan dalam kultur dan karakterisasi MSCs berbeda. Hal ini memicu konsensus terkait karakteristik MSC, sehingga pada tahun 2006 disampaikan karakteristik MSC yang berdasarkan rekomendasi *International Society for Cellular Therapy* (ISCT). Secara spesifik sekelompok sel disebut MSC, jika memiliki kriteria dan terminologi sebagai berikut kriteria minimum dan mengekspresikan marker (CD) tertentu, yang akan dibahas selanjutnya. Sejarah MSC dapat dilihat pada *milestone* dibawah ini.



Gambar 96. *Milestone* MSC

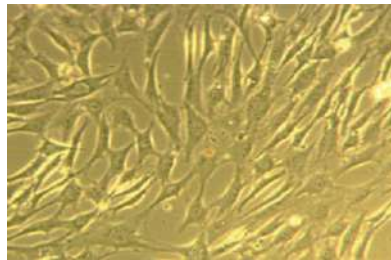
### 3. Terminologi MSC

Penelitian MSC terdahulu yang dinamis beberapa tahun terakhir yang dijelaskan dalam sekuen *milestone* MSC sebelumnya, tampak terlihat adanya variasi dalam batasan terminologi suatu MSC. Secara eksponensial mendorong para ilmuwan untuk membuat batasan dan definisi terkait karakteristik MSC. Definisi berdasarkan konsensus ISCT merekomendasikan bahwa sekelompok sel dikatakan MSC bila memiliki beberapa kriteria minimum.

MSC didefinisikan sebagai sel punca dewasa yang didapatkan dari jaringan *mesencymal* atau stromal (paska tahapan embriogenesis selesai) dengan karakteristik sebagai berikut :

1. Kreteria minimum:

- 1) MSC adalah sel yang memiliki kemampuan untuk menempel pada bahan *plastic tissue culture* ketika dikultur dalam kondisi standar in-vitro dan mampu membentuk koloni.

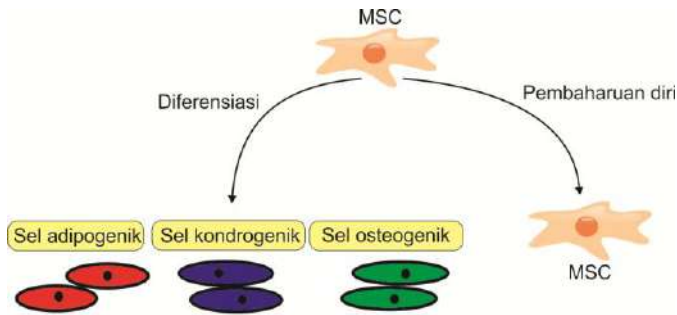


Gambar 97. MSC

MSC menempel pada *disk culture* dengan morfologi spindel seperti sel fibroblas.

- 2) MSC adalah sel yang memiliki potensi untuk diferensiasi (in-vitro) menjadi 3 turunan sel yaitu:
  1. Sel adipogenik
  2. Sel kondrogenik
  3. Sel osteogenik.

Konsep diferensiasi dan pembaharuan diri MSC dijelaskan pada gambar dibawah ini.



Gambar 98. Diferensiasi dan pembaharuan diri MSC

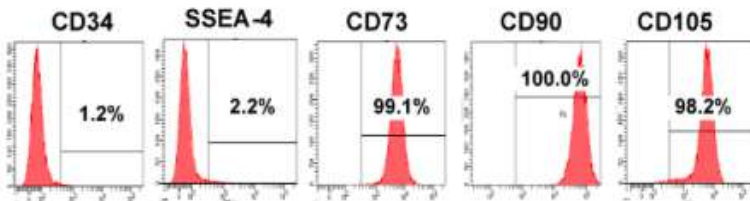
2. Persyaratan tambahan adalah:

1) MSC mampu mengekspresikan marker molekuler

1. CD105(+)
2. CD 90(+)
3. CD73(+)

2) Tidak mengekspresikan marker hematopoetik yaitu:

1. CD45(-)
2. CD(19-)
3. CD79a(-)
4. CD14(-) atau
5. CD11b(-)
6. HLA-DR(-)
7. HLA Class II antigen.



Gambar 99. Visualisasi marker

#### 4. Marker Molekuler MSC

Sekalipun terminologi yang dibuat ISCT telah banyak digunakan dalam berbagai penelitian, namun hingga kini belum dapat ditentukan marker MSC yang dapat mencakup seluruh MSC asal berbagai jaringan. Hal ini dimungkinkan karena setiap MSC yang berasal dari berbagai jaringan akan memiliki marker sedikit berbeda antara satu dan yang lainnya. Tidak adanya satu karakter tunggal MSC atau satu marker yang dapat mendefinisikan MSC membuat pengetahuan marker molekuler MSC perlu dieksplorasi lebih mendalam. Hal ini terlihat pada contoh dibawah ini. Secara spesifik molekuler MSC berupa :

1. MSC mengekspresikan CD105(+)  
CD105(+) memperlihatkan tingkat aktivitas MSC dalam membentuk CFU-F adalah tinggi,
2. MSC mengekspresikan CD146(+)  
CD146(+) memperlihatkan tingkat MSC dalam menghasilkan CFU-F, perbaharuan diri in-vivo dan pembentukan tulang serta hematopoiesis tinggi.

Sekalipun demikian ketika MSC mengekspresikan marker ini secara bersamaan dan atau salah satu, maka karakteristik menjadi berbeda. Hal ini terlihat pada contoh dibawah ini:

1. MSC mengekspresikan marker CD146(+) CD45 (-)  
CD146(+) CD45 (-) adalah subendothelial sebagai *adventitial reticular cells*.
2. MSC tidak mengekspresikan CD271(-) dan CD146(-)  
Secara spesifik keberadaan marker ini terkait dengan pembentukan tulang *ossicles* dan sel stromal terkait hematopoiesis yaitu ketika CD271(+)/ CD146(+) atau CD271(+)/ CD146(-).

## 5. Tinjauan definisi MSC kedepan

Berbagai hasil penelitian terkait melaporkan bahwa didapatkan berbagai MSC asal sumber jaringan lain. sekalipun demikian setelah dilakukan verifikasi tidak ditemukan karakteristik MSC secara kuat pada populasi tersebut. Sisi lain perkembangan molekuler memungkinkan untuk memunculkan definisi terkini terkait karakteristik MSC. Berbagai fakta terkini MSC dijelaskan dalam :

### 5.1 Batasan definisi MSC

1. MSC didefinisikan sebagai *mesenchymal stromal cells* bukan *mesencymal stem cell* meskipun istilah ini tidak ideal.
2. MSC didiskripsikan sebagai sebuah sel dengan karakteristik perbaharuan diri dan diferensiasi.
3. Perbedaan karakteristik dalam MSC dimungkinkan karena sumber MSC yang berbeda, termasuk *profile* marker yang bervariasi antar spesies.

### 5.2 Potensi multi diferensiasi MSC

Berbagai penelitian terkini melaporkan bahwa MSC selain dapat berdiferensiasi menjadi turunan mesodermal, namun pada MSC asal jaringan tertentu juga dapat berdiferensiasi juga menjadi :

1. MSC menjadi turunan ectodermal seperti: neuron, keratosit dan keratinosit.
2. MSC menjadi turunan endodermal seperti: hepatosit dan sel  $\beta$  pankreas.

### 5.3 MSC sebagai molekul sekretom/ proteotom

Hasil penelitian terkini melaporkan bahwa MSC memiliki kemampuan metabolik aktif dalam mensekresi berbagai komponen ekstraseluler dan sitokin, disamping dalam mentranskripsi berbagai komponen terkait dengan regenerasi. Hal ini menunjukkan bahwa MSC dapat berfungsi sebagai :

1. MSC sebagai sel sekretom (konsep parakrin)
2. MSC sebagai sel pretotom

3. MSC sebagai sel transkriptom

#### **5.4 SVF bukan sebagai MSC**

*Stromal vascular fraction* (SVF) merupakan sel yang berasal dari jaringan adiposa dengan karakteristik heterogenus dan mampu menempel pada disk kultur serta mengekspresikan CD90 (+). Sekalipun demikian SVF tidak mengekspresikan CD105 (-), sehingga SVF bukan merupakan kelompok MSC namun sebagai MSC-like.

### **6. Evolusi MSC: konsep *soluble molecule***

Kemunculan pemahaman terkini terkait mekanisme MSC dalam meregenerasi jaringan atau proses diferensiasi yang dapat kembali semula (dediferensiasi) memunculkan evolusi baru terkait pemahaman MSC. Berdasarkan hal tersebut penulis membagi menjadi :

#### **6.1 MSC sebagai konsep sel fusi**

Fusi sel merupakan salah satu konsep MSC dalam reparasi dan regenerasi jaringan. Secara teoritis berbagai jaringan tertentu memiliki kemampuan untuk meregenerasi diri pasca terjadi cedera seperti hati, otot, tulang dan tulang rawan. Regenerasi ini terjadi dengan melibatkan proliferasi dan diferensiasi sel punca, termasuk MSC/ progenitor endogenous yang berada jaringan cideran atau berasal dari migrasi sumsum tulang sebagai respon terhadap sinyal cedera/ stres.

#### **6.2 MSC sebagai konsep transdiferensiasi**

Konsep transdiferensiasi sel progenitor hematopoietik menjadi sel kardiak sebagai fenomena *cell fusion* dan konsep *reprogramming* MSC yang dapat terjadi dua arah turunan seperti dibahas dalam bab 2 sebelumnya.

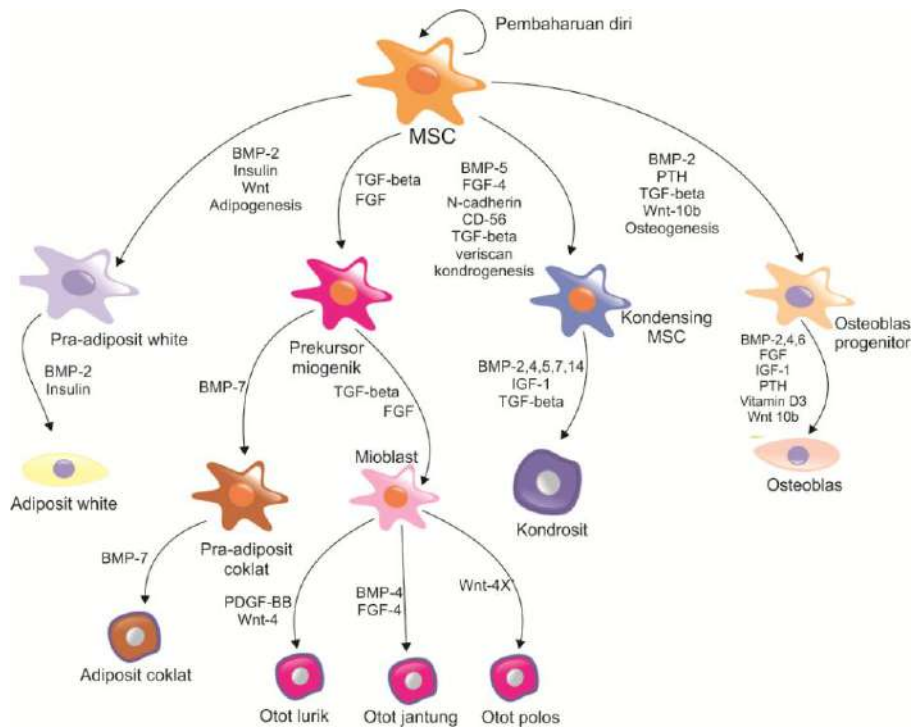
#### **6.3 MSC sebagai sel parakrin : *small molecule GF***

Karakteristik "*paracrine effect*", yaitu sel yang persepsikan mampu mengeluarkan efek biologik dengan melepaskan berbagai

faktor yang dapat menstimulasi jaringan, terutama :

1. Stimulasi sel punca
2. Imunosupresi
3. Supresi apoptosis
4. *Remodelling* matrik ekstraseluler
5. Angiogenesis

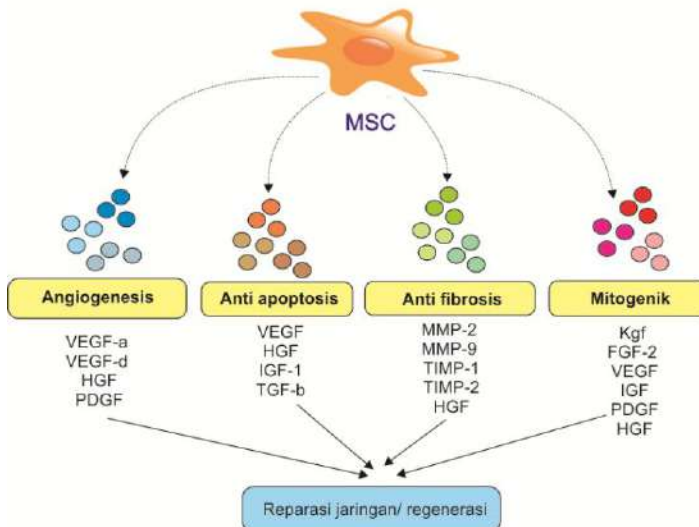
## 7. Molekuler MSC dalam diferensiasi



Gambar 100. Molekuler MSC dalam berdiferensiasi

## 8. Konsep evolusi MSC: *small molecule GF*

Berbagai laporan penelitian terkini melaporkan bahwa keberadaan *small molecule* yang diinduksi dari MSC pada kondisi tertentu memunculkan pergeseran baru dalam studi MSC. Penelitian MSC sebagai faktor sitokin membuka cakrawala baru dalam bidang sel punca terutama dalam hal mekanisme molekuler yang dilepas MSC sebagai respon terhadap jaringan cedera.



Gambar 101. *Small molecule GF* MSC

### 8.1 Dasar konsep *small molecule GF* MSC

Secara spesifik kelahiran konsep *small molecule GF* MSC didasarkan atas :

1. Kompleksitas teknik isolasi MSC

Sebagaimana diketahui teknik dan metode dalam mengisolasi MSC membutuhkan kerja yang kompleks disamping kerja aseptis serta waktu kultur selama beberapa minggu agar mendapatkan turunan MSC yang homogen dengan potensi *stemness* tinggi, terutama kemampuan multi-diferensiasi menjadi berbagai sel jaringan spesifik. Berbagai faktor harus dikendalikan untuk mencapai hasil optimum.

Hal ini juga pengalaman penulis rasakan ketika bekerja mengisolasi MSC, dimana banyak faktor yang ikut menentukan hasil akhir isolasi.

2. Waktu paruh kehidupan MSC yang singkat

Berbagai hasil penelitian melaporkan bahwa waktu paruh kehidupan MSC ketika berintegrasi dalam jaringan cedera pasca transplantasi adalah singkat, sehingga kemungkinan MSC melakukan fungsi immunosupresi dan regenerasi tidak optimal. Berbagai faktor internal yang terjadi, jaringan cedera ikut mempengaruhi waktu paruh kehidupan MSC.

3. Konsep molekul parakrin MSC dalam regenerasi

Laporan penelitian terkini mengungkapkan bahwa sebagian besar MSC yang diberikan lewat intravenous akan terjebak dalam paru sebagai *small emboli* (namun tetap aman tidak menimbulkan oklusi vaskuler). Sekalipun demikian, MSC yang terjebak tersebut tetap melepas berbagai molekul pro-regenerasi sebagai respon terhadap stimulasi molekul SDF-1 yang dilepas jaringan cedera, disamping molekul pro-inflamatori lain (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  dan IL-1). Hal ini memunculkan bahwa *small molecule* yang dilepas MSC secara parakrin merupakan faktor utama dalam regenerasi jaringan.

## **8.2 Induksi *small molecule* GF MSC**

Begitu pentingnya peranan *small molecule* GF MSC ini, sehingga memunculkan berbagai upaya dalam menghasilkan *small molecule* ini secara in-vitro. Hal yang sama penulis lakukan dan telah dipublikasi dalam beberapa jurnal. Secara spesifik induksi *small molecule* GF MSC dapat dibagi menjadi 2 :

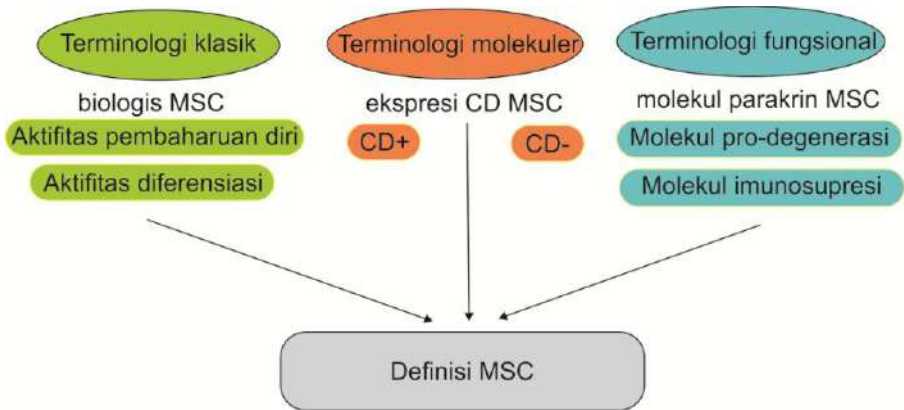
1. Induksi MSC dengan stimulasi molekul pro-inflamasi

Secara teoritis MSC yang diaktivasi sebelumnya oleh TNF $\alpha$  akan melepas berbagai molekul anti-inflamasi, seperti penulis telah bahas dalam bab sebelumnya.

2. Induksi MSC dengan teknik hipoksia

MSC yang diinkubasi dalam keadaan hipoksia akan melepas berbagai molekul pro-regenerasi. Hal ini memunculkan teori *hypoxic-*





Gambar 103. Terminologi MSC

## 9.1 Terminologi klasik MSC

Terminologi klasik MSC merupakan definisi minimal MSC yang didasarkan atas gambaran morfologi MSC terhadap :

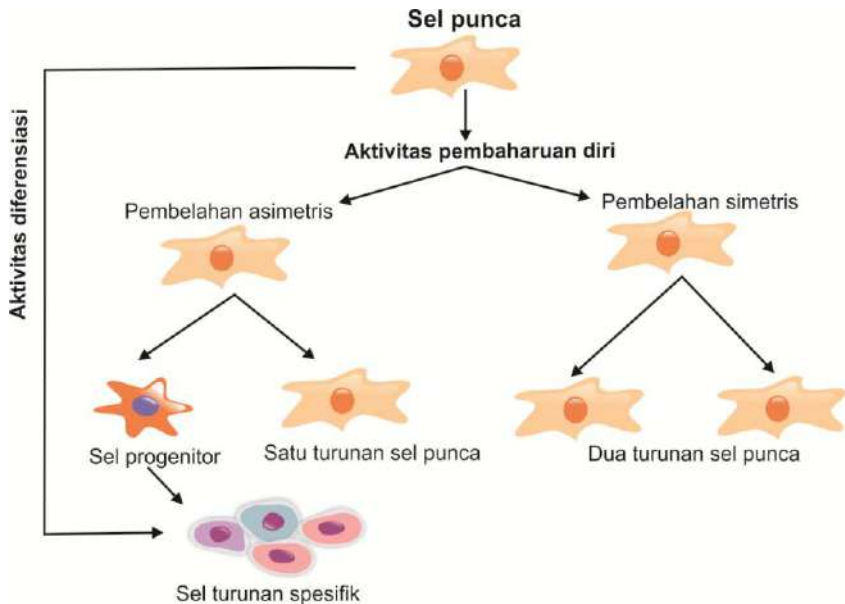
1. Aktivitas pembaharuan diri

MSC digambarkan sebagai sel yang mampu menghasilkan turunan sel yang identik dengan induk baik melalui pembelahan simetris dan atau asimetris.

2. Potensi berdiferensiasi

Potensi diferensiasi menunjukkan kemampuan MSC dalam menghasilkan berbagai turunan sel yang spesifik.

Terminologi klasik MSC dijelaskan pada gambar dibawah ini.



Gambar 104. Terminologi klasik MSC

Terminologi klasik menggambarkan kemampuan sel punca dalam aktivitas pembaharuan diri dan potensi diferensiasi. Pembaharuan diri melalui pembelahan simetris dan asimetris, sedangkan diferensiasi menghasilkan berbagai turunan sel yang lebih spesifik.

## 9.2 Terminologi molekuler MSC

Terminologi molekuler MSC didasarkan atas kemampuan MSC dalam hal :

1. MSC mampu mengekspresikan marker molekuler
  - 1) CD105 (+)
  - 2) CD 90 (+)
  - 3) CD 73 (+)
2. Tidak mengekspresikan marker hematopoietik, yaitu :
  - 1) CD45 (-)
  - 2) CD19 (-)
  - 3) CD79a (-)

- 4) CD14 (-)
- 5) CD11b (-)
- 6) HLA-DR (-)
- 7) HLA Class II antigen.

### 9.3 Terminologi fungsional MSC

Terminologi fungsional MSC didasarkan atas kemampuannya dalam mensekresi berbagai *soluble molecule* secara parakrin. Konsep parakrin adalah komunikasi MSC dengan sel matriks sekitarnya melalui molekul sinyal tertentu yang dilepas MSC. Secara spesifik *soluble molecule* dan ligan yang lepas MSC berupa:

1. Molekul anti-inflamasi:

MSC paska terpapar molekul inflamasi poten seperti  $TNF\alpha$ , IL-1 dan  $IFN\gamma$ , maka akan melepas berbagai molekul anti-inflamasi :

- 1) IL-10
- 2)  $TGF\beta$
- 3) IL-1ra
- 4) TSG6
- 5) PGE2

2. Molekul pro-regenerasi :

MSC melepas berbagai molekul pro-regenerasi sebagai respon inflamasi terhadap inflamasi yang telah terkendali, maka akan melepas berbagai molekul pro-regenerasi :

- 1) VEGF
- 2) PDGF
- 3) IGF
- 4) FGF-2
- 5) Ang-1

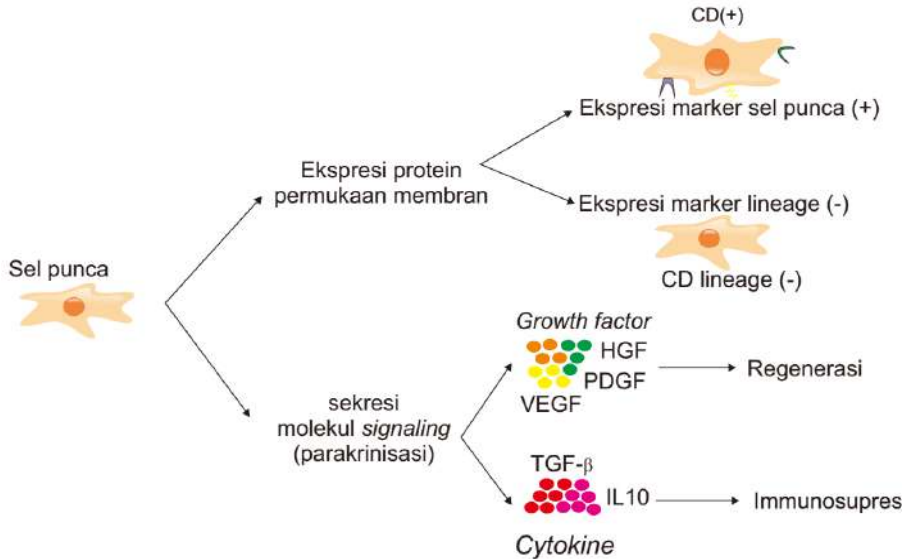
3. Molekul/ ligan kemoatraksi

Sel punca mampu mendeteksi berbagai molekul kemoatraksi seperti HGF dan SDF-1 melalui reseptor CXCR-3, sehingga terjadi homing, molekul tersebut diantaranya :

- 1) HGF

2) CXCR3-R

Terminologi fungsional sel punca dijelaskan pada gambar dibawah ini.



Gambar 105. Terminologi fungsional MSC

Sel punca mengeskpresikan berbagai CD tertentu dan atau marker diferensiasi *lineage*(-) serta mensekresi berbagai *soluble molecule* baik VEGF, HGF dan PDGF maupun TGF-β, IL-1ra, PGE3, TSG6 dan IL-10 secara parakrin

## 10. Sumber sel punca

Hasil penelitian melaporkan bahwa berbagai jaringan stromal dewasa yang mengandung MSC, namun dalam jumlah sedikit adalah sebagai berikut:

1. Matriks (*wharton jelly*) dan *umbilical cord blood*
2. Sumsum tulang
3. Jaringan adiposa
4. Jaringan otot
5. Jaringan plasenta
6. Cairan amnion,
7. Membran sinovial

8. Jaringan dental pulp
9. Jaringan liver
10. Jaringan paru

Sumber MSC yang beraneka ragam menyebabkan potensi *stemness* MSC juga bervariasi, meskipun demikian MSC asal jaringan *umbilical cord* memiliki potensi *stemness* jauh lebih kuat dibandingkan lainnya. Hal ini disebabkan karena MSC *umbilical cord* masih memiliki karakter pluripotent, sehingga kemampuan diferensiasi lebih luas dibandingkan MSC asal jaringan stromal lain.

## 11. MSC dalam regenerasi dan restorasi

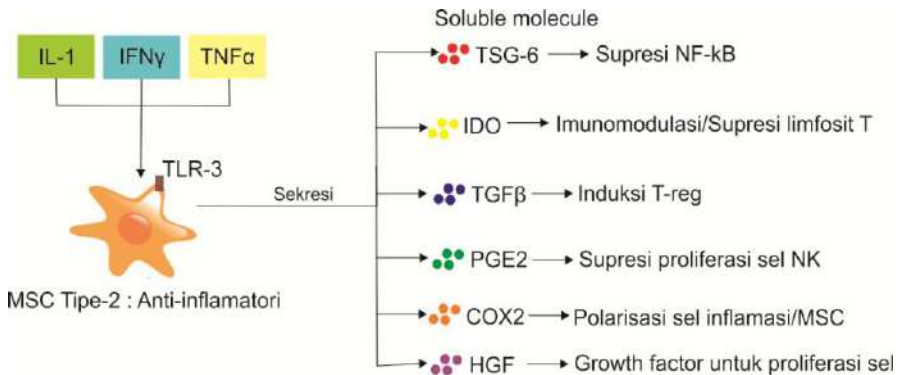
Kemampuan berdiferensiasi menjadi berbagai sel jaringan membuat MSC menarik secara klinik. Berbagai jurnal penelitian melaporkan MSC terlibat kuat dalam restorasi dan regenerasi berbagai kerusakan dan atau degenerasi jaringan, diantaranya adalah:

1. Neurodegeneratif:
  - a. Penyakit stroke
  - b. Parkinson,
  - c. Alzheimer
  - d. Huntington
2. Lesi kardiovaskuler:
  - a. Miokard infark
  - b. Periphera vaskuler iskemia
3. Disfungsi dan disuffisiensi hormonal
  - a. Diabetes melitus
4. Imun sistem:
  - a. Autoimmune
5. Muskuloskeletal
  - a. Fraktur
  - b. Osteoporosis
  - c. Osteartosis
  - d. Sendi

6. kulit, kornea.

## 12. Imunoregulasi MSC

Kemampuan MSC dalam menghindarkan diri dari deteksi sistem imunitas tubuh pada awalnya cukup membingungkan diantara para ilmuwan imunologis. Regulasi imunologis menerangkan bahwa setiap sel allogenik yang memasuki tubuh akan dilakukan delesi oleh respon imun host, oleh karena itu harus dilakukan proses mismatch secara ketat sebelumnya. Sekalipun demikian MSC melawan semua aturan ini. MSC mampu lolos dari sergapan sistem imun host (deteksi alloantigen). Imunoregulasi MSC dijelaskan pada gambar dibawah ini.



Gambar 106. Imunoregulasi MSC

### 12.1 Sistem imunitas deteksi MSC (allorejeksi)

Keterbatasan utama dalam graft organ solid adalah akibat pengenalan dini sel T terhadap antigen (alloantigen) resipien yang masuk ke dalam tubuh. Deteksi dini ini dilakukan sel T melalui keberadaan molekul antigen MHC/ HLA. Secara teoritis hal ini dimediasi melalui 2 mekanisme molekuler, yaitu :

#### 1. Pengenalan langsung

Pengenalan langsung alloantigen secara langsung ini melibatkan sel T, baik CD4 $^{+}$  atau CD8 $^{+}$  host dengan mengenali langsung keberadaan molekul MHC *class I* dan *class II* MSC.

## 2. Pengenalan tidak langsung

Mekanisme pengenalan tidak langsung melibatkan proses sel APC seperti sel dendritik. Keberadaan sel dendritik sentral karena mampu mengenali dini peptide dari jaringan allogenic untuk kemudian dipresentasikan pada sel T *naive* melalui molekul MHC.

Dengan demikian setiap benda asing yang masuk tubuh maka semua akan mengalami hal yang sama yaitu proses allorejeksi, kecuali pada *fetal allograft*. Jaringan fetal ini mampu menghindari rejeksi dari sang ibu melalui proses yang kompleks.

### **12.2 MSC meloloskan diri**

MSCs mampu menghindari sistem imun karena MSC tidak mengekspresikan antigen HLA class II pada permukaan sel sehingga sulit/ tidak dikenali oleh sel APC. MSC relatif aman terhadap potensi rejeksi sel imun tubuh, ketika dilakukan transplantasi. MSC *allogenic* berpotensi menjadi salah satu terapi seluler efektif dalam meregulasi kekacauan/ penyakit sistem imun pada model tikus *multiple sclerosis*, *inflammatory bowel disease* dan diabetes tipe I.

### **12.3 MSC supresi sel dendritik**

MSC mensupresi sel dendritik dengan cara :

#### 1. Menghambat maturasi (diferensiasi) monosit

MSC secara spesifik menginhibisi maturasi monosit menjadi sel dendritik matur sehingga sel dendritik matur tidak terbentuk, berakibat pelepasan mediator inflamasi mereda. Dendritik matur merupakan produsen utama mediator inflamasi poten ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$ ).

#### 2. Mendorong sel dendritik matur menjadi imatur

MSC mampu mendorong sel dendritik matur menjadi imatur melalui pelepasan IL-10. Sel dendritik imatur rentan terhadap lisis yang dilakukan sel NK aktif.

### **12.4 MSC tipe-2 supresi sel limfosit**

MSC mampu mensupresi sel limfosit T dan sel B melalui pelepasan iNOS (tikus) atau iDO (manusia) paska terpapar sitokin  $\text{TNF}\alpha$  dan  $\text{IFN}\gamma$  dalam jumlah besar. Inflamasi menyebabkan sel T

limfosit teraktifasi, menghasilkan sitokin pro-inflamatori MSC, sehingga MSC terpolarisasi menjadi MSC tipe-2.

Secara spesifik MSC tipe-2 mensupresi sel limfosit melalui :

1. MSC menurunkan proliferasi sel limfosit T

Hal ini berperan penting dalam mengontrol penyakit GVHD yang terjadi paska transplantasi sumsum tulang.

2. MSC mensupresi sel limfosit T CD4+

MSC mensupresi sel limfosit CD4+ secara langsung melalui pelepasan berbagai molekul, yaitu :

- 1) PGE2
- 2) IDO
- 3) TGF- $\beta$ 1
- 4) HGF
- 5) iNOS
- 6) HO1

3. MSC mensupresi sel limfosit T CD8+

MSC menghambat sel sitotoksik limfosit T CD8+ secara langsung melalui pelepasan molekul : sHLA-G5.

4. MSC supresi fungsi sel B

MSC menghambat fungsi sel B yang tergantung pada *soluble factor* dan *cell contact*.

5. MSC menghambat apoptosis sel T

6. MSC mendorong pergeseran sel T menjadi TH2

Proliferasi sel T yang menurun paska inhibisi MSC tipe-2 menyebabkan sekresi IFN $\gamma$  menurun, sehingga menyebabkan peningkatan produksi IL-4 oleh sel TH2 (anti-inflamasi). Pergeseran status pro-inflamasi (dimotori IFN $\gamma$ ) menjadi status anti-inflamasi melalui IL-4.

## **12.5 MSC supresi sel leukosit**

MSC tidak mempengaruhi kemampuan sel neutrofil dalam hal fagositosis, ekspresi molekul adhesi dan kemotaksis. Secara spesifik peranan MSC terhadap leukosit sel neutrofil adalah :

1. MSC memperkecil efek *respiratory burst* neutrofil.

*Respiratory burst* melepas ROS secara cepat. ROS berperan penting dalam mendegradasi partikel (mikroba) yang telah difagosit sel makrofag. Sisi lain *respiratory burst* memicu proses inflamasi dan apoptosis MSC memperlemah efek *respiratory burst*, sehingga inflamasi mereda, namun kemampuan fagositosis, ekspresi molekul adhesi dan kemotaksis sel leukosit tidak dipengaruhi.

2. MSC menunda program apoptosis sel neutrofil.

MSC menghambat program apoptosis dengan cara melepas dependent IL-6.

3. MSC ikut terlibat eliminasi mikroba bersama dengan leukosit.

MSC terlibat dalam mengeliminasi mikroba bersama dengan leukosit dengan cara meningkatkan reseptor CXCR3-R MSC

## **12.6 MSC supresi sel NK**

Sel natural killer (NK) adalah sel efektor utama imun innate dalam mengeliminasi berbagai virus, mikroba dan sel tumor melalui pelepasan granzim B yang dimediasi sel limfosit sitotoksik, dikenal sebagai *NK-mediated target cell lysis*. NK juga memproduksi sitokin pro-inflamasi. Kemampuan NK dalam memusnahkan sel target tergantung pada kadar molekul MHC kelas I yang diekspresikan sel target. MSC tidak mengekspresikan MHC kelas I, sehingga MHC tidak dikenali sebagai program lisis sel NK, baik MSC autologus maupun allogenik. Sel NK aktif akan mengikat ligan MSC pada reseptor permukaan sel NK sehingga dapat mengeliminasi keberadaan MSC.

Secara spesifik peran MSC dalam supresi NK melalui :

1. MSC menghambat proliferasi sel NK

MSC menghambat proliferasi sel NK dengan melepas molekul :

- 1) Prostaglandin E2 (PGE2)
- 2) Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)
- 3) sHLA-G5 (soluble HLA-G5)

2. MSC menghambat aktivitas sitotoksitas sel NK *resting*

MSC menghambat aktivitas sitotoksitas NK sel *resting* dengan menurunkan regulasi terhadap ekspresi protein NKp30 dan NK group2, anggota D (NKG2D). Protein tersebut berperan sebagai aktivator reseptor target pemusnahan.

### **13. Konsep homing MSC**

Homing MSC sirkuler menuju area inflamasi/ cedera merupakan hasil interaksi dan integrasi reseptor MSC dengan berbagai molekul sitokin/ kemokin atau *soluble molecule* yang dilepas sel radang aktif, terutama sel neutrofil dan makrofag serta jaringan rusak.

#### **13.1 Pengertian homing MSC**

Homing MSC adalah migrasi MSC menuju area inflamasi/ cedera akibat stimulasi molekul kemoatraksi yang dilepas oleh jaringan rusak atau oleh sel radang.

#### **13.2 Molekul kemoatraksi MSC**

1. TNF $\alpha$

TNF $\alpha$  merupakan mediator pro-inflamatori poten yang dilepas sel dendritik dan makrofag aktif yang dapat menarik radang, termasuk MSC sirkuler untuk migrasi menuju area cedera/ inflamasi, disamping sebagai pengaktivasi.

2. IFN $\gamma$

IFN $\gamma$  merupakan mediator pro-inflamatori poten yang dilepas sel dendritik, yang dapat menarik migrasi sel radang termasuk MSC sirkuler menuju area cedera, disamping sebagai pengaktivasi.

3. SDF-1

SDF-1 merupakan molekul kemokin yang dilepas jaringan rusak dengan fungsi sebagai pemandu arah bagi sel MSC dalam menuju area inflamasi/ cedera sehingga SDF-1 berperan sebagai co-lokalisasi bagi reseptor CXCR3-R MSC.

### **13.3 Reseptor MSC**

MSC mendeteksi keberadaan molekul kemoatraksi dan bergerak migrasi menuju area inflamasi dengan cara :

1. MSC mengekspresikan reseptor TLR-3

TLR-3 adalah reseptor yang diekspresikan oleh berbagai sel radang, termasuk MSC. Reseptor TLR-3 berperan penting dalam mendeteksi keberadaan molekul kemoatraksi dan mempromosikan MSC migrasi keluar sirkulasi, homing menuju area cedera/ inflamasi. Sisi lain pengikatan reseptor TLR-3/MSK dengan sitokin pro-inflamatori juga menyebabkan polarisasi MSC dari tipe-1 menjadi tipe-2 yang bersifat immunosupresif, sehingga mampu mensekresi molekul aktif anti-inflamasi terutama IL-1ra, PGE3, TGF $\beta$  dan TSG6, disamping molekul proliferasi VEGF, PDGF dan HGF.

2. Reseptor CXCR3-R

CXCR3-R merupakan reseptor yang diekspresikan berbagai sel radang, termasuk MSC secara kuat dengan fungsi mendeteksi keberadaan molekul kemokin SDF-1 yang dilepaskan oleh jaringan rusak, MSC yang mengekspresikan reseptor CXCR3-R secara kuat yang akan mendeteksi dan mengikat SDF-1, sehingga merupakan co-lokalisasi bagi MSC untuk bergerak menuju area inflamasi.

## **14. Fusi MSC dalam reparasi dan regenerasi**

Fusi sel merupakan salah satu konsep MSC dalam reparasi dan regenerasi jaringan. Secara teoritis berbagai jaringan tertentu memiliki kemampuan untuk meregenerasi diri paska terjadi cedera seperti hati, otot, tulang dan tulang rawan. Regenerasi ini terjadi dengan melibatkan proliferasi dan diferensiasi sel punca, termasuk MSC/ progenitor endogenous yang berada jaringan cedera atau berasal dari migrasi sumsum tulang sebagai respon terhadap sinyal cedera/ stres.

Sekalipun demikian konsep regenerasi ini tidak menjelaskan bagaimana sel punca atau progenitor pindah ke lokasi optimal dalam

tubuh yang terbentuk selama perkembangan. Kami percaya bahwa pertanyaan ini dapat dijawab jika sel punca menyatu dengan sel parenkim yang sudah diposisikan dengan benar. Sel yang menyatu selanjutnya dapat membesar atau membelah, tetapi dalam kedua kasus sel yang sehat memberikan arah atau orientasi yang diperlukan untuk mengembalikan fungsi jaringan.

## **Daftar pustaka**

1. Wang X, Nakamoto T, Dulińska-Molak I, Kawazoe N, Chen G. Regulating the stemness of mesenchymal stem cells by tuning micropattern features. *J Mater Chem B*. 2016;4(1):37–45.
2. Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal [Internet]*. BioMed Central Ltd; 2011;9(1):12.
3. Kim N, Cho SG. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Korean J Intern Med [Internet]*. BioMed Central Ltd; 2013;28(4):387–402.
4. P. De Miguel M, Fuentes-Julian S, Blazquez-Martinez A, Y. Pascual C, A. Aller M, Arias J, et al. Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stem Cells: Advances and Applications. *Curr Mol Med [Internet]*. 2012;12(5):574–91.
5. Putra A, Hutagalung A, Hasanah IH, Trisnadi S, Djannah D, et al. PeranInduksi TNF- $\alpha$  Serial Doses dalamPeningkatan VEGF dan PDGFMesenchymal Stem Cells. 2018. *MKB*. 50(2):67–73.
6. Putra A, Antari AD, Kustiyah AR, Intan YSN, Sadyah NAC, et al. (2018). Mesenchymal stem cells accelerate liver regeneration in acute liver failure animal model. *Biomedical Research and Therapy*, 5(11), 2802-2810.
7. Putra A, Ridwan FB, Putridewi AI, et al. The Role of TNF- $\alpha$  induced MSCs on Suppressive Inflammation by Increasing TGF- $\beta$  and IL-10. *Open Access Maced J Med Sci*. 2018;6(10):1779-1783.

# **BAB IX**

## **HEMATOPOIETIK STEM CELL**

### **Tujuan**

---

Setelah membaca bagian ini, diharapkan pembaca dapat memahami definisi HSC, kompleksitas marker HSC, fisiologis dinamis hematopoiesis, perkembangan maturasi HSC, ontogenis HSC, karakterisasi HSC berdasarkan uji CFU, HSC dalam aplikasi klinis dan sirkuit molekuler diferensiasi HSC.

*Hematopoietic stem cells (HSCs) menghasilkan berbagai darah dan turunan sel imun. HSC memiliki potensi migrasi ke area cidera (inflamasi). HSC merupakan sel langka yang memiliki karakteristik perbaharuan diri dan multipoten yang dapat menghasilkan seluruh sistem hematopoetik. HSC diidentifikasi berdasarkan tahapan perkembangan embrionik yang telah ditentukan dan beberapa subset telah dikarakterisasi dalam hematopoiesis jaringan dewasa.*

*Catatan penulis*

## **1. Latar belakang**

HSC adalah arsitek difinitif hematopoiesis, yang berfungsi sebagai produsen sel darah secara terus menerus selama kehidupan suatu organisme. Setiap HSC diprogram untuk memproduksi berbagai komponen sel darah secara efisien, sehingga memungkinkan sel darah merah mengangkut oksigen, *megakaryocytes* dan turunan trombosit berinteraksi dengan vaskuler yang cidera serta sel sistem imun dalam memproteksi serangan mikroba. Kemunculan HSC pertama kali pada proses hematopoiesis tahapan embrio diidentifikasi di area *aorto-gonado-mesonephros*, yang kemudian bergeser ke organ hati janin dan berlanjut ke sumsum tulang seiring dengan waktu.

Pencarian marker spesifik sel punca menjadi intens sejak HSC pertama kali berhasil diidentifikasi. Hal didasarkan atas asumsi mendasar bahwa setiap sel memiliki marker tertentu yang dapat diidentifikasi termasuk sel darah, dikenal sebagai *cluster of differentiation* (CD). Sebagian besar marker sel hematopoietik adalah CD45 positif. Studi HSC telah dimulai sejak tahun 1960 yaitu dalam menganalisis diferensiasi HSC menjadi sel progenitor baik pada uji koloni in-vitro dan uji transplantasi HSC/ progenitor terhadap hewan coba dengan myeloablastik. Studi terkini juga memungkinkan untuk menganalisis lebih lanjut keberadaan HSC dan turunanya secara in-

situ, baik dalam menganalisis fisiologi hematopoiesis maupun rekonstitusi sistem hematopoetik.

## **2. *Hematopoietic stem cell***

Sel darah matur memiliki rentang masa kehidupan singkat dan oleh karena itu harus direstorasi secara terus menerus. Hal ini dilakukan oleh sekelompok kecil sel yang memiliki kemampuan perbaharui diri dan diferensiasi, dikenal sebagai *hematopoietic stem cell* (HSC). Kemampuan diferensiasi HSC di bawah MSC dimungkinkan karena HSC tidak mampu membentuk kelompok sel non hematopoietik seperti halnya MSC.

### **2.1 *Pengertian hematopoietik stem cell***

*Hematopoietik stem cell* (HSC) adalah sel punca dewasa yang berasal dari sistem hematopoetik (sumsum tulang) yang mengekspresikan *marker* CD34+, CD133+, Thy1+ dan tidak mengekspresikan *marker* CD38-, CD33-. HSC mampu berdiferensiasi secara aktif dengan membentuk seluruh komponen darah (multipoten), disamping memperbaharui diri. HSC juga memiliki kemampuan memasuki fase dormansi yaitu fase G0 siklus sel dimana tidak terjadi aktivitas pembelahan. Sekalipun demikian sel yang dalam fase G0 ini tetap dibutuhkan terutama ketika terjadi cedera jaringan.

### **2.2 *Sumber HSC***

HSC sebagian besar berasal dari sumsum tulang, sehingga sulit ditemukan dalam pembuluh darah perifer pada keadaan normal. Oleh karenanya untuk menginduksi HSC migrasi ke pembuluh darah perifer, maka dibutuhkan stimulasi dengan pemberian sitokin tertentu. Secara spesifik upaya stimulasi dan induksi HSC dilakukan dengan pemberian *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF) atau agen sitotoksik (penekan sumsum tulang *myelo-suppressive*). Agen sitotoksik dapat mengganggu interaksi antara sel hematopoietik dengan

sel stromal sumsum tulang, sehingga dapat memicu mobilisasi sejumlah besar sel progenitor dan HSC kedalam sirkulasi.

### **3. Kompleksitas *marker* HSC**

HSC memiliki berbagai macam *marker* yang berfungsi sebagai molekul integrasi intrinsik dan sinyal dalam aktivitas jalur transduksi. Sekalipun demikian secara konvensional *marker* HSC adalah CD34+/ CD133+/ Thy1+/ CD38-/ CD33-, namun *marker* konvensional ini dapat disederhanakan menjadi CD34+/CD38-. Menggunakan *marker* lebih banyak digunakan karena lebih praktis. Secara sistematis *marker* HSC dibagi menjadi :

1. *Marker* konvensional HSC
2. *Marker* kompleks HSC

#### **3.1 Marker konvensional HSC**

Secara sistematis *marker* konvensional HSC dibagi menjadi 3 macam, yaitu:

1. CD34+

CD34+ adalah protein transmembran *sialomucin* yang diekspresikan HSC dengan fungsi sebagai molekul adhesi. Protein CD34+ juga diekspresikan oleh sel endotelial nodus limfatikus yang akan dikat ligan *selectin* sel T ketika memasuki nodus limfatikus.

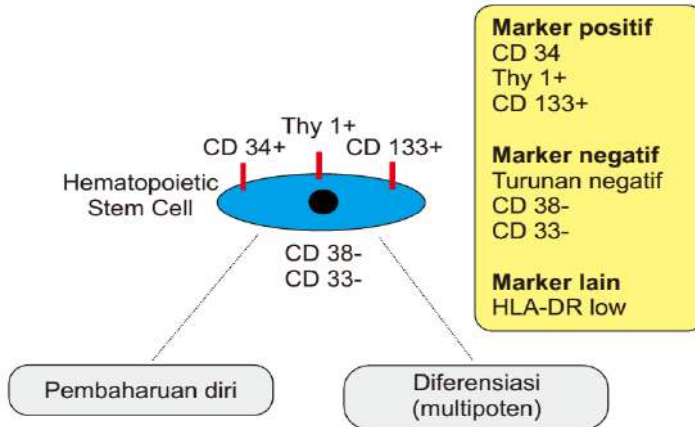
2. CD133+

CD133+ atau dikenal sebagai prominin 1 adalah glikoprotein yang diekspresikan oleh sel HSC, progenitor dan endotel yang berperan untuk melokalisasi seluler.

3. Thy1+

Thy1+ atau dikenal juga sebagai CD90+ adalah glikoprotein yang diekspresikan oleh HSC, *thymocytes* (pre-cursor sel T), MSC, NK, neuron dan endotelium dengan peranan sebagai molekul komunikasi/ interaksi antar sel dan sel ke matrik.

Marker konvensional HSC dijelaskan pada gambar dibawah ini.



Gambar 107. Marker HSC

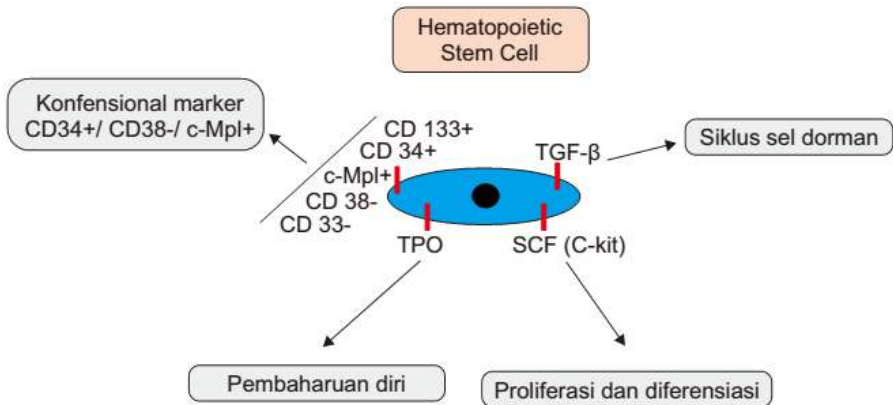
HSC mengekspresikan *marker* CD34+, CD133+, Thy1+, namun tidak mengekspresikan marker CD38-, CD33-. HSC memiliki kemampuan aktif berdiferensiasi membentuk seluruh komponen darah, disamping memelihara diri.

### 3.2 Marker kompleks molekul HSC

Secara sistematis marker kompleks HSC dibagi menjadi 4 macam, yaitu:

1. CD34+/CD38-/c-Mpl+  
*Marker* ini berfungsi sebagai penanda fisik seluler
2. *Trombopoietin* (TPO)  
*Marker* ini berfungsi sebagai aktivitas pembaharuan diri,
3. SCF  
*Marker* ini berfungsi sebagai aktivitas proliferasi dan diferensiasi
4. TGF- $\beta$   
*Marker* ini berfungsi sebagai siklus sel dorman.

Marker kompleksitas molekuler HSC dijelaskan pada gambar di bawah ini.



Gambar 108. Marker kompleksitas molekuler HSC mengekspresikan CD34+/ CD38-/ c-Mpl+ sebagai *marker* konvensional, TPO sebagai *marker* pembaharuan diri, SCF sebagai *marker* proliferasi dan diferensiasi dan TGF-β sebagai *marker* yang berfungsi sebagai siklus sel dorman.

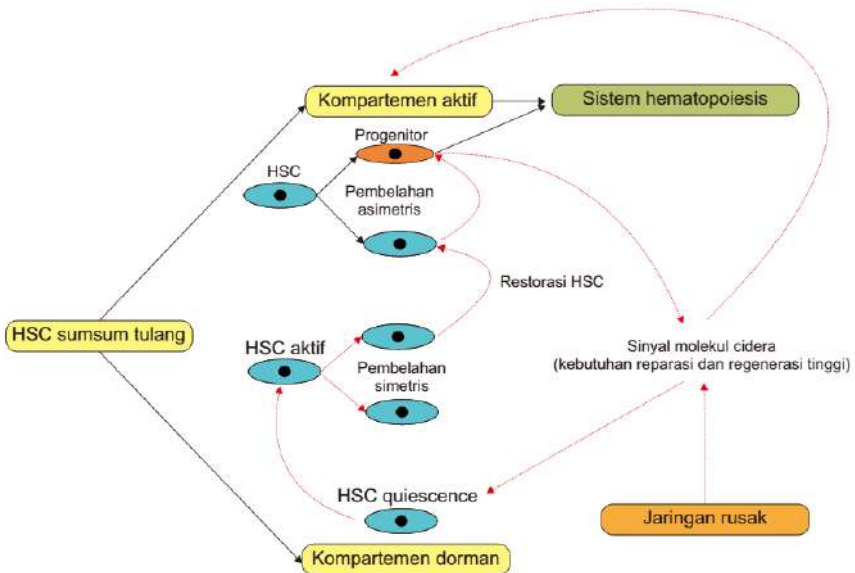
*Marker* molekuler HSC yang berperan kuat adalah SCF dan TPO. Kedua protein *marker* ini berfungsi sebagai regulator sitokin. Secara spesifik SCF berperan dalam promosi dan diferensiasi sel progenitor hematopoietik, sedangkan TPO berperan dalam pembaharuan diri. Sisi lain sitokin TPO dan reseptornya yaitu c-Mpl berperan dalam hematopoiesis awal HSC, sehingga sel dengan *marker* CD34+/CD38-/c-Mpl+ memiliki aktifitas *engraftment* HSC yang jauh lebih baik. Sinyal yang berasal dari angiopoietin-1 melalui Tie2 mengatur dormansi HSC dengan cara mempromosikan adhesi HSC ke osteoblas sumsum tulang dan mempertahankan aktivitas repopulasi jangka panjang.

#### 4. Fisiologis dinamis hematopoiesis.

Aktivitas HSC in-vivo dapat dikarakteristik melalui perilaku proliferasi. HSC memiliki laju pembelahan yang lebih lambat

dibandingkan sel progitor turunan. Laju pembelahan HSC yang lambat dalam melewati siklus sel, dapat dinilai melalui status G0 atau status *quiescence*. Status G0 terkait dengan status sel yang keluar dari siklus sel (menjadi dorman), namun masih reversibel. Keadaan ini dapat dibedakan dengan status sel yang tertahan pada fase G1 secara ireversibel yang dikenal sebagai *senescence*.

Peranan sel punca, termasuk HSC didukung pada analisis jaringan dengan tingkat pergantian sel tinggi, seperti sel usus dan folikel rambut. Jaringan ini memiliki sel punca dengan tingkat proliferasi tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa HSC mengandung kompartemen aktif yang dapat mengarahkan proses hematopoiesis menuju keadaan stabil dan kompartemen dorman yang berperan sebagai cadangan dalam mempertahankan status pembaharuan diri sel punca jangka panjang. Sekalipun demikian status dorman HSC mampu merespon terhadap stres. Aktivitas proliferasi HSC tidak identik dengan aktivitas pembelahan asimetris yang mengharuskan bahwa aktivasi HSC berkorelasi dengan diferensiasi. Pembelahan HSC berupa aktivitas pembaharuan diri dalam rangka pergantian HSC yang hilang akibat diferensiasi (ketika terjadi cedera jaringan).



Gambar 109. HSC sumsum tulang.

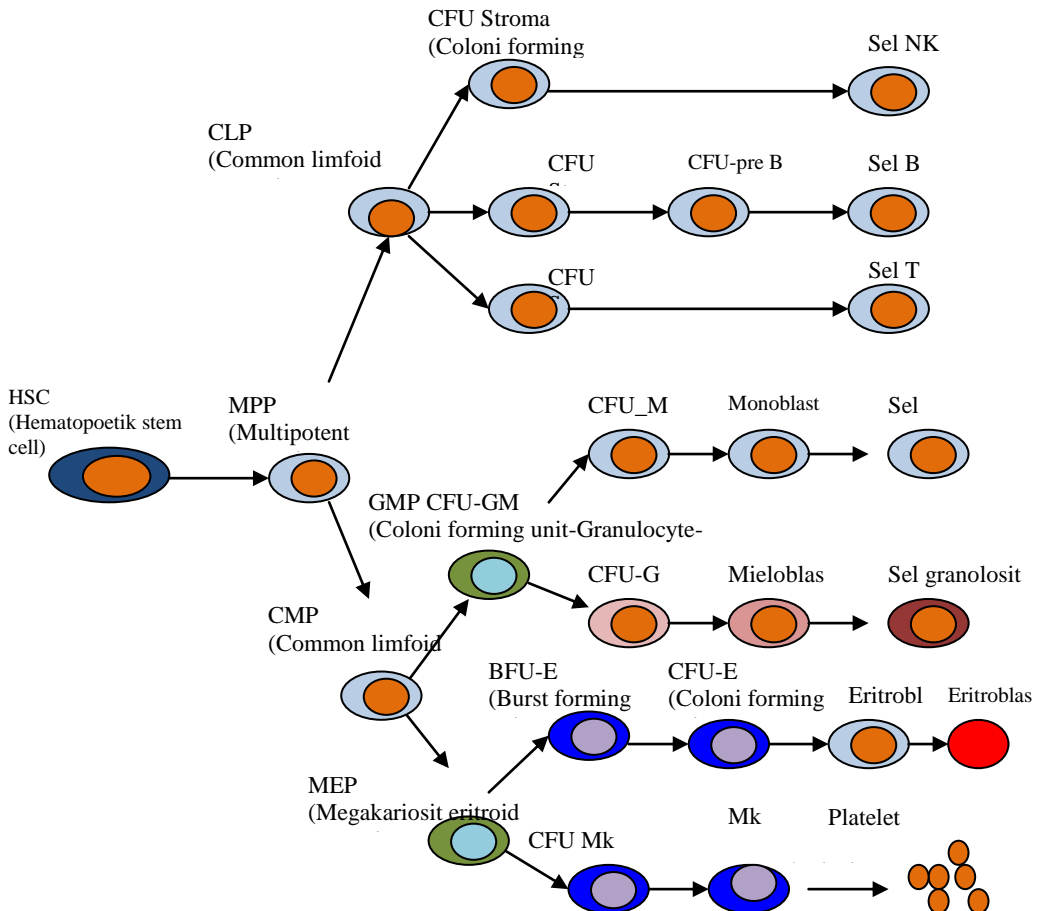
Jaringan rusak mengeluarkan molekul sinyal cedera yang menunjukkan akan kebutuhan reparasi dan regenerasi jaringan tinggi. Sinyal injuri memicu HSC *senescence* kompartemen dorman aktif sehingga membelah secara simetris untuk merestorasi HSC kompartemen aktif yang telah terlebih dahulu membelah secara asimetris untuk memenuhi kebutuhan regenerasi jaringan yang rusak, disamping tetap mempertahankan sistem hematopoiesis.

## 5. Perkembangan maturasi HSC

HSC secara terus menerus melakukan proliferasi dan diferensiasi menjadi turunan sel bentuk dewasa. Selama proses diferensiasi ini, turunan HSC mengalami berbagai perubahan sesuai dengan tahapan maturasi, mulai dengan menjadi *multi-potential progenitors* (MPP), kemudian progenitor yang telah berkomitmen pada turunan tertentu (*lineage-committed progenitors*) hingga akhirnya mencapai maturasi menjadi sel spesifik, apakah monosit, eritrosit limfosit dan sebagainya.

## 5.1 Hematopoiesis

Hematopoiesis proses produksi darah secara terus-menerus oleh HSC sepanjang siklus kehidupan dengan tujuan mempertahankan fungsi normalitas sistem imun dan hemostatis. Secara anatomis hemostatis terjadi terutama pada sumsum tulang, baik pada pelvis, sternum, colum vertebrae maupun tengkorak. Proses molekuler hematopoiesis dijelaskan pada gambar dibawah ini.



Gambar 110. Hierarki HSC

LT-HSC

: long term-hemapoietic stem cell,

ST-HSC

: short-term hematopoietic stem cell

MPP	: multipotential progenitor
CLP	: common lymphoid progenitor
CMF	: common myeloid progenitor
CFU-GEMM	: colony-forming unit-granulocyte/ erythrocyte/ macrophage/ megakaryocyte
BFU-E	: burst-forming unit-erythroid
CFU-E	: colony-forming unit-erythroid
CFU-Mk	: colony-forming unit-megakaryocyte
CFU-GM	: colony-forming unit-granulocyte/Macrophage
CFU-G	: colony-forming unit-granulocyte
CFU-M	: colony-forming unit-macrophage

## 6. Ontogeni HSC

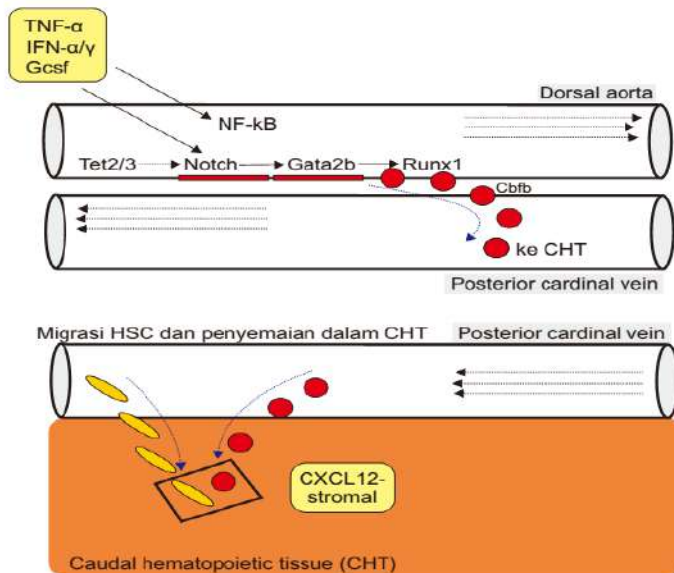
Kemunculan dan spesifikasi HSC memerlukan integrasi faktor intrinsik dan jalur sinyal transduksi yang berbeda, mulai awal prekursor mesoderm hingga terbentuk HSC pada sumsum tulang. Beberapa jalur regulasi kemunculan HSC telah diidentifikasi via hewan coba, yaitu jalur *vascular endothelial growth factor* (VEGF) yang dapat menstimulasi diferensiasi dan migrasi sel, jalur *sonic hedgehog* (SHH) dan *bone morphogenetic protein* (BMP) yang meregulasi polarisasi dinding arterial (spesifikasi HSC) serta jalur *notch* untuk pembentukan dan spesifikasi HSC.

Prekursor HSC pada awalnya muncul dari posterior *lateral plete mesoderm* (PLM) yang bermigrasi menuju regio media embrio untuk menghasilkan *vascular cord*, yang akan menjadi bagian dorsal dari aorta (DA). Sekali DA terbentuk maka HSC muncul dari sel endotelial hemogenik terspesialisasi, yang kemudian keluar dari aorta memasuki sirkulasi darah dan kemudian menyemai pada area *niche* untuk perkembangan selanjutnya.

Proses dimulai dengan pelepasan molekul sinyal pro-inflamasi TNF- $\alpha$  dan IFN- $\alpha/\gamma$  oleh sel efektor *myeloid* yang dapat mendorong kemunculan HSC via jalur sinyal NF- $\kappa$ B dan *Notch*. Sisi lain protein Tet2/3 juga ikut meregulasi sinyal *Notch*. Semua keadaan tersebut

memicu ekspresi Gata2-b dan runx1 sel endotelial hemogenik. Molekul Cbf- $\beta$  dibutuhkan untuk mendorong ekstravasasi kemunculan HSC dari dalam dorsal aorta (DA) sehingga *nascent* HSC (HSC baru lahir) muncul. *Nascent* HSC kemudian menyemai ke bagian *caudal hematopoietic tissue* (CHT) untuk menginduksi *remodeling* endotel sehingga membentuk *mikro-niche* yang terdiri atas HSC dikelilingi sel endotel berdekatan dengan sel stromal yang mengekspresikan CXCL12.

Pembentukan molekuler HSC dijelaskan pada gambar dibawah ini.



Gambar 111. Pembentukan molekuler HSC

Proses pembentukan HSC dimulai dengan pelepasan TNF- $\alpha$  dan IFN- $\alpha/\gamma$  mengaktifasi jalur sinyal NF- $\kappa$ B dan *Notch*. Bersama dengan protein Tet 2/3 memicu ekspresi Gata2-b dan runx1 sel endotelial hemogenik dan bersama molekul Cbf- $\beta$  mendorong kemunculan HSC sebagai *nascent* HSC dari dalam DA. *Nascent* HSC kemudian menyemai ke bagian CHT membentuk *mikro-niche* yang terdiri atas HSC yang sel endotel dan sel stromal yang mengekspresikan CXCL12, sehingga HSC berada pada sumsum tulang.

Regulasi dan koordinasi faktor transkripsi HSC yaitu Gata2, Scl, Runx1, Lmo2, dan C-myb. Koordinasi faktor transkripsi HSC dengan faktor epigenetik adalah penting dalam menentukan nasib HSC. Gata2 berperan penting dalam hematopoiesis, terutama *downstream* sinyal *Notch* selama spesifikasi HSC. Gata2-a juga berperan dalam vaskuler, sebaliknya Gata2-b diperlukan dalam pembentukan HSC.

## **7. Karakterisasi HSC berdasarkan uji CFU**

### **7.1 Historis uji CFU**

Karakterisasi HSC pada awalnya didasarkan atas kemampuan HSC donor dalam meregenerasi (menyusun kembali) sistem hematopoietik darah sumsum tulang resipien yang telah dirusak sebelumnya dengan mengablasi menggunakan radiasi. Hal ini menunjukkan pengembangan konsep bahwa HSC adalah sel dalam sumsum tulang dengan kemampuan menghasilkan seluruh sistem darah secara lengkap. Berbagai koloni sel (klonogenik) yang telah diturunkan donor pada resipien dapat diidentifikasi secara langsung pada organ limfe resipien. Secara spesifik *colony forming unit* (CFU) limfe resipien memungkinkan dilakukan karakterisasi dengan menganalisis sel progenitor (sel yang bertanggung jawab dalam pemuihan hematopoietik). HSC menghasilkan sel progenitor yang mampu membentuk beberapa turunan hematopoietik atau multipotensi disamping memperbaharui diri dalam rangka mempertahankan karakteristik sel induk.

### **7.2 Pengertian uji CFU**

*Colony-forming unit* (CFU *assay*), adalah uji in-vitro untuk menilai sel progenitor hemapoetik, terutama sel progenitor multipoten (MPP) dan sel progenitor turunan terbatas eritroid, granulositik dan monosit. HSC dan progenitor primitip dapat membentuk koloni pada kondisi kultur tertentu (potensi stemness), namun pada in-vivo

mayoritas CFU yang terdeteksi dalam sumsum tulang dan darah memiliki potensi yang terbatas. Pemeriksaan CFU dilakukan dengan menyemai sel tunggal dengan densitas rendah dalam medium semi-solid (metil selulosa) seperti MethoCult™ yang disuplementasi dengan sitokin dengan kombinasi tertentu. Hal ini menyebabkan HSC berproliferasi dan diferensiasi menjadi sel progenitor tertentu dan kemudian menghasilkan pembentukan koloni terpisah dan berbeda. Koloni yang berasal dari tipe sel progenitor berbeda diklasifikasi dan dihitung atas jumlah dan tipe sel matur yang dihasilkan dengan menggunakan kriteria morfologi dan fenotip. Pemeriksaan CFU berguna bagi HSC pada keadaan dimana pemeriksaan transplantasi jangka panjang mahal dan tidak praktis.

## **8. HSC dalam aplikasi klinis**

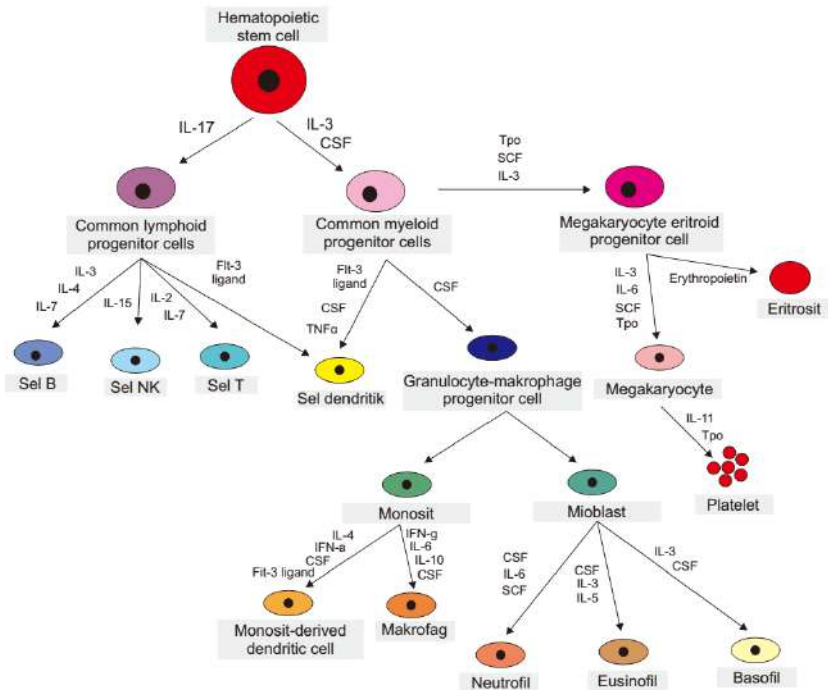
Secara klinik keberhasilan terapi tranplantasi sumsum tulang dan tali pusat disebabkan karena kemampuan HSC dalam menghasilkan sistem darah pada host baru. Keterbatasan jumlah donor yang cocok dalam terapi berbasis HSC akan menghambat penggunaan transplantasi lebih luas. Berbagai langkah besar telah dibuat selama beberapa decade terakhir dengan menggunakan model hewan untuk mengungkap banyak langkah baru dalam ontogeni HSC. HSC adalah sel punca dewasa/ sel progenitor multipoten yang dapat memperbaharui diri sendiri dan difrensiasi menghasilkan seluruh jenis sel darah yang berbeda selama proses hematopoiesis, mulai limfosit, granulosit, dan makrofag dari system imunitas tubuh serta eritrosit dan trombosit yang bersirkulasi

## **9. Sirkuit molekuler diferensiasi HSC**

Mekanisme yang mengendalikan pembaharuan diri dan diferensiasi HSC dipengaruhi oleh berbagai sitokin, kemokin, reseptor, dan molekul sinyal intraseluler. Diferensiasi HSC diregulasi

oleh growth factor dan sitokin termasuk CSF dan IL yang mengaktifkan jalur sinyal intra seluler. Secara klasik HSC berdiferensiasi menjadi dua turunan sel progenitor terbatas, yaitu limfoid dan myelo-erythroid (sel progenitor oligopotent).

Turunan HSC dijelaskan pada gambar dibawah ini.



Gambar 112. Turunan HSC

Model pengembangan garis turunan HSC. HSC berdiferensiasi menjadi *commonlymphoid progenitorcell* dan *commonmyeloid progenitorcell*. *Common lymphoid progenitor cell* akan menghasilkan sel T, sel B, sel NK dan dendritik, sedangkan *common myeloid progenitor cell* akan menghasilkan *granulocyte macrophage progenitor cell* dan *megakaryocyte erythroid progenitor cell*. *Granulocyte macrophage progenitor cell* menghasilkan monosit dan *myeloblast*, sedangkan monosit akan menghasilkan makrofag. Kelompok *megakaryocyte erythroid progenitor cell* akan menghasilkan eritrosit dan platelet.

## **Daftar pustaka**

1. Ng AP, Alexander WS. Haematopoietic stem cells: past, present and future. *Cell Death Discov* [Internet]. 2017;3(December 2016):17002.
2. chen T, W FWM, Zack Wang. Development of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells from Human Pluripotent Stem Cells. 2016;34(1):27–33.
3. Tober J, Maijenburg MMW, Li Y, Gao L, Hadland BK, Gao P, et al. Maturation of hematopoietic stem cells from prehematopoietic stem cells is accompanied by up-regulation of PD-L1. *J Exp Med* [Internet]. 2018;215(2):645–59.
4. Eaves CJ. Hematopoietic stem cells : concepts , de fi nitions , and the new reality. *Blood*. 2015;125(17):2605–14.
5. Sarma NJ, Takeda A, Yaseen NR. Colony Forming Cell (CFC) Assay for Human Hematopoietic Cells. *J Vis Exp* [Internet]. 2010;(46):3–7.
6. Li C, Lu L, Zhang J, Huang S, Xing Y, Zhao M, et al. Granulocyte colony-stimulating factor exacerbates hematopoietic stem cell injury after irradiation. *Cell Biosci*. 2015;5(1):1–11.
7. Putra A, Hutagalung A, Hasanah IH, Trisnadi S, Djannah D, et. al. Peran Induksi TNF- $\alpha$  Serial Doses dalam Peningkatan VEGF dan PDGF Mesenchymal Stem Cells. 2018. *MKB*. 50(2):67–73.
8. Nugraha A, Putra A. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -activated mesenchymal stem cells accelerate wound healing through vascular endothelial growth factor regulation in rats. *Univmed*. 2018; 37(2):135-42.

# **BAB X**

## **MOLEKUL DANGER-TLR :**

### **SEL RADANG DAN MSC**

#### **Tujuan**

---

Setelah membaca bagian ini, diharapkan pembaca dapat memahami tentang pengertian dan peran molekul *danger*, reseptor TLR, sel dendritik, sel limfosit, MSC menghindari sistem imun, MSC supresi sel dendritik, MSC menginduksi polarisasi sel monosit, MSC supresi limfosit, MSC supresi sel leukosit, MSC supresi sel NK

*Inflamasi pada dasarnya adalah respon protektif tubuh terhadap berbagai kerusakan jaringan dan invasi mikroba patogenik. Inflamasi diinisiasi oleh sekelompok sel imun innate sel dendritik, neutrofil, limfosit T dan B dan sel NK. Sel radang teraktivasi paska terpapar molekul sinyal danger yang dilepas jaringan rusak, dikenal sebagai damage molecular associated pattern (DAMP) dan atau oleh mikro organism patogenik, yang dikenal sebagai pathogenic-associated molecular patterns (PAMP). MSC dapat lolos dari deteksi sistem imun, disebabkan MSC tidak mengekspresikan antigen MHC kelas II. MSCs mampu mensupresi inflamasi dengan cara mensupresi sel dendritik, limfosit dan NK baik pada cidera jaringan, transplantasi organ allogenik dan penyakit autoimun. MSC memperoleh respon imun akibat stimulasi allogenik namun MSC juga mampu mengatasi respon imun allogenik karena kemampuannya sebagai imunomodulator dengan cara berpolarisasi menjadi MSC tipe-1 dan atau tipe-2.*

*Catatan penulis*

## **1. Latar belakang**

Inflamasi merupakan respon lokal berbagai sel radang dengan tujuan mengeliminasi, membersihkan, membangun dan menjaga kembali integritas sistem homoestasis jaringan. Inflamasi diinisiasi oleh aktivasi sel radang akibat stimulasi molekul sinyal *danger* yang dilepas sesaat terjadi kerusakan jaringan atau subtansi tertentu mikroorganisme patogenik. Molekul ini dikenal sebagai molekul *danger*, baik berupa *damage-associated molecular pattern* (DAMP) atau *pathogenic-associated molecular patterns* (PAMP). Molekul *danger* berperan sebagai inisiator dalam aktivasi sel radang, terutama dalam menciptakan suasana awal inflamasi. Sel radang merespon molekul *danger* ini melalui reseptor *Toll-like receptors* (TLR) dan atau reseptor IL-1R.

Secara spesifik respon inflamasi diinisiasi oleh pelepasan molekul sel cedera secara pasif yang dikenal sebagai *damage-associated molecular pattern* (DAMP) dan atau secara aktif oleh sel makrofag residen melalui pelepasan IL-1 $\alpha$ . Sitokin IL-1 $\alpha$  menstimulasi sel parenkim untuk melepas molekul kemokin agar mampu merekrut sel radang lain, terutama neutrofil, termasuk MSC. Sisi lain secara klasik makrofag residen juga dapat teraktivasi oleh molekul *pathogen-associated molecular pattern* (PAMP) ketika berinteraksi dengan kelompok reseptor *pattern recognition receptors* (PRR), terutama reseptor TLR. Ikatan molekul PAMP dan reseptor TLR sel radang dapat menghasilkan sitokin pro-inflamasi dalam kadar tinggi dan produk *reactive nitrogen and reactive oxygen species* (ROS). Pelepasan molekul sitokin dan ROS tersebut dapat menginduksi respon inflamasi fase akut.

Sel dendritik, neutrofil, limfosit T dan B dan sel NK, termasuk MSC memiliki reseptor TLR sehingga dapat teraktivasi ketika berikatan dengan molekul sinyal DAMP dan PAMP. Sisi lain sel radang yang teraktivasi akan melepas mediator inflamasi, baik sitokin dan kemokin yang dapat berperan penting untuk mengaktivasi sel imun sekitarnya termasuk MSC, disamping merekrut sel radang sistemik. Pengikatan molekul *danger* DAMP atau PAMP pada reseptor TLR sel imun dan MSC berlanjut dengan transduksi sinyal sitoplasmik hingga memicu polarisasi sel radang termasuk MSC. Polarisasi MSC penting dalam mengontrol berbagai sel radang aktif sehingga inflamasi mereda.

## **2. Molekul *danger***

Pengikatan molekul *danger*-TLR akan memicu polarisasi berbagai sel radang, termasuk MSC yang berakibat pada peningkatan aktivitas fungsional sel tersebut, baik berupa sekretom maupun fagositosis. Secara spesifik aktivitas MSC paska berikatan dengan molekul *danger* atau sitokin adalah terpolarisasi menjadi tipe-1 atau

menjadi tipe-2 tergantung pada kadar stimulatornya.

## **2.1 Pengertian molekul *danger***

Molekul *danger* adalah molekul sinyal yang dilepaskan jaringan sesaat terjadi kerusakan, dikenal sebagai molekul *damage-associated molecular pattern* (DAMP) atau ketika mikroba patogenik menginvasi jaringan, dikenal sebagai *pathogenic-associated molecular patterns* (PAMP). Molekul *danger* berperan sebagai inisiator dalam menciptakan suasana awal inflamasi yang dapat menyebabkan polarisasi berbagai sel radang sekitarnya, termasuk MSC. Hal ini disebabkan karena MSC memiliki karakteristik yang serupa dengan sel radang diantaranya adalah kemampuannya dalam mengekspresikan reseptor TLR.

Secara spesifik molekul *danger* dibagi menjadi 2:

1. Molekul *danger* DAMP
2. Molekul *danger* PAMP

## **2.2 Molekul DAMP**

DAMP adalah berbagai molekul yang dilepaskan sesaat terjadi kerusakan jaringan, baik berupa struktur protein dan atau non-protein. Secara struktural molekul DAMP ini dibagi menjadi 2 yaitu:

1. DAMP struktur protein:
  - 1) Protein intra seluler: *heat-shock protein* (Hsp) dan *high-mobility group box-1*(HMGB1)
  - 2) Protein matriks ekstra seluler: fragmen *hyaluronan*
2. DAMP struktur non-protein: ATP, asam urat dan heparin sulfat

## **2.3 Molekul PAMP**

PAMP adalah molekul *danger* yang berasal dari berbagai komponen mikroba patogenik tertentu. Secara struktural dibagi menjadi:

1. *Lipo-polysaccharide* (LPS)

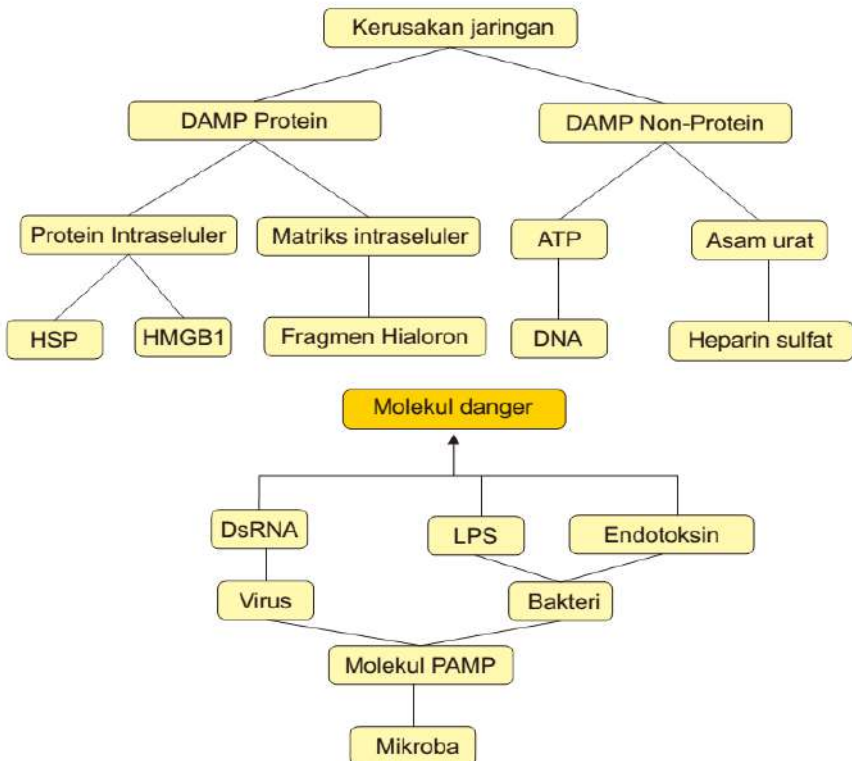
LPS adalah partikel bakteri gram-negatif yang dapat mengaktivasi reseptor TLR4 sel radang atau MSC.

2. dsRNA (*double strand RNA*)

dsRNA adalah partikel virus yang dapat mengaktifasi reseptor TLR3 sel radang atau MSC.

3. Endotoksin

Konsep molekul danger dijelaskan pada gambar berikut.



Gambar 113. *Danger molecule*

### 3. Peran molekul danger

#### 3.1. Molekul danger HMGB1

HMGB1 adalah molekul protein *danger* DAMP yang disekresikan sel hematopoetik melalui lisosom. Molekul ini merupakan prototipe protein LSP (*leaderless secreted protein*) terkait

kromatin, yang berperan sebagai mediator poten dalam memicu respon inflamasi kuat, terutama dalam menginduksi syok endotoksin. Hal ini terjadi melalui pengikatan molekul HMGB1 pada reseptor TLR-2, TLR-4 dan *receptor for advanced glycation endproducts* (RAGE) berbagai sel radang sehingga mengaktifasi jalur JAK-STAT. Secara spesifik molekul HMGB1 memicu aktivitas fungsional:

1. Induksi sel dendritik matur  
HMGB1 memicu sel dendritik meningkatkan ekspresi CD80, CD83, dan CD11c, yaitu sebagai marker sel dendritik matur
2. Induksi sel *myeloid* dalam sekresi sitokin pro-inflamatori  
HMGB1 memicu sel dendritik untuk memproduksi sitokin proinflamatori, terutama IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8
3. Aktivasi sel endotel  
HMGB1 memicu peningkatkan ekspresi molekul adhesi, terutama ICAM-1, VCAM-1.

### **3.2. Molekul *danger* DNA/RNA**

Secara natural DNA berada dalam nukleus atau mitokondria suatu sel dan ketika tidak pada tempatnya maka molekul DNA ini dapat berperan sebagai molekul DAMP yang dapat memicu respon imun. Secara spesifik molekul DNA akan diikat oleh reseptor TLR-9, sedangkan molekul RNA dengan TLR-3. Paparan sinar UV-B pada sel keratinosit (*sunburn injury*) dapat menyebabkan kerusakan RNA (sekali pun sel keratinosit masih intak). Hal ini mendorong reseptor TLR-3 mengikat molekul RNA tersebut sehingga menyebabkan aktivasi jalur JAK-STAT dengan target sekresi molekul proinflamasi seperti TNF- $\alpha$  dan IL-6. Hal ini akan menginisiasi proses inflamasi sekitar kulit.

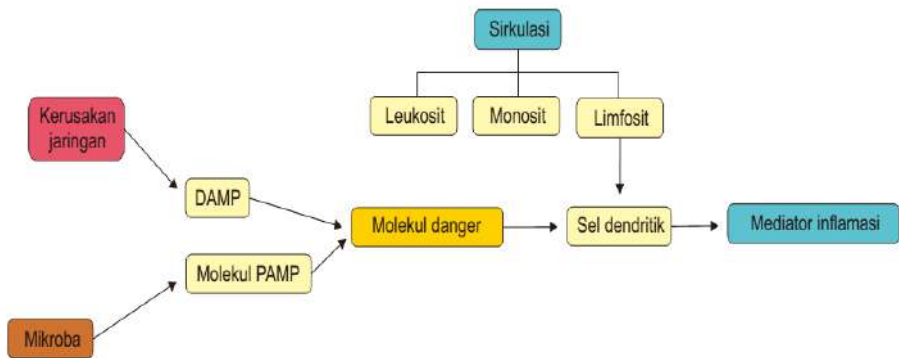
### **3.3. Molekul *danger* fragmen *hyaluronan***

Berbagai hasil penelitian melaporkan bahwa struktur fragmen *hyaluronan* adalah glikan atau glikokonjugat, yang dikenali reseptor TLR sel radang sebagai struktur molekul DAMP. Oleh karenanya molekul ini akan mengaktifasi jalur JAK-STAT dengan target sekresi

mediator pro-inflamasi.

### 3.4. Molekul danger metabolit purin

Berbagai nukleotide, terutama ATP dan nukleoside seperti adenosine dapat berperan sebagai molekul *danger sinyal*. Molekul ini dilepas ekstraseluler ketika terjadi nekrosis sel, yang kemudian direspon oleh reseptor purinergik dan TLR sehingga memicu peningkatan sinyal inflamasi. Sisi lain molekul ATP ekstraseluler juga dapat memicu degranulasi sel mast melalui sinyal reseptor P2X7, sementara molekul adenosine melalui reseptor P1. Dengan demikian pelepasan asam urat oleh jaringan cedera dapat berperan sebagai molekul sinyal *danger* endogenous. Sistemik respon imun dan sel yang terlibat diilustrasikan dalam gambar dibawah ini.



Gambar 114. Respon *danger molecule*

Beberapa saat paska kerusakan jaringan atau invasi patogen, dilepas molekul *danger*, berupa DAMP atau PAMP. Molekul ini dapat mengaktivasi sel dendritik lokal, yang kemudian mensekresi berbagai mediator inflamasi.

## 4. Reseptor TLR

Reseptor *Toll-like receptors* (TLR) mampu mengenali berbagai *molekul danger* yang dilepas oleh jaringan rusak, sebagai molekul DAMP. Sisi lain reseptor TLR juga mampu mengenali dan

mengikat komponen mikro-organisme patogenik, sebagai molekul PAMP.

#### **4.1 Pengertian reseptor TLR**

TLR merupakan reseptor permukaan transmembran yang diekspresikan oleh berbagai sel radang terutama dendritik dan limfosit disamping MSC. Reseptor TLR mampu merespon molekul sinyal *danger* DAMP yang dilepas jaringan rusak atau PAMP yang dilepas potongan mikroba patogen dan kemudian memodulasinya melalui aktivasi jalur JAK-STAT atau MyD88. Hal ini memungkinkan untuk mengarahkan respon imun yang sesuai dengan derajat kerusakan.

Secara teoritis setidaknya terdapat 10 anggota keluarga human TLR yang diekspresikan sel radang, yaitu:

1. Reseptor TLR permukaan sel  
Reseptor ini adalah TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, dan TLR6
2. Reseptor TLR sitoplasmik  
Reseptor ini adalah TLR3, TLR7, TLR8, dan TLR9, yang secara spesifik terlokalisasi dalam kompartemen endosomal/lisosomal.

#### **4.2 Struktur reseptor TLR**

Secara struktural reseptor TLR merupakan protein transmembran yang terdiri atas 2 domain, yaitu:

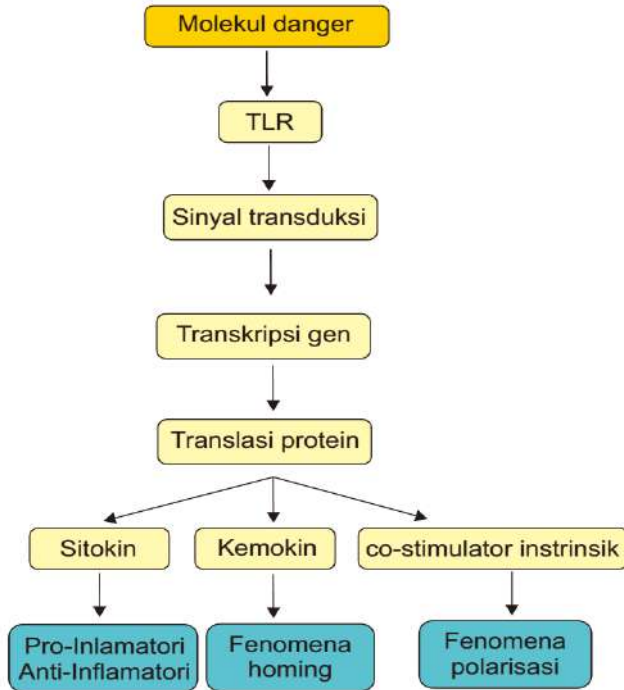
1. Domain ekstraseluler

Secara kimia domain ekstraseluler berupa area yang kaya akan pengulangan protein *leucine*. Domain *leucine-rich* berfungsi sebagai reseptor pengenalan terhadap berbagai komponen patogen spesifik/molekul *danger*.

2. Domain intraseluler

Secara kimia domain intraseluler reseptor TLR berupa area *Toll- interleukin-1 receptor* (TIR) pada ekor sitoplasmik. Domain TIR sitoplasmik ini berperan penting sebagai reseptor bagi IL-1 dan IL-8 (inisiator sinyal intraseluler). Sinyal intraseluler kemudian

mengaktivasi jalur JAK-STAT yang dapat menstimulasi berbagai produk sitokin dan substansi mikrobisidal dalam respon imunologik.



Gambar 115. *Danger molecule* dan reseptor TLR

### 4.3 Peran reseptor TLR dalam inflamasi

Reseptor TLR berperan sentral dalam menginisiasi proses inflamasi. Secara sistematis peranan reseptor TLR dalam inflamasi adalah sebagai berikut:

1. Deteksi mikroorganisme dan atau jaringan rusak

Reseptor TLR mampu mengenali berbagai sinyal cedera terutama molekul DAMP (molekul *danger*) yang dilepas oleh jaringan rusak dan atau mengenali sinyal mikroorganisme patogenik melalui PAMP. Kemampuan deteksi reseptor TLR-MSK terlihat pada peristiwa inflamasi, dimana terjadi mobilisasi dan migrasi MSC dan sel progenitor asal sumsum tulang menuju area inflamasi.

2. Deteksi sinyal inflamasi (*homing mechanism*)

Mediator inflamasi merupakan sinyal profesional bagi sel yang mengekspresikan reseptor TLR, seperti dendritik dan limfosit. MSC juga mengekspresikan TLR sehingga juga dapat merespon mediator inflamasi dan bergerak menuju area inflamasi yang dikenal sebagai mekanisme *homing* terhadap respon inflamasi.

3. Polarisasi sel radang dan MSC

TLR berperan kuat dalam polarisasi berbagai sel radang termasuk MSC. Polarisasi dimulai ketika terjadi ligasi molekul *danger* pada reseptor TLR yang berakibat pada perubahan fenotip sel radang/ MSC dari pro-inflamatori menjadi anti-inflamatori atau sebaliknya tergantung pada tipe dan kadar molekul penstimulasinya.

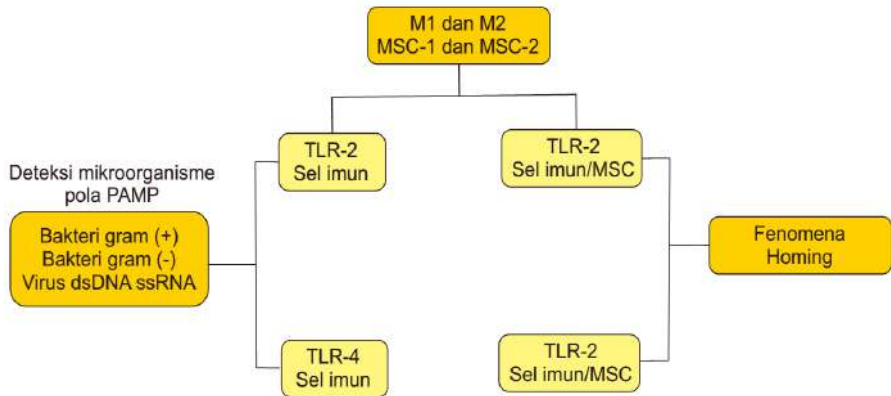
4. Modulasi sel inaktif

Reseptor TLR mampu memodulasi berbagai sel imun fase *innate* menjadi bentuk aktif ketika reseptor TLR yang diekspresikan sel radang/ MSC tersebut mampu berikatan dengan molekul ligan pro-inflamasi, sehingga mendorong terbentuknya sinyal transduksi sitoplasmik yang berakhir dengan pelepasan molekul bioaktif tertentu.

5. Mengarahkan respon sel yang sesuai

Kemampuan reseptor TLR dalam mengarahkan respon imun dan atau respon MSC yang sesuai terlihat pada berbagai peristiwa inflamasi. Reseptor TLR3 sel makrofag yang berikatan dengan sitokin tertentu akan mendorong sel makrofag tersebut berubah menjadi sel fagosit profesional dan atau sel asesoris APC. Hal yang sama juga terjadi ketika reseptor TLR3- MSC berikatan dengan molekul sitokin pro-inflamatori dimana akan terjadi polarisasi MSC menjadi MSC tipe-2. MSC tipe-2 memiliki sekretom, yaitu mensekresi molekul anti-inflamatori, seperti IL-1ra, PGE3, TGFb dan TSG6, disamping molekul proliferasi VEGF, PDGF, FGF. MSC tipe-2 ini berkarakteristik immunosupresif dan proliferasi. Sisi lain ketika reseptor TLR- MSC berikatan dengan molekul sitokin anti-inflamatori, maka akan berdampak sebaliknya menjadi MSC tipe-1 yang

berkarakteristik sebagai imunomodulasi.



Gambar 116. Polarisasi fenotip

## 5. Sel dendritik

Sel dendritik teraktivasi akan mensekresi berbagai molekul sitokin yang berfungsi untuk memperkuat respon inflamasi, dikenal sebagai mediator inflamasi.

### 5.1 Distribusi sel dendritik

Secara hirarki sel dendritik berasal dari *pre-cursor* HSC asal sumsum tulang. Sel dendritik pada awalnya hadir dalam bentuk imatur di darah hasil diferensiasi (turunan) sel progenitor hamatopoetik. Sel dendritik imatur ini kemudian bermigrasi ke jaringan perifer menjadi sel dendritik residen. Beberapa diantaranya berubah menjadi sel dendritik bentuk khusus yaitu sel *langerhans* akibat pengaruh lingkungan eksternal.

### 5.2 Sel dendritik imatur

Sel dendritik imatur memiliki karakteristik berupa aktivitas endositik tinggi namun potensi aktivasi sel-T rendah, sehingga secara terus menerus mendeteksi keberadaan berbagai antigen disekitar lingkungan mikroseluler untuk kemudian untuk dilakukan fagosit,

termasuk juga mencoba fagositosis sejumlah kecil membran sel dendritik itu sendiri, dikenal proses *nibbling* (belajar menggigit). Kemampuan mendeteksi berbagai antigen ini dimungkinkan karena sel dendritik mengekspresikan reseptor *pattern recognition receptors* (PRR) seperti *toll like receptor* (TLR) yang mampu mengenali substansi kimia tertentu sebagai bagian dari patogen.

### **5.3 Maturasi sel dendritik dan *travelling***

Proses maturasi dimulai ketika sel dendritik imatur bersentuhan dengan *presentable antigen* (antigen yang tepat) yang kemudian memfagositosis dan mendegradasinya menjadi kepingan kecil/ fragmen lalu dipresentasikan ke permukaan membran melalui molekul MHC kepada sel limfosit T dalam jaringan limfoid sekunder. Hal ini menunjukkan bahwa sel dendritik melakukan *travelling* menuju jaringan limfoid, disebabkan karena sel dendritik mulai mengekspresikan reseptor CCR7, sebagai detektor kemotaksis yang dapat menginduksi perjalanan sel dendritik baik melalui aliran darah ke limpa atau sistem limfatik ke kelenjar getah bening. Fakta ini menunjukkan bahwa proses maturasi mulai terjadi di dalam jaringan limfoid, namun maturasi sempurna terjadi di dalam jaringan limfoid primer ketika antigen yang telah difagosome tersebut dipresentasikan kepada sel limfosit T, sehingga dikenal sebagai sel APC (*antigen-presenting cells*).

### **5.4 Sel dendritik matur**

Sel dendritik matur adalah sel dendritik imatur yang teraktivasi dan terspesialisasi sehingga mampu mensekresi molekul sitokin aktif IFN $\gamma$  atau TNF $\alpha$  sebagai mediator inflamasi poten dan mengekspresikan CD11c dan CD83 sebagai *marker*. Sel dendritik matur berperan memperpanjang onset inflamasi.

### **5.5 Sel dendritik aktivasi limfosit T**

Secara bersamaan dengan maturitas, sel dendritik matur mulai meningkatkan ekspresi reseptor permukaan sel CD80, CD86 dan CD40 sebagai *co-receptor* yang berperan untuk meningkatkan

kemampuan sel dendritik dalam mengaktifkan sel limfosit T. Dengan demikian sel dendritik matur bertindak sebagai sel penyaji atau pembawa pesan antigen dari sistem imun innate ke adaptif. Sisi lain sel dendritik matur adalah juga mengekspresikan molekul MHC-I dan MHC-II untuk interaksi dengan sel limfosit Th1 dan Th2.

## **6. Sel limfosit**

### **6.1 Limfosit**

Limfosit adalah sel leukosit yang berperan sentral dalam sistem imunitas adaptif. Secara garis besar dibagi menjadi 2 tipe, yaitu limfosit T (imunitas seluler) dan limfosit B (imunitas humoral) yang melibatkan pembentukan antibodi. Limfosit T sendiri dikenal pula sebagai sel  $T_H$  naif dan sel T *Helper*. Paradigma modifikasi baru adalah Th17 dan T *regulator* (Treg). Secara teoritis limfosit T yang terdistribusi dalam sirkulasi perifer adalah dalam bentuk CD4(+) sekitar 60% dan dalam bentuk CD8(+) sekitar 30%, meskipun demikian prosentasi ini bersifat dinamik sehingga dapat berubah pada keadaan tertentu, namun tetap konsep dominasi klon, sehingga tidak akan dijumpai CD4+ dan CD8+ dalam waktu bersamaan.

### **6.2 Pengertian sel $T_H$ naif**

Sel  $T_H$  naif adalah sel T yang telah berdiferensiasi dalam sumsum tulang dan kemudian lolos dalam proses seleksi positif dan negatif di *thymus*. Sel ini dianggap sel matur, namun statusnya masih sebagai  $T_H0$  disebabkan karena belum dijumpai adanya kognasi antigen dalam dirinya.

### **6.3 Pengertian sel $T_H-1$ atau $T_H-2$**

Stimulasi antigen yang dibawa sel dendritik aktif (sel APC) menyebabkan sel  $T_H0$  ( $T_H$  naif) terpolarisasi menjadi  $T_H-1$  atau  $T_H-2$  tergantung pola sitokin yang disekresi. Sesuai paradigma  $T_H-1/T_H-2$  *Mosmann and Coffman*, dikatakan sel  $T_H-1$  ketika IL-2 dan IFN- $\gamma$  yang disekresi dan menjadi  $T_H-2$  ketika IL-4, IL-10, dan IL-13. Sel

T<sub>H</sub> ini berfungsi untuk memberikan bantuan kepada sel limfosit T lain atau kepada limfosit B penghasil *immunoglobulin*.

#### **6.4 Sel limfosit CD4/ CD8,**

Secara spesifik sel limfosit dikatakan sebagai sel limfosit CD4 ketika sel limfosit mengenali dan berikatan dengan antigen yang dikonjugasi oleh molekul MHC kelas II sel dendritik matur (sel APC), sebaliknya disebut sel limfosit CD8 ketika dengan MCH kelas 1. Sel limfosit T CD4<sup>+</sup> sendiri berperan sebagai sel T<sub>H</sub> karena berfungsi memberikan bantuan kepada sel limfosit T lain atau kepada limfosit B penghasil *immunoglobulin*, sedangkan sel limfosit T CD8<sup>+</sup> sebagai *T cytotoxic cell* (T<sub>C</sub>) atau T<sub>S</sub>, karena berfungsi sebagai sitotoksik/ supresi terhadap sel yang terinfeksi virus atau sel tumor.

#### **6.5 Maturasi dan seleksi sel limfosit**

Tahapan maturasi limfosit ditentukan oleh sitokin IL-2 dan IL-7 yang dilepas sel stromal, yang memiliki aktivitas *growth factor* sehingga mampu mendorong *thymocyte* immatur untuk proliferasi dan diferensiasi menjadi limfosit matur. Molekul lain adalah *Lymphocyte function-associated antigen 3* (LFA-3) yang disekresi sel epitel *thymic*. Berdasarkan ekspresi *marker* permukaan sel, terutama TCR (*T cell reseptor*), CD3 (sinyal transduksi) dan CD4/CD8 maka perkembangan sel T dibagi menjadi:

1. Tahapan migrasi prekursor sel T

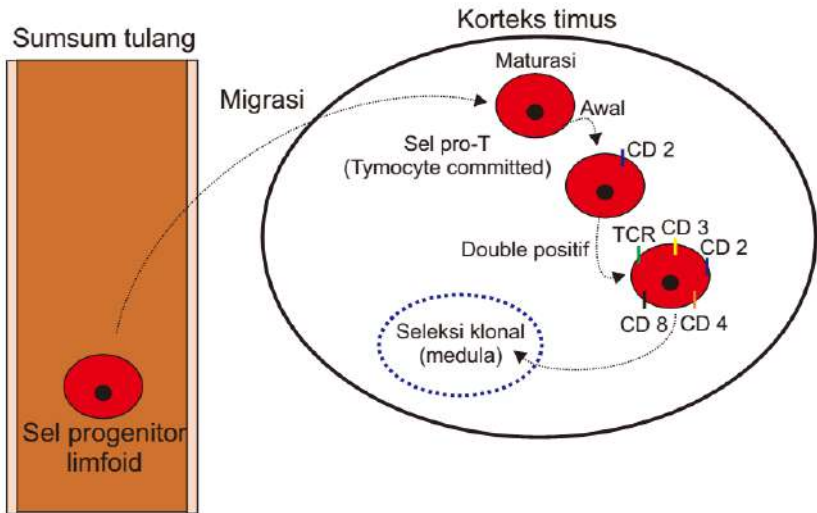
Perkembangan sel T dimulai dengan migrasi *pre-cursor* sel T (sel progenitor) asal sumsum tulang menuju regio kortek timus.

2. Tahapan maturasi awal: sel pro-T

Tahapan ini dimulai dengandiferensiasi prekursor sel T menjadi sel pro-T (*thymocyte committed*) yang ditandai dengan ekspresi CD2 (reseptor eritrosit domba) dibawah pengaruh hormon *thymik* dan *tympoetin* yang disekresi epitel *thymic*. Sel pro-T ini belum mengekspresikan reseptor antigen sel T (TCR) maupun CD4 atau CD8, sehingga dikenal sebagai sel dengan *double* negatif.

3. Tahapan sel *double* positif

Tahapan ini adalah pembentukan reseptor TCR dan CD3, disamping pembentukan CD4 dan CD8, sehingga sel *thymocyte* disebut sebagai sel dengan *double positif*, yang selanjutnya akan mengalami tahapan seleksi klonal.



Gambar 117. Maturasi sel limfosit

Perkembangan sel T dimulai dengan migrasi sel progenitor limfoid sumsum tulang menuju regio kortek timus. Tahapan maturasi dimulai dengan diferensiasi sel progenitor limfoid menjadi sel pro-T (*thymocyte committed*) di bawah pengaruh hormon *thymik* dan *tymopoetin*. Sel pro-T ditandai dengan ekspresi CD2 (reseptor eritrosit domba) namun belum mengekspresikan reseptor antigen sel T baik TCR atau CD4 dan atau CD8 (*double* negatif). Tahapan selanjutnya adalah pembentukan reseptor TCR dan CD3 serta CD4 dan CD8 yang dikenal sebagai *double positif*. Proses berlanjut menuju tahapan seleksi klonal di medula.

4. Seleksi klonal "*eduksi thymic*"

Tahapan seleksi klonal merupakan tahapan akhir seleksi, yaitu melalui pengenalan dan pendidikan reseptor TCR sel limfosit di medula *thymic*, sehingga mampu mengenali antigen MHC sendiri,

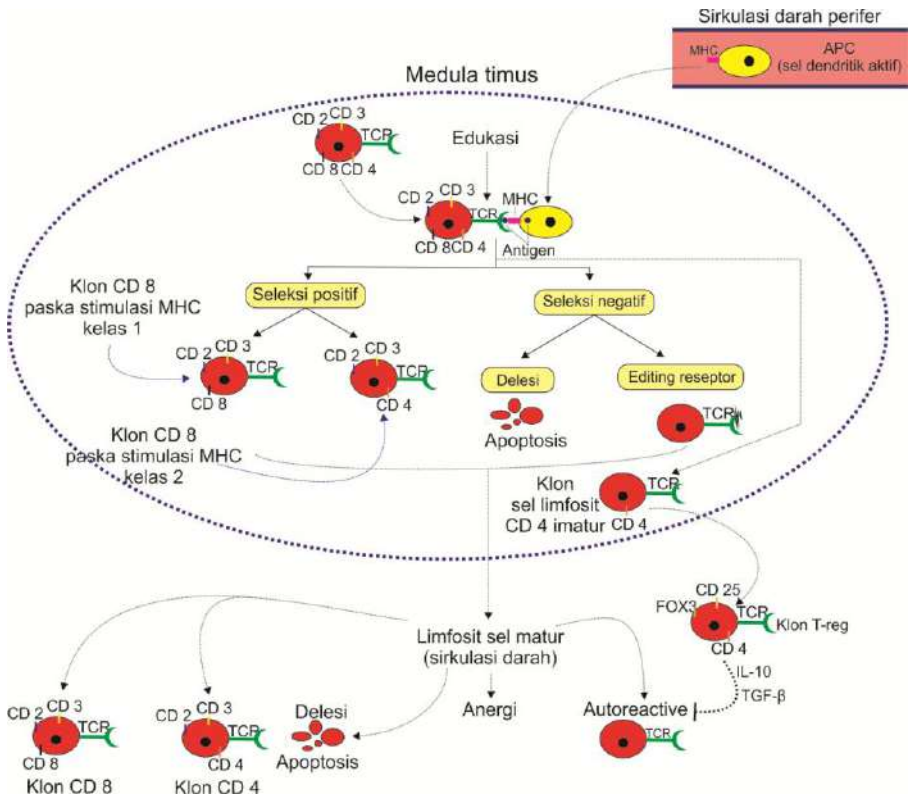
dikenal sebagai *self tolerance*, disamping *non-MCH*. Tahapan ini ditandai dengan kehilangan salah satu CD secara progresif, apakah CD4 atau CD8 tergantung proses edukasi. Klon yang mengenali molekul MHC secara *over-reactive/* berlebihan juga akan mengalami delesi, sehingga hanya 10% saja sel limfosit yang kembali ke sirkulasi. Keberhasilan diferensiasi dan proliferasi sel T tergantung pada rendahnya afinitas reseptor TCR-MHC terhadap antigennya sendiri. Secara spesifik seleksi klon dibagi menjadi 2 yaitu:

1) Seleksi Positif

Seleksi positif adalah seleksi yang terjadi pada klon *double positipe* (CD4+ dan CD8+) dengan tujuan untuk menghilangkan salah satu klon, melalui stimulasi TCR sel limfosit dengan MHC-I/II sel dendritik (konjugasi dengan benda asing). Stimulasi MHC-II menyebabkan klon dengan CD4 dipertahankan, namun klon CD8 delesi demikian sebaliknya. Sisi lain sel yang tidak mampu mengenali MHC host sama sekali akan diprogram apoptosis.

2) Seleksi negatif

Seleksi negatif adalah seleksi yang terjadi pada klon sel T yang mengenali MHC dan peptide sendiri secara berlebihan. Klon demikian akan diprogram apoptosis. Klon sel patologik ini ketika lolos dari seleksi negatif dan berhasil keluar sirkulasi maka akan memicu kemunculan penyakit autoimun.



Gambar 118. Seleksi klonal dan maturasi limfosit

### 5. Limfosit T matur

Limfosit T matur adalah sel limfosit yang telah lolos dari seleksi baik seleksi positif maupun negatif dan meninggalkan medula menuju sirkulasi sistemik. Limfosit T ini terdistribusi di berbagai jaringan limfoid perifer untuk beberapa saat, terutama pada kortek nodus limfatikus, spleen dan jaringan limfoid terkait mukosa (*plaque peyer kolon*). Maturasi progenitor sel T dalam timus dan aktivasi sel T matur dalam jaringan perifer dipengaruhi oleh molekul MHC, dimana hanya mengizinkan sel dengan MHC yang telah mengalami restriksi dan *non-reactive* terhadap diri saja yang dapat menjadi limfosit matur. Sel limfosit matur fungsional akan menghasilkan dua

subpopulasi baik sebagai CD4(+) ketika mampu mengenali MHC kelas II atau CD8(+) ketika mengenali MHC kelas I melalui interaksi reseptor sel T (TCR). Sisi lain aviditas dalam interaksi reseptor sel TCR sel limfosit dengan MHC adalah rendah, sehingga membutuhkan bantuan ko-reseptor dan molekul membran tambahan untuk memperkuat interaksi sel limfosit dan sel dendritik, sehingga memicu aktivasi sinyal transduksi sinyal. Aktivasi sel limfosit matur menyebabkan proliferasi dan diferensiasi sel T menjadi berbagai tipe sel efektor limfosit termasuk CD8+ (CTL) dan atau sel T memori.

## **7. MSC menghindari sistem imun**

Secara teoritis setiap partikel asing yang memasuki tubuh akan dikenali sel radang terutama sel dendritik melalui proses APC sebagai antigen yang diproses, dideteksi dan kemudian dieliminasi. Sisi lain sel NK juga memiliki kemampuan kuat dalam mendeteksi partikel asing untuk dimusnahkan.

### **7.1 Kemampuan MSC meloloskan diri**

MSCs mampu menghindari sistem imun karena MSC tidak mengekspresikan antigen HLA kelas II pada permukaan sel sehingga sulit/ tidak dikenali oleh sel APC. Hal ini menjadi keuntungan tersendiri bagi MSC karena MSC relatif aman terhadap potensi rejeksi sel imun tubuh ketika dilakukan transplantasi. Berbagai hasil penelitian telah melaporkan bahwa MSC *allogenic* berpotensi menjadi salah satu terapi seluler efektif dalam meregulasi kekacauan/penyakit sistem imun pada berbagai hewan coba, diantaranya model tikus *multiple sclerosis, inflammatory bowel disease* dan diabetes tipe I. Kemampuan MSC menghindar dari sistem imun menjadi penting agar keberadaan MSC dalam situs inflamasi tersebut tidak dipersepsikan sebagai antigen yang harus dieliminasi.

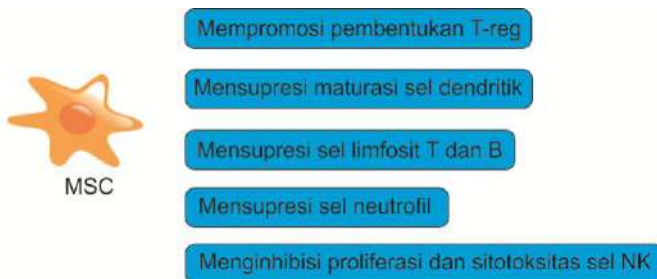
### **7.2 Efek pleotropik MSC dalam supresi sel inflamasi**

Secara spesifik efek pleotropik MSC berupa supresi, reduksi

dan atau inhibisi terhadap berbagai sel radang baik dendritik, neutrofil, limfosit T dan B, dan sel NK. Sisi lain MSC juga mempromosi dan memodulasi pembentukan sel T *regulator* (Treg) yang berfungsi menjaga homeostatis sistem imunitas. Secara spesifik efek pleotropik MSC terhadap sel radang adalah:

1. MSC mensupresi maturasi sel dendritik
2. MSC mensupresi sel limfosit T dan B
3. MSC mensupresi sel neutrofil
4. MSC menghambat proliferasi dan sitotoksitas sel NK
5. MSC mempromosi pembentukan sel T regulatori (T-reg)

Efek pleotropik MSC dalam supresi sel inflamasi dijelaskan pada gambar di bawah ini.



Gambar 119. Efek pleotropik MSC dalam supresi sel inflamasi

## 8. MSC supresi sel dendritik

MSC menyebabkan sel dendritik aktif mensekresikan  $\text{TNF-}\alpha$  dan  $\text{IFN-}\gamma$  dalam jumlah besar ketika terjadi inflamasi. MSC memperpendek masa inflamasi dengan cara mensupresi sel radang terutama sel dendritik dengan cara :

1. MSC menghambat maturasi (diferensiasi) sel dendritik

MSC menghambat maturasi monosit sehingga sel dendritik matur tidak terbentuk. Hal ini penting karena sel dendritik matur sebagai produsen utama pelepasan mediator inflamasi poten  $\text{TNF-}\alpha$  dan  $\text{IFN-}\gamma$ , sehingga dengan tidak terbentuknya dendritik matur, maka mediator inflamasi berkurang dan inflamasi mereda

2. MSC mendorong sel dendritik matur menjadi imatur

MSC mampu mendorong sel dendritik matur menjadi imatur melalui pelepasan IL-10. Dendritik imatur tidak mengekspresikan mediator inflamasi poten TNF $\alpha$  atau IFN $\gamma$  sehingga inflamasi yang terjadi akan mereda. Sisi lain dendritik imatur rentan terhadap proses litik yang dilakukan oleh sel NK aktif.

## **9. MSC menginduksi polarisasi sel monosit**

### **9.1 Konsep dasar polarisasi makrofag**

Secara teoritis sel makrofag dapat terpolarisasi menjadi 2 fenotip dengan fungsi dan karakter yang berbeda (berlawanan). Satu sisi berfungsi sebagai pro-inflamasi, sisi lain sebagai anti-inflamasi tergantung pada stimulasi molekul inflamasi yang dilepas oleh sel radang aktif lainnya di samping *niche*. Secara spesifik polarisasi makrofag terbagi menjadi 2 fenotip, yaitu :

1. Makrofag tipe M-1

Makrofag tipe M-1 adalah makrofag yang mensekresikan molekul pro-inflamasi TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 dan IL-6 dalam konsentrasi tinggi dan molekul anti-inflamasi IL-10 dan TGF- $\beta$ 1 dalam konsentrasi rendah.

2. Makrofag tipe M-2

Makrofag tipe M-2 adalah makrofag yang mensekresi molekul anti-inflamasi IL-10 dan TGF- $\beta$ 1 dalam konsentrasi tinggi dan molekul pro-inflamasi IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  dan IFN- $\gamma$  dalam konsentrasi rendah secara bersama. Hal ini menimbulkan efek supresi inflamasi sehingga memungkinkan terjadi proses regenerasi jaringan. Penelitian terkini mengungkap polarisasi makrofag tipe M-1 (fagositosis) menjadi tipe M-2 (imunotoleran) banyak terjadi pada keganasan sel yang dikenal sebagai *tumor associated cancer* (TAM).

### **9.2 MSC memicu polarisasi makrofag tipe M-2**

MSC mampu menginduksi polarisasi sel makrofag tipe M-1

menjadi tipe M-2. Hal ini terlihat jelas pada eksperimen *co-culture* MSC dengan sel monosit. Sisi lain MSC sendiri dapat terpoliarisasi menjadi MSC tipe-1 dan tipe-2, karena MSC memiliki properti seperti sel radang (persamaan karakteristik). Hal ini membuat MSC dapat berperan sebagai imunoregulator pada sistem imun, disamping fungsi regenerasi jaringan. Kemampuan poliarisasi makrofag dan MSC dikaitkan dengan keberadaan reseptor TLR.

## **10. MSC supresi limfosit**

MSC mampu mensupresi sel limfosit T dan sel B melalui pelepasan iNOS (tikus) atau iDO (manusia) paska terpapar sitokin TNF $\alpha$  dan IFN $\gamma$  dalam jumlah besar. Inflamasi menyebabkan sel T limfosit teraktivasi sehingga menghasilkan sitokin pro-inflamatori TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  dan IL-1 dalam jumlah besar. Hal ini menyebabkan MSC terpoliarisasi menjadi tipe-2 dengan fungsi sebagai immunosupresi.

### **10.1 Peran MSC tipe-2 dalam supresi limfosit**

Secara spesifik mekanisme MSC tipe-2 dalam mensupresi sel limfosit adalah :

1. MSC menurunkan proliferasi sel limfosit T

Proliferasi sel limfosit T dapat dikontrol oleh MSC baik pada kultur *in-vitro* ataupun *in-vivo*. Kemampuan MSC dalam supresi limfosit ini menjadi penting terutama dalam mengontrol kemunculan penyakit GVHD yang terjadi paska transplantasi sumsum tulang. Sisi lain MSC sendiri tidak mengekspresikan HLAII, sehingga relatif aman terhadap potensi rejeksi yang diperantarai sel limfosit-APC.

2. MSC mensupresi sel limfosit T CD4+

MSC mampu mensupresi sel limfosit CD4+ secara langsung melalui pelepasan berbagai *soluble molecule* PGE2, IDO, TGF- $\beta$ 1, HGF, iNOS dan HO1.

3. MSC mensupresi sel limfosit T CD8+ (sitotoksik)

MSC mampu menghambat sel sitotoksik limfosit T CD8+ secara langsung melalui pelepasan molekul sHLA-G5.

4. MSC supresi fungsi sel B

MSC menghambat fungsi sel B yang tergantung pada *soluble factors* and *cell contact*

5. MSC menghambat apoptosis sel T

6. MSC mendorong pergeseran sel T menjadi TH2

Proliferasi sel T Yng menurun paska dihambat MSC tipe-2 menyebabkan penurunan sekresi IFN- $\gamma$  (mediator pro-inflamasi). Hal ini akan menyebabkan peningkatan produksi IL-4 oleh sel TH2 (anti-inflamasi) sehingga terjadi pergeseran status sel T dari pro-inflamasi yang dimotori IFN- $\gamma$  menjadi status anti-inflamasi yang fasilitasi IL-4.

## **10.2 Mekanisme MSC dalam supresi sel T**

*Nitric oxide* (NO) adalah molekul yang mampu mensupresi proliferasi sel T melalui fosforilasi STAT5 dan inhibisi sintesis NO atau inhibisi sintesis prostaglandin. Sisi lain *indoleamine-2, 3-dioxygenase* (IDO) juga berperan penting dalam memediasi efek NO. Sekalipun demikian upaya menetralkan fungsi IDO (dengan *blocking* antibodi) tidak berpengaruh terhadap supresi NO. Hal ini mengesankan bahwa efek supresi sel T tergantung pada MSC.

Pelepasan sitokin pro-inflamasi akan mengaktifasi sel radang yang kemudian melepas kemokin CXCR-3 yang kemudian akan diikat oleh reseptor CXCR-3R MSC sehingga terjadi ko-lokalisasi antara sel limfosit T dan MSC. Hal ini menyebabkan pelepasan NO, yang berakibat hambatan pada fosforilasi STAT5, sehingga siklus sel tertahan yang berdampak pada aktivitas proliferasi sel limfosit T menurun. Secara spesifik mekanisme MSC tipe-2 dalam mensupresi sel limfosit T adalah melalui pelepasan molekul iNOS atau IDO yang dijelaskan sebagai berikut :

1. Menghambat jalur JAK-STAT

Hambatan jalur JAK-STAT akan menghambat fosforilasi STAT5 sel limfosit T, sehingga siklus sel tertahan. Hal ini berakibat pada hambatan aktivitas proliferasi sel limfosit T.

2. Menghambat jalur sinyal MAPK
3. Menghambat jalur NF- $\kappa$ B (*nuclear factor- $\kappa$ B*)

Nf-kb merupakan jalur utama dalam ekspresi sitokin pro-inflamasi, sehingga hambatan Nf-kb sel limfosit akan mereduksi pelepasan sitokin.

## **11. MSC supresi sel leukosit**

Neutrofil berperan utama dalam imunitas *innate*, terutama dalam mengeliminasi invasi agen bakteri melalui *respiratory burst*. Secara spesifik sel neutrofil merespon sitokin IL-8, f-MLP dan C5a yang dilepas selama inflamasi, sehingga menyebabkan peningkatan kemampuan fagosit, ekspresi molekul adhesi dan kemotaksis (rekrutmen neutrofil dengan pola IL-8 dan MIF *dependent*). Sekalipun demikian MSC tidak mempengaruhi kemampuan neutrofil dalam hal fagositosis, ekspresi molekul adhesi dan kemotaksis.

Secara spesifik peranan MSC dalam mensupresi sel neutrofil adalah sebagai berikut:

1. MSC memperkecil efek *respiratory burst* sel neutrofil.

Secara teoritis *respiratory burst* melepas ROS secara cepat. ROS berperan penting dalam mendegradasi partikel (mikroba) yang telah difagosit sel neutrofil. Sisi lain *respiratory burst* memicu proses inflamasi dan apoptosis bagi sel sekitar, sehingga efek *respiratory burst* yang diperlemah akan meredakan inflamasi, namun kemampuan fagositosis, ekspresi molekul adhesi dan kemotaksis tidak dipengaruhi.

2. MSC menunda program apoptosis sel neutrofil

Program apoptosis yang dijalankan sel neutrofil adalah dengan cara pelepasan IL-6 *dependent*, namun hal ini dihambat dengan keberadaan MSC. Berbagai penelitian melaporkan bahwa sel neutrofil yang terekrut dan teraktivasi dalam area inflamasi akan memiliki masa siklus kehidupan yang lebih panjang ketika dengan MSC.

3. MSC ikut terlibat dalam proses eliminasi mikroba bersama dengan leukosit

MSC bersama leukosit ikut berperan dalam eliminasi mikroba didasarkan atas penelitian yang menyebutkan bahwa stimulasi endotoksin bakterial mampu meningkatkan reseptor CXCR3-R MSC. Hal ini mengesankan bahwa MSC juga ikut terlibat dalam proses eliminasi mikroba bersama dengan sel leukosit.

## **12. MSC supresi sel NK**

Sel *natural killer* (NK) adalah sel efektor utama dari imun innate dalam mengeliminasi berbagai virus, mikroba dan sel tumor melalui aktifitas granzim B yang dilepas NK dengan dimediasi oleh sel limfosit sitotoksik, sehingga dikenal sebagai *NK-mediated target cell lysis*. Sisi lain NK juga memproduksi sitokin pro-inflamasi. Peranan MSC dalam menghambat NK aktif adalah sentral karena sel NK aktif mampu mengikat ligan MSC pada reseptor permukaannya, sehingga dapat mengeliminasi keberadaan MSC.

### **12.1 Kemampuan MSC lolos deteksi NK**

Kemampuan NK dalam memusnahkan sel target tergantung pada kadar molekul *major histocompatibility complex* (MHC) kelas I yang diekspresikan sel target tersebut. Kemampuan melisiskan sel target yang dimediasi sel NK berkorelasi terbalik dengan ekspresi HLA kelas I pada sel target tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa sel yang mengekspresikan MHC kelas I akan mudah dimusnahkan NK. Sisi lain MSC tidak mengekspresikan MHC kelas I, sehingga MHC sulit dikenali oleh program lisis sel NK, baik MSC yang berasal autologus maupun allogenik .

### **12.2 Peran MSC dalam supresi sel NK**

Secara spesifik MSC mensupresi sel NK melalui :

1. MSC menghambat proliferasi sel NK

MSC menghambat proliferasi sel NK dengan cara pelepasan molekul, sebagai berikut :

- 1) prostaglandin E2 (PGE2)

2) IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase)

3) sHLA-G5 (soluble HLA-G5)

2. MSC menghambat aktivitas sitotoksitas sel NK *resting*

MSC menghambat aktivitas sitotoksitas sel NK dengan cara menurunkan regulasi terhadap ekspresi protein NKp30 dan NK group 2, anggota D (NKG2D). Protein tersebut berperan sebagai aktivator reseptor target pemusnahan.

Hal ini dibuktikan dalam penelitian dimana inkubasi sel NK dengan IL-2 atau IL-15 dapat menyebabkan proliferasi sel NK yang dalam posisi *resting* akan memperoleh aktivitas sitotoksik yang kuat, namun sebaliknya ketika sel NK diinkubasi dengan MSC, maka kemampuan NK dalam memproduksi IFN $\gamma$  (produk molekul utama) hampir seluruhnya hilang. Fakta ini menunjukkan bahwa MSC sebagai inhibitor sel NK poten, sekalipun demikian sel NK yang dalam posisi *pre-activated* akan memperlihatkan daya resistensi terhadap efek immunosupresif MSC dibandingkan dengan sel NK *resting*.

## **Daftar Pustaka**

1. Frevert CW, Felgenhauer J, Wygrecka M, Nastase M V., Schaefer L. Danger-Associated Molecular Patterns Derived From the Extracellular Matrix Provide Temporal Control of Innate Immunity. *J Histochem Cytochem.* 2018;66(4):213–27.
2. Magna M, Pisetsky D. The Role of HMGB1 in the Pathogenesis of Inflammatory and Autoimmune Diseases. *Mol Med [Internet].* 2014;20(1):1.
3. Noll F, Behnke J, Leiting S, Troidl K, Alves GT, Müller-Redetzky H, et al. Self-extracellular RNA acts in synergy with exogenous danger signals to promote inflammation. *PLoS One.* 2017;12(12):1–17.
4. Collins SL, Black KE, Chan-Li Y, Ahn YH, Cole PA, Powell JD, et al. Hyaluronan fragments promote inflammation by down-regulating the anti-inflammatory A2a receptor. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;45(4):675–83.
5. Fumagalli M, Lecca D, Abbracchio MP, Ceruti S. Pathophysiological role of purines and pyrimidines in neurodevelopment: Unveiling new pharmacological approaches to congenital brain diseases. *Front Pharmacol.* 2017;8(DEC):1–18.
6. Lin Y-T, Verma A, Hodgkinson CP. Toll-Like Receptors and Human Disease: Lessons from Single Nucleotide Polymorphisms. *Curr Genomics.* 2012;13:633–45.
7. Drexler SK, Foxwell BM. The role of Toll-like receptors in chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol [Internet]. Elsevier Ltd;* 2010;42(4):506–18.
8. Prockop DJ, Youn Oh J. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): Role as guardians of inflammation. *Mol Ther [Internet]. Nature Publishing Group;* 2012;20(1):14–20.
9. Agrawal A, Agrawal S, Gupta S. Role of dendritic cells in inflammation and loss of tolerance in the elderly. *Front Immunol.* 2017;8(JUL):1–8.
10. Said A, Weindl G. Regulation of Dendritic Cell Function in Inflammation. *J Immunol Res.* 2015;2015.
11. Tai Y, Wang Q, Korner H, Zhang L, Wei W. Molecular mechanisms of T cells activation by dendritic cells in autoimmune diseases. *Front Pharmacol.* 2018;9(JUN):1–10.
12. Von Essen MR, Kongsbak M, Geisler C. Mechanisms behind functional avidity maturation in T cells. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012.
13. Qi Q, Liu Y, Cheng Y, Glanville J, Zhang D, Lee J-Y, et al. Diversity

- and clonal selection in the human T-cell repertoire. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 2014;111(36):13139–44.
14. Ankrum JA, Ong JF, Karp JM. Mesenchymal stem cells: Immune evasive, not immune privileged. *Nat Biotechnol*. 2014;32(3):252–60.
  15. English K, Barry FP, Mahon BP. Murine mesenchymal stem cells suppress dendritic cell migration, maturation and antigen presentation. *Immunol Lett*. 2008;115(1):50–8.
  16. Kudlik G, Hegyi B, Czibula Á, Monostori É, Buday L, Uher F. Mesenchymal stem cells promote macrophage polarization toward M2b-like cells. *Exp Cell Res [Internet]*. Elsevier; 2016;348(1):36–45.
  17. Rivera-Cruz CM, Shearer JJ, Figueiredo Neto M, Figueiredo ML. The immunomodulatory effects of mesenchymal stem cell polarization within the tumor microenvironment niche. *Stem Cells Int*. Hindawi; 2017;2017.
  18. Haddad R, Saldanha-araujo F. Mechanisms of T-Cell Immunosuppression by Mesenchymal Stromal Cells: What Do We Know So Far? *Biomed Res Int [Internet]*. 2014;2014:1–14.
  19. Yang SH, Park MJ, Yoon IH, Kim SY, Hong SH, Shin JY, et al. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp Mol Med*. 2009;41(5):315–24.
  20. Duffy MM, Ritter T, Ceredig R, Griffin MD. Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem Cell Res Ther*. 2011;2(4):1–9.
  21. Wang L, Zhao Y, Shi S. Interplay between mesenchymal stem cells and lymphocytes: Implications for immunotherapy and tissue regeneration. *J Dent Res*. 2012;91(11):1003–10.
  22. Qu M, Cui J, Zhu J, Ma Y, Yuan X, Shi J, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells suppress NK cell recruitment and activation in PolyI:C-induced liver injury. *Biochem Biophys Res Commun [Internet]*. Elsevier Ltd; 2015;466(2):173–9.

# **BAB XI**

## **IMUNOREGULASI MSC:**

### **POLARISASI MSC DALAM INFLAMASI**

#### **Tujuan**

---

Setelah membaca bagian ini, diharapkan pembaca dapat memahami tentang polarisasi MSC, MSC tipe-2 immunosupresif, mekanisme polarisasi MSC tipe-2 dan tipe-1, MSC tipe-1 pro-inflamatori, MSC supresi proses inflamasi, sirkuit jalur inflamasi JAK-STAT

MSC memiliki kemampuan imunoregulasi disamping sebagai regenerasi, sehingga dapat mempengaruhi respon imun inate dan adaptif. MSC memperlihatkan kedua efek yang berlawanan, yaitu anti-inflamasi dan pro-inflamasi. MSC yang terpapar mediator inflamasi IL-1, TNF- $\alpha$  atau IFN- $\gamma$  akan segera mensekresi molekul anti-inflamasi (IL-1ra, IL-10, TGF- $\beta$  PGE-2 dan TSG-6), namun seiring dengan menurunnya mediator inflamasi tersebut, maka sekresi molekul anti inflamasi juga menurun. Hal ini menunjukkan bahwa MSC mampu berperan sebagai imunoregulasi. Kemampuan ini disebabkan karena MSC memiliki properti seperti leukosit yaitu mengekspresikan reseptor TLR yang dapat merespon setiap molekul inflamasi dan mendorong polarisasi MSC menjadi tipe-2 atau tipe-1. Poliarisasi dimulai ketika MSC terpapar molekul pro-inflamasi yang berakibat aktivasi jalur NF- $\kappa$ B via MyD88, sehingga mensekresi molekul pro-inflamatori COX-2, kemudian menginduksi PGE2 sehingga jalur TRIF dan IRF-3 teraktivasi. Hal ini menyebabkan transkripsi molekul anti inflamatori, terutama IL-1ra, IL-10 dan TGF- $\beta$ . MSC dengan perilaku demikian dikenal sebagai MSC tipe-2. Secara spesifik MSC tipe-2 ini ditandai dengan ekspresi TLR-3, CXCR3, IL-1R dan TNFR.

Catatan penulis

## 1. Latar belakang

Pemahaman bahwa MSC dapat berperan sebagai *guardian of inflammation* muncul secara bertahap dalam beberapa penelitian dekade terakhir. Hal ini mendorong perubahan dramatis pada hipotesis banyak penelitian. MSC yang awalnya dieksplorasi sebagai sel dengan fungsi reparasi dan regenerasi, namun kini telah bergeser ke arah imunoregulasi dengan kemampuan supresi inflamasi, sehingga mampu meredakan inflamasi dan mempercepat fase regenerasi. Data penelitian menunjukkan bahwa pemberian MSC IV tidak menunjukkan peningkatan *engraftment* MSC pada area cedera secara signifikan. Tampak sebagian kecil saja yang berada pada area cedera dalam waktu yang singkat yaitu 24 jam paska IV. Sekalipun

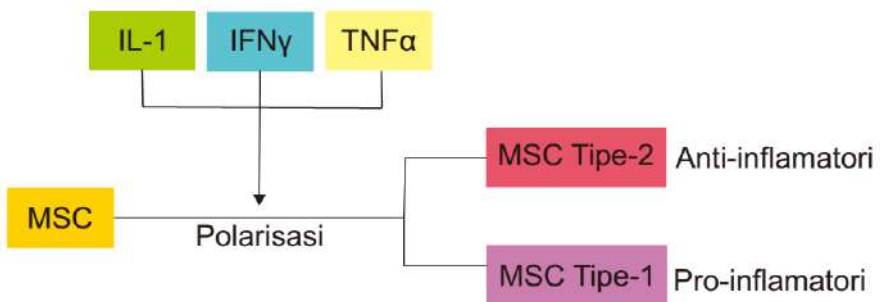
demikian selama waktu singkat ini, tetap terjadi perbaikan jaringan secara bermakna. Hal ini menunjukkan bahwa MSC tetap mampu melakukan komunikasi *crostalk* dengan berbagai molekul yang dilepas sel radang sekitar area cedera, sekalipun dalam waktu singkat.

## 2. Polarisasi MSC

Polarisasi adalah perubahan fenotip dan fungsi suatu sel menjadi bentuk lain akibat stimulasi molekul tertentu. Kemampuan polarisasi dimiliki oleh sel leukosit. MSC memiliki properti seperti leukosit sehingga juga mampu berpolarisasi menjadi MSC tipe-2 dengan fenotip anti-inflamatori dan atau MSC tipe-1 pro-inflamatori.

### 2.1 Pengertian polarisasi MSC

Polarisasi MSC adalah perubahan fenotip suatu MSC menjadi bentuk lain, baik secara karakter maupun fungsional. Secara spesifik MSC dapat berpolarisasi menjadi 2 fenotip, yaitu MSC tipe-2 dan atau MSC tipe-1 tergantung pada tipe dan kadar molekul inflamatori (IL-1/ IFN $\gamma$ / TNF $\alpha$ ) yang menstimulasi. Kadar mediator inflamatori tinggi mendorong MSC terpolarisasi menjadi MSC tipe-2 dan sebaliknya. Polarisasi MSC dijelaskan pada gambar di bawah ini.



Gambar 120. Polarisasi MSC

Paparan molekul stimulator (IL-1, IFN $\gamma$  dan TNF $\alpha$ ) menyebabkan MSC terpolarisasi menjadi fenotip MSC tipe-2 yang berkarakter anti-

inflamatori dan atau MSC tipe-1 yang bersifat pro-inflamatori tergantung pada kadar molekul stimulator tersebut.

## **2.2 Faktor polarisasi MSC**

Polarisasi MSC dipengaruhi oleh tingkat konsentrasi IL-1, IFN $\gamma$  dan TNF $\alpha$  (mediator poten) yang menstimulasinya, disamping jenis reseptor TLR yang diekspresikan MSC. Proses polarisasi terjadi secara kompleks dan rumit, dimulai dengan polarisasi MSC menjadi tipe-1 terlebih dahulu, kemudian berlanjut menjadi MSC tipe-2, yang akan dibahas secara detail pada mekanisme polarisasi MSC.

Secara sistematis faktor polarisasi MSC dibagi menjadi 2, yaitu:

### **1. Mediator inflamasi; TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ atau IL-1 dan dsRNA**

Konsentrasi TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  dan IL-1 dapat mempengaruhi polarisasi MSC menjadi MSC tipe-1 atau MSC tipe-2 tergantung pada tingkat kadar molekul tersebut. Secara spesifik polarisasi MSC tipe-2 juga dapat distimulasi oleh molekul dsRNA (*double stranded RNA*) asal virus *niche*, disebabkan karena dsRNA juga mampu menstimulasi reseptor TLR-3 MSC.

### **2. Reseptor MSC; TLR-3 dan TLR-4**

Reseptor TLR diekspresikan MSC dengan tujuan untuk mendeteksi keberadaan molekul inflamasi, kemudian mengikatnya. Komplek pengikatan TLR-molekul inflamasi ini secara kaskade akan mengaktifasi jalur inflamasi hingga kemudian menginduksi polarisasi MSC. Polarisasi MSC dimulai dengan menjadi MSC tipe-1 menggunakan reseptor TLR-4 dan berlanjut menjadi MSC tipe-2 melalui reseptor TLR-3.

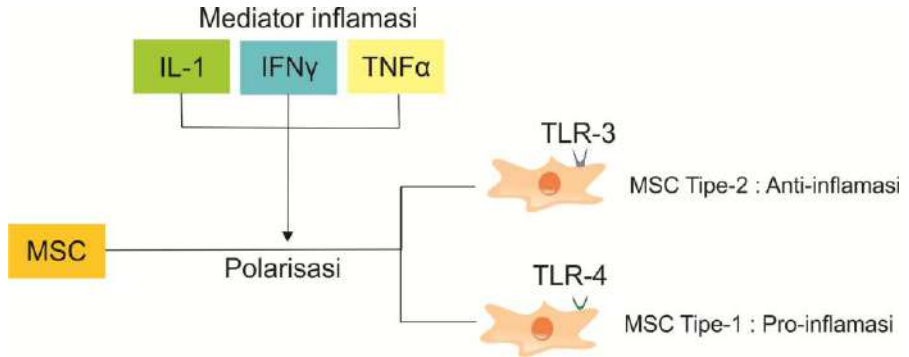
## **2.3 Bentuk polarisasi MSC**

Bedasarkan konsentrasi molekul IL-1, TNF $\alpha$  dan IFN $\gamma$  yang menstimulasi reseptor TLR-MSC, maka polarisasi MSC dibagi menjadi 2 tipe yaitu :

### **1. MSC tipe-1: reseptor TLR-4**

## 2. MSC tipe-2: reseptor TLR-3

Reseptor TLR-3 dan TLR-4 dijelaskan pada gambar di bawah ini.



Gambar 121. TLR-3 dan TLR-4

Paparan mediator inflamatori poten (IL-1, IFN $\gamma$  dan TNF $\alpha$ ) dengan konsentrasi tinggi menyebabkan polarisasi MSC menjadi fenotip MSC tipe-2 yang mengekspresikan reseptor TLR-3 (anti-inflamatori), sebaliknya paparan mediator inflamasi konsentrasi rendah akan menyebabkan MSC terpolarisasi menjadi MSC tipe-1 yang mengekspresikan reseptor TLR-4 (pro-inflamatori).

## 3. MSC tipe-2: immunosupresif

Mediator inflamatori poten IL-1, TNF- $\alpha$  atau IFN- $\gamma$  berperan aktif dalam menginisiasi kaskade jalur inflamasi sel radang. Sisi lain mediator tersebut juga dapat memicu sel radang aktif dan merekrut sel radang sistemik sehingga terbentuk suasana inflamasi akut. MSC merespon mediator inflamasi dengan cara mengikat molekul tersebut melalui reseptor IL-1R untuk IL-1 atau TNF-R untuk TNF- $\alpha$  sehingga dapat mengaktifasi jalur utama inflamasi NF- $\kappa$ B untuk mensekresikan molekul proinflamasi COX-2, sehingga polarisasi MSC fase demikian disebut MSC tipe-1. Sisi lain COX-2 juga menginduksi PGE2 yang akan mengaktifasi jalur TRIP-TRAM yang berakhir dengan sekresi IL-1ra, IL-10 dan TGF- $\beta$ . Polarisisasi MSC tipe demikian dikenal sebagai MSC tipe-2.

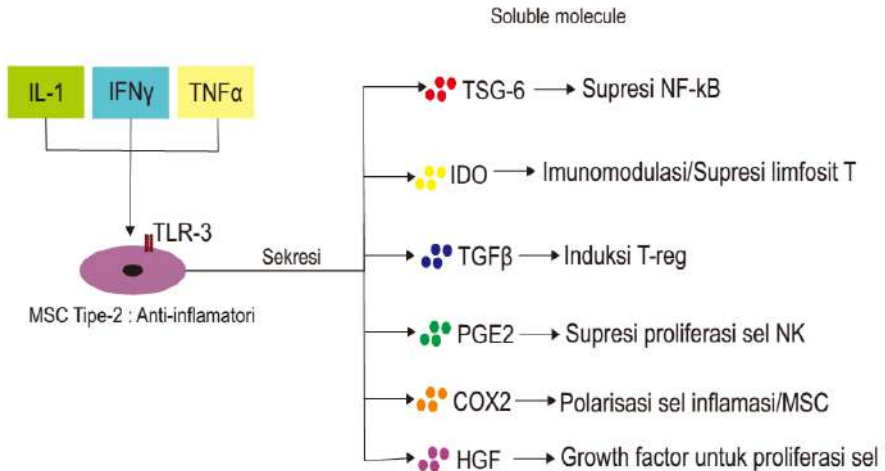
### 3.1 Pengertian MSC tipe-2

MSC tipe-2 adalah MSC yang terpolarisasi menjadi tipe-2 dengan ekspresi TLR-3 yang berkaraktersistik immunosupresif (anti-inflamatori terutama terhadap proliferasi sel T) paska paparan IL-1, TNF- $\alpha$  atau IFN- $\gamma$  kadar tinggi (dilepas sel dendritik residen aktif).

### 3.2 MSC tipe-2 : sekresi *soluble molecule*

Secara teoritis MSC tipe-2 akan melepas berbagai *soluble molecule* immunosupresif tertentu paska terpapar molekul inflamasi poten (IL-1, TNF- $\alpha$  atau IFN- $\gamma$ ) kadar tinggi. Sekalipun demikian MSC tipe-2 tidak hanya mensekresi *soluble molecule* yang bersifat immunosupresif saja, namun juga mensekresi molekul yang bersifat pro-regenerasi seperti PDGF, VEGF, IGF.

Secara spesifik *soluble molecule* yang disekresi MSC tipe-2 dengan karakter immunosupresif dijelaskan pada gambar dibawah ini.

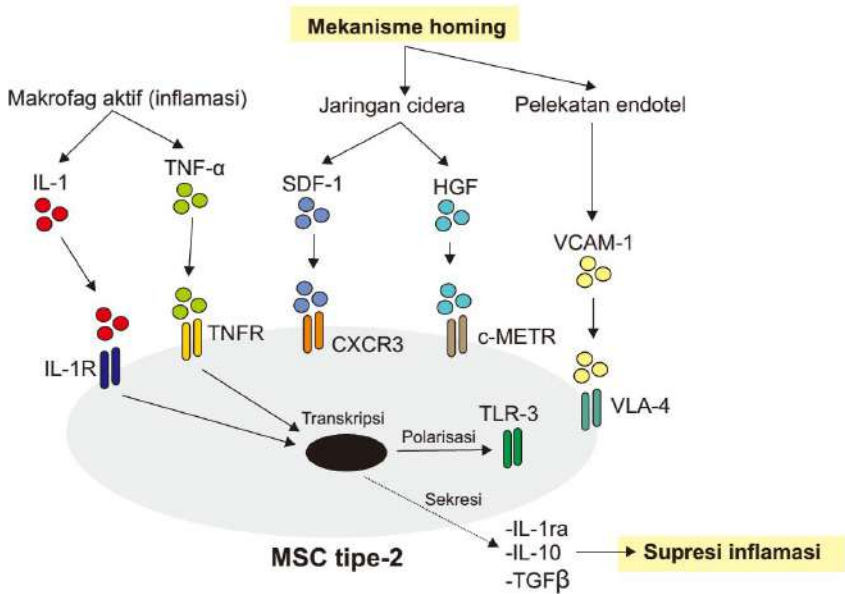


Gambar 122. *Soluble molecule* MSC Tipe-2

MSC tipe-2 paska terpapar IL-1, TNF- $\alpha$  dan IFN- $\gamma$  akan mensekresi TSG-6 dengan fungsi mensupresi jalur NF-kB, IDO untuk mensupresi limfosit T, TGF $\beta$  untuk menginduksi T-reg, PGE2 untuk mensupresi proliferasi sel NK, COX2 untuk polarisasi sel inflamasi/ MSC dan HGF sebagai *growth factor* bagi proliferasi seluler (pro-regenerasi). MSC juga mensekresi molekul pro-regenerasi lainnya.

### 3.3 Tipe reseptor MSC tipe-2

Secara spesifik MSC tipe-2 mengekspresikan reseptor TLR-3, sekalipun demikian MSC tipe-2 juga mengekspresikan berbagai reseptor lainnya seperti pada gambar di bawah ini.



Gambar 123. Reseptor MSC tipe 2

MSC tipe-2 mengekspresikan reseptor TLR-3 untuk menghasilkan molekul immunosupresif. MSC tipe-2 juga mengekspresikan IL-1R dan TNFR yang dapat mengikat IL-1 dan TNF- $\alpha$ , serta mengekspresikan CXCR3-R dan c-METR untuk mengikat SDF-1 dan HGF (*soluble molecule* yang dilepas dari jaringan cedera). Sisi lain MSC tipe-2 mensekresi VLA-4 dan CD44 yang mengikat VCAM dan P-selectin yang diekspresikan sel endotel aktif.

### 4. Mekanisme polarisasi MSC tipe-2

Mekanisme molekuler polarisasi MSC tipe-2 sangat kompleks dan hingga kini belum bisa diungkap dengan jelas. Kami mencoba

untuk menguraikan mekanisme polarisasi MSC tipe-2 paska terpapar mediator inflamasi menjadi 2 tahapan, sebagai berikut:

1. Respon initial MSC paska inflamasi: polarisasi MSC tipe-1
2. Respon lanjut MSC polarisasi MSC tipe-2

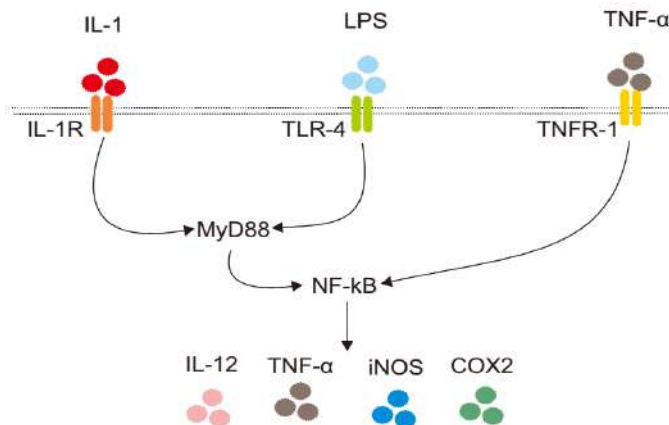
## 5. Respon *initial* MSC: polarisasi MSC tipe-1

Hasil penelitian terkini mengungkapkan bahwa inflamasi diinisiasi oleh 2 molekul utama yaitu:

1. Pelepasan IL-1 $\alpha$  yang berperan sentral dalam inflamasi steril melalui stimulasi molekul *danger* DAMP (jaringan luka steril)
2. Pelepasan TNF- $\alpha$  pada inflamasi infeksius melalui stimulasi molekul *danger* PAMP (jaringan cedera infeksius.)

### 5.1 Respon *initial* MSC paska inflamasi: MSC tipe-1

Keberadaan IL-1 akan dideteksi dan diikat oleh reseptor IL-1R, sedangkan TNF- $\alpha$  oleh TNFR yang diekspresikan MSC. Secara spesifik pengikatan IL-1 dan LPS akan mengaktivasi jalur NF- $\kappa$ B via protein MyD88, sedangkan TNF- $\alpha$  dapat secara langsung mengaktivasi jalur NF- $\kappa$ B. Hal ini menunjukkan bahwa jalur NF- $\kappa$ B menjadi sentral dalam inisiasi proses polarisasi MSC.



Gambar 124. Aktivasi jalur inflamasi NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B teraktivasi oleh jalur MyD88 via stimulasi IL-1 dan LPS dan atau jalur TNFR-1/TNF- $\alpha$ . Jalur NF- $\kappa$ B teraktivasi akan mentranskripsi sitokin proinflamasi TNF- $\alpha$ , IL-12, COX-2 dan iNOS.

## **5.2 Respon initial MSC: konsep NF- $\kappa$ B**

NF- $\kappa$ B merupakan heterodimer (protein Rel dan p50) yang dalam keadaan normal berada pada posisi inaktif di dalam sitosol. Sekalipun demikian NF- $\kappa$ B tidak membutuhkan protein lain dalam menjalankan aktivitasnya, sehingga termasuk kelompok *rapid-acting molecule*. NF- $\kappa$ B teraktivasi akan memasuki nukleus untuk mentranskripsi berbagai gen target yang bersifat pro-inflamasi.

NF- $\kappa$ B berperan dalam proses inflamasi dengan mentranskripsi sitokin proinflamasi TNF- $\alpha$ , IL-12, COX-2 dan iNOS.

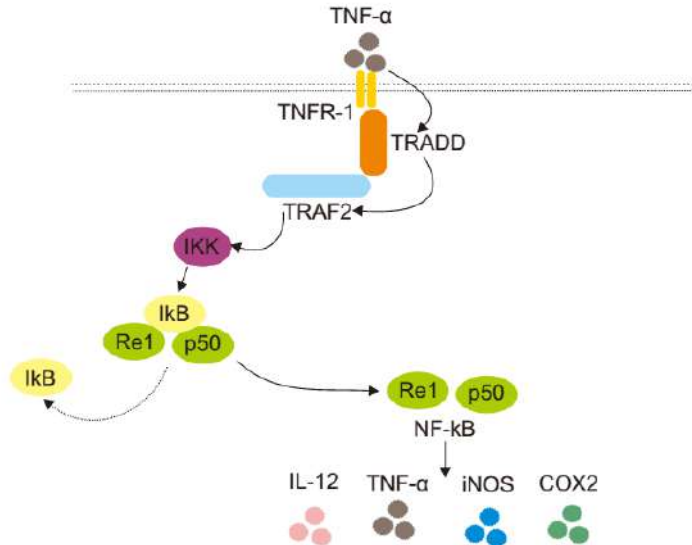
Secara spesifik NF- $\kappa$ B dapat teraktivasi oleh berbagai molekul ligan ekstraseluler yang dilepas sel radang (disamping radiasi ionisasi dan Ros), yaitu:

1. IL-1 dan LPS melalui jalur inflamasi MyD88
2. TNF- $\alpha$  melalui jalur inflamasi TNFR

## **5.3 Respon initial MSC: jalur TNF- $\alpha$ / TNFR**

Secara teoritis TNF- $\alpha$  merupakan molekul sitokin pro-inflamatori poten yang berperan penting dalam mengaktivasi jalur NF- $\kappa$ B. Secara spesifik proses aktivasi jalur NF- $\kappa$ B dimulai dengan pengikatan TNF- $\alpha$  pada reseptor TNF-R. Hal ini menyebabkan fosforilasi reseptor sehingga menyebabkan protein TRADD (*tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain*) terdisosiasi. Protein TRADD kemudian merekrut TRAF2 (*TNF receptor-associated factor-2*) yang kemudian memicu aktivasi IKK sehingga memecah NF- $\kappa$ B menjadi molekul bebas dan aktif memasuki nukleus untuk mentranskripsi protein proinflamasi. Berbagai molekul inflamasi yang disekresi diantaranya adalah sitokin TNF- $\alpha$ , IL-12, COX-2 dan iNOS.

Aktivasi jalur NF- $\kappa$ B via TNF- $\alpha$ /TNFR dijelaskan pada gambar di bawah ini.



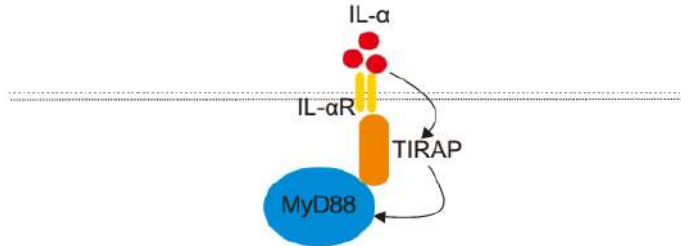
Gambar 125. Aktifasi jalur NF- $\kappa$ B

Pengikatan TNF- $\alpha$  pada TNFR-1 menyebabkan disosiasi protein TRADD. Protein TRADD kemudian merekrut TRAF2 yang dapat memicu aktivasi IKK sehingga dapat memecah NF- $\kappa$ B menjadi molekul aktif yang dapat memasuki nukleus untuk mentranskripsi berbagai molekul proinflamasi seperti sitokin TNF- $\alpha$ , IL-12, COX-2 dan iNOS.

#### 5.4 Respon initial MSC: jalur IL-1 $\alpha$

Pengikatan IL-1 $\alpha$  dengan reseptor IL-1 $\alpha$ R menyebabkan reseptor IL-1 $\alpha$ R teraktivasi yang kemudian berjalan menuju domain sitoplasmik reseptor *Toll/ Interleukin-1* (domain TIR). Keadaan ini menyebabkan TIRAP aktif. Protein TIRAP adalah protein yang menghubungkan antara reseptor IL-1R yang teraktivasi dengan protein MyD88 sitoplasmik. Hal ini menyebabkan protein MyD88 teraktivasi.

Respon initial MSC melalui jalur MyD88 dijelaskan pada gambar dibawah ini.



Gambar 126. Respon initial MSC: MyD88

## 5.5 Respon initial MSC: MyD88

Protein MyD88 adalah suatu protein adaptor yang berfungsi sebagai penerima sinyal *downstream* dari ikatan kompleks ligan-reseptor TLR/ IL-1R untuk kemudian diteruskan secara kaskade pada jalur protein kinase sinyal transduksi intraseluler menuju nukleus, sehingga dapat ditranskripsi berbagai gen terkait dengan inflamasi. Jalur inflamasi MyD88 dapat diaktivasi melalui pengikatan IL-1 pada reseptor IL-1R MSC dan atau pengikatan LPS pada reseptor TLR-4 MSC. Secara kimia domain intraseluler reseptor TLR (ekor sitoplasmik) sendiri adalah area *Toll- interleukin-1 receptor*(TIR), yaitu sebagai area penerus fosforilasi dari reseptor teraktivasi IL-1 atau IL-8 kepada protein adaptor intraseluler (inisiasitor sinyal intraseluler).

Secara spesifik aktivasi jalur MyD 88 melalui tahapan sebagai berikut:

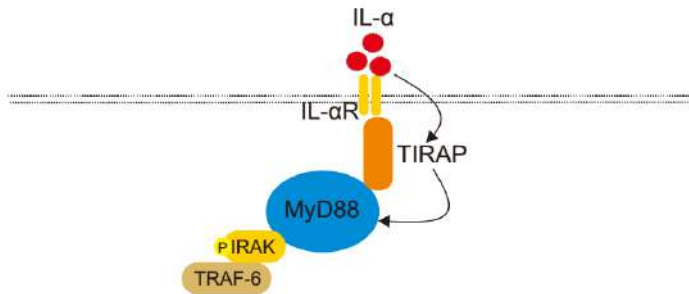
1. Jalur IRAK dan TRAF-6
2. Jalur IRAK-1/TRAF-6 /TAK-1/TAB-1/TAB-2

## 5.6 Respon initial MSC: IRAK dan TRAF-6

Protein MyD88 teraktivasi berinteraksi secara langsung dengan protein *IL-1R-associated kinase* (IRAK) dan sekali IRAK

terfosforilasi maka merekrut protein adaptor lain yaitu *TNF receptor-associated factor 6* (TRAF-6) sehingga menjadi kompleks IRAK-1-TRAF6 dan kemudian berdisosiasi dari kompleks IL-1R, sehingga kompleks IRAK-1-TRAF6 terbebas dan dapat berinteraksi dengan kompleks protein lain.

Pengikatan IRAK dan TRAF-6 dijelaskan pada gambar di bawah ini.

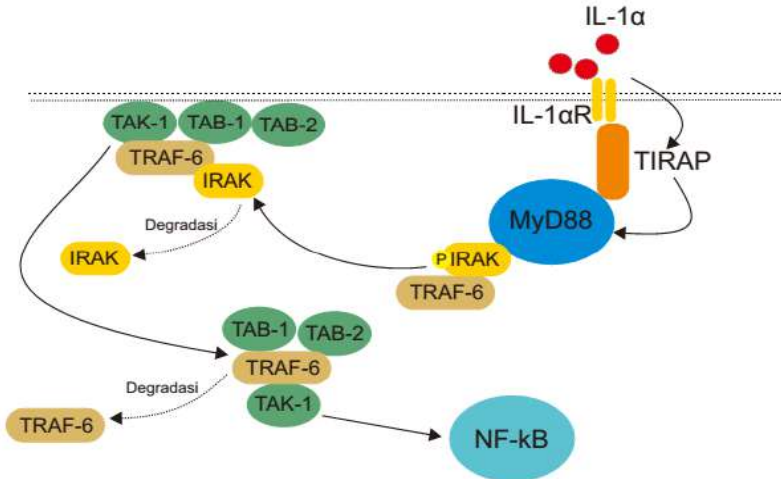


Gambar 127. Respon initial MSC: IRAK dan TRAF-6

## 5.7 Respon initial MSC: IRAK-1/TRAF-6 /TAK-1/TAB-1/TAB-2

Kompleks IRAK-1/TRAF-6 bebas dapat berinteraksi dengan kompleks protein yang sudah ada dalam membran plasma yaitu *TGF-β activated kinase 1* (TAK-1), TAB-1 dan TAB-2, sehingga membentuk kompleks IRAK-1/ TRAF-6/ TAK1/ TAB-1/ TAB-2 dan melekat pada membran. TAK-1 adalah protein *mitogen-activated protein kinase kinase kinase* (MAPKKK). IRAK-1 kemudian didegradasi secara ubiquinasi, sehingga tinggal kompleks TRAF-6/ TAK1/ TAB-1/ TAB-2 yang bergerak bebas dalam sitoplasmik. Sekali kompleks TRAF-6/ TAK1/ TAB-1/ TAB-2 berada dalam sitoplasmik, maka TRAF6 akan didegradasi sehingga memicu aktivasi protein TAK1 kinase yaitu jalur transkripsi NF-κB.

Respon *initial* MSC IRAK/TRAF6/TAK-1/TAB-1/2 dijelaskan pada gambar di bawah ini.



Gambar 128. Respon initial MSC: IRAK/TRAF-6/TAK-1/TAB-1/2

## 6. Respon lanjut MSC: polarisasi MSC tipe-2

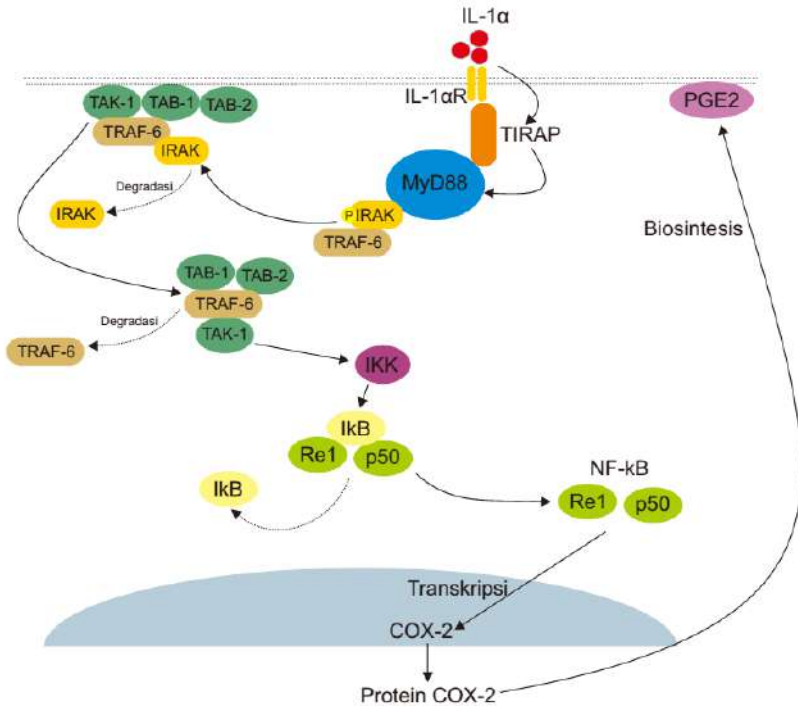
Respon lanjut MSC dimulai dengan pelepasan *Cyclooxygenase-2* (COX-2) via jalur Nf-Kb. COX-2 adalah protein enzim *myeloperoxidase* yang berlokasi di RE dan membran nuklear dengan fungsi mengkatalisis proses yang membatasi laju biosintesis prostaglandin dari sumber *arachidonic acid*. Proses ini mengakibatkan konversi *arachidonic acid* yang dilepas membran plasma (via *phospholipase A2*) menjadi prostaglandin G2, kemudian menjadi prostaglandin H2. Hal ini menunjukkan bahwa COX-2 mampu menginduksi biosintesis PGE2.

### 6.1 Respon lanjut MSC: COX-2 induksi PGE2

Respon lanjut MSC dimulai dengan pelepasan COX-2 via jalur NF-κB, disebabkan karena COX-2 memiliki area promotor untuk respon element NF-κB dan IL-6. Pelepasan COX-2 menyebabkan peningkatan produksi PGE2 (sebagai salah satu produksi utama COX-2). PGE2 secara autokrin akan mengikat

reseptor EP-1, EP-2, EP-3, dan EP-4 MSC, sehingga mengaktifasi jalur TRIP-TRAM.

Mekanisme COX-2 dalam induksi biosintesis PGE2 dijelaskan pada gambar di bawah ini.



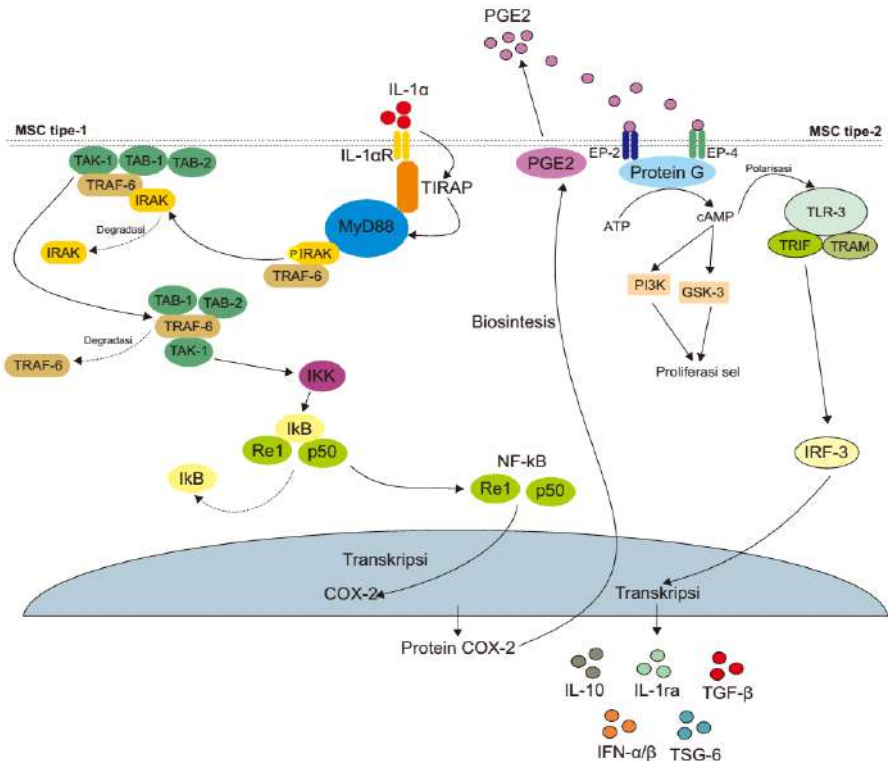
Gambar 129. Respon lanjut MSC: COX2 induksi PGE2

## 6.2 Respon lanjut MSC: TRIP-TRAM

Secara spesifik PGE2 mengikat reseptor EP2 dan EP4 MSC, yaitu reseptor terkait dengan protein G, yang dapat mengaktifasi *adenylate cyclase*, sehingga menyebabkan peningkatan cAMP. Molekul cAMP kemudian mengaktifasi berbagai jalur PI3K (aktivitas proliferasi) dan GSK3 (aktivitas  $\beta$ -catenin siklus sel), disamping mengkativasi jalur TRIP-TRAM. Protein TRIF merupakan satu-satunya protein adaptor yang digunakan dalam aktivasi jalur TLR-3. Secara spesifik TLR-3 adalah CD283 yaitu protein reseptor

anggota family TLR yang berada dalam sitoplasmik. TRIF yang teraktivasi dapat menginduksi aktivasi jalur IRF-3 (*interferon regulatory factor-3*) yang kemudian memasuki nukleus untuk mentranskripsi protein target anti-inflamatori, terutama IL-1ra, IL-10 dan TGF- $\beta$ . Proses ini dikenal sebagai polarisasi MSC dari MSC tipe-1 (pro-inflamasi) menjadi MSC tipe-2 (anti-inflamasi).

Polarisasi MSC tipe-2 secara jelas dijelaskan pada gambar di bawah ini.



Gambar 130. Polarisasi MSC

## 7. MSC tipe-1: Pro-inflamatori

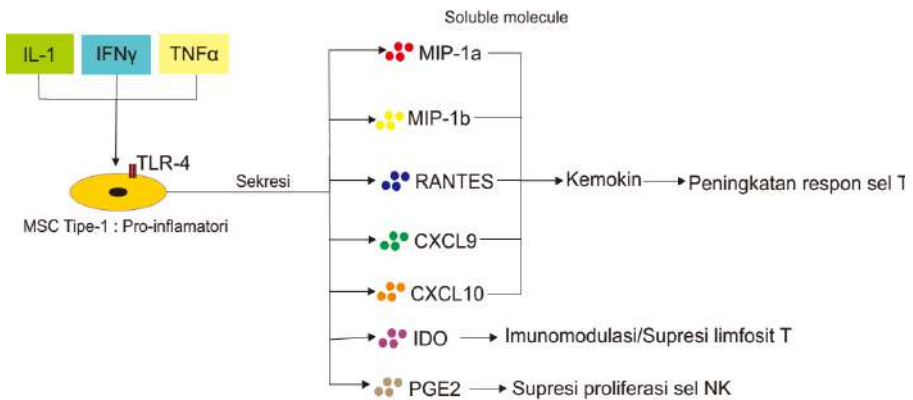
### 7.1 Pengertian MSC tipe-1

MSC tipe-1 adalah MSC yang mengekspresikan reseptor

TLR-4 dengan karakteristik promosi proliferasi sel T (pro-inflamatori). MSC tipe-1 terbentuk akibat paparan IL-1, TNF- $\alpha$  atau IFN- $\gamma$  (molekul pro-inflamatori) dalam konsentrasi rendah pada reseptor TLR-4 MSC.

## 7.2 MSC tipe-1 : sekresi *soluble molecule*

Secara teoritis MSC juga dapat merespon pro-inflamasi IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$  dan IFN $\gamma$  dalam konsentrasi rendah. Hal ini dapat menyebabkan polarisasi MSC menjadi MSC tipe-1 yang dapat mensekresikan berbagai *soluble molecule*, seperti dijelaskan pada gambar di bawah ini.



Gambar 131. *Soluble molecule* MSC Tipe-1

MSC tipe-1 paska terpapar IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$  dan IFN $\gamma$  mampu mensekresi molekul: MIP-1a, MIP-1b, RANTES, CXCL9, CXCL10 (kemokin) yang berperan untuk meningkatkan respon sel T. Sisi lain MSC tipe-1 juga mensekresikan IDO yang berperan sebagai imunomodulasi limfosit T dan PGE2 sebagai supresi proliferasi NK.

## 7.3 Polarisasi MSC tipe-1

MSC tipe-1 terjadi akibat stimulasi molekul pro-inflamatori IL-1, TNF $\alpha$  dan atau IFN $\gamma$  dalam konsentrasi rendah pada reseptor TLR4-MS. Secara sistematis proses polarisasi dimulai dengan berikatannya molekul TNF $\alpha$  atau IFN $\gamma$  konsentrasi rendah pada reseptor TLR4-MS. Ikatan ini menyebabkan MSC beradaptasi dan

kemudian terpolarisasi (berubah) menjadi MSC tipe-1.

#### **7.4 Karakteristik molekuler MSC tipe-1**

MSC tipe-1 secara aktif akan mensekresikan berbagai *soluble molecule*, sebagai berikut, yaitu:

1. Kemokin dalam kadar tinggi

Pelepasan kemokin berakibat pada peningkatan respon sel T dalam hal perekrutan limfosit menuju situs inflamasi, sehingga menyebabkan aktivasi sinyal pro-inflamasi. Berbagai kemokin yang disekresikan MSC tipe-1 dalam jumlah besar, antara lain:

- 1) MIP-1a
- 2) MIP-1b
- 3) RANTES
- 4) CXCL9
- 5) CXCL10

2. Molekul IDO/iNOS dan PGE2 dalam kadar rendah

Molekul iNOS atau IDO dalam konsentrasi rendah menyebabkan kemampuan MSC dalam supresi sel T berkurang dan hilang, sehingga terjadi proliferasi sel T aktif. Sisi lain terjadi penurunan regulasi ligan *Notch*. Hal ini dibuktikan dengan penelitian bahwa hambatan iNOS atau *ablasi genetic* iNOS dapat berdampak pada peningkatan proliferasi sel T oleh MSC.

### **8. MSC supresi proses inflamasi**

Secara teoritis MSC merespon inflamasi ketika terpapar berbagai molekul pro-inflamasi, terutama IL-1 $\alpha$  yang dilepas sel makrofag residen dan sel dendritik pada area cedera. Respon MSC terhadap inflamasi tersebut berupa supresi sel makrofag residen dan sel dendritik matur. Hal ini menunjukkan bahwa respon MSC, terutama melalui aktivasi jalur IL-1.

#### **8.1 MSC mensekresi IL-1ra: anti inflamasi**

Seiring dengan aktivasi berbagai sel radang maka berbagai

mediator inflamasi poten, seperti IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  dilepas pada area cedera, disamping molekul *danger* dari jaringan cedera dan nekrosis. Keberadaan mediator inflamasi dan molekul *danger* ini dalam jumlah tinggi dapat mengaktivasi MSC. MSC merespon melalui reseptor TLR. Keberadaan reseptor TLR dalam MSC dimungkinkan karena adanya kesamaan karakteristik antara sel radang dengan MSC.

Secara spesifik MSC merespon inflamasi dengan cara mengikat molekul tersebut (IL-1) melalui reseptor TLR yang berakhir dengan disekresinya IL-1 *receptor antagonist* (IL-1ra). Reseptor IL-1ra ini akan berkompetisi dengan IL-1 dalam mengikat reseptor IL-1R sel radang/ MSC, sehingga IL-1ra pada konsentrasi tinggi akan mendominasi pengikatan reseptor IL-1R. Hal ini menyebabkan IL-1 yang dilepas sel radang tidak lagi mampu mengaktivasi sel radang, yang menyebabkan hambatan pelepasan sitokin pro-inflamasi sehingga inflamasi mereda.

## **9. MSC supresi inflamasi pada *animal* model**

Berbagai hasil penelitian bahwa MSC memiliki efek mempercepat penyembuhan penyakit melalui supresi inflamasi pada berbagai kasus *animal* model seperti pada penjelasan di bawah ini.

### **9.1 Anti-inflamasi pada model tikus fibrosis paru**

Pemberian MSC tertentu (dosis  $5 \times 10^5$  sel) secara IV bersamaan dengan pemberian *bleomycin* pada tikus model cedera paru, mampu mencegah munculnya fibrosis paru dibandingkan kelompok kontrol. *Bleomycin* sendiri merupakan agen kemotoksik yang dapat menyebabkan inflamasi hebat terhadap paru, sehingga digunakan sebagai penginduksi fibrosis paru pada model hewan coba. Hal ini menunjukkan bahwa MSC mampu mencegah berkembangnya fibrosis dengan cara mensupresi proses inflamasi paru yang terjadi paska pemberian *bleomycin* melalui sekresi IL-1ra. Sitokin IL-1ra bersifat anti-inflamasi dengan cara memperlemah efek IL-1 (pro-inflamasi)

melalui kompetisi dengan reseptor IL-1R.

## **9.2 Anti-inflamasi pada model tikus infark miokard**

Pemberian MSC dosis tertentu ( $2 \times 10^6$  sel) secara IV mampu menurunkan respon inflamasi secara signifikan pada tindakan ligasi permanen arteri koronaria, disamping memperkecil ukuran infark dan memperbaiki fungsi ventrikel jantung 3 minggu kemudian. Hasil penelitian ini mengungkapkan bahwa hanya sebagian kecil saja dari MSC yang berada pada area injuri ( $1500$  dari  $2 \times 10^6$  sel) dan bersifat sementara (24 jam dan menghilang setelah 48 jam). Sisi lain hasil penelitian ini menemukan bahwa sebagian besar MSC terjebak dalam paru sebagai mikro emboli dengan waktu paruh 24 jam.

Hal ini menunjukkan bahwa perbaikan yang terjadi bukan akibat proses *homing* MSC pada area cedera pada jantung (area ligasi arteri koronaria). Sekalipun demikian proses perbaikan tetap terjadi paska pemberian MSC, meskipun sebagian besar terjebak di area paru. Hal ini ditunjukkan dengan pemeriksaan tingkat genetik yang menunjukkan bahwa terjadi peningkatan ekspresi lebih dari 50 gen anti-inflamasi dengan karakteristik MSC, diantaranya adalah *TNF- $\alpha$  stimulated gene/protein-6* (TSG-6). Temuan ini menguatkan bahwa MSC berperan sentral dalam mensupresi inflamasi dan mempercepat fase regenerasi, sehingga mengakselerasi proses penyembuhan.

## **9.3 Anti-inflamasi pada model cedera kornea.**

Pemberian MSC dosis tertentu ( $1 \times 10^6$  sel) secara IV pada model cedera kornea mampu menurunkan respon inflamasi secara signifikan, ditandai dengan penurunan infiltrasi neutrofil dan reduksi produksi sitokin pro-inflamatori serta mencegah perkembangan *opacity* dalam kornea. Perbaikan ini sejalan dengan disekresinya TSG-6, namun bukan akibat proses *engraftment* MSC pada kornea. Hal ini disebabkan karena MSC yang berada di kornea hanya sebagian kecil saja (kurang dari 10 buah). Sisi lain perbaikan juga akan terjadi ketika dilakukan penyuntikan hanya dengan rhTSG-6 dengan dosis dependen. Temuan ini menunjukkan bahwa perbaikan

yang terjadi pada kornea, terjadi akibat dari proses parakrinisasi MSC melalui pelepasan anti-inflamasi TSG-6 bukan akibat dari proses *homing* MSC.

## **10. Sirkit jalur inflamasi JAK-STAT**

### **10.1 Pengertian jalur JAK-STAT**

Jalur JAK-STAT adalah jalur yang menghantarkan molekul sinyal ligan kimia (molekul *danger*) dari ekstraseluler ke dalam intraseluler menuju nukleus, dengan tujuan mentranskripsi gen terkait proses imunitas, disamping pembelahan, kematian, dan pembentukan tumor.

Secara sistematis jalur sinyal JAK-STAT dibagi menjadi 4 bagian, yaitu:

1. Reseptor domain ekstraseluler: TLR-ligan kimia
2. Reseptor domain intraseluler TIR: *Janus kinases* (JAK)
3. Sitoplasmik: *Signal transducer and activator transcription* (STAT)
4. Nukleus: aktivasi STAT.

### **10.2 Reseptor domain ekstraseluler: TLR-ligan**

Pengikatan molekul sinyal ligan (interferon atau interleukin) pada domain ekstraseluler reseptor permukaan sel menyebabkan reseptor TLR teraktivasi (dimerisasi) yang kemudian terus berjalan menuju domain intraseluler, sehingga mencapai *receptor-associated JAK*. Hal ini menyebabkan JAK yang berada dalam reseptor intraseluler terfosforilasi dan aktif. JAK aktif akan transfosforilasi pada area loop aktivasi (residu tirosin), sehingga terjadi peningkatan aktivitas domain kinase. Hal ini menghasilkan situs pengikatan untuk protein tertentu yaitu protein dengan domain SH2 (termasuk protein STAT).

### **10.3 Aktivasi STAT sitoplasmik**

STAT memiliki protein domain SH2 sehingga STAT dapat mengikat tirosin terfosforilasi pada situs pengikatan. STAT yang terikat pada situs ini kemudian difosforilasi oleh JAK sehingga STAT terdisosiasi dari reseptor, menjadi bebas dan aktif membentuk hetero atau homodimer. Komplek hetero/homodimer STAT ini kemudian translokasi ke nukleus untuk menginduksi transkripsi gen target.

### **10.4 Aktivitas STAT nukleus**

Secara spesifik untuk mencapai nukleus, STAT harus melalui *nuclear pore complexes* (NPC) yaitu protein kompleks yang berada disepanjang membran nukleus yang berperan sebagai kontrol aliran molekul yang keluar-masuk nukleus. Sekalipun demikian untuk memasuki nukleus maka *nuclear localization signal* (NLS) yaitu sekuen asam amino STAT harus diikat terlebih dahulu oleh protein *importins*. STAT yang terikat *importin* (dimer STAT-importin) akan mudah memasuki nukleus. Sekali STAT-*importin* memasuki nukleus maka *importin* harus dilepas dengan protein Ran. Keadaan ini menyebabkan STAT terlepas bebas dalam nukleus, sehingga mampu mentranskripsi gen target, terutama terkait dengan imunitas.

## **11. JAK-STAT dengan PI3K/AKT/mTOR**

Jalur molekuler JAK-STAT dapat berinteraksi dengan jalur RTK (PI3K/AKT/mTOR), meskipun demikian tetap membutuhkan JAK karena sebagian besar reseptor PI3K tidak memiliki aktivitas JAK kinase bawaan. Jalur JAK-STAT terhubung secara langsung dengan jalur PI3K/ AKT/ mTOR, sehingga ketika JAK diaktifkan dan difosforilasi, maka protein domain SH2 mengikat fosfotirosin. Sisi lain protein PI3K juga memiliki domain SH2 dan karenanya juga dapat mengikat reseptor terfosforilasi ini. Dengan demikian, aktivasi jalur JAK-STAT juga dapat mengaktifkan jalur PI3K / AKT / mTOR.

## **12. JAK-STAT dengan MAPK/ERK**

Jalur JAK-STAT terhubung dengan jalur MAPK/ERK, sehingga ketika JAK diaktifkan dan difosforilasi, maka protein domain SH2 mengikat fosfotirosin. Sisi lain jalur MAPK/ERK juga memiliki domain SH2 yaitu Grb2 yang dapat mengikat reseptor terfosforilasi ini. Dengan demikian, aktivasi jalur JAK-STAT juga dapat mengaktifkan jalur MAPK/ERK.

## **Daftar pustaka**

1. Prockop DJ, Youn Oh J. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): Role as guardians of inflammation. *Mol Ther* [Internet]. 2012;20(1):14–20.
2. Agrawal A, Agrawal S, Gupta S. Role of dendritic cells in inflammation and loss of tolerance in the elderly. *Front Immunol*. 2017;8(JUL):1–8.
3. Said A, Weindl G. Regulation of Dendritic Cell Function in Inflammation. *J Immunol Res*. 2015;2015.
4. Tai Y, Wang Q, Korner H, Zhang L, Wei W. Molecular mechanisms of T cells activation by dendritic cells in autoimmune diseases. *Front Pharmacol*. 2018;9(JUN):1–10.
5. Von Essen MR, Kongsbak M, Geisler C. Mechanisms behind functional avidity maturation in T cells. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012.
6. Qi Q, Liu Y, Cheng Y, Glanville J, Zhang D, Lee J-Y, et al. Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2014;111(36):13139–44.
7. Ankrum JA, Ong JF, Karp JM. Mesenchymal stem cells: Immune evasive, not immune privileged. *Nat Biotechnol*. 2014;32(3):252–60.
8. English K, Barry FP, Mahon BP. Murine mesenchymal stem cells suppress dendritic cell migration, maturation and antigen presentation. *Immunol Lett*. 2008;115(1):50–8.
9. Kudlik G, Hegyi B, Czibula Á, Monostori É, Buday L, Uher F. Mesenchymal stem cells promote macrophage polarization toward M2b-like cells. *Exp Cell Res* [Internet]. 2016;348(1):36–45.
10. Rivera-Cruz CM, Shearer JJ, Figueiredo Neto M, Figueiredo ML. The immunomodulatory effects of mesenchymal stem cell polarization within the tumor microenvironment niche. *Stem Cells Int*. 2017;2017.
11. Haddad R, Saldanha-araujo F. Mechanisms of T-Cell Immunosuppression by Mesenchymal Stromal Cells: What Do We Know So Far? *Biomed Res Int* [Internet]. 2014;2014:1–14.
12. Yang SH, Park MJ, Yoon IH, Kim SY, Hong SH, Shin JY, et al. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp Mol Med*. 2009;41(5):315–24.
13. Duffy MM, Ritter T, Ceredig R, Griffin MD. Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem Cell Res Ther*. 2011;2(4):1–9.

14. Wang L, Zhao Y, Shi S. Interplay between mesenchymal stemcells and lymphocytes: Implications for immunotherapy and tissue regeneration. *J Dent Res.* 2012;91(11):1003–10.
15. Qu M, Cui J, Zhu J, Ma Y, Yuan X, Shi J, et al. Bone marrow derived mesenchymal stem cells suppress NK cell recruitment and activation in PolyI: C-induced liver injury. *Biochem Biophys Res Commun*[Internet].2015;466(2):173–9
16. Putra A, Pertiwi D, Milla M, Indrayani U, Jannah D, Sahariyani M, Trisnadi S, Wibowo J. Hypoxia-preconditioned MSCs Have Superior Effect in Ameliorating Renal Function on Acute Renal Failure Animal Model. *Open Access Maced J Med Sci* [Internet]. 30Jan.2019 [cited 23Feb.2019];7(3):305-10.
17. Putra A, Rahmalita A, Tarra Y, Prihananti DH, Hutama SH, Sa'diyah NAC. The effect of mesenchymal stem cells to the endothelial in diabetic mice. *Advaces in Biomolecular Medicine: Proceedings of the 4thBIBMC.* 2017;4:57-60
18. Putra A, Pertiwi D, Milla M, Indrayani U, Jannah D, Sahariyani M, Trisnadi S, Wibowo J. Hypoxia-preconditioned MSCs Have Superior Effect in Ameliorating Renal Function on Acute Renal Failure Animal Model. *Open Access Maced J Med Sci* [Internet]. 30Jan.2019 [cited 23Feb.2019];7(3):305-10
19. Nugraha A, Putra A. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -activated mesenchymal stem cells accelerate wound healing through vascular endothelial growth factor regulation in rats. *Univmed.* 2018; 37(2):135-42.

## **BAB XII**

# **KONSEP HOMING MSC**

### **Tujuan**

---

Setelah membaca bagian ini, diharapkan pembaca dapat memahami konsep dan mekanisme molekuler *homing* MSC, molekul-reseptor neutrofil dalam *homing*, mekanisme molekuler *homing* leukosit, molekul-reseptor MSC dalam *homing* dan transmigrasi MSC/neutrofil

*Homing merupakan fenomena pergerakan sel leukosit menuju area inflamasi. MSC memiliki kemampuan homing (migrasi) menuju area inflamasi atau cedera disebabkan karena MSC memiliki karakteristik yang serupa dengan sel leukosit, diantaranya adalah mengekspresikan reseptor TLR-3 dan CXCR3-R. Reseptor tersebut mampu mendeteksi keberadaan molekul danger yang dilepas jaringan rusak dan atau sel radang aktif, terutama SDF-1, TNF $\alpha$ , dan IFN $\gamma$ . Terdapat perbedaan nyata antara homing leukosit dan MSC, dimana leukosit menggunakan PECAM-1/ CD34, sedangkan MSC menggunakan reseptor VLA-4 dan CD-44, serta TLR-3 dan CXCR3-R. Fenomena homing MSC penting dalam dunia klinis karena menunjukkan bahwa MSC mampu mendeteksi, memasuki dan memperbaiki area inflamasi (cedera) secara efektif, sekalipun diberikan secara intravena.*

*Catatan penulis*

## **1. Latar belakang**

*Homing* merupakan peristiwa pergerakan sel leukosit menuju area inflamasi. Hal ini disebabkan akibat stimulasi faktor kemoatraksi yang dilepas oleh berbagai sel radang, termasuk jaringan cedera. Molekul kemoatraksi tersebut akan dideteksi oleh reseptor sel radang, termasuk MSC. MSC mampu mendeteksi molekul kemoatraksi karena memiliki properti seperti sel leukosit. Kemampuan deteksi tersebut disebabkan adanya perbedaan gradien molekul antara area cedera dengan area normal, sehingga memandu sel leukosit atau MSC bergerak menuju arah sumber produksi kemoatraksi.

Faktor kemoatraksi dapat berupa sitokin dan atau *growth factor*, sedangkan reseptor yang mampu mendeteksi molekul kemoatraksi berupa reseptor kelompok TLR. Terdapat perbedaan reseptor deteksi antara leukosit dengan MSC. Leukosit menggunakan PECAM-1/ CD34, sedangkan MSC menggunakan CXCR3-R.

Kemampuan leukosit dan atau MSC dalam mengekspresi reseptor tersebut terkait dengan paparan mediator inflamasi. Mediator inflamasi berperan dalam mendorong ekspresi reseptor TLR-3, CXCR3 MSC atau CD34 leukosit, disamping mengaktivasi sel imun/ MSC. MSC yang berhasil *homing* pada situs inflamasi akan melakukan kontrol terhadap berbagai sel radang, sehingga inflamasi mereda dan proses regenerasi terjadi.

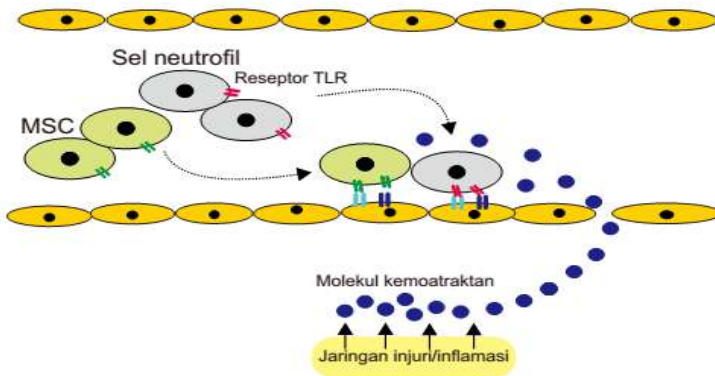
Peranan *homing* MSC dalam mengontrol inflamasi dan mempercepat regenerasi mendorong kami untuk mengeksplorasi lebih lanjut, mengenai konsep molekuler *homing* mulai dari pengertian, mekanisme molekuler *homing* sel leukosit dan MSC dan pergerakan transmigrasi MSC menuju area jaringan inflamasi/ cedera.

## **2. Konsep *homing***

*Homing* adalah peristiwa migrasi sel radang atau MSC dari sirkulasi darah menuju area inflamasi atau cedera, akibat stimulasi molekul kemoatraksi dan adhesi yang dilepaskan sel radang dan atau jaringan cedera. Fenomena migrasi juga terjadi pada MSC, disebabkan karena MSC memiliki karakteristik yang serupa dengan sel imun, terutama dalam mengekspresikan reseptor TLR-3 dan CXCR3-R. Secara spesifik reseptor CXCR-3 MSC akan mendeteksi keberadaan molekul SDF-1 yang dilepaskan oleh jaringan rusak, sedangkan reseptor TLR-3 memungkinkan mendeteksi keberadaan sitokin TNF $\alpha$  dan IFN $\gamma$ .

Terdapat perbedaan *homing* antara leukosit dan MSC dimana leukosit menggunakan molekul *platelet endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1)/ CD34 untuk mengikat molekul L-*selectin* dan E-*selectin* sel endotel aktif dalam proses inisiasi *homing*, sedangkan MSC menggunakan TLR-3 dan CXCR3-R. Secara spesifik mekanisme molekuler *homing* dan pergerakan migrasi/ transmigrasi leukosit/ MSC dijelaskan pada bahasan selanjutnya.

Konsep *homing* dijelaskan pada gambar di bawah ini.



Gambar 132. Konsep *homing*

Neutrofil dan MSC dapat bermigrasi dari sirkulasi sistemik menuju area inflamasi akibat stimulasi molekul sinyal kemoatraksi yang dilepas oleh jaringan cedera dan atau sel radang aktif.

## 2.1 Pengertian *homing* leukosit

*Homing* leukosit adalah perpindahan sel neutrofil sirkuler menuju area inflamasi akibat stimulasi molekul kemoatraksi dan adhesi yang dilepas sel makrofag residen atau matriks sekitar jaringan cedera. Hal ini disebabkan karena reseptor neutrofil mampu mendeteksi perubahan gradien kimia molekul tersebut dan kemudian mengikatnya. Neutrofil adalah sel leukosit pertama yang bermigrasi sesaat setelah hemostasis sekunder tercapai. Penurunan migrasi sel neutrofil menunjukkan bahwa sinyal kemoatraksi telah mereda yang berkorelasi dengan kontaminasi luka telah terkontrol.

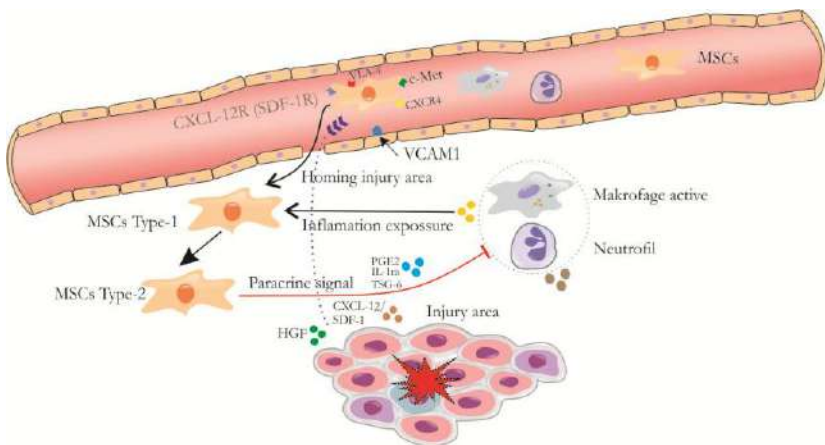
## 2.2 Pengertian *homing* MSC

*Homing* MSC adalah peristiwa migrasi MSC dari sirkulasi darah menuju jaringan cedera/ luka atau area inflamasi akibat stimulasi molekul sinyal kemoatraksi  $IFN\gamma$ ,  $TGF\alpha$  dan  $SDF-1$  yang dilepas oleh sel makrofag residen dan atau jaringan cedera. MSC tidak mengekspresikan  $CD34$  sehingga tidak memungkinkan mengikat molekul *L-selectin* dan *E-selectin* dalam proses *homing*.

### 3. Mekanisme molekuler *homing* MSC

*Homing* MSC terjadi ketika area inflamasi/cidera melepaskan protein *stromal derivate factor-1* (SDF-1) dan *hepatocyte growth factor* (HGF) yang berperan sebagai kemoatraksi terhadap MSC. MSC merespon dan mengikat SDF-1 melalui reseptor CXCR-3 dan HGF melalui c-METR. Saat bersamaan makrofag aktif juga melepaskan molekul TNF $\alpha$  dan IFN $\gamma$  (mediator inflamatori poten) yang berperan sebagai kemoatraktan terhadap MSC. MSC merespon dengan cara mengikat TNF $\alpha$  dan IFN $\gamma$  melalui reseptor TLR-3. Sekalipun demikian proses migrasi membutuhkan molekul adhesi yang memungkinkan MSC menempel pada sel endotel kapiler. Endotel kapiler aktif mengekspresikan *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) dan *P-selectin* (molekul adhesi). MSC merespon dengan cara mengikat VCAM-1 melalui reseptor VLA-4 dan mengikat *P-selectin* dengan CD-44.

Mekanisme molekuler *homing* MSC dijelaskan pada gambar di bawah ini.



Gambar 133. Mekanisme molekuler *homing* MSC

Area inflamasi/cidera melepaskan SDF-1 dan HGF yang akan diikat reseptor CXCR-3 dan c-METR MSC. Makrofag aktif melepaskan TNF $\alpha$  dan IFN $\gamma$  yang akan diikat oleh reseptor TLR-3 MSC. Semua molekul tersebut sebagai kemoatraktan bagi MSC. Prose transmigrasi

dilakukan melalui penempelan pada sel endotel dengan mengikat VCAM-1 dan *P-selectin* melalui reseptor VLA-4 dan CD-44 MSC.

## **4. Molekul-reseptor neutrofil dalam *homing***

Molekul *homing* neutrofil adalah molekul kemoatraksi atau adhesi. Molekul kemoatraksi adalah *small molecule* yang mampu menarik dan memandu neutrofil keluar sirkulasi menuju area inflamasi, sedangkan molekul adesi adalah molekul yang diekspresikan permukaan membran sel endothel aktif dengan fungsi mengikat ligan leukosit melalui reseptor PSGL-1 sehingga terjadi perlekatan dan migrasi.

### **4.1. Molekul kemokin leukosit**

#### **1. CXCL8 dan CXCL1 (GRO- $\alpha$ )**

CXCL8 adalah molekul kemokin poten pertama bagi neutrofil yang disekresi oleh makrofag residen aktif. Sel neutrofil merespon molekul tersebut dengan mengikat melalui reseptor CXCLR1 dan CXCR2. CXCL1 adalah kemokin neutrofil hasil sekresi makrofag residen aktif yang diikat sel neutrofil melalui reseptor CXCLR1.

#### **2. TNF- $\alpha$**

TNF- $\alpha$  adalah mediator pro-inflamatori poten yang dilepas sel radang aktif, terutama sel dendritik dan makrofag dengan fungsi memicu kemoatraksi berbagai sel radang termasuk MSC menuju area radang/cidera, disamping sebagai pengaktivasi berbagai sel radang, termasuk MSC.

#### **3. *Complement factor* C5a dan leukotrient B4**

C5a adalah protein fragmen hasil potongan komponen *complement* C5 oleh enzim C5-convertase (jalur klasif/ alternatif/ lektin) yang dapat menarik neutrofil/ monosit menuju area injuri/cidera, disamping fungsi fagositosis dan anafilatoksis. *Leukotrient* B4 adalah metabolit hasil oksidasi *arachidonic acid* (AA) melalui lipogenase yang berfungsi menginduksi migrasi neutrofil di samping fungsi modulasi inflamasi.

4. *Formyl methionyl* dan Molekul H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

*Formyl methionyl* adalah peptide potongan debris bakteri lisis (*lipopolysaccharide*) yang dapat menarik monosit/leukosit disamping mengaktivasi, melalui pengikatan reseptor *formyl peptide receptor-1* (FPR-1) dan *transient receptor potential melastatin-2* (TPRPM2). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adalah molekul kimia radikal bebas yang mampu menginduksi neutrofil bermigrasi dengan mengaktivasi reseptor *transient receptor potential melastatin-2* (TPRPM2) melalui oksidasi *cystein 549*.

#### **4.2. Molekul adesi leukosit**

1. *P-selectin*

*P-selectin* adalah molekul adesi yang diekspresikan oleh sel endotel aktif paska stimulasi protein thrombin, bradikinin dan histamin yang dilepas jaringan cidera.

2. *E-selectin*

*E-selectin* adalah molekul adhesi yang diekspresikan sel endotel aktif paska stimulasi TNF- $\alpha$  yang dilepas sel makrofag aktif.

#### **4.3. Reseptor TLR leukosit**

Reseptor TLR adalah reseptor yang diekspresikan oleh berbagai sel radang, termasuk MSC dengan fungsi mempromosikan sel radang dan MSC untuk bermigrasi keluar sirkulasi menuju area jaringan cidera.

Secara spesifik fungsi reseptor TLR adalah sebagai berikut:

1. Deteksi area inflamasi (cidera)

Kemampuan deteksi reseptor TLR disebabkan karena reseptor ini mampu mendeteksi berbagai molekul sitokin, interleukin dan kemokin yang dilepas oleh sel radang aktif pada area inflamasi dan atau jaringan cidera. Kemampuan deteksi reseptor TLR-MSK terlihat pada peristiwa inflamasi. Secara spesifik terlihat pada aktivitas pergerakan dan migrasi dari berbagai sel progenitor/ MSK asal sumsum tulang dalam menuju area inflamasi.

2. Modulasi sel inaktif

Kemampuan reseptor TLR dalam memodulasi berbagai sel

radang/MSK fase *innate* (fase inaktif) terlihat ketika terjadi pengikatan antara molekul pro-inflamatori dengan reseptor TLR. Pengikatan ligan-reseptor ini akan memicu aktivasi sinyal transduksi sitoplasmik yang berakhir dengan sekresi berbagai molekul bioaktif lainnya.

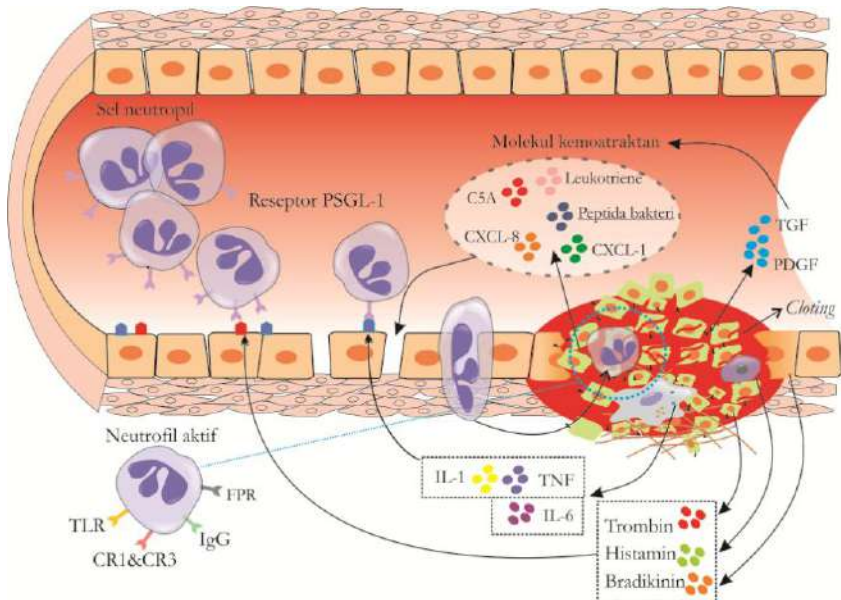
3. Mengarahkan respon sel yang sesuai

Kemampuan reseptor TLR dalam mengarahkan respon imun/respon MSC yang sesuai terlihat pada peristiwa polarisasi sel. Sel makrofag pada keadaan tertentu dapat berpolarisasi menjadi sel fagosit profesional namun sisi lain juga dapat berubah menjadi sel asesoris APC dengan fungsi sekresi. Hal yang sama terlihat ketika MSC terpapar molekul pro-inflamatori dimana akan terjadi polarisasi MSC menjadi MSC tipe-2 yang bersifat immunosupresif dengan mensekresi molekul anti-inflamatori (IL-1ra, PGE3, TGFb, IL-10 dan TSG6), disamping molekul proliferasi (VEGF, PDGF, FGF).

## **5. Mekanisme molekuler *homing* leukosit**

Mekanisme *homing* leukosit paska terjadi kerusakan jaringan proses dimulai dengan pelepasan thrombin, bradikinin dan histamin oleh sel platelet dan mast aktif yang kemudian mengaktifasi sel endotel untuk mengekspresikan molekul *P-selectin*. Sisi lain sel makrofag residen aktif melepas TNF- $\alpha$  dan IL-1 yang dapat mengaktifasi sel endotel untuk mengekspresikan molekul *E-selectin*. Sel neutrofil aktif merespon dengan cara mengekspresikan reseptor *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1) yang dapat mengikat *P-selectin* dan *E-selectin* endotelial sehingga terjadi perlekatan dan migrasi. Proses migrasi dimulai dengan dilepaskannya kemokin CXCL8 oleh sel makrofag residen aktif sebagai sinyal kemoatraktan poten bagi sel neutrofil. Neutrofil merespon dengan mengikat CXCL8 melalui reseptor CXCR1 dan CXCR2. Bersamaan dengan hal tersebut sel makrofag juga melepas kemokin CXCL1 untuk memperkuat daya kemotaksis. Faktor kemotaksis lainnya adalah

aktivasi jalur komplemen (komplemen C5a aktif) sebagai sinyal kemotaksis dan aktivasi sel neutrofil dan monosit. *Leukotrient* B4 dan potongan peptide *N-formyl-methionyl-phenyalalanin* bakteri juga dapat berperan sebagai kemotaksis sel neutrofil. Peranan molekuler kemoatraktan dalam migrasi dijelaskan pada gambar dibawah ini.



Gambar 134. Molekuler kemoatraktan dalam migrasi neutrofil  
 Sel endotel aktif mengekspresikan *P-selectin* (paska stimulasi thrombin, bradikinin dan histamine) dan *E-selectin* (paska stimulasi TNF- $\alpha$  dan IL-1). Sel neutrofil aktif mengikat *P-selectin* dan *E-selectin* melalui reseptor PSGL-1. Migrasi leukosit distimulasi oleh CXCL8 (dilepas sel makrofag aktif) melalui reseptor CXCR1 dan CXXR2. Kemokine CXCL1 (dilepas sel makrofag aktif) memperkuat daya kemotaksis. Korporasi seluruh molekul di atas mendorong terjadinya *homing* sel neutrofil.

## 6. Molekul dan reseptor MSC dalam *homing*

*Homing* MSC menuju area inflamasi/ cedera merupakan hasil interaksi dan integrasi reseptor tertentu yang diekspresikan MSC

dengan berbagai molekul sitokin/ kemokin atau *soluble molecule* yang dilepas sel radang aktif terutama sel neutrofil dan makrofag dan atau jaringan cedera.

## **6.1 Molekul kemoatraksi MSC**

### **1. TNF $\alpha$**

TNF $\alpha$  merupakan mediator pro-inflamatori poten yang dilepas sel radang aktif, terutama sel dendritik dan makrofag dengan fungsi menarik berbagai radang termasuk MSC sirkuler untuk migrasi menuju area cedera/ inflamasi, disamping sebagai pengaktivasi berbagai sel radang termasuk MSC. Peningkatan kadar TNF- $\alpha$  secara berlebihan dapat memicu kegagalan organ multi-sistem, disamping menyebabkan proses kronis.

### **2. IFN $\gamma$**

IFN $\gamma$  merupakan molekul sitokin mediator pro-inflamatori poten yang dilepas berbagai sel radang terutama sel dendritik dengan fungsi sebagai pemicu utama migrasi sel radang dan MSC sirkuler menuju area cedera, disamping sebagai pengaktivasi.

### **3. SDF-1**

SDF-1 merupakan molekul kemokin yang dilepas oleh jaringan rusak dengan fungsi sebagai pemandu arah bagi sel MSC dalam menuju area inflamasi/ cedera. Hal ini menunjukkan bahwa SDF-1 berperan sebagai ko-lokalisasi bagi reseptor CXCR3-R MSC.

## **6.2 Reseptor MSC**

Suasana inflamasi memungkinkan MSC dan sel progenitor asal sumsum tulang bergerak dan migrasi menuju area inflamasi.

### **1. Reseptor TLR-3**

TLR-3 adalah reseptor yang diekspresikan oleh berbagai sel radang, termasuk MSC. Reseptor TLR-3 berperan penting dalam mempromosikan MSC untuk migrasi keluar sirkulasi, *homing* menuju area jaringan cedera/ inflamasi. Hal ini disebabkan karena reseptor TLR-3 yang diekspresikan MSC tersebut mampu mendeteksi keberadaan molekul sitokin, interleukin dan kemokin yang dilepas

sel imun aktif pada area inflamasi/cidera. Sisi lain pengikatan reseptor TLR-3/MSK dengan sitokin pro-inflamatorik juga menyebabkan polarisasi MSC dari tipe-1 menjadi tipe-2 yang berisifat immunosupresif, yaitu mampu mensekresi berbagai molekul aktif anti-inflamatori terutama IL-1ra, PGE3, TGFb dan TSG6, disamping molekul proliferasi VEGF, PDGF, FGF.

## 2. Reseptor CXCR3-R

CXCR3-R merupakan reseptor yang diekspresikan berbagai sel radang termasuk oleh MSC secara kuat dengan fungsi mendeteksi keberadaan molekul kemokin SDF-1 yang dilepaskan jaringan rusak. Secara teoritis MSC mengekspresikan reseptor CXCR3-R secara kuat, sehingga dapat mendeteksi keberadaan molekul SDF-1 dan mengikatnya. Hal ini menunjukkan bahwa SDF-1 berperan sebagai ko-lokalisasi MSC untuk bergerak menuju area inflamasi.

## 7. Perbedaan *homing* MSC dan leukosit

Secara spesifik perbedaan *homing* MSC dan leukosit adalah sebagai berikut. Terdapat perbedaan nyata antara migrasi MSC dan leukosit/ HSC dimana leukosit dominan menggunakan *L-selectin* dan *E-selectin* dalam menginisiasi proses *rolling*, namun MSC menggunakan reseptor VLA-4 untuk mengikat VCAM-1 dan CD-44 untuk *P-selectin* dalam perlekatan dengan sel endotel.

### 1. Sel leukosit menggunakan molekul *L-selectin* dan *E-selectin*

Sel leukosit melakukan aktivitas *rolling* pada sel endotelial pada tahap pertama rekrutmen dengan menggunakan *E-selectin* dan *L-selectin*, namun MSC lebih menggunakan *P-selectin* (*L-selectin* dan *E-selectin* tidak diekspresi). MSC menggunakan reseptor VLA-4 dan CD-44 dalam merespon molekul VCAM-1 dan *P-selectin* perlekatan dengan sel endotel.

### 2. Sel leukosit menggunakan molekul PECAM-1/ CD34

Sel leukosit mengekspresikan molekul *platelet/ endothelial cell adhesion molecule-1* PECAM-1/ CD34 yang memungkinkan sel

leukosit melakukan proses transmigrasi (menyebarang) endotelium, sedangkan MSC tidak mengekspresikan CD-34 sehingga migrasi dan transmigrasinya menggunakan reseptor VLA-4, CD-44 dalam mengikat molekul adhesi, disamping menggunakan reseptor TLR-3 dan CXCR-3 stimulasi molekul kemokin SDF-1, TNF- $\alpha$  dan IFN $\gamma$

3. MSC menggunakan reseptor protein G

Selama aktivitas *rolling*, MSC menggunakan reseptor 7-*transmembrane spanning G protein-coupled receptors*.

## **8. Transmigrasi MSC/ neutrofil**

### **8.1 Pengertian transmigrasi MSC**

Transmigrasi adalah pergerakan migrasi atau perpindahan MSC/ neutrofil sikuler yang sebelumnya telah melekat di endotel kemudian keluar menuju area inflamasi secara amubiasid melalui sisi lateral sel endotel. Gerakan ini dikontrol oleh protein *Rho GTPases* (protein G *subfamily Ras*) melalui jalur PI3K yang menghasilkan protein aktin *cytoskeleton dynamic* dengan fungsi sebagai pemicu motilitas neutrofil.

### **8.2 Pengaruh molekul adhesi dalam transmigrasi**

MSC yang diberikan intravena akan bergerak bebas dalam sirkulasi darah hingga suatu saat reseptor TLR-3 dan CXCR-3R mendeteksi sinyal cedera (SDF-1, TNF $\alpha$  dan IFN $\gamma$ ) kemudian bergerak menuju sumber sinyal cedera tersebut. Sekalipun demikian MSC harus mampu melakukan migrasi dan transmigrasi (*trafficking*). Hal ini dilakukan MSC dengan cara mengikat molekul adesi P-*selectin* yang dihasilkan oleh sel endotel dengan CD44, disamping mengikat VCAM-1 dengan integrin melalui reseptor VLA-4.

Secara teoritis MSC yang terikat pada molekul adhesi sel endotel berakibat pada penurunan kecepatan pergerakan MSC sirkuler, sehingga memungkinkan MSC melakukan migrasi dan transmigrasi trans-endothelia menuju area cedera (pola gerakan

leukopedesis). MSC yang gagal dalam proses transmigrasi akan tertanam dalam lapisan endotel vaskuler.

### **8.3 Pola pergerakan transmigrasi MSC**

MSC yang bermigrasi secara trans-endothelia mengikuti pola leukopedesis seperti pergerakan motilitas MSC. Gerakan motilitas MSC ini terdiri atas 5 tahapan yaitu:

#### **1 *Rolling* MSC**

*Rolling* MSC adalah pergerakan tertentu MSC berupa gerakan berguling (*rolling*) menuju area tepi endotel akibat stimulasi molekul kemoatraksi (SDF-1, TNF $\alpha$  dan IFN $\gamma$ ) yang dilepas jaringan cedera dan makrofag aktif.

#### **2 *Attaching* MSC**

*Attaching* MSC adalah proses penempelan MSC pada sel endotel akibat pengikatan molekul adhesi E-*selectin* dan L-*selectin* yang diekspresikan sel endotel aktif melalui reseptor PSGL-1, sedangkan *attaching* MSC melalui pengikatan molekul adhesi P-*selectin* di samping VLA-4 dan CD-44. Saat yang sama MSC/neutrofil aktif akan mengikat kolagen, fibronektin dan fibrinogen yang terekspos disekitar endotel melalui reseptor integrin  $\beta$ 1/  $\beta$ 2.

#### **3 *Spreading* MSC**

*Spreading* adalah gerakan memanjang MSC membentuk lamellipodia dan filipodia akibat aktivasi *cytoskeletonactin* paska pengikatan molekul adhesi dengan reseptor MSC.

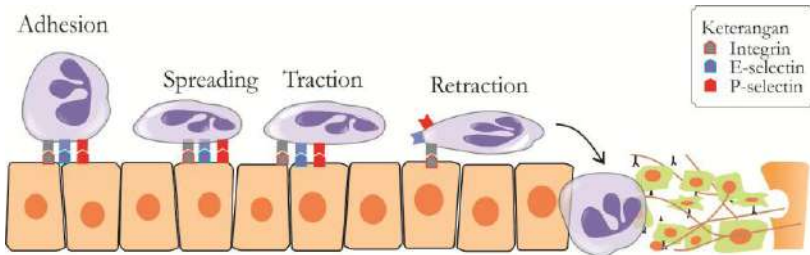
#### **4 *Traction***

*Traction* atau traksi adalah gerakan penarikan tepi ujung MSC akibat kontraksi, sehingga reseptor integrin dapat mengikat pada bagian depan selanjutnya.

#### **5 *Retraction***

*Retraction* atau retraksi adalah gerakan penarikan MSC ke belakang hingga terlepas akibat pergeseran reseptor integrin ke arah belakang. Gerakan ini memungkinkan MSC bergerak maju.

Pola pergerakan transmigrasi dijelaskan pada gambar dibawah ini.



Gambar 135. Pola pergerakan transmigrasi

## **Daftar pustaka**

1. Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: Polarization into a proinflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One*. 2010;5(4).
2. Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells: Sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2013;13(4):392–402.
3. Rivera-Cruz CM, Shearer JJ, Figueiredo Neto M, Figueiredo ML. The immunomodulatory effects of mesenchymal stem cell polarization within the tumor microenvironment niche. *Stem Cells Int*. 2017;2017.
4. Yang S, Wang Y, Chao C, Chuang Y, Lan C, Chen B. Dynamic cross-talk analysis among TNF-R, TLR-4 and IL-1R signalings in TNF $\alpha$ -induced inflammatory responses. *Med genomic*. 2010;3(19):2–19.
5. Wu Y, Zhou BP. TNF- $\alpha$ /NF $\kappa$ -B/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer*. 2010;102(4):639–44.
6. Lin CC, Lee IT, Yang YL, Lee CW, Kou YR, Yang CM. Induction of COX-2/PGE2/IL-6 is crucial for cigarette smoke extract-induced airway inflammation: Role of TLR4-dependent NADPH oxidase activation. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2010;48(2):240–54.
7. Kyurkchiev D. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* [Internet]. 2014;6(5):552.
8. Kim B-S, Ko I-K. Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Myocardial Infarction. *Int J Stem Cells* [Internet]. 2008;1(1):49–54.
9. Thomas SJ, Snowden JA, Zeidler MP, Danson SJ. The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours. *Br J Cancer* [Internet]. 2015;113(3):365–71.
10. Liongue C, Ward AC. Evolution of the JAK-STAT pathway. *JakStat* [Internet]. 2013;2(1):e22756.
11. Zisakis A, Chatziandreu I, Boviatsis E, Saetta AA, Spyropoulou A, Samaras V, et al. Complex interactions between the components of the PI3K/AKT/mTOR pathway, and with components of MAPK, JAK/STAT and Notch-1 pathways, indicate their involvement in meningioma development. *Virchows Arch*. 2014;465(4):473–85.
12. Becker A De, Riet I Van. Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? *World J Stem Cells* [Internet]. 2016;8(3):73.

13. Sohni A, Verfaillie CM. Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. *Stem Cells Int.* 2013;2013:14–6.
14. Warnock RA, Askari S, Butcher EC, Von Andrian U. Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *J Exp Med* [Internet]. 1998;187(2):205–
15. Nourshargh S, Alon R. Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. *Immunity* [Internet]. 2014;41(5):694–707.
16. Hocking AM. The Role of Chemokines in Mesenchymal Stem Cell Homing to Wounds. *Adv Wound Care.* 2014;4(11):623–30.
17. Park S, Jang H, Kim BS, Hwang C, Jeong GS, Park Y. Directional migration of mesenchymal stem cells under an SDF-1 $\alpha$  gradient on a microfluidic device. *PLoS One.* 2017;12(9):1–18.
18. Franziska N, Claudia M, Barbara L, Jukka J, Alexander D, Johannes B. Concise Review: MSC Adhesion Cascade—Insights into Homing and Transendothelial Migration. *Stem Cells* [Internet]. 2017;35(6):1446–60.
19. Teo GSL, Ankrum JA, Martinelli R, Boetto SE, Simms K, Sciuto TE, et al. Mesenchymal Stem Cells Transmigrate Between and Directly Through TNF- $\alpha$ -activated Endothelial Cells. *Stem Cells.*
20. Putra A, Pertiwi D, Milla M, Indrayani U, Jannah D, Sahariyani M, Trisnadi S, Wibowo J. Hypoxia-preconditioned MSCs Have Superior Effect in Ameliorating Renal Function on Acute Renal Failure Animal Model. *Open Access Maced J Med Sci* [Internet]. 30Jan.2019 [cited 23Feb.2019];7(3):305-10.
21. Putra A, Rahmalita A, Tarra Y, Prihananti DH, Hutama SH, Sa'diyah NAC. The effect of mesenchymal stem cells to the endothelial in diabetic mice. *Advances in Biomolecular Medicine: Proceedings of the 4th BIBMC.* 2017;4:57-60
22. Putra A, Pertiwi D, Milla M, Indrayani U, Jannah D, Sahariyani M, Trisnadi S, Wibowo J. Hypoxia-preconditioned MSCs Have Superior Effect in Ameliorating Renal Function on Acute Renal Failure Animal Model. *Open Access Maced J Med Sci* [Internet]. 30Jan.2019 [cited 23Feb.2019];7(3):305-10
23. Nugraha A, Putra A. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -activated mesenchymal stem cells accelerate wound healing through vascular endothelial growth factor regulation in rats. *Univmed.* 2018; 37(2):135-42.

# **BAB XIII**

## **PERAN MSC DALAM**

### **REGENERASI JARINGAN CIDERA**

#### **Tujuan**

---

Setelah membaca bagian ini, diharapkan pembaca dapat memahami konsep molekuler dalam cedera, molekuler hemostasis, homing MSC menuju jaringan cedera, mekanisme molekuler neutrofil, makrofag dan MSC dalam inflamasi

*Kegagalan memasuki tahapan penyembuhan luka akibat inflamasi yang berkepanjangan menjadi penyebab utama dalam penyembuhan jaringan cedera. Penyembuhan luka melibatkan interaksi berbagai faktor, mulai soluble molecule growth factor, matriks ekstraseluler dan komponen seluler mulai sel radang, parenkrim termasuk mesenchymal stem cell (MSC). Proses penyembuhan luka dibagi menjadi 4 tahapan yaitu; hemostasis, inflamasi, proliferasi dan remodeling. MSC berperan kuat dalam proses regenerasi jaringan rusak, termasuk luka kronis. Hal ini dimungkinkan karena MSCs mampu mengontrol inflamasi, berdiferensiasi, mengaktifasi sel punca/ progenitor endogenous hingga aktivitas proliferasi, disamping melakukan exosome. MSC mampu homing dan melepas molekul parakrin secara kuat sehingga memungkinkan berperan lebih dini dalam mengakselerasi proses penyembuhan jaringan cedera.*

*Catatan penulis*

## **1. Latar belakang**

Penyembuhan kronis seperti ulkus diabetes dan dekubitus hingga kini masih menjadi masalah dunia kesehatan dengan insiden sekitar 5-7 kasus pertahun. Berbagai strategi kedokteran telah dilakukan mulai perawatan intensif, pemberian antibiotik hingga topikal *growth-factor*, namun hingga kini hasil yang diperoleh masih belum memuaskan, bahkan separuh diantaranya tidak merespon. Hal ini diduga akibat adanya hambatan dalam memasuki tahapan proliferasi proses penyembuhan luka. Hambatan ini disebabkan akibat proses inflamasi berkepanjangan yang dapat memicu pelepasan berbagai sitokin pro-inflamatori dan ROS yang terus menerus dan bersifat litik. Keadaan ini menyebabkan kerusakan jaringan semakin meluas dan kesulitan pembentukan jaringan baru bahkan berpotensi memicu fibrosis.

Penyembuhan luka adalah proses kompleks yang saling berkesinambungan dengan melibatkan interaksi berbagai faktor,

mulai *soluble molecule growth factor*, matriks ekstraseluler dan komponen seluler mulai sel radang, parenkrim dan mesenchymal. Secara simultan proses penyembuhan luka dibagi menjadi 4 tahapan, yang dimulai dengan hemostasis, inflamasi, proliferasi dan *remodeling*. Pembentukan matriks pada tahapan hemoestasis merupakan pintu awal bagi migrasi berbagai sel, termasuk MSCs menuju area cedera sedangkan proses inflamasi yang terkendali merupakan fase krusial dalam menuju tahapan regenerasi. Penelitian terkini melaporkan bahwa MSC berperan kuat dalam proses meregenerasi jaringan rusak, termasuk jaringan luka kronis. Hal ini dimungkinkan karena MSC memiliki kemampuan mengontrol inflamasi secara parakrin, berdiferensiasi menjadi sel spesifik, mengaktivasi sel progenitor endogenous hingga aktivitas proliferasi.

MSC merupakan sel punca dewasa asal jaringan stromal dengan kemampuan memperbaharui diri dan berdiferensiasi serta mengekspresikan CD105 (+), CD73 (+), CD90 (+), CD45(-), CD34(-), CD14 atau CD11b (-), CD79a atau CD19 (-) , HLA-DR(-) dan a HLA Class II antigen (-). MSC terlibat dalam setiap tahapan penyembuhan luka, mulai tahapan hemostasis, inflamasi, proliferasi hingga *remodeling*. Hal ini disebabkan karena MSC memiliki kemampuan *homing*, mensupresi proses inflamasi dan terlibat aktif dalam proses regenerasi. Hal ini mengesankan bahwa pemberian MSC eksogenous mampu meregenerasi penyembuhan kerusakan jaringan, termasuk luka kronis, disamping mempersingkat waktu penyembuhan. Sekalipun demikian peranan MSC dalam meregulasi luka setiap tahapan proses penyembuhan luka secara molekuler hingga kini masih belum dapat dijelaskan. Hal ini mendorong penulis untuk mengeksplorasi peran MSC dalam jaringan cedera, dimulai dengan pembahasan tahapan molekuler penyembuhan luka hingga peranan MSC dalam setiap fasenya.

## 2. Konsep molekuler dalam cedera

Prinsip molekuler dalam luka adalah memperpendek masa inflamasi dan mempercepat pembentukan jaringan baru.

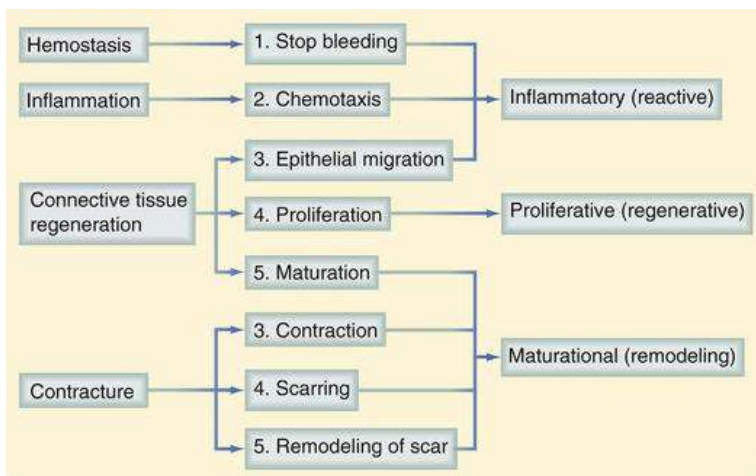
### 2.1 Pengertian cedera

Secara teoritis cedera adalah serangkaian kejadian biokimia kompleks dan terorganisir yang terjadi sesaat setelah kerusakan jaringan. Terdapat beberapa kemungkinan yang dapat terjadi pada cedera jaringan, yaitu sembuh secara normal baik morfologis maupun fungsi (regenerasi sempurna), sembuh dengan fibrosis (regenerasi tidak sempurna) dan atau menjadi luka kronis.

### 2.2 Tahapan penyembuhan jaringan cedera

Secara spesifik tahapan penyembuhan jaringan cedera ditandai dengan 4 tahapan penting, yaitu:

1. Tahapan homeostatis
2. Tahapan inflamasi
3. Tahapan proliferasi
4. Tahapan *remodeling*



Gambar 136. Tahapan respon penyembuhan cedera

Tahapan penyembuhan cedera ditandai dengan pembentukan jaringan baru, dikenal sebagai fase proliferasi. Fase ini dimulai ketika fase inflamasi telah mereda. Inflamasi yang berkepanjangan menyebabkan kesulitan memasuki tahapan proliferasi sehingga berdampak pada kegagalan pembentukan jaringan baru dan berpotensi fibrosis. Upaya memperpendek masa inflamasi akan mempercepat pembentukan jaringan baru.

### **3. Molekuler hemostasis**

Hemostasis terjadi segera setelah endotelial mengalami kerusakan. Kerusakan sel endotelial memicu pelepasan molekul *von willebrand factor* (faktor VIII) dan hambatan sekresi molekul *heparin-like*, *nitric oxide* dan *prostacylin*.

#### **3.1 Pengertian hemostasis**

Hemostasis adalah upaya jaringan dalam menghentikan perdarahan dengan menutup permukaan luka melalui kaskade koagulasi jalur intrinsik dan ekstrinsik dengan tujuan pembentukan agregasi platelet dan bekuan darah sehingga kehilangan darah diminimalisasi dan kerusakan jaringan dibatasi.

#### **3.2 Fase hemostasis**

Fase hemostasi bertujuan untuk membatasi kerusakan dengan cara menghentikan perdarahan dan menutup permukaanluka. Secara teoritis proses hemostasis melibatkan 3 tahapan yaitu:

1. Vasokonstriksi arteriole dan kapiler
2. Hemostasis primer
3. Pembentukan hemostasis sekunder

#### **3.3 Vasokonstriksi arteriole dan kapiler**

Vasokonstriksi adalah kontraksi pembuluh darah sebagai refleksi awal sel otot polos vaskuler akibat stimulus syaraf simpatis lokal pada pembuluh darah yang cedera, dengan tujuan mengurangi laju aliran darah dan membatasi kehilangan darah. Vasokonstriksi

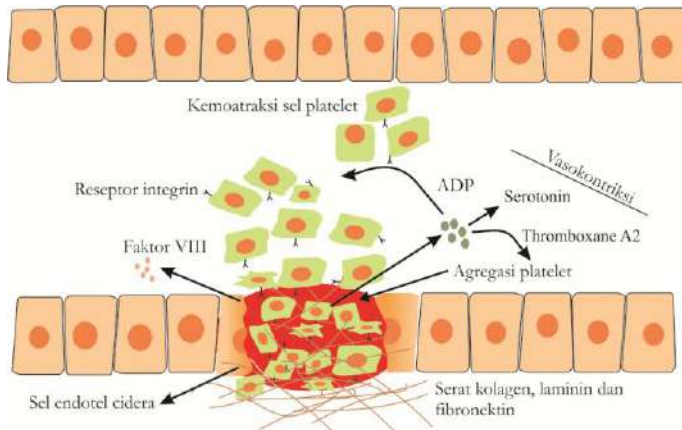
merupakan respon awal terhadap kerusakan pembuluh darah dengan tujuan menghentikan perdarahan sementara.

### 3.4 Hemostasis primer

Hemostasis primer merupakan tahap initial dalam penghentian darah melalui agregasi sel platelet yang bersifat sementara. Tahapan ini dikenal juga sebagai hemostasis primer. Mekanisme hemostasis primer melalui:

1. Pengikatan sel platelet pada endothelium
2. Agregasi platelet

Secara molekuler proses hemostasis primer digambarkan dibawah ini.



Gambar 137. Molekuler hemostasis primer

Tahapan hemostasis dimulai dengan vasokonstriksi akibat stimulus saraf simpatis, sehingga menyebabkan laju aliran darah melambat. Sel endothelial cidera melepas faktor VIII yang menginisiasi *arachidonic cascade*. Saat yang sama sel platelet yang terlepas dari vaskuler rusak, mengikat serat kolagen tipe IV dan V (terekspose sekitar endothelium cidera) melalui reseptor integrin ( $\alpha_2\beta_1$ ) dan mengikat glikoprotein laminin dengan reseptor integrin ( $\alpha_6\beta_1$ ). Sisi lain terjadi pengikatan antar sel platelet melalui reseptor integrin ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) dengan tujuan membentuk agregasi platelet. Hal ini menyebabkan sel platelet aktif, ditandai dengan pelepasan serotonin dan ADP (kemoatraksi sel platelet lain) dan thromboxane A2 (agregasi platelet).

1. Pengikatan sel platelet pada endothelium

Kontraksi pembuluh darah memungkinkan sel platelet dan eritrosit melekat pada endotelium kapiler yang rusak, karena vaskuler yang rusak menyebabkan serat kolagen terekspos sekitar endotelial rusak. Sel platelet mampu melekat dan mengikat serat kolagen karena memiliki reseptor integrin ( $\alpha_2\beta_1$ ) dan ( $\alpha_6\beta_1$ ). Sisi lain pengikatan platelet membutuhkan faktor VIII (*von willebrand*), yaitu protein heterodimer yang disintesis oleh sel megakariosit dan endotelial.

2. Agregasi platelet

Agregasi sel platelet adalah sekelompok sel platelet yang saling berikatan dan melekat pada serat kolagen endotelial yang rusak. Agregasi platelet menyebabkan bentuk platelet berubah sehingga menyebabkan reseptor platelet terkonformasi, kemudian menginduksi sinyal transduksi dan menjadi aktif. Sel platelet aktif ditandai dengan karakter:

- 1) Mengekspresikan reseptor integrin GPIIb-IIIa( $\alpha_{IIb}\beta_3$ )
- 2) Mensekresi molekul granula vasoaktif-amine, yaitu serotonin, ADP, thromboxane A2

Akumulasi proses diatas menyebabkan pembentukan sumbatan kapiler sementara yang dapat menghentikan perdarahan.

### **3.5 Hemostasis sekunder**

Hemostasis sekunder adalah tahap akhir dalam hemostasis berupa serangkaian proses kompleks yang melibatkan kaskade koagulasi dan agregasi platelet untuk membuat *scaffold* (kerangka bekuan darah berjala). *Scaffold* berfungsi untuk menutupi seluruh permukaan luka. Produk akhir tahapan ini adalah bekuan darah yang menghentikan perdarahan secara permanen. Sisi lain pembentukan *scaffod* merupakan matrik bagi migrasi berbagai sel, seperti eritrosit, endotelial, sel radang, sel fibroblast termasuk termasuk MSC.

Secara spesifik proses pembentukan bekuan darah meliputi:

1. Pembentukan trombin

Trombin adalah enzim proteolitik aktif kelompok serine

protease yang mampu memecah protein fibrinogen menjadi bentuk fibrin. Trombin sendiri berasal dari pemecahan protein protrombin (faktor koagulasi II) oleh enzim protrombinase (proteolitik) yang teraktivasi pada membran sel platelet aktif setelah berikatan dengan faktor V dan berinteraksi dengan faktor X. Trombin berperan mengaktivasi sel platelet lain dan mampu melarutkan membran basalis untuk proses selanjutnya, terutama pada fase proliferasi.

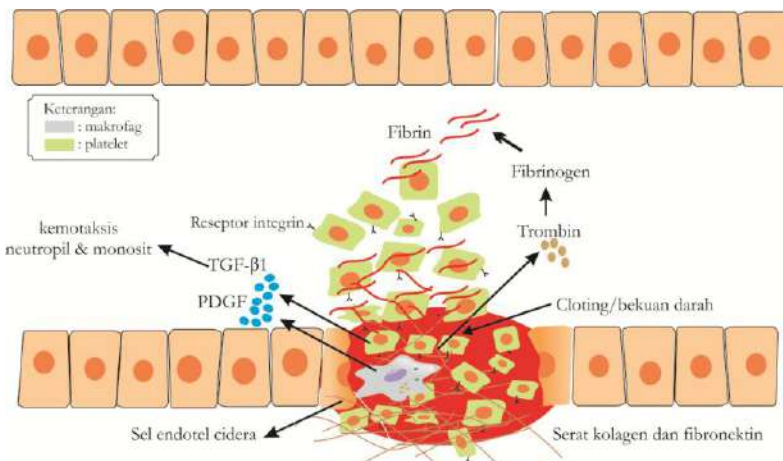
2. Pembentukan untaian fibrin

Untaian fibrin merupakan komponen utama bekuan darah hasil konversi fibrinogen oleh trombin di sekitar area agregasi platelet.

3. Pembentukan bekuan darah

Bekuan darah adalah *scaffold* (kerangka jala) yang mampu menutupi permukaan luka dan menjadi tempat migrasi dan perlekatan berbagai sel, sehingga dapat membesar dan membentuk bekuan darah yang solid, dikenal sebagai sebagai thrombus.

Proses hemostasis sekunder digambarkan dibawah ini.



Gambar 138. Proses molekuler hemostasis sekunder

Pembentukan bekuan darah dimulai dengan agregasi platelet dan kaskade koagulasi yang berdampak pada aktivasi protein plasma, dimulai dengan pembentukan trombin dari membran fosfolipid sel platelet aktif dengan bantuan faktor V dan X. Trombin aktif

mengubah fibrinogen menjadi untaian fibrin, yang kemudian melekat dan integrasi dengan agregasi platelet, sehingga membentuk *scaffold*. Bangunan *scaffold* merupakan tempat migrasi dan pelekatan berbagai sel, diantaranya sel erosit, endotelial, sel inflamasi dan sel fibroblast, termasuk MSC sehingga membentuk bekuan darah sekunder yang dikenal thrombus.

## **4. *Homing* MSC menuju area cedera**

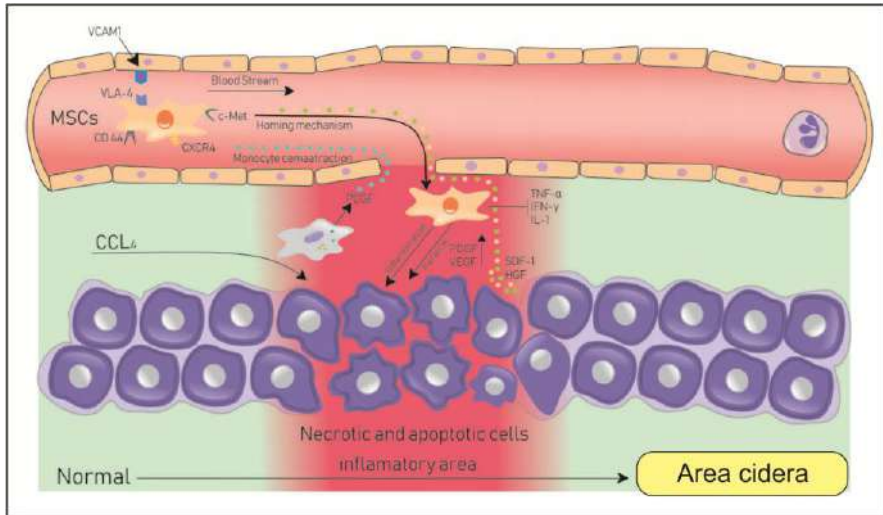
### **4.1. Konsep *homing* MSC**

*Homing* MSC merupakan peristiwa migrasi MSC dari sirkulasi darah menuju area cedera (inflamasi), akibat stimulasi molekul kemoatraksi dan adhesi yang dilepas area cedera dan atau sel radang residen aktif. Fenomena *homing* MSC disebabkan karena MSC memiliki karakteristik yang serupa dengan sel imun, terutama dalam mengekspresikan reseptor TLR-3 dan CXCR3-R. Reseptor ini mampu mendeteksi berbagai *danger* molekul seperti TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  dan SDF-1 yang dilepas oleh sel radang aktif, terutama oleh sel dendritik dan sel makrofag. *Homing* MSC merupakan hal penting dalam dunia klinis, karena memungkinkan MSC untuk mendeteksi dan memasuki area cedera secara presisi sekalipun MSC diberikan secara transplanasi sistemik

### **4.2. Mekanisme molekuler *homing* MSC**

*Homing* MSC terjadi ketika area inflamasi/ cedera melepas protein SDF-1 dan HGF yang mampu berperan sebagai kemoatraksi terhadap MSC. MSC merespon dan mengikat SDF-1 melalui reseptor CXCR-3 dan HGF melalui c-METR. Saat bersamaan sel dendritik residen aktif juga melepas molekul TNF $\alpha$  dan IFN $\gamma$  (mediator inflamatori poten) yang berperan sebagai kemoatraktan terhadap MSC. MSC meresponnya dengan mengikat TNF $\alpha$  dan IFN $\gamma$  melalui reseptor TLR-3. Sisi lain proses migrasi MSC membutuhkan perlekatan pada sel endotel dengan cara mengikat molekul adhesi berupa VCAM-1 dan P-*selectin* melalui reseptor VLA-4 dan CD-44.

Mekanisme molekuler *homing* MSC dijelaskan dalam gambar dibawah ini.



Gambar 139. Mekanisme molekuler *homing* MSC

Area inflamasi/cidera paska trauma fisik/ kimia (pemberian CCL4) menyebabkan pelepasan molekul SDF-1 dan HGF. MSC merespondan mendeteksi molekul tersebut dan mengikatnya menggunakan reseptor CXCR-3 dan c-METR. Sisi lain area cedera memicu aktivasi sel makrofag residen untuk melepas sitokin TNF $\alpha$  dan IFN $\gamma$ . MSC mampu mendeteksi keberadaan sitokin tersebut melalui reseptor TLR-3 MSC. Proses diatas menyebabkan MSC *homing* dan mendekati sel endotel untuk proses pengikatan. Hal ini dilakukan dengan cara mengikat molekul VCAM-1 dan P-selectin melalui reseptor VLA-4 dan CD-44 MSC. Pengikatan molekul adhesi dengan reseptor MSC menyebabkan proses migrasi secara trans-endothelial mengikuti pola leukopedesis. Secara spesifik pola tersebut berupa pergerakan motilitas MSC seperti *rolling*, *attaching*, *spreading*, *traction* dan *retraction*. Proses pergerakan ini memungkinkan MSC bergerak maju ke depan keluar endotel kapiler menuju area cidera.

## 5. Molekuler inflamasi

Tahapan inflamasi merupakan tahapan krusial dalam proses penyembuhan luka.

Tahapan molekuler inflamasi dibagi menjadi:

1. Peningkatan permeabilitas kapiler
2. Migrasi sel radang neutrofil
3. Migrasi sel radang monosit
4. Migrasi sel radang limfosit

Migrasi sel radang terjadi secara kemotaksis dengan tujuan utama pembuangan jaringan nekrotik, debris asing atau bakteri. Aktivasi sel radang juga bertujuan untuk pelepasan molekul sitokin dan *growth factor* dalam rangka memperkuat aktivitas sel radang dalam hal fagositosis dan migrasi, disamping mendorong proses inflamasi untuk segera memasuki tahapan proliferasi.

### 5.1 Pengertian inflamasi

Fase inflamasi adalah suatu tahapan dalam penyembuhan luka yang terjadi sesaat setelah proses hemostasis tercapai, dimulai dari peningkatan permeabilitas vaskuler, migrasi sel radang dan aktivitas fagositosis-sekretome sel radang. Fase inflamasi merupakan proses seluler yang melibatkan interaksi berbagai molekul sitokin dan *growth factor* yang saling tumpang tindih dan dapat terpolarisasi sesuai dengan *niche*. Secara spesifik inflamasi ditandai dengan kemunculan berbagai sel radang yaitu:

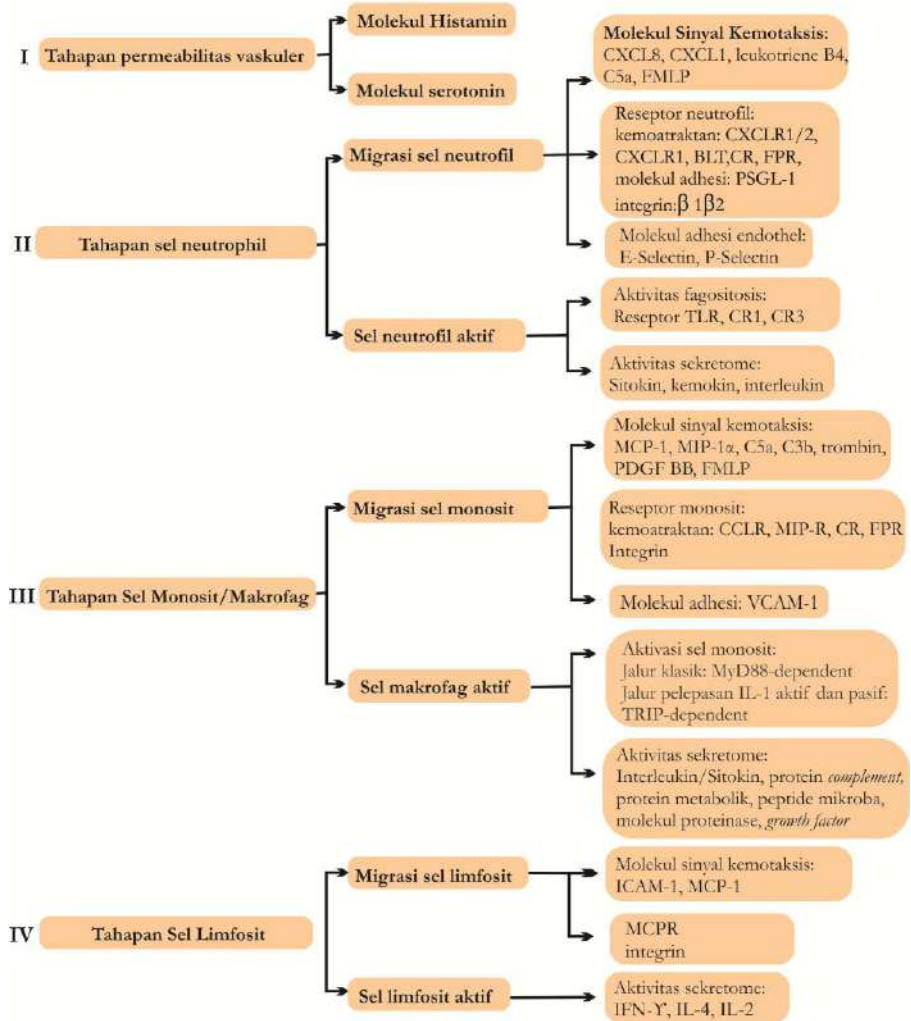
1. Sel neutrophil dalam 24-36 jam
2. Sel monosit dalam 48-72 jam
3. Sel limfosit dalam 5 hari kemudian.

### 5.2 Tahapan inflamasi

Bedasarkan perjalanan sel radang dan molekul yang terlibat maka sistematika molekuler inflamasi kami bahas menjadi 4 tahapan.

Secara spesifik tahapan tersebut seperti skema dibawah ini

**Sistematika Tahapan Molekuler Inflamasi**



Gambar 140. Tahapan inflamasi

**6. Tahapan peningkatan permeabilitas kapiler**

Peningkatan permeabilitas kapiler dapat berimplikasi pada migrasi dan transmigrasi berbagai sel radang termasuk MSC,

disamping terjadi perembesan (kebocoran) plasma darah dari ruang intravaskuler menuju kompartemen ekstra-seluler.

### **6.1 Pengertian permeabilitas kapiler**

Peningkatan permeabilitas kapiler adalah pembentukan ruang celah antar sel endotel vaskuler, sehingga memungkinkan bagi berbagai sel radang untuk keluar dari sirkulasi darah (migrasi) melalui celah dan kemudian transmigrasi menuju area inflamasi.

### **6.2 Molekuler permeabilitas kapiler**

Secara spesifik proses molekuler yang terjadi dalam peningkatan permeabilitas kapiler adalah akibat stimulasi molekul:

#### 1. Molekul serotonin

Serotonin adalah neurotransmitter monoamine yang disekresi platelet aktif saat proses hemostasis dengan fungsi sebagai agen vasodilatasi. Hal ini disebabkan karena serotonin memediasi pelepasan *nitro oxide* (NO) dari sel endothel vaskuler. NO yang bebas merupakan sinyal relaksasi otot polos vaskuler sekitar, sebagai *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF).

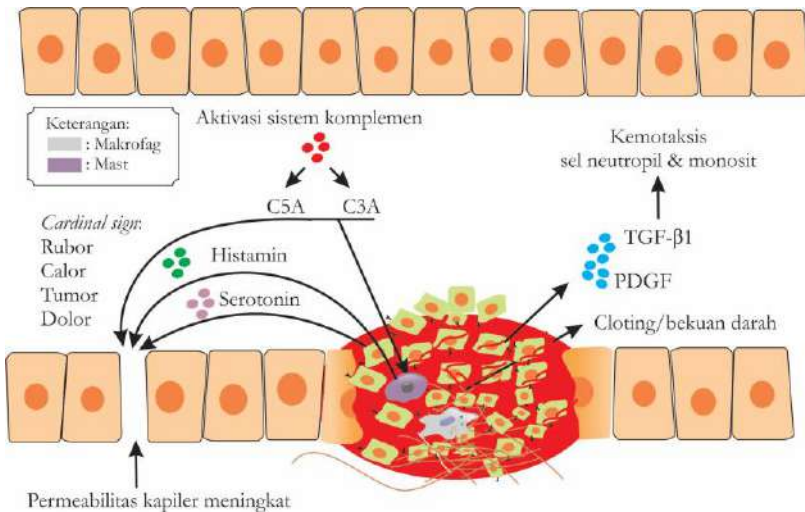
#### 2. Molekul histamin

Histamin adalah molekul vasoaktif yang disekresi sel mast aktif dengan fungsi sebagai agen vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas kapiler, disamping mediator inflamasi.

Pelepasan mediator inflamasi dapat memunculkan tanda patognomonik disekitar area inflamasi yang dikenal sebagai *cardinal sign* yaitu:

- 1) Rubor (kemerahan)
- 2) Calor (panas)
- 3) Tumor (pembengkakan)
- 4) Dolor (nyeri).

Proses peningkatan permeabilitas kapiler digambarkan dibawah ini.



Gambar 141. Molekuler permeabilitas kapiler

Pelepasan serotonin dan histamin menyebabkan vasodilatasi kapiler. Hal ini berakibat pada penurunan aliran darah sekitar area inflamasi dan kemudian menarik sel radang, terutama sel neutrophil mendekati endotelium (menjauhi pusat lumen). Hal ini disebabkan karena laju aliran darah sisi tepi relatif lebih rendah dibandingkan dengan pusat lumen. Saat yang sama terjadi aktivasi sistem komplemen secara kaskade yang menghasilkan C5a/ C3a dan bersama dengan histamin memicu peningkatan permeabilitas kapiler.

Sisi lain sesaat neutrophil mendekati endotel maka akan terjadi ikatan antara sel leukosit dengan endotel melalui selektin yang diekspresikan keduanya. Transmigrasi leukosit menuju area inflamasi akibat stimulasi kemokine CXCL8 yang akan dibahas berikutnya.

## 7. Molekuler sel neutrofil

Neutrofil adalah sel leukosit pertama yang bermigrasi kedalam area inflamasi sesaat setelah bekuan darah (hemostasis sekunder) terbentuk. Berdasarkan waktu kejadian dan molekul yang terlibat

dalam tahapan ini, maka kami membagi tahapan sel neutrofil menjadi 3 aktivitas, yaitu:

1. Aktivitas migrasi sel neutrofil
2. Gerakan motilitas neutrofil
3. Aktivasi sel neutrofil

## **7.1 Migrasi sel neutrofil**

Migrasi neutrofil adalah aktivitas perpindahan sel neutrofil dari sirkulasi darah menuju area cedera/ inflamasi. Aktivitas migrasi disebabkan karena sel neutrofil mengekspresikan berbagai reseptor permukaan yang mampu mendeteksi gradien kimia berbagai molekul sinyal kemoatraksi dan molekul adhesi yang dilepas oleh sel atau matriks sekitar jaringan cedera. Aktivitas migrasi neutrofil akan menurun dan berhenti ketika luka terkontrol dan proses penyembuhan mulai memasuki tahapan selanjutnya.

Secara spesifik aktivitas migrasi dibagi menjadi:

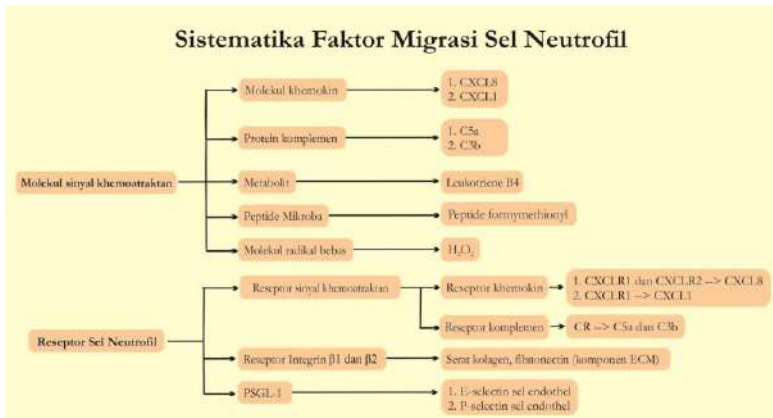
1. Waktu migrasi neutrofil

Aktivitas migrasi sel neutrofil terjadi sesaat setelah proses hemostatis sekunder tercapai dan berlangsung hingga 24-36 jam, kemudian akan menurun secara progresif dan mengalami apoptosis, sehingga proses fagositosis diambil alih oleh sel radang lainnya. Masa hidup sel neutrofil yang singkat bertujuan untuk membatasi kerusakan jaringan karena neutrofil melepas molekul litik yang dapat merusak jaringan sekitar. Aktivitas fagositosis neutrofil pada jaringan menimbulkan gambaran penampilan warna keputihan/ kekuningan.

2. Faktor molekuler dalam migrasi sel neutrofil

Migrasi dan transmigrasi sel neutrofil secara teoritis akibat paparan berbagai molekul kemokin pada reseptor sel neutrofil. Molekul kemokin bersifat kemoatraksi yang dapat menarik dan memandu sel neutrofil keluar sirkulasi darah menuju area inflamasi.

Secara sistematis kami membagi menjadi 2 kelompok besar seperti gambar dibawah ini



Gambar 142. Sistematika faktor migrasi sel neutrofil

## 7.2 Molekuler kemoatraksi sel neutrofil

Molekul kemoatraksi adalah molekul sinyal kemokin yang dilepas sel radang, komponen mikroba dan molekul plasma dengan tujuan menarik dan memandu sel neutrofil keluar sirkulasi darah menuju area inflamasi. Secara spesifik molekul kemokin sel neutrofil dibagi menjadi:

### 1. CXCL8 (IL-8)

CXCL8 adalah molekul kemokin poten yang pertama kali disekresi makrofag residen aktif, dengan peran sebagai kemoatraksi sel neutrofil (*neutrophil chemotactic factor*).

### 2. CXCL1 (GRO-α)

CXCL1 adalah molekul kemokin yang disekresi makrofag resident aktif, dengan peranan sebagai kemoatraksi sel neutrofil.

### 3. Leukotrient B4

Leukotrient B4 adalah metabolit utama sel neutrofil yang dapat memodulasi inflamasi, disamping sebagai faktor kemoatraksi sel neutrofil.

### 4. Komplemen faktor C5a

C5a adalah protein fragmen hasil potongan komponen komplemen C5 oleh enzim C5-convertase hasil aktivasi jalur klasik, alternatif atau lektin yang dapat berfungsi sebagai fagositosis dan anaphilatoksin, disamping sebagai kemoatraksi dan perlekatan bagi sel neutrofil dan monosit pada endotel vaskuler.

5. *Peptide formylmethionyl*

*Peptide formylmethionil* adalah potongan fragmen bakteri yang dapat dikenali oleh sel neutrofil melalui reseptor TLR, sehingga dapat berperan sebagai kemotaksis.

6. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> merupakan komponen molekul kimia radikal bebas, yang berperan kuat sebagai molekul kemoatraksi berbagai sel radang, termasuk neutrofil.

### **7.3 Reseptor integrin β1 dan β2 sel neutrofil**

Reseptor integrin β1 dan β2 adalah reseptor transmembran yang diekspresikan membran permukaan sel neutrofil aktif dengan fungsi sebagai pengikat matriks ekstraseluler, terutama serat kolagen, fibronectin dan fibrinogen yang terekspos sekitar sel endotelium cidera. Secara spesifik pengikatan reseptor integrin-ligan menyebabkan sel neutrofil melekat pada sel endotel yang kemudian mengaktivasi jalur sinyal transduksi, sehingga menimbulkan respon seluler berupa sitoskeleton interseluler. Sisi lain reseptor integrin juga berperan penting dalam modulasi jalur sinyal reseptor tirosin kinase (RTK), yang berakibat pada peningkatan aktivitas fungsional sel.

### **7.4 Peran molekul adhesi dalam migrasi neutrofil**

Molekul adhesi adalah molekul yang diekspresikan permukaan membran sel endothel aktif dengan fungsi mengikat ligan antar sel (termasuk sel neutrofil) dan atau komponen ECM lain. Komponen molekul adhesi sel neutrofil berupa:

1. *P-selectin*

P-selectin adalah molekul adhesi yang diekspresikan sel endotel akibat stimulasi thrombin, bradikinin dan histamin yang

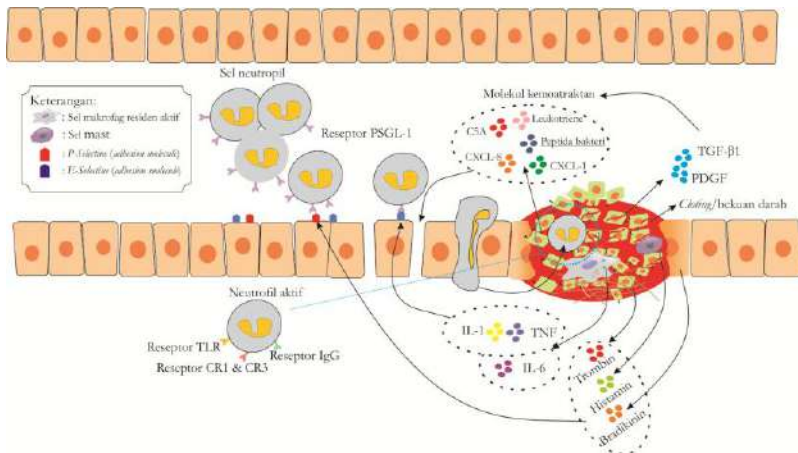
dilepas oleh jaringan cidera.

## 2. *E-selectin*

*E-selectin* adalah molekul adhesi yang diekspresikan sel endotel akibat stimulasi  $TNF-\alpha$  yang dilepas makrofag residen aktif.

Secara spesifik *P-selectin* dan *E-selectin* yang diekspresikan endotel akan diikat oleh *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1) sel neutrofil, sehingga terjadi perlekatan sel neutrofil pada endotel yang dapat memicu migrasi dan transmigrasi.

Secara sistematis peranan molekuler yang terlibat dalam migrasi neutrophil digambarkan dibawah ini.



Gambar 143. Peranan molekuler adhesi sel neutrofil

Perlekatan sel neutrofil pada endotel disebabkan karena reseptor PSGL-1 sel neutrofil mengikat *P-selectin* dan *E-selectin* sel endotel. Secara spesifik ekspresi *P-selectin* distimulasi oleh thrombin, bradikinin dan histamine yang dilepas sel platelet dan sel mast aktif, sedangkan *E-selectin* distimulasi oleh  $TNF-\alpha$  dan IL-1 yang dilepas sel makrofag aktif. Perlekatan sel neutrofil pada endotel mengakibatkan migrasi sel neutrofil menuju area cidera setelah stimulasi sinyal kemokin CXCL8 yang dilepas makrofag residen aktif. Sisi lain makrofag aktif juga melepas CXCL1 untuk menunjang migrasi sel neutrofil dan diperkuat dengan pelepasan komplemen C5a aktif, *Leukotriene B4*, dan *peptide N-formyl-methionyl* bakteri.

## 8. Gerakan motilitas neutrofil

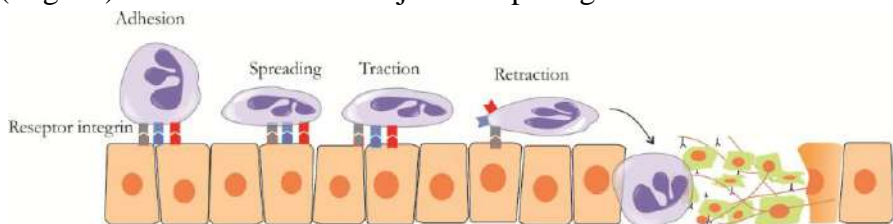
Neutrofil memiliki kemampuan bergerak secara dinamis menuju ke area cedera disebabkan karena properti yang dimiliki sel neutrofil mampu merespon terhadap stimulasi molekul kemoatraktan.

### 8.1 Pengertian motilitas neutrofil

Gerakan motilitas adalah gerakan tertentu sel neutrofil dalam transmigrasi menuju area cedera/ inflamasi paska terjadi perlekatan pada sel endotel. Gerakan tersebut berupa memanjang, traksi, retraksi dan lepas secara amubiasis. Gerakan motilitas neutrofil merupakan bentuk polaritas neutrofil akibat aktivitas protein *Rho GTPases* (jalur sinyal transduksi Ras) yang meregulasi protein aktin intraseluler, yaitu protein yang berperan sentral dalam *cytoskeleton dynamic* dan pergerakan sel. Sisi lain aktivasi *Rho GTPase* juga dapat terjadi akibat induksi molekul lipid via jalur sinyal transduksi PI3K.

### 8.2 Motilitas neutrofil

Secara spesifik gerakan motilitas neutrofil dibagi menjadi 4 tahap, dimulai dengan perlekatan sel neutrofil pada endotel via *E-selectin* dan *P-selectin*, berlanjut dengan *spreading* berupa gerakan memanjang sel neutrofil membentuk lamellipodia dan filipodia, kemudian traksi dengan menarik tepi ujung sel neutrofil yang berakhir dengan retraksi berupa penarikan neutrofil ke belakang, sehingga terlepas dan bergerak maju kedepan menuju area cedera (migrasi). Motilitas neutrofil dijelaskan pada gambar dibawah ini



Gambar 144. Motilitas neutrofil

## 9. Aktivitas sel neutrofil

Aktivasi sel neutrofil terjadi ketika sel neutrofil telah berada pada area cedera, sekalipun proses dimulai saat migrasi. Aktivasi sel neutrofil terjadi melalui pengikatan molekul ligan pada reseptor TLR neutrofil, yang kemudian mengaktivasi cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*) sehingga memicu sinyal transduksi yang berakibat pada aktivasi sel neutrofil.

### 9.1 Karakteristik molekuler neutrofil aktif

Secara sistematis neutrofil aktif memiliki karakteristik sebagai berikut:

1. Mengekspresi reseptor antigen permukaan:
  - 1) Reseptor TLR
  - 2) Reseptor CR1 dan CR3
  - 3) Reseptor IgG
2. Peningkatan aktivitas fagositosis
3. Kemampuan melepas *soluble molecule* litik:
  - 1) myeloperoxidase
  - 2) defensin
  - 3) cathepsin
  - 4) lysozyme
  - 5) lactoferrin
  - 6) collagenase.

### 9.2 Ekspresi reseptor antigen permukaan

Neutrofil aktif mengekspresikan berbagai reseptor permukaan membran baru yang sebelumnya tidak ada dengan tujuan untuk membantu peningkatan aktivitas fagositosis dan merespon terhadap stimulasi berbagai molekul *danger*. Reseptor tersebut berupa:

1. Reseptor CR1 dan CR3

CR1 dan CR3 adalah reseptor yang diekspresikan neutrofil dengan tujuan untuk mengikat dan memfagositosis kompleks

C3b/C3b1-bakteri (opsonisasi-antibodi bakteri). Opsonisasi bakteri menyebabkan sel neutrofil mudah mendeteksi dan mengikat bakteri.

2. Reseptor IgG

Reseptor IgG adalah reseptor yang diekspresikan sel neutrofil untuk mengikat molekul IgG yang telah opsonisasi dengan bakteri.

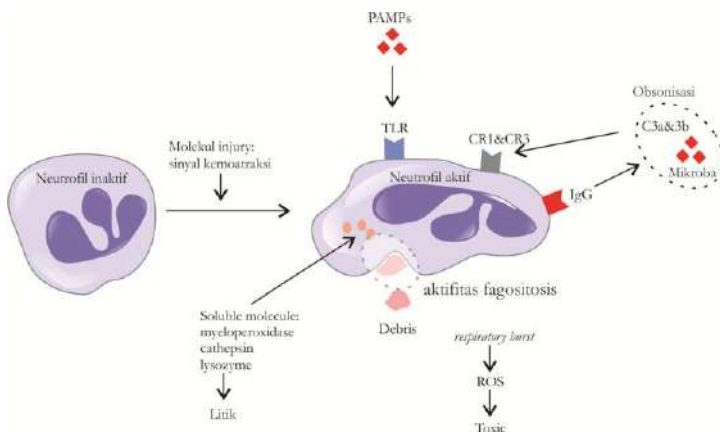
3. Reseptor TLR

Reseptor TLR adalah reseptor yang diekspresikan sel neutrofil dan berbagai sel radang, terutama makrofag yang berperan penting dalam mendeteksi dan mengeliminasi berbagai molekul *danger* DAMP dan mikroorganisme PAMP, disamping polarisasi sel

**9.3 Aktivitas fagositosis**

Aktivitas fagositosis adalah aktivitas ingesti atau penelanan terhadap berbagai molekul *danger* DAMP/ PAMP baik berupa material nekrotik/ debris asing atau mikroba (pembersihan/ *scavenge*) ke dalam tubuh sel melalui proses fagosom. Aktivitas yang terjadi dalam fagosom berupa pelepasan enzim hidrolitik sehingga mampu melisiskan berbagai sel dan matriks sekitar sel neutrofil, disamping terjadi aktivitas *respiratory burst* menghasilkan ROS yang toksik bagi mikroba (*bakteri* *adal* *potent*) dan jaringan sekitar.

Secara spesifik karakteristik neutrofil aktif dijelaskan pada gambar dibawah ini.



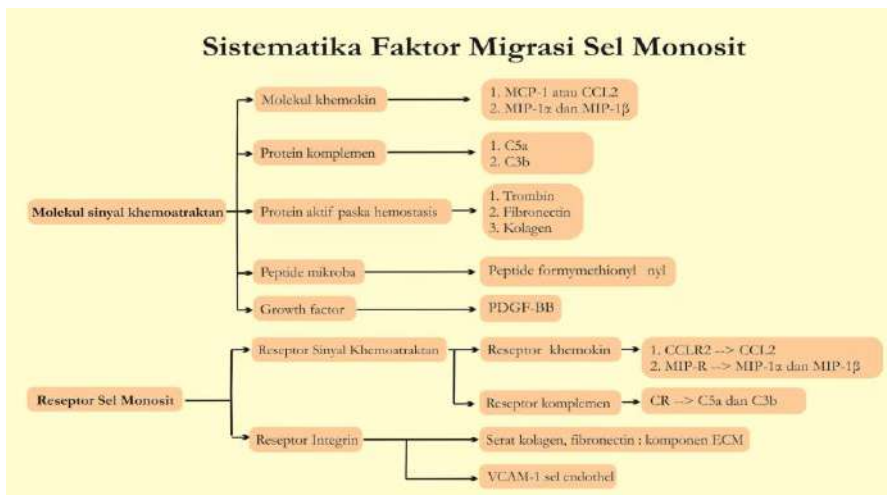
Gambar 145. Aktivitas neutrofil aktif

## 10. Molekuler sel monosit

Migrasi monosit adalah aktivitas perpindahan sel monosit dari sirkulasi darah menuju area cedera/ inflamasi. Aktivitas migrasi disebabkan karena sel monosit mengekspresikan berbagai reseptor permukaan yang mampu mendeteksi gradien kimia terhadap berbagai molekul sinyal kemoatraksi dan molekul adhesi yang dilepas sel atau matriks sekitar jaringan cedera.

### 10.1 Migrasi sel monosit

Migrasi sel monosit dari sirkulasi darah menuju area cedera/ inflamasi akibat stimulasi berbagai faktor kemotaksis. Secara spesifik aktivitas migrasi monosit terjadi sekitar 48-72 jam terutama setelah sel neutrofil mulai apoptosis. Terdapat banyak faktor yang terlibat dalam migrasi sel monosit. Secara sistematis kami jelaskan seperti gambar dibawah ini.



Gambar 146. Sistematika faktor migrasi sel monosit

### 10.2 Molekul kemoatraksi sel monosit

Molekul kemoatraksi adalah molekul sinyal kemokin yang dilepas sel radang, komponen mikroba dan molekul plasma yang

berfungsi sebagai kemoatraksi (menarik dan memandu) sel monosit keluar sirkulasi darah menuju area inflamasi. Secara spesifik molekul kemoatraksi sel monosit adalah:

1. MCP-1 atau CCL2

MCP-1 (*macrophage chemoattractant protein*) adalah molekul kemokin monosit yang disekresi sel keratinosit dan makrofag residen aktif, disamping limfosit dan sel mast saat terjadi cedera.

2. MIP-1 $\alpha$  dan MIP-1 $\beta$

MIP (*macrophage inflammatory protein*) adalah molekul kemokin monosit yang disekresi sel neutrofil aktif setelah 5-6 jam dalam area inflamasi.

3. Trombin, fibronektin dan kolagen

Trombin, fibronektin dan kolagen adalah protein aktif hemostasis yang dapat berfungsi sebagai kemoatraksi bagi monosit.

4. Molekul PDGF-BB

PDGF-BB adalah *growth factor* yang dilepas oleh sel platelet, fibroblas dan monosit dengan tujuan memicu pertumbuhan dan pembelahan sel/ mitogenesis, disamping sebagai kemotaksis monosit.

5. *N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine* (FMLP)

FMLP adalah potongan bakteri lisis/ debris bakteri, terutama *lipopolysaccharide* yang berperan sebagai kemoatraksi monosit disamping aktivasi sel monosit (jalur pelepasan radikal bebas).

6. Protein *complement C5a*

C5a adalah protein fragmen hasil potongan komplemen C5 oleh enzim C5-convertase hasil aktivasi jalur klasik, alternatif atau lektin dengan fungsi meningkatkan migrasi neutrofil dan monosit, disamping fagositosis dan sebagai anafilatoksin.

### **10.3 Reseptor sel monosit**

Reseptor sel monosit berupa reseptor transmembran yang diekspresikan pada membran permukaan sel dengan tujuan mengikat matriks ekstraseluler, terutama serat kolagen, fibronektin dan fibrinogen yang terekspos sekitar endotelium cedera. Pengikatan

reseptor tersebut dapat menyebabkan sel monosit aktif dan bermigrasi. Secara spesifik ikatan reseptor monosit dan ligan molekul dijelaskan sebagai berikut:

1. CCL2-CCL2R  
Reseptor CCL2R sel monosit akan mengikat ligan CCL2.
2. MIP-1 $\alpha$  dan MIP-1 $\beta$ -MIPR  
Reseptor  $\beta$ -MIPR sel monosit akan mengikat ligan MIP-1 $\alpha$  dan MIP-1 $\beta$ .
3. PDGF-PDGFR  
Reseptor PDGFR sel monosit akan mengikat ligan PDGF.
4. FMLP(debris bakteri)-FPR  
Reseptor FPR sel monosit akan mengikat ligan FMLP.
5. Leukotrin-BLT  
Reseptor BLT sel monosit akan mengikat ligan leukotrin.
6. Protein komplemen C5a-CR  
Reseptor CR sel monosit akan mengikat ligan C5a

Sisi lain ligan VCAM-1 yang diekspresikan endotel aktif pasca stimulasi IL-1 berperan sebagai molekul adhesi bagi sel monosit.

## **11. Molekuler sel makrofag**

Sel makrofag aktif mampu menginduksi apoptosis sel neutrofil dan mengambil alih fungsi fagosit serta aktif melepaskan berbagai sitokin untuk proses selanjutnya.

### **11.1 Pengertian sel makrofag**

Makrofag adalah hasil polarisasi sel monosit yang memasuki area cedera. Proses dimulai dengan pengikatan sel monosit pada matrik ekstraseluler melalui reseptor integrin  $\beta$ , menyebabkan transduksi sinyal, sehingga memicu ekspresi elemen sinyal transduksi gen sitokin tertentu dan EGR2 dan c-Fos (respon pertumbuhan). Hal ini menimbulkan respon sel monosit berupa peningkatan aktivitas fagosit dan ekspresi sitokin.

## 11.2 Molekul sekresi sel makrofag aktif

Sel makrofag aktif akan mensekresi berbagai molekul bioaktif mediator inflamasi yaitu:

### 1. Molekul TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  adalah mediator inflamasi poten yang terdeteksi dalam 12 jam paska cedera dengan puncak 72 jam. TNF- $\alpha$  merupakan hasil sekresi makrofag aktif sebagai respon stimulasi molekul DAMP atau PAMP, dengan target sebagai berikut:

- 1) Peningkatan permeabilitas kapiler (bersama IL-1 dan IL-6)
- 2) Ekspresi *E-Selectin* untuk migrasi neutrofil. (bersama IL-1)
- 3) Aktivasi sel makrofag/ neutrofil untuk mensekresi M-CSF, G-CSF, GM-CSF sumsum tulang, sehingga terjadi peningkatan hemoepoiesis dan leukositosis perifer
- 4) Sintesis PGE2 di hipotalamus (induksi febris), berperan sebagai pirogen endogenous (bersama IL-1 dan IL-6)
- 5) Sintesis protein akut liver berupa CRP, faktor komplemen, fibrinogen, *mannose binding protein* (M-bp) (bersama IL-6, IL-1 dan LIF)

### 2. Molekul IL-1

IL-1 adalah sitokin proinflamatori yang dilepas makrofag residen aktif yang diperkuat oleh TNF- $\alpha$  makrofag dan endotoxin bakteri. IL-1 menjadi patogenesis luka kronis *non-healing*. Secara spesifik target molekuler IL-1 adalah:

- 1) Mengekspresi *E-Selectin* endotel untuk migrasi neutrofil (bersama TNF- $\alpha$ ), VCAM-1 untuk migrasi monosit dan ICAM-1 untuk migrasi limfosit.
- 2) Mengaktivasi sel neutrofil dan limfosit
- 3) Sintesis PGE2 hipotalamus (induksi febris), sebagai molekul pirogen endogenous (bersama TNF- $\alpha$  dan IL-6)
- 4) Sintesis protein akut liver berupa CRP, faktor komplemen, fibrinogen, *mannose binding protein* (M-bp) (bersama TNF- $\alpha$ , IL-1 dan LIF)

### 3. IL-6

IL-6 adalah sitokin proinflamasi yang disekresi makrofag residen dan limfosit aktif sebagai respon stimulasi PAMP dengan target molekuler berupa:

- 1) Peningkatkan permeabilitas kapiler (bersama TNF- $\alpha$  / IL-1)
- 2) Sintesis PGE2 hipotalamus (induksi febris), sebagai molekul pirogen endogenous (bersama TNF- $\alpha$  dan IL-1)
- 3) Mobilisasi energi jaringan otot dan lemak (suhu meningkat).
- 4) Sintesis protein akut liver berupa CRP, faktor komplemen, fibrinogen, *mannose binding protein* (M-bp) (bersama TNF- $\alpha$ , IL-1 dan LIF)

### 4. *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF)

LIF merupakan sitokin yang berperan dengan target:

- 1) Inhibisi diferensiasi

LIF menghambat diferensiasi sel dan menginduksi *terminal differentiation leukemic myeloid*.

- 2) Sintesis protein akut liver berupa CRP, faktor komplemen, fibrinogen, *mannose binding protein* (M-bp) (bersama TNF- $\alpha$ , IL-1 dan IL-6 )

### 5. *Nitric oxide* (NO)

NO adalah molekul sinyal yang disekresi makrofag aktif dengan peran ganda, yaitu sebagai mediator pro-inflamasi (disekresi makrofag aktif) dan molekul anti-inflamasi (dilepas endotel *intact*). NO dalam keadaan fisiologis dapat mencegah agregasi platelet dan menginduksi vasodilatasi, termasuk kardiovaskuler. Secara spesifik molekul NO berperan sebagai:

- 1) Molekul sinyal dalam patogenesis inflamasi.
- 2) Radikal bebas poten yang toksik terhadap mikroba dan jaringan viable sekitar (disfungsi mitokondria hingga gangguan sintesis DNA). Makrofag aktif dapat mengekspresikan *inducible NO synthesis* (iNOS) yang dapat mengubah L-arginin menjadi L-sitruilin dengan

bantuan oksigen dan NADPH.

3) Neurotransmitter poten pada sinap neuron

4) Regulasi apoptosis

6. IL-12

IL-12 adalah molekul interleukin yang disekresi sel dendritik dan makrofag aktif, disamping neutrofil sebagai respon terhadap stimulasi antigen dengan target:

1) Diferensiasi sel T naif menjadi Th1 aktif, sehingga mensekresi IFN- $\gamma$  dan TNF- $\alpha$ ,

2) Aktivasi sel NK dan limfosit T CD8 sitotoksik, sehingga mensekresi IFN- $\gamma$  dan TNF- $\alpha$ .

3) Menurunkan sekresi IL-4 yang dihasilkan

7. Metabolit aktif: tromboxan A<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , leukotrien B<sub>4</sub> dan C<sub>4</sub>

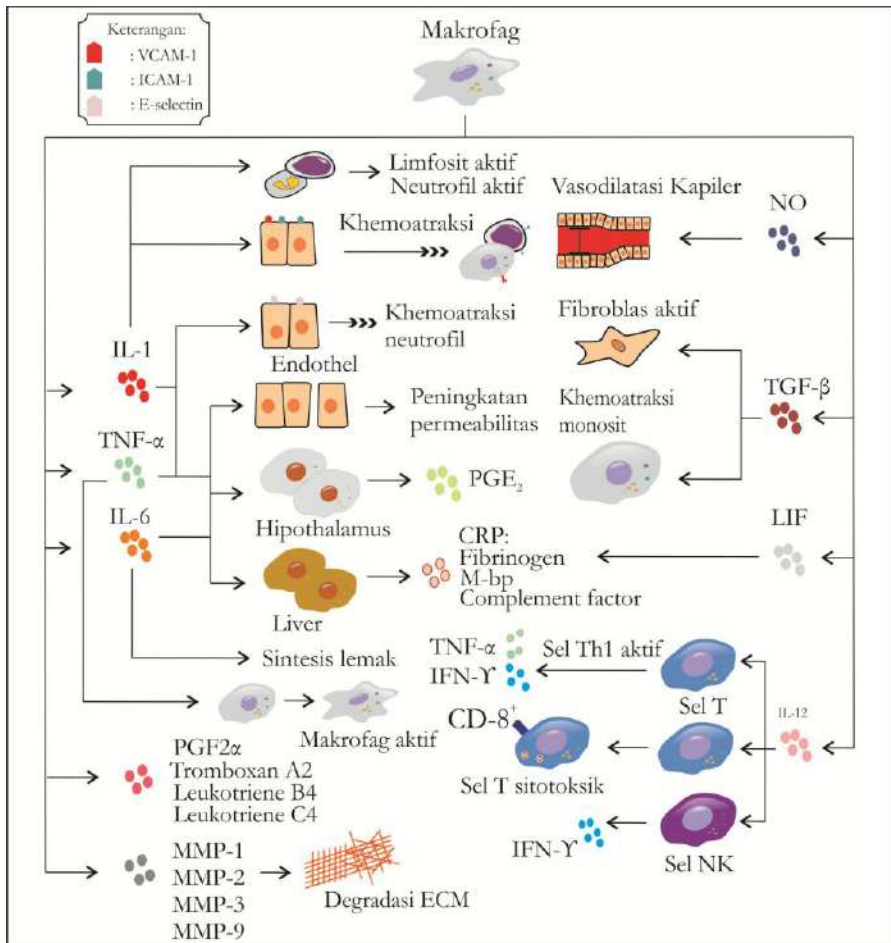
Makrofag aktif menginduksi *phospholipase* yang berakibat degradasi membran fosfolid sel makrofag, sehingga menyebabkan pelepasan protein tromboxan A<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , leukotrien B<sub>4</sub> dan C<sub>4</sub>

8. MMP-1, MMP-2, MMP-3 dan MMP-9 (proteinase)

Makrofag aktif melepaskan MMP-1, MMP-2, MMP-3 dan MMP-9 (enzim pendegradasi ECM) sebagai pembersihan material asing dan mekanisme pergantian EMC serta mendorong migrasi sel radang (via celah jaringan yang terbentuk). Aktivitas ini tergantung pada jalur cAMP (diinhibisi glukokortikoid dan NSAID).

9. TGF- $\beta$

TGF- $\beta$  merupakan polipeptida yang disekresi platelet dan makrofag residen aktif yang peranannya tergantung pada fase penyembuhan luka dapat sebagai aktivasi makrofag di awal inflamasi dan inhibisi makrofag/ limfosit fase selanjutnya.



Gambar 147. Kompleksitas molekul makrofag

## 12. Molekuler sel limfosit

Sel limfosit T adalah sel radang ketiga yang bermigrasi ke dalam area cedera/ luka pada hari ke 5 dan puncaknya pada hari ke 7.

### 12.1 Migrasi sel limfosit

Secara spesifik migrasi sel limfosit dari sirkulasi darah distimulasi oleh beberapa faktor kemoatraksi, yaitu:

1. ICAM-1

2. CCL2 (MCP-1)
3. CXCL12 (SDF-1)
4. CXCR3

1. Ekspresi ICAM-1

ICAM-1 sebagai molekul adhesi limfosit yang diekspresikan endotel paska stimulasi IL-1 (hasil sekresi makrofag residen aktif).

2. CCL2 (MCP-1)

MCP-1 (*macrophage chemoattractant protein*) adalah molekul sinyal kemokin limfosit (monosit dan sel mast) yang dilepas sel keratinosit saat cedera. Ekspresi MCP-1 yang berkepanjangan menyebabkan migrasi neutrofil, makrofag dan limfosit T berkepanjangan sehingga terjadi respon inflamasi terus menerus, yang menyebabkan penyembuhan luka tidak terjadi.

3. CXCL12 (SDF-1)

SDF-1 adalah molekul sinyal kemokin limfosit yang dilepas jaringan cedera, terutama oleh sel endotelial, miofibroblas dan keratinosit, disamping mendorong proses angiogenesis dan proliferasi/ reepitelisasi. Secara spesifik SDF-1 merupakan sinyal kemoatraksi bagi sel progenitor/ sel punca sirkuler sumsum tulang (termasuk MSC) menuju sirkulasi area cedera di jaringan perifer.

4. CXCL10 (IP-10)

CXCL10 merupakan molekul sinyal kemokin limfosit (*interferon inducible protein 10*) yang diproduksi oleh keratinosit. Kadar molekul ini meningkat pada luka akut dan juga keadaan inflamasi kronis. CXCL10 mengganggu proses penyembuhan karena meningkatkan proses inflamasi dan merekrut sel limfosit ke dalam area cedera serta menghambat proliferasi sel dengan cara menurunkan proses reepitelisasi, mencegah angiogenesis/ migrasi sel fibroblas.

5. CXCR3

Molekul CXCR3 adalah molekul sinyal kemokin limfosit.

## **12.2 Aktivitas sel limfosit**

Sel limfosit T terlibat penting dalam penyembuhan luka

kronik. Sel limfosit diduga berperan minimal dalam penyembuhan akut terutama ketika tidak ada inflamasi yang berlebihan. Secara spesifik kerja limfosit dapat dilihat dalam hubungan antara sel dendritik dengan sel limfosit yang dikenal dengan APC, dimana sel makrofag memproses debris asing sebagai antigen kemudian dipresentasikan pada sel limfosit. Limfosit teraktivasi akan melepaskan sitokin sebagai berikut:

1. IFN- $\gamma$

IFN- $\gamma$  adalah sitokine proinflamatori yang disekresikan oleh limfosit T aktif sebagai respon terhadap stimulasi IL-12 yang disekresi oleh sel makrofag aktif. Secara spesifik IFN- $\gamma$  berfungsi sebagai:

- 1) Mengaktivasi sel makrofag dan leukosit PMN (fagositosis aktif), sebaliknya makrofag aktif melepas IL-12 untuk mengaktivasi sel limfosit T, disamping IL-1 dan TNF- $\alpha$ .
- 2) Menurunkan sintesis prostaglandin (molekul anti-inflamasi), sehingga efek mediator inflamasi meningkat.
- 3) Menahan sel makrofag agar tetap dalam area cidera.
- 4) Faktor penting dalam terjadinya luka kronis, sehingga sering digunakan dalam terapi hipertropik dan *scar keloid* karena efeknya dalam memperlambat produksi kolagen dan *cross linking* dan saat yang sama meningkatkan produksi MMP-1 (kolagenase).

2. IL-4

IL-4 adalah sitokin yang berperan dalam:

- 1) Induksi diferensiasi sel T naif menjadi sel Th2

IL-4 mampu menginduksi diferensiasi sel T naif (sel Th0) menjadi sel Th2, yang kemudian secara *feedback* positif menghasilkan IL-4 secara mandiri.

- 2) Polarisasi makrofag tipe M1 menjadi M2

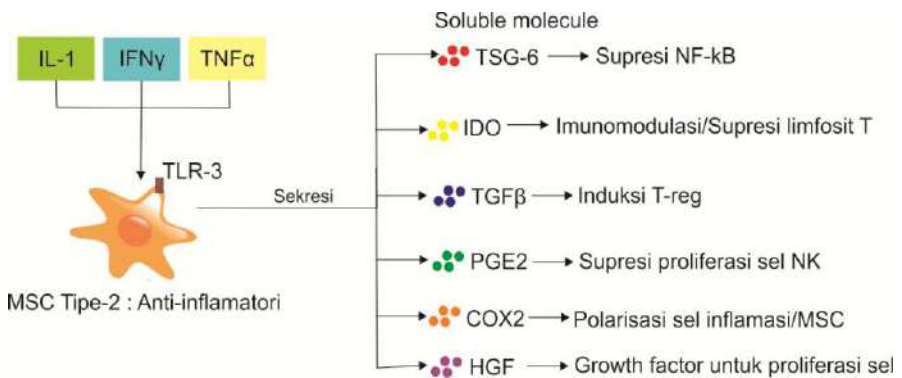
IL-4 berperan penting dalam inflamasi kronis, terutama dengan mengubah aktivasi makrofag (polarisasi) melalui

jalur alternatif, sehingga menghasilkan M2. Secara teoritis keberadaan IL-4 dengan sitokin anti-inflamasi (IL10 dan TGF) akan mengurangi inflamasi kronis.

## 13. MSC dan inflamasi

### 13.1 Konsep imunoregulasi MSC

MSC mampu menghindari diri dari deteksi sistem imunitas tubuh karena MSC tidak mengekspresikan antigen HLA class II pada permukaan sel sehingga tidak dikenali oleh sel APC-limfosit T. Secara spesifik MSC mensupresi sel radang dengan cara melepaskan molekul seperti pada gambar dibawah ini.



Gambar 148. Imunoregulasi MSC

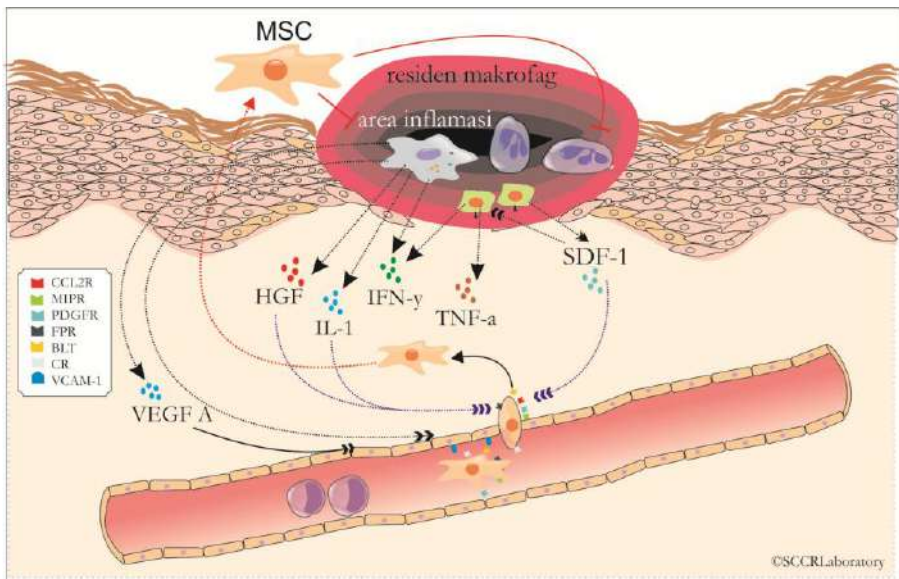
### 13.2 Mekanisme immunosupresi MSC

Secara spesifik MSC mensupresi berbagai sel radang dengan cara sebagai berikut :

1. MSC supresi sel limfosit: dengan melepas iNOS (tikus) atau iDO (manusia), PGE2, TGF- $\beta$ 1, HGF, sHLA-G5 dan HO1 sehingga berakibat pada :
  - 1) Proliferasi sel limfosit T menurun
  - 2) Limfosit T CD4+, Limfosit T CD8+ dan Sel B tersupresi
  - 3) Apoptosis sel T dihambat

- 4) Pergeseran sel T menjadi TH2 terinduksi
- 5) Promosi Treg
2. MSC supresi sel NK dengan cara melepas PGE2, IDO dan sHLA-G5 sehingga berakibat pada :
  - 1) Hambatan proliferasi sel NK
  - 2) Hambatan aktivitas sitotoksitas sel NK *resting*
3. MSC supresi sel dendritik dengan cara melepas IL-10, sehingga berakibat pada :
  - 1) Hambatan maturasi sel dendritik
  - 2) Promosi dendritik matur menjadi imatur

Secara molekuler mekanisme immunosupresi MSC pada inflamasi dijelaskan pada gambar dibawah ini.



Gambar 149. Peran MSC dalam mengontrol inflamasi

## 14. Tahapan proliferasi

Tahapan proliferasi merupakan tahapan penyembuhan luka berupa proses reparasi jaringan rusak secara terintegrasi melalui

angiogenesis, epitelisasi dan granulasi. Tahapan ini merupakan bentuk pergeseran arah penyembuhan luka dari fase akut inflamasi menjadi bentuk regenerasi, yang dimulai pada hari ke-3, ketika proses hemostasis tercapai sempurna dan inflamasi telah terkontrol yang dapat berlangsung hingga 2 minggu. Secara mikroskopis tahapan proliferasi ditandai oleh migrasi fibroblas dan pembentukan jaringan granulasi secara berlebihan akibat deposisi ECM baru hasil sintesis fibroblas aktif. Sisi lain deposisi ECM menggantikan matriks *scaffold* (kompleks fibrin dan fibronektin) sebelumnya.

Secara sistematis tahapan proliferasi dibagi menjadi:

1. Aktivitas angiogenesis
2. Aktivitas fibroplasia
3. Aktivitas epitelisasi

MSC berperan sentral dalam ketiga tahapan tersebut, mulai dengan menginisiasi pembentukan angiogenesis, aktivasi sel fibroblas sehingga terjadi deposisi kolagen secara signifikan, hingga pembentukan sel epitel baru (re-epitelisasi). Secara spesifik peranan MSC dalam ketiga tahapan tersebut adalah dengan:

1. Melepas *soluble molecule* yang secara parakrin
2. Berdiferensiasi menjadi sel spesifik sekitar area luka
3. Melakukan fusi dan transdiferensiasi
4. Melakukan eksosom

Sekalipun demikian peranan *soluble molecule* dalam proliferasi ini sangat dominan, disebabkan karena kemampuannya dalam mengaktivasi sel sekitarnya, disamping menginduksi *endogenous stem cell* agar terlibat aktif dalam proses proliferasi.

## **15. *Soluble molecule* MSC**

Peranan MSC dalam proliferasi adalah melepas berbagai molekul GF yang berperan penting dalam angiogenesis, pembentukan fibroblas, deposisi kolagen dan pembentukan epitelisasi. Secara spesifik molekul yang dilepas MSC adalah :

## **15.1 FGF-1 dan FGF-2**

FGF-1 dan FGF-2 adalah molekul angiogenik *growth factor* pertama (sub-famili FGF) yang disekresi fibroblas aktif secara autokrin (paska stimulasi PDGF), disamping oleh makrofag aktif, endotel dan sel mast dalam 3 hari pertama cidera. FGF bekerja dengan cara mengikat reseptor FGFR sel target yang mengandung heparin proteoglikan (afinitas tinggi molekul angiogenik), kemudian memicu kaskade transduksi sinyal yang berdampak pada banyak fungsi dan tipe sel mulai diferensiasi, proliferasi, mitogenik-angiogenesis, sehingga dikenal sebagai *promiscuous growth factor*.

Molekul FGF dibagi menjadi 2, yaitu :

### 1. FGF-1

FGF-1 berperan sebagai mitogen poten untuk proliferasi dan diferensiasi endothel dan otot polos (pembentukan pembuluh arterial), sedangkan VEGF pada pembuluh darah baru.

### 2. FGF-2

FGF-2 dikenal juga sebagai bFGF adalah faktor angiogenik poten dibandingkan VEGF dan PDGF, karena proses angiogenesis menghasilkan pembentukan struktur fisik endothel seperti pipa. pluripoten hingga dilusi matriks, FGF-1 dan FGF-2 juga menstimulasi fibroblast dalam pembentukan jaringan granulasi.

## **15.2 VEGF (*vasculer endothelial growth factor*)**

Adalah molekul angiogenik *growth factor* kedua (sub-famili PDGF) yang disekresi fibroblast aktif (disamping makrofag aktif, endothel dan platelet) dalam 4-7 hari cidera. Secara spesifik peranan VEGF dalam angiogenesis (pembentukan pembuluh darah baru dari pembuluh sebelumnya) adalah menarik endothel migrasi, mendorong proliferasi dan membentuk struktur seperti kapiler, disamping vaskulogenesis (pembentukan *denovo*). Terdapat 5 famili VEGF, yaitu VEGF-A, -B, -C, D dan PGF. VEGF-A mendorong awal angiogenesis, khemotaksis makrofag dan sel neutrophil, dan vasodilatasi.

### **15.3 TGF- $\beta$**

TGF- $\beta$  merupakan molekul *growth factor* yang disekresi berbagai fase penyembuhan terutama oleh sel platelet dan makrofag aktif, disamping keratosit. TGF- $\beta$  berperan sebagai sinyal khemotaktis makrofag diawal inflamasi dan sebaliknya menghambat aktivasi makrofag pada fase proliferasi. TGF- $\beta$  secara tidak langsung juga berperan pada angiogenesis dengan cara mengaktivasi fibroblast sehingga mampu menghasilkan FGF secara autokrin. TGF- $\beta$  merupakan sensor terhadap peningkatan produksi kolagen, proteoglikan dan fibronectin (komponen ECM) dengan menurunkan sekresi protease MMP (enzim degardasi matriks ECM). Merupakan *growth factor* yang disekresi oleh sel makrofag aktif, disamping sel keratosit dengan peranan mengaktivasi sel fibroblast disamping angiogenesis. TGF- $\beta$  merupakan stabilator dalam proses pembentukan jaringan granulasi dengan cara memberikan sinyal kritis terhadap peningkatan aktivitas produksi kolagen, proteoglikan dan fibronectin (komponen ECM) dan saat yang sama menurunkan sekresi protease MMP yaitu enzim pendegardasi matriks ECM. or kontak antar sel endothel saat migrasi dalam area luka.

### **15.4 *Platelet derivate growth factor (PDGF)***

PDGF merupakan molekul *growth factor* (atas subunit PDGF AA, -BB dan -AB) yang disekresi sel platelet aktif (dalam granula alpha), disamping makrofag dan endothel aktif dengan fungsi proliferasi, diferensiasi, morfogenesis, migrasi dan angiogenesis. PDGF berperan sebagai mitogenik potent (agen pembelahan baik proliferasi, diferensiasi dan morfogenesis) mesenkimal terutama sel fibroblast dan otot polos, disebabkan karena PDGF dapat mempercepat siklus sel terutama melewati area G1 *checkpoint* (daerah retriksi).

PDGF-BB juga berperan sebagai molekul khemotaksis langsung terhadap sel monosit. Merupakan *growth factor* yang disekresi oleh sel platelet (tersimpan dalam granula alpha), disamping

makrofag aktif dan endothel. PDGF terdiri atas subunit PDGF AA, -BB dan -AB, yang akan mengikat reseptor alpha (PDGFRA) dan beta (PDGFRB). Reseptor PDGFRB adalah marker penting bagi aktivasi sel stellata hepar dalam proses fibrogenesis.

### **15.5 PECAM-1 (*platelet endothelial adhesion moleculer-1*)**

PECAM-1 adalah molekul adhesi yang disekresi endothel aktif yang berperan sebagai mediatPDGF derivate sel platelet

### **15.6 FGF-2.**

FGF-2 merupakan *growth factor* yang disekresi sel fibroblast aktif secara autokrin akibat stimulasi PDGF. Fibroblast aktif akan menstimulasi sel fibroblast lain proliferasi dan aktif yang kemudian melepas FGF-2 secara autokrin menstimulasi replikasi dirinya.

### **15.7 EGF atau IGF-1**

EGF atau IGF-1 merupakan *growth factor* yang disekresi sel makrofag aktif, disamping sel keratinosit dengan peranan sebagai agen proliferasi, diferensiasi, migrasi bagi sel fibroblast dan keratinosit serta terlibat aktif pada pembentukan jaringan granulasi.

### **15.8 *Keratinocyte growth factor (KGF)***

KGF merupakan *growth factory* yang disekresi sel keratinosit, dikenal sebagai FGF7 pada fase epitelisasi dari fase penyembuhan luka. KFG merupakan small molekul signaling yang mengikat FGFR2b terkait dengan heparin proteoglikan.

## **16. MSC dan angiogenesis**

### **16.1 Pengertian angiogenesis**

Angiogenesis adalah proses pembentukan pembuluh darah baru dari pembuluh darah yang telah ada sebelumnya dalam menunjang proses penyembuhan luka. Angiogenesis berbeda vaskulogenesis atau neovaskulerisasi, dimana pembuluh darah yang dihasilkan angiogenesis berasal dari tonjolan dan perkembangan

tunas kapiler (*capillary bud*) yang telah ada sebelumnya, sedangkan pada neovaskularisasi berasal dari pembentukan jaringan mikrovaskuler embrionik.

## **16.2 Peranan MSC dalam angiogenesis**

MSC berperan sentral dalam proses angiogenesis, seperti dalam fase berikut ini.

### 1. Fase migrasi endotel

Fase migrasi endotel merupakan fase awal angiogenesis dimana terjadi migrasi endotel dari jaringan terdekat menuju area cedera akibat stimulasi molekul angiogenesis (bFGF, PDGF, VEGF) yang disekresi makrofag tipe M2 dan sel mast (paska hemostasis terkontrol hingga akhir fase inflamasi), termasuk MSC. Secara spesifik molekul angiogenesis mampu menarik sel endotel terdekat untuk migrasi (bersifat kemotaksis).

### 2. Fase aktivasi endothel

Fase aktivasi endotel adalah fase dimana sel endothel menjadi aktif paska stimulasi berbagai molekul angiogenesis (bFGF, PDGF, VEGF dan PECAM-1). Fase ini ditandai oleh :

1) Kemampuan mengekspresikan VCAM-1

2) Kemampuan meretraksi diri, sehingga mampu menurunkan *cell junctions* yang berakibat pengengenduran (sel endotel sebelumnya tertanam kuat). Secara mikroskopis tampak nukleolus membesar.

### 3. Fase degradasi membran basalis

Fase ini ditandai dengan terjadinya proses degradasi membran basalis oleh enzim protease (dilepas endothel aktif) dan MMP (dilepas makrofag aktif dan mast sel), termasuk MSC, sehingga endotel terlepas dari dinding endotelium.

### 4. Fase tunas angiogenesis(*sprouting*)

Fase ini ditandai dengan pembentukan tunas vaskuler baru paska sel endotel migrasi-melekat diserat kolagen (matriks sekitar) yang berkoneksi dengan pembuluh darah sekitarnya. Stimulus

molekul angiogenik menyebabkan tunas baru tumbuh secara tandem. keadaan hipoksia/ asidosis memicu aktivasi proses angiogenesis. Ekspresi molekul adhesi integrin  $\beta 1$  dibutuhkan untuk stabilisasi kontak antar endotel dan pembentukan *tight junction*, sehingga memudahkan pembentukan lumen vaskuler.

#### 5. Fase maturasi

Fase maturasi merupakan proses pemisahan pembuluh darah yang baru terbentuk, dimulai dari zona kontak area tengah antara dua dinding pembuluh kapiler berlawanan, kemudian terjadi reorganisasi endotelial *cell junction* dan penetrasi sel *pericytes* dan *myofibroblast* ke dalam lumen, yang dikenal sebagai proses *intussusception angiogenesis*. Pemisahan ini menunjukkan bahwa proses reorganisasi berasal dari pembuluh yang telah ada sebelumnya, sehingga memungkinkan meningkatkan jumlah kapiler tanpa perlu meningkatkan jumlah endotel terutama ketika sumber tidak cukup. Kecepatan tumbuh tunas perhari adalah beberapa mm.

## **17. MSC dan Fibroblas**

Pembentukan dan aktivasi fibroblas merupakan bagian penting dalam tahapan proliferasi. Proliferasi terjadi akibat sel platelet dan makrofag aktif mensekresi molekul PDGF yang berperan kuat sebagai agen proliferasi sel fibroblas. Secara spesifik sel platelet aktif melepas molekul TGF- $\beta$ , yang dapat memicu sel makrofag residen aktif dan bermigrasi menuju area luka. Sisi lain inflamasi yang terkontrol mendorong polarisasi makrofag menjadi tipe-2 yang aktif melepas molekul PDGF dan TGF.

### **17.1 Pengertian fibroblas**

Fibroblas adalah sel mesenkimal yang dalam keadaan normal berada pada posisi *quiescence* (tidak membelah) siklus sel tertahan difase G0. Aktivasi fibroblas terjadi ketika distimulasi oleh TGF- $\beta$  dan PDGF yang disekresi makrofag dan platelet, termasuk MSC di hari 3-5 (inflamasi terkontrol). Hal ini menunjukkan bahwa fibroblas

muncul di area luka pada hari ke tiga seiring dengan proses inflamasi yang terkendali dan terus meningkat hingga 7-14 hari seiring dengan proses angiogenesis yang kemudian menurun di minggu 2-4 seiring dengan fase *remodelling*. Fibroblast aktif ditandai dengan aktivitas replikasi dan proliferasi (pergerakan siklus sel) yang menghasilkan produk kolagen (komponen matriks ECM).

## **17.2 Peran MSC dalam mengaktivasi fibroblas**

Fibroblas dan miofibroblas berasal dari jaringan sekitar jaringan cedera yang mengalami aktivasi dan proliferasi yang kemudian bermigrasi ke area luka. Secara spesifik aktivasi fibroblas terjadi akibat stimulasi TGF- $\beta$  dan PDGF yang dilepas oleh sel makrofag dan platelet aktif, termasuk MSC. Sisi lain FGF-2 juga berperan dalam aktivasi fibroblas. Keberadaan TGF- $\beta$  dan PDGF dapat memandu fibroblas dan miofibroblas bermigrasi menuju area luka. PDGF merupakan agen mitogenik poten dalam pembelahan proliferasi, diferensiasi dan morfogenesis. Peranan PDGF terlihat jelas dalam proses percepatan siklus sel terutama melewati area G1 *checkpoint* (daerah retriksi).

## **17.3 MSC dan pembentukan jaringan granulasi**

Secara sistematis pembentukan jaringan granulasi terdiri atas 5 fase, sebagai berikut.

### **1. Fase migrasi fibroblas**

Fase migrasi fibroblas merupakan tahapan penyembuhan luka antara fase hemostasis dan akhir inflamasi dimana terjadi pelepasan berbagai molekul pro-regenerasi oleh sel makrofag aktif dan sel mast, termasuk MSC. Secara spesifik molekul pro-regenerasi tersebut berupa TGF- $\beta$  dan PDGF yang berperan sebagai kemoatraksi bagi migrasi fibroblas dari jaringan berdekatan, kemudian menempel pada fibronectin matriks sekitar luka (*scaffold* bekuan darah) melalui reseptor integrin  $\beta 1$  dan  $\beta 2$ . Matriks tersebut bersifat sementara hingga kemudian digantikan dengan matriks EMC *provisional*.

2. Fase aktivasi sel fibroblas.

Fase aktivasi sel fibroblas paska stimulasi berbagai molekul pro-regenerasi yang disekresi oleh makrofag tipe-M2 dan MSC. Makrofag tipe-2 merupakan makrofag yang bersifat pro-regenerasi (hasil polarisasi tipe-M1 pro-inflamasi) setelah inflamasi terkontrol akibat supresi MSC. Secara langsung MSC juga mampu mendorong polarisasi makrofag tipe-1 menjadi tipe-2. Sel fibroblas aktif akan mensekresi molekul sinyal kemoatraksi, terutama FGF-2 untuk migrasi sel fibroblas, epitel dan endothel.

3. Fase degradasi membran basalis fibroblas

Merupakan tahapan degradasi membran basalis sel fibroblas aktif akibat stimulasi enzim protease yang dilepas sel makrofag aktif dan sel mast, sehingga terjadi penurunan *cell junctions* yang berakibat pada pengenduran sel fibroblas (yang sebelumnya tertanam erat dalam EMC) dan kemudian lepas.

4. Fase pembentukan jaringan granulasi

Fase ini ditandai dengan pembentukan jaringan granulasi berupa pembuluh darah baru, sel fibroblast, myofibroblast, sel inflamasi, sel endothel dan komponen ECM provisional. Sekalipun demikian dalam fase ini pembentukan komponen ECM oleh sel fibroblas matur menjadi sentral. ECM berupa serat kolagen dan elastin yang mengisi ruang ekstraseluler sebagai substansi *amorphous* seperti gel. Hipoksik dapat menghambat proliferasi sel fibroblas (berbeda dengan angiogenesis). Komposisi ECM provisional berbeda dengan EMC jaringan normal, dimana ECM provisional merupakan gabungan sel fibroblas dengan berbagai serat fibronetin, kolagen, glikosaminoglikan, elastin, glikoprotein dan proteoglikan. Serat fibronetin dan hyaluronan sebagai komponen utama matriks bersifat hidratik yang dapat memfasilitasi migrasi sel fibroblas.

5. Fase maturasi.

Fase ini ditandai dengan keseimbangan antara produksi dan degradasi kolagen (maturasi kolagen), dimana laju sintesis kolagen

akan menurun dan mulai terjadi destruksi kolagen baru akibat pembentukan enzim MMP-1 (kolagenase). Hal ini menyebabkan kadar glikoprotein, mucopolisakarida dan kolagen menurun, disamping itu pembentukan kapiler baru juga menurun. Kondisi ini menyebabkan komponen matrik ECM provisional secara perlahan menyerupai ECM jaringan normal (non-cidera). Proses ini mulai terjadi pada minggu ke 4 dan terus berlanjut hingga beberapa bulan bahkan tahunan dalam rangka mencapai hemostasis. Perubahan ini mengubah penampilan luka dan meningkatkan kekuatannya.

### **17.4 MSC dan Deposisi kolagen**

Sel fibroblas aktif akan menghasilkan kolagen, sehingga terjadi deposisi kolagen secara terus menerus, sehingga dapat mengubah penampilan dan kekuatan luka yang sebelumnya hanya ditutupi oleh bekuan darah fibrin-fibronectin yang lemah dan tidak tahan traumatik. Secara spesifik fibroblas aktif menghasilkan kolagen tipe III dan fibronectin dalam jumlah besar setelah 10 jam pertama dari inflamasi terkendali hingga 3 hari kemudian tergantung pada ukuran luka. Deposisi kolagen ini mencapai puncaknya pada 1-3 minggu, yang kemudian diganti dengan kolagen tipe I yang jauh lebih kuat. Fibroblas aktif tetap mensintesis matriks kolagen, sekalipun enzim kolagenase mendegradasi matriks tersebut, sehingga sintesis kolagen akan jauh lebih besar dibanding dengan proses degradasi hingga mencapai keseimbangan antara sintesis dan degradasi yang dikenal fase maturasi. Hal ini disebabkan karena MSC mampu meregulasi molekul sinyal regenerasi, sehingga molekul pengaktivasi sel fibroblas secara gradual menurun dan kembali normal (fibroblas mulai mengalami apoptosis diakhir fase granulasi).

## **18. MSC dan re-epitelisasi**

### **18.1 Pengertian epitelisasi**

Epitelisasi adalah tahapan pembentukan epitelisasi (sel

keratinosit) pada jaringan granulasi untuk menutupi luka. Sel keratinosit adalah sel epithelium yang berasal dari migrasi basal tepi luka beberapa jam paska hemostasis tercapai hingga hari 2-3. Sel keratinosit ini berproliferasi pada tepi luka dan terhenti ketika saling bertemu di tengah. Sel keratosit migrasi ke atas dari statum basale (situs regenerasi) jika membran basalis utuh/ tidak rusak (tidak cidera) dalam waktu 3 hari, namun jika membran basalis rusak maka repitelisasi terjadi dari batas tepi luka dan *appendage* (folikel rambut, kelenjar keringat) memasuki dermis. Hal ini menunjukkan bahwa pada kasus luka sangat dalam (*skin appendage* juga rusak). maka migrasi sel hanya terjadi lewat tepi luka. Hal ini membutuhkan banyak sel keratinosit asal tepi luka. Sekalipun demikian MSC mampu berdiferensiasi menjadi sel keratinosit untuk mengisi area luka tersebut, disamping MSC juga mampu mendorong sel punca endogenous epithelial dari folikel rambut berdiferensiasi menjadi sel keratinosit, sehingga keberadaan MSC mempercepat proses re-epitelisasi.

## **Daftar pustaka**

1. Vivekanand P, Rebay I. Intersection of Signal Transduction Pathways and Development. *Annu Rev Genet.* 2006;40(1):139–57.
2. Wolberg AS, Campbell RA. Thrombin Generation, Fibrin Clot Formation and Hemostasis. *Transfus Apher Sci.* 2009;38(1):15–23.
3. Landén NX, Li D, Ståhle M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(20):3861–85.
4. Kumar U, Kumar P, Honnegowda T, Kumar S, Udupa EP, Rao P. Role of angiogenesis and angiogenic factors in acute and chronic wound healing. *Plast Aesthetic Res.* 2015;2(5):243.
5. Sinno H, Prakash S. Complements and the Wound Healing Cascade: An Updated Review. *Plast Surg Int.* 2013;2013:1–7.
6. Pastar I, Ramirez H, Yin NC, Stojadinovic O, Khalid L, Nusbaum AG, et al. Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Adv Wound Care.* 2014;3(7):445–64.
7. Qing C. The molecular biology in wound healing & non-healing wound. *Chinese J Traumatol - English Ed [Internet].* 2017;20(4):189–93.
8. Putra A, Pertiwi D, Milla M, Indrayani U, Jannah D, Sahariyani M, Trisnadi S, Wibowo J. Hypoxia-preconditioned MSCs Have Superior Effect in Ameliorating Renal Function on Acute Renal Failure Animal Model. *Open Access Maced J Med Sci [Internet].* 30Jan.2019 [cited 23Feb.2019];7(3):305-10.
9. Putra A, Rahmalita A, Tarra Y, Prihananti DH, Hutama SH, Sa'diyah NAC. The effect of mesenchymal stem cells to the endothelial in diabetic mice. *Advances in Biomolecular Medicine: Proceedings of the 4th BIBMC.* 2017;4:57-60
10. Putra A, Pertiwi D, Milla M, Indrayani U, Jannah D, Sahariyani M, Trisnadi S, Wibowo J. Hypoxia-preconditioned MSCs Have Superior Effect in Ameliorating Renal Function on Acute Renal Failure Animal Model. *Open Access Maced J Med Sci [Internet].* 30Jan.2019 [cited 23Feb.2019];7(3):305-10
11. Nugraha A, Putra A. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -activated mesenchymal stem cells accelerate wound healing through vascular endothelial growth factor regulation in rats. *Univmed.* 2018; 37(2):135-42.

## **Indeks**



















## **GLOSARIUM**

**1-TMS :**

Protein dengan sebuah segmen *transmembrane* dengan domain globular substansial.

**a4-laminin :**

Molekul protein matriks ekstraseluler yang disekresi oleh komponen matriks ekstraseluler sekitar sel punca dengan peranan mempertahankan ekspresi berbagai faktor transkripsi stemness.

**Akt :**

Protein serin/ threonin kinase yang direkrut situs docking fosfoinositida (PDK-1) sehingga menjadi jalur PI3K/Akt aktif, yaitu jalur transduksi sinyal tiroksin kinase yang teraktivasi (terfosforilasi) oleh PDK-1, hasil proses fosforilasi PIP2 menjadi PIP3.

**Amplikasi sinyal sitoplasmik:**

Tahapan proses penguatan sinyal tingkat sitoplasmik

**Anafase :**

Suatu kondisi dimana kromosom terpisah menjadi dua bagian dan tertarik pada sisi berlawanan sel

**Angiogenesis:**

Proses pembentukan pembuluh darah baru fisiologis dari pembuluh darah yang telah ada sebelumnya dalam menunjang proses penyembuhan luka.

**Attaching leukosit :**

Proses penempelan leukosit pada sel endotel akibat pengikatan molekul adhesi E-selektin dan L-selektin yang diekspresikan sel endotel aktif melalui reseptor PSGL-1

**Attaching MSC:**

Proses penempelan MSC melalui pengikatan molekul adhesi P-selektin di samping VLA-4 dan CD-44.

**Autokrin :**

Bentuk komunikasi intraseluler yang unik, karena sebagai substansi molekul komunikator (ligan) yang telah disekresikan ke ekstraseluler oleh tersebut masih dapat berikatan dengan reseptor sendiri.

**Basalis fibroblast :**

Tahapan degradasi dari membran basalis sel fibroblast aktif akibat stimulasi enzim protease yang dilepas sel makrofag aktif dan sel mast, sehingga terjadi penurunan cell junctions yang berakibat sel

fibroblast yang sebelumnya tertanam dalam EMC mengendur dan terlepas (retraksi).

BMP :

Anggota super famili TGF- $\beta$  yang mengikat BMPR2 dan berdampak pada proliferasi sel termasuk osteogenesis, embriogenesis dan proliferasi sel

C5a :

Protein fragmen hasil potongan komponen complement C5 oleh enzim C5-convertase (jalur klasif/ alternatif/ lektin) yang dapat menarik neutrofil/ monosit menuju area injuri/cidera, di samping fungsi fagositosis dan anafilatoksik.

cAMP :

Subtansi kimia hasil sintesis enzim *adenylyl cyclase* (enzim yang terikat membran) yang memerlukan ATP (*ATP-dependent enzyme*) sebagai proses aktivasi.

CD133+ a:

Glikoprotein yang diekspresikan oleh sel HSC, progenitor dan endotel dengan peranan untuk melokalisasi seluler.

CD34+ :

Protein transmembran sialomucin yang diekspresikan HSC dengan fungsi sebagai molekul adhesi.

CD90+ :

Glikoprotein yang diekspresikan oleh HSC, thymocytes (pre-cursor sel T), MSC, NK, neuron dan endotelium dengan peranan sebagai komunikasi/interaksi cell to cell dan cell to matrix.

Cdk :

Famili protein *serine/ threonine* kinase dengan berat molekul 34-40 kDa (*small protein*) yang dalam beraktivitas tergantung pada protein siklin (subunit regulator non-katalitik).

Cdk1:

Protein kinase yang berperan penting pada fase M siklus sel dengan cara mengikat siklin B.

Cdk2 :

Protein kinase yang berperan penting pada transisi fase G1/S siklus sel dengan cara mengikat siklin E.

Cdk3 :

Protein kinase yang berperan penting pada fase G0 siklus sel dengan cara mengikat siklin C.

**Cdk4 :**

Protein kinase yang berperan penting dalam fase G1 siklus sel dengan cara mengikat siklin D.

**Cdx2 :**

Protein yang diekspresikan dalam trofektoderm pada embrio awal dan sangat penting untuk pembentukan trofektoderm yang baik.

*Cell fusion:*

Suatu keadaan dimana sel somatik dipadukan dengan sel punca embrionik dan memaparkannya pada lingkungan reprogramming (program ulang).

*Checkpoint fase G0-G1:*

Area checkpoint yang memastikan sinyal yang masuk dan diterima tersebut adalah kompaktable dengan struktur protein sinyal sehingga bisa diteruskan ke fase siklus sel selanjutnya.

*Checkpoint fase G2:*

Area Checkpoint G2 akhir berfungsi dalam mendeteksi setiap kerusakan DNA subseluler yang terjadi atau terhadap duplikasi DNA.

*Checkpoint fase M:*

Area checkpoint terakhir terjadi fase M dengan tujuan mengecek apakah kromosom telah menempel pada spindle mitotic atau belum.

*Checkpoint fase S :*

Jalur ini untuk mendeteksi double strand break (DSB) yaitu deteksi kerusakan untai ganda DNA melalui aktivasi ATR dan ATM kinase.

*Checkpoint fase S-M :*

Jalur ini untuk memblokir mitosis hingga seluruh genom selesai diduplikasikan dengan sempurna.

*Checkpoint G<sub>2</sub>/M :*

Penundaan sel dalam G<sub>2</sub> sebelum memasuki mitosis sebagai respon atas stress genotoksik (radiasi UV, oksidative stress dan agen interkalasi DNA) baik melalui pola p53-dependen maupun p53-independent.

*Checkpoint replikasi :*

Jalur untuk mendeteksi replication fork yang terhenti, dengan mengintegrasikan sinyal asal ATR interacting protein (ATRIP) dan RAD17.

*Checkpoint* sinyal proliferasi :

Suatu pemeriksaan terhadap kelayakan sinyal intrinsik (mitogenik) yang sedang memasuki tahapan siklus sel untuk memastikan bahwa integritas DNA tidak terganggu.

Cidera :

Serangkaian kejadian biokimia kompleks dan terorganisir yang terjadi sesaat kerusakan jaringan hingga memasuki tahapan proliferasi dan remodeling

c-MET :

Protein kinase yang juga ikut dalam aktivitas proliferasi ke arah perbaharuan diri dengan mengaktifasi jalur PI3K.

*Colony-forming unit assay*:

Uji in-vitro untuk menilai sel progenitor hemopoetik, terutama sel progenitor multipoten (MPP) dan sel progenitor turunan terbatas eritroid, granulositik dan monosit.

CXCL1 :

Molekul kemokin bagi neutrofil hasil sekresi makrofag residen aktif yang akan diikat sel neutrofil melalui reseptor CXCLR1.

CXCL1 :

*Small molekul chemoattractant* yang dilepas oleh jaringan cidera yang berperan sebagai regulator chemotaktik potent bagi sel leukosit PMN

CXCL10 :

*Small molekul chemoattractant* (interferon inducible protein 10) yang diproduksi keratinosit.

CXCL8 :

Molekul kemokin poten pertama bagi neutrofil yang disekresi oleh makrofag residen aktif.

CXCR3-R :

Reseptor yang diekspresikan berbagai sel radang termasuk MSC secara kuat dengan fungsi mendeteksi keberadaan molekul kemokine SDF-1 yang dilepaskan jaringan rusak

Cyclin D :

Akselerator perpindahan siklus sel dari fase G1 ke S.

*Cyclooxygenase*:

Protein enzim myeloperoxidase yang berlokasi di RE dan membrane nuclear dengan fungsi mengkatalisis langkah yang membatasi laju biosintesis prostaglandin dari arachidonic acid.

**DAMP :**

Berbagai molekul yang dilepaskan sesaat terjadi kerusakan jaringan, baik berupa struktur protein maupun non-protein.

**Dediferensiasi :**

Suatu proses dimana sebagian atau seluruh sel yang telah terdiferensiasi mengalami kehilangan properti dan karakteristik diferensiasi sehingga sel matur tersebut kembali ke status sebelumnya yang kurang/ belum terdiferensiasi dan bahkan dapat kembali menjadi sel punca kembali

**Deposisi Kolagen :**

Selalu aktifnya fibroblast dalam menghasilkan kolagen sehingga dapat mengubah penampilan luka dan kekuatannya yang sebelumnya hanya ditutupi oleh bekuan darah fibrin-fibronectin yang lemah dan tidak tahan traumatik

**Difusi :**

Pergerakan suatu molekul dari area konsentrasi tinggi ke konsentrasi yang lebih rendah secara pasif.

**Difusi lipid bilayer :**

Suatu model komunikasi sel yang dilakukan dengan cara; “ligan berdifusi melalui membran lipid bilayer” agar dapat berikatan dengan reseptor intrasel dalam rangka mempengaruhi sel target.

**Dimerisasi reseptor :**

Proses aktivasi reseptor RTK pasca terikat ligan, yaitu berupa autofosforilasi atau transfosforilasi pada kedua reseptor domain spesifik tirosin kinase residue (activation loop).

**Disk kultur :**

Permukaan tempat dimana sel kultur melekat dan tumbuh

**dsRNA :**

Partikel virus yang dapat mengaktivasi reseptor TLR3 sel radang atau MSC.

**E2F-DP :**

Protein faktor transkripsi famili E2F yang dibutuhkan dalam proses replikasi DNA pada fase S.

**EGF :**

Growth factor yang disekresi sel makrofag aktif, disamping sel keratinosit dengan peranan sebagai agen proliferasi, diferensiasi, migrasi bagi sel fibroblast dan keratinosit serta terlibat aktif pada pembentukan jaringan granulasi.

Endokrin :

Bentuk komunikasi intraseluler jarak jauh, dimana sel mensekresikan substansi molekul komunikator (sebagai ligan), yang bergerak memasuki sistem sirkulasi tubuh dan menuju dan berikatan dengan reseptor sel target yang jauh letaknya.

Epigenetik:

Proses di luar DNA namun mempengaruhi ekspresi dan aktivitas gen sehinggadapat menyebabkan perubahan fenotipe, baik perubahan karakter maupun morfologi suatu sel.

E-selektin :

Molekul adesi yang diekspresikan endotel aktif paska stimulasi TNF- $\alpha$  yang dilepas sel makrofag aktif.

Faktor co/transkripsi :

Berbagai protein spesifik yang ikut terlibat membantu mengontrol laju transkripsi genetik terkait gen pemeliharaan jalur pembaharuan diri

Faktor transkripsi *stemness*:

Protein Oct4/Sox2/Nanog/Klf4 yang mengontrol laju transkripsi genetik DNA ke mRNA dengan cara mengikat sekuens DNA tertentu terkait gen pemeliharaan potensi *stemness* pluripotent dan supresi gen promosi diferensiasi

Fase aktivasi endothel:

Fase dimana terjadi sel endothel aktif paska stimulasi berbagai molekul angiogenesis (bFGF, PDGF, VEGF dan PECAM-1) hasil sekresi makrofag tipe-M2 (makrofag pro-regenerasi, hasil polarisasi tipe-M1 pro-inflamasi) paska inflamasi terkontrol dan memasuki tahapan proliferasi.

Fase aktivasi sel fibroblast :

Fase aktivasi sel fibroblast paska stimulasi berbagai molekul hasil sekresi makrofag tipe-M2, yaitu makrofag yang bersifat pro-regenerasi (hasil polarisasi tipe-M1 pro-inflamasi) terutama ketika inflamasi telah terkontrol dan mulai memasuki fase proliferasi.

Fase degradasi membran basalis:

Fase dimana endotel aktif terlepas dari dinding endothelium akibat proses degradasi membran basalis oleh enzim protease (dilepas endothel aktif) dan MMP (dilepas makrofag aktif dan mast sel).

Fase G<sub>1</sub> (gap 1) :

Fase pertama dalam siklus sel yang ditandai dengan perkembangan sel (ukuran sel) dan sintesis mRNA/ protein histon (untuk fase S berikutnya)

Fase G<sub>2</sub> (gap 2):

Suatu tahapan dari siklus sel dimana terjadi pertumbuhan cepat sel dan sintesis protein untuk preparasi memasuki fase selanjutnya (mitosis).

Fase lag :

Periode pertama dalam kultur, dimana sel mulai beradaptasi dengan lingkungan kultur paska disemai kembali.

Fase log:

Periode dimana sel tumbuh dan proliferasi secara eksponential.

Fase maturase:

Proses memisahkannya pembuluh darah yang baru terbentuk, dimulai dari zona kontak area tengah antara dua dinding pembuluh kapiler berlawanan, kemudian terjadi reorganisasi endothelial *cell junction* dan penetrasi selterutamapericytes dan myofibroblast ke dalam lumen, dikenal sebagai proses *intussusception angiogenesis*.

Fase maturasi :

Tahapan dimana terjadi keseimbangan antara produksi dan degradasi kolagen (maturasi kolagen), dimana laju sintesis kolagen menurun dan mulai terjadi destruksi kolagen yang baru terbentuk, melalui enzim MMP-1 (kolagenase).

Fase migrasi endotel:

Fase dimana terjadi migrasi endothel dari jaringan terdekat menuju area cedera akibat stimulasi molekul angiogenesis (bFGF, PDGF, VEGF) yang disekresi makrofag tipe M2 dan sel mast paska hemostasis terkontrol dan terus meningkat diakhir fase inflamasi.

Fase migrasi sel fibroblast :

Tahapan penyembuhan luka antara fase hemostasis dan akhir inflamasi dimana terjadi pelepasan berbagai molekul pro-regenerasi oleh sel makrofag aktif dan sel mast yang dapat mendorong migrasi fibroblast dari jaringan berdekatan, kemudian menempel pada fibronectin matriks sekitar luka melalui reseptor integrin  $\beta 1$  dan  $\beta 2$ .

Fase S (sintesis) :

Suatu tahapan dalam siklus sel antara fase G<sub>1</sub> dan G<sub>2</sub> dimana DNA direplikasi

Fase stasioner :

Fase plateau dimana sel kultur berhenti melakukan pertumbuhan dan proliferasi.

Fase tunas angiogenesis:

Fase pembentukan tunas vaskuler baru paska sel endotel migrasi-menempel disertai kolagen (matriks sekitar) tersebut berkoneksi dengan pembuluh darah sekitar.

*Feeder layer:*

Komponen penunjang bagi aktifitas sel lainnya.

FGF :

Molekul angiogenik *growth factor* (sub-famili FGF) yang disekresi fibroblast aktif secara autokrin (paska stimulasi PDGF), disamping oleh makrofag aktif, endothel dan sel mast dalam 3 hari pertama cedera

FGF-1 :

Molekulangiogenik growth factor pertama (sub-famili FGF) yang disekresi fibroblast aktif secara autokrin (paska stimulasi PDGF), disamping oleh makrofag aktif, endothel dan sel mast dalam 3 hari pertama cedera dan berperan sebagai mitogen poten untuk proliferasi dan diferensiasi endothel dan otot polos.

FGF-2 :

Growth factor yang disekresi sel fibroblast aktif secara autokrin akibat stimulasi PDGF

Fibroblas :

Sel mesenkimal yang muncul di area luka pada hari ke tiga seiring dengan proses inflamasi yang terkendali

Fibrosis :

Pembentukan jaringan ikat fibrosa berlebihan (jaringan parut)

*Formyl methionyl:*

Peptide potongan debris bakteri lisis (lipopolysaccharide) yang dapat menarik monosit/leukosit di samping mengaktivasi, melalui pengikatan reseptor formyl peptide receptor-1 (FPR-1) dan transient receptor potential melastatin-2 (TPRPM2).

Fosforilasi:

Aktivasi molekul secara kaskade hingga membentuk sinyal transduksi menuju nukleus untuk menimbulkan respon sel.

*Gap junction:*

Suatu saluran yang terbentuk antara dua sel, dimana antara sitoplasma sel satu dan sel sekitarnya saling terhubung, yang dikenal sebagai communicating junction.

Gata6 :

Protein yang dikode oleh gen GATA6 yang berfungsi dalam mempromosikan sel punca untuk berdiferensiasi dengan cara mensupresi protein faktor transkripsi pluripotent

Granulasi:

Merupakan tahapan dimana terjadi pembentukan jaringan granulasi dimana sel fibroblast matur mensekresi ECM terutama substansia dasar (substansia amorphous seperti gen) menuju ruang ekstraseluler disertai serat kolagen dan elastin.

Granulasi :

Sel fibroblast matur mensekresi ECM terutama substansia dasar (substansia amorphous seperti gen) menuju ruang ekstraseluler disertai serat kolagen dan elastin

*Growth factor:*

Molekul protein ligan (enabling signal) yang berfungsi sebagai faktor pertumbuhan sel.

GSK-3 :

Protein yang menghambat siklin D1.

H202 :

Molekul kimia radikal bebas yang mampu menginduksi neutrofil untuk bermigrasi dengan cara mengaktifasi reseptor transient receptor potential melastatin-2 (TPRPM2) melalui oksidasi cystein 549.

Histon :

Protein yang berperan dalam mengkondensasi atau memadatkan dan membungkus DNA ke dalam kromosom secara rapih.

HMGB1 :

Molekul protein danger DAMP yang disekresikan sel hematopoetik melalui lisosom dan prototipe protein LSP (leaderless secreted protein) terkait kromatin, yang berperan sebagai mediator poten dalam memicu respon inflamasi kuat, terutama dalam menginduksi syok endotoksin.

Homing leukosit:

Perpindahan sel neutrophil sirkulermenuju area inflamasi (area cidera) akibat stimulasi molekul kemoatraksi dan adhesi yang dilepas sel makrofag residen atau matriks sekitar jaringan cidera.

Homing MSC:

Peristiwa migrasi MSC dari sirkulasi darah menuju jaringan cidera/ luka atau area inflamasi akibat stimulasi molekul sinyal

khemoatraksi (IFN $\gamma$ , TGF $\alpha$  dan SDF-1) yang dilepas sel radang terutama sel makrofag sekitar area cedera.

Homing :

Peristiwa migrasi sel radang atau MSC dari sirkulasi darah menuju area inflamasi atau injuri, akibat stimulasi molekul kemoatraksi dan adhesi yang dilepas sel radang atau jaringan cedera.

HSC :

Sel punca dewasa yang berasal dari sistem hematopoetik (sumsum tulang) yang mengekspresikan marker CD34+, CD133+, Thy1+ dan tidak mengekspresikan marker CD38-, CD33-.

IFN $\gamma$  :

Molekul sitokin mediator pro-inflamatori poten yang dilepas berbagai sel radang terutama sel dendritik dengan fungsi sebagai pemicu utama migrasi sel radang termasuk MSC sirkuler menuju area cedera, di samping sebagai pengaktivasi berbagai sel radang termasuk MSC.

IGF-1 :

Salah satu aktivator kuat jalur sinyal PI3K/AKT yang merupakan stimulator pertumbuhan dan proliferasi serta menghambat apoptosis.

IL-8 :

*Small molekul chemoattractant* yang diekspresikan oleh luka akut dan kronik

*Induced Pluripotent Stem Cell:*

Sel punca embrionik pluripoten yang diperoleh dari rekayasa sel matur melalui induksi faktor transkripsi pluripoten Oct4, Sox2, Klf4 dan Nanog via lentivirus sebagai mediator pembawa.

Inflamasi :

Respon lokal berbagai sel radang dengan tujuan mengeliminasi, membersihkan, membangun dan menjaga kembali integritas sistem homeostasis jaringan.

Intrakrin :

Bentuk komunikasi intraseluler, dimana sinyal yang terjadi dan terbentuk ada didalam sel target itu sendiri.

Jalur canonical Wnt :

Jalur Wnt yang dapat menyebabkan  $\beta$ -catenin terakumulasi dalam sitoplasma yang kemudian translokasi menuju nukleus berperan sebagai ko-aktivator transkripsional faktor transkripsi yang termasuk family TCF/ LEF.

*Jalur hedgehog signaling :*

Salah satu jalur utama yang mengontrol tahapan perkembangan embrionik berupa sinyal transmisi yang diperlukan sel embrionik untuk berdiferensiasi dengan tepat.

*Jalur JAK-STAT:*

Serangkaian molekul sinyal yang menghantarkan ligan kimia (molekul danger) dari luar sel kedalam protein intraseluler melalui jalur JAK-STAT menuju nukleus, dengan tujuan mentranskripsi gen terkait proses imunitas, pembelahan sel, kematian sel, bahkan juga padapembentukan tumor.

*Jalur proliferasi :*

Serangkaian sinyal kaskade yang dimulai dari stimulasi ligan-reseptor kemudian membentuk serial sinyal transduksi menuju nukleus dengan target berupa aktivitas pembelahan sel baik perbaharuan diri maupun diferensiasi.

*Jalur protein integrin :*

Jalur inisiasi sinyal melalui protein integrin, yaitu suatu protein yang dapat mengikat substrat (ligan) dalam matriks ekstraseluler dalam memunculkan sinyal transduksi.

*Jalur RTK :*

Jalur utama proliferasi ke arah diferensiasi melalui aktivasi reseptor trans-membran-ligan yang berlanjut ke jalur sinyal transduksi MAPK/PI3K hingga menuju nukleus untuk menimbulkan respon seluler.

*Jalur sinyal Wnt :*

Sekelompok jalur sinyal transduksi yang dimulai dengan protein yang meneruskan sinyal intraseluler menuju nukleus.

*Jalur sirkuit proliferasi :*

Jalur proliferasi yang melibatkan jalur fibroblast growth factor-reseptor tiroksin kinase (FGF-RTK)/MAPK dalam diferensiasi dan jalur G-protein couple receptor (GPCR)/ (Phosphatidylinositol-3phosphatasekinase) PI3K, BMP-R/SMAD dan LIF-R/STAT3 dalam proses pembaharuan diri.

*Kariokinesis :*

Bagian dari tahapan pembelahan sel dimana terjadi pemisahan kromosom,

*KGF:*

Growth factor yang disekresi sel keratinosit, dikenal sebagai FGF7 pada fase epitelisasi dari fase penyembuhan luka.

*Klf4 :*

Protein pengikat DNA yang berperan dalam meregulasi ekspresi gen sebagai penunjang aktifitas sirkuit regulator utama *stemness*

Kondisi fisiologi kultur :

Kondisi kultur yang telah disesuaikan dengan kondisi in-vivo, sehingga sel kultur dapat beradaptasi dengan baik pada kondisi tersebut

Kontak inhibisi:

Suatu model komunikasi sel yang terjadi ketika suatu sel menyentuh sel sekitarnya secara berlebihan melalui “contact inhibition.”

Kultur sel:

Cara atau teknik dalam mengembangbiakan (propagasi) sebuah sel secara in-vitro melalui penyemaian sel, termasuk sel punca pada tempat yang telah berisi medium dengan kondisi tertentu

Kultur sel primer:

Kultur sel yang didapat dari migrasi sel primer asal eksplan jaringan primer (potongan irisan kecil) dan atau sel primer hasil proses disosiasi mekanik/enzimatik.

Leukotrient B4 :

Metabolit hasil oksidasi arachidonic acid (AA) melalui lipogenase yang berfungsi menginduksi migrasi neutrofil di samping fungsi modulasi inflamasi.

LIF :

Interleukin kelas 6 yang mempengaruhi pertumbuhan sel dengan cara menghambat jalur diferensiasi.

Ligan :

*Small molecule* baik berupa peptida atau non peptida yang secara spesifik dapat mengikat molekul reseptor sehingga berperan sebagai sinyal komunikasi antar sel.

Ligan peptide :

Small molekul kelompok protein yang dapat berikatan dengan reseptor permukaan sel dalam menginduksi sinyal komunikasi.

Ligan-difusi :

Sekelompok molekul ligan yang dalam menginduksi sinyal komunikasi intraseluler terjadi secara langsung dengan berdifusi melalui membran lipid bilayer, hingga kemudian mengikat reseptor intraseluler.

Ligan-non difusi :

Sekelompok molekul ligan yang dalam menginduksi sinyal komunikasi intraseluler tidak berdifusi pada membran lipid bilayer, namun dengan cara mengikat reseptor permukaan membran sel.

**Limfosit:**

Sel leukosit yang berperan sentral dalam sistem imunitas adaptif.

**Limfosit T matur :**

Sel limfosit yang telah lolos terhadap seleksi baik seleksi positif maupun negatif dan meninggalkan medula menuju sirkulasi sistemik lalu terdistribusi diberbagai jaringan limfoid perifer untuk beberapa saat, terutama pada kortek nodus limfatikus, spleen dan jaringan limfoid terkait mukosa (plaque peyer kolon).

**Lingkungan mikroseluler kultur :**

Kondisi lingkungan sekitar (niche) sel kultur berupa substratum yang menyerupai keadaan jaringan in-vivo.

**LPS :**

Partikel bakteri gram-negatif yang dapat mengaktivasi reseptor TLR4 sel radang atau MSC

**Makrofag tipe M-1:**

Makrofag yang mensekresikan molekul pro-inflamasi TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 dan IL-6 dalam konsentrasi tinggi dan anti-inflamasi dalam konsentrasi rendah (IL-10 dan TGF- $\beta$ 1).

**Makrofag tipe M-2:**

Makrofag yang mensekresi molekul anti-inflamasi dalam konsentrasi tinggi yaitu IL-10 dan TGF- $\beta$ 1 dan molekul pro-inflamasi dalam konsentrasi rendah yaitu IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  dan IFN- $\gamma$  secara bersama.

**Malignansi :**

Salah bentuk disregulasi dari sistem autokrin

**MCP-1 :**

*Small molekul chemoattractant* yang dilepas sel keratinosit paska cedera

**Media kultur sel:**

Campuran kompleks berbagai komponen berupa asam amino, karbohidrat, vitamin, prekursor metabolisme, faktor pertumbuhan, hormon dan garam elektrolit.

**Mediator inflamasi:**

Sinyal bagisel yang mengekspresikan reseptor TLR, seperti dendritik dan limfosit.

**Mekanisme feedback negatif :**

Bagian dari konsep homeostasis, yang normalnya berfungsi dalam mengurangi/ memperkecil kekuatan signalling yang terjadi dalam sirkuit intraseluler, dalam rangka menyeimbangkan proses subseluler demi mencapai keadaan homeostatis.

Mesenkimal :

Sel/jaringan embrional yang terbentuk saat pembentukan embrio

Metafase:

Kondisi dimana seluruh kromosom bergerak dan berkumpul dipusat spindle mitotic sehingga tampak sebagai *equatorial plate*.

Metilasi DNA :

Proses dimana sekelompok gugus metil berikatan pada molekul DNA sehingga aktivitas segmen DNA tersebut berubah namun sekuen urutan DNA tetap.

Migrasi sel secara khemotaksis:

Pergerakan berbagai sel radang dari sirkulasi darah menuju area cedera akibat stimulasi molekul signal chemokin. CXC, CC, C ligand.

Mitosis:

Suatu periode pembelahan sel dengan tujuan menduplikasi semua komponen penting sel turunan terutama set kromosom, sehingga memungkinkan setiap calon sel turunan menerima salinan seluruh genom identik dengan induk.

Modulasi proteinefektor :

Proses aktifasi protein sinyalsitoplasmik menggunakan protein aktif secara kaskade berantai

Molekul adhesi :

Molekul yang diekspresikan permukaan membran sel endothel aktif dengan fungsi mengikat ligan sel leukosit melalui reseptor PSGL-1 sehingga terjadi perlekatan dan migrasi

Molekul danger :

Molekul sinyal yang dilepaskan jaringan sesaat terjadi kerusakan, dikenal sebagai molekul damage-associated molecular pattern (DAMP) atau ketika mikroba patogenik menginvasi jaringan, dikenal sebagai pathogenic-associated molecular patterns(PAMP).

Molekul kemoatraksi :

*Small molecule* yang mampu menarik dan memandu neutrofil keluar sirkulasi menuju area inflamasi

MSC :

Sel punca dewasa yang didapatkan dari jaringan mesencymal atau stromal paska tahapan embriogenesis

mTOR :

Famili protein kinase anggota dari PI3K-related kinase yang dikode oleh gen mTOR

Multipoten :

Diferensiasi turunan terbatas hanya satu lapisan germinal

MyD88:

Protein canonical sitoplasmik yang berperan sebagai adaptor dari sinyal downstream jalur inflamatori tingkat membran reseptor TLR atau reseptor IL-1 yang teraktivasi.

Nanog :

Faktor transkripsi homeobox NK-2 kelas yang diekspresikan seluruh sel pluripotent ICM

Nekrosis:

Bentuk cedera sel yang mengakibatkan kematian prematur berbagai sel dengan autolisis.

NF- $\kappa$ B :

Heterodimer (protein Rel dan p50) yang berada dalam keadaan inaktif di sitosol, namun dalam menjalankan aktivitas transkripsi gen target tidak membutuhkan protein lain, sehingga termasuk kelompok *rapid-acting* molecule.

*Niche* sel punca:

Lingkungan mikroseluler sekitar sel punca yang saling berinteraksi dan ikut menentukan arah nasib suatu sel punca.

*Niche* :

Lingkungan mikroseluler

Nitrit oxide:

Molekul yang mampu mensupresi proliferasi sel T melalui fosforilasi STAT5 dan inhibisi sintesis NO atau inhibisi sintesis prostaglandin.

*Non-Coding*RNA :

Molekul RNA yang tidak ditranslasikan menjadi protein.

Notch :

Jalur sinyal penting dalam memicu proses pembaharuan diri sel punca.

Oct3/4 :

Protein faktor transkripsi yang berperan penting dalam mempertahankan pluripoten baik sel punca embrionik maupun sel punca dewasa.

PAMP :

Molekul danger yang berasal dari berbagai komponen mikroba patogenik tertentu

Panen MSC :

Aktifitas pelepasan sel kultur (MSC) yang melekat pada permukaan flask secara mekanik/ enzimatis pada kondisi tertentu.

Panen sel kultur :

Aktifitas yang terjadi ketika sel telah mencapai konfluens 80%.

Parakrin:

Salah satu bentuk komunikasi interseluler pada jarak dekat, dimana sel mensekresikan beberapa substansi molekul komunikator sebagai ligan yang akan terikat oleh reseptor sel target sekitarnya yang sesuai.

Parakrinisasi MSC :

Suatu keadaan dimana MSC mensekresi berbagai molekul tertentu sebagai bentuk respon stimulasi molekul sitokin pro-inflamatori (TNF $\alpha$ , IL-1 dan IFN $\gamma$ ).

PcG:

Protein yang berperan mensupresi gen diferensiasi dengan memodulasi ekspresi banyak gen melalui modifikasi protein histon.

PDGF :

Molekul growth factor (atas subunit PDGF AA, -BB dan -AB) yang disekresi sel platelet aktif (dalam granula alpha), disamping makrofag dan endothel aktif dengan fungsi proliferasi, diferensiasi, morfogenesis, migrasi dan angiogenesis.

PECAM-1 :

Molekul adhesi yang disekresi endothel aktif yang berperan sebagai mediat PDGF derivat sel platelet

Pembaharuan diri :

Kemampuan sel punca dalam menghasilkan turunan yang identik dengan induk baik melalui pembelahan simetris (menghasilkan dua turunan identik) maupun pembelahan asimetris (menghasilkan satu turunan identik).

Peptida:

Protein ligan yang berperan sebagai molekul komunikator ketika berikatan dengan reseptor.

Perubahan konformasi reseptor :

Suatu keadaan dimana struktur kimia suatu reseptor sel berubah akibat stimulasi molekul ligan pada situs pengikatan reseptor.

PI3K :

Famili enzim kinase yang berperan sebagai transduksi sinyal intraseluler melalui proses fosforilasi PIP2 menjadi PIP3, berakibat

pada pembentukan *phosphoinositide dependent kinase-1* (PDK-1) yang dapat menginduksi Akt.

PI3K kelas I :

Jalur downstream dari aktivasi independent RTK dengan fungsi memfosforilasi PIP2 menjadi PIP3.

Platisitas sel :

Kemampuan suatu sel untuk merubah nasibnya.

Pluripoten :

Upaya mempertahankan stabilitas pembaruan diri melalui pencegahan proses diferensiasi dan peningkatan aktivitas proliferasi

Polarisasi:

Perubahan fenotip dan fungsi suatu sel menjadi bentuk lain.

Polarisasi MSC :

Perubahan fenotip suatu MSC menjadibentuk lain, secara karakter maupun fungsi baik menjadi fenotip MSC tipe-2 (karakteristik anti-inflamatori) maupun fenotip MSC tipe-1 (pro-inflamatori).

Potensi sel:

Kemampuan sel untuk mengekspresikan protein tertentu terkait dengan berbagai tingkat diferensiasi, mulai diferensiasi tak terbatas dikenal sebagai pluripoten, diferensiasi turunan terbatas hanya satu lapisan germinal (multipoten) hingga diferensiasi yang hilang (unipoten).

pRB :

Protein *supressor* tumor yang berperan membatasi sel dalam mereplikasi DNA dengan cara mengikat area E2F-DP (faktor transkripsi famili E2F untuk situs gen promotor proliferasi dan perkembangan siklus sel).

Profase:

Suatu kondisi dimana kromosom yang telah bereplikasi sebelumnya mengalami kondensasi dan *spindle mitotic* mulai dirakit diluar nucleus

Proliferasi :

Istilah umum yang mengacu pada laju kecepatan pembelahan suatu sel.

Prometafase:

Suatu kondisi dimana membran nukleus mulai melebur dan hancur sehingga memungkinkan terjadi kontak antara *spindle mitotic* dengan kromosom.

Protein G :

Famili *guanine nucleotide-binding protein* yang berperan sebagai saklar molekul intraseluler dengan fungsi mentransmisikan sinyal ekstraseluler ke dalam intraseluler.

P-selektin :

Molekul adesi yang diekspresikan oleh sel endotel aktif pasca stimulasi protein thrombin, bradikinin dan histamin yang dilepas jaringan cedera.

Quiescence :

Suatu keadaan dimana sel punca berada dalam keadaan inaktif, tidak ada aktivitas pergerakan siklus sel, dikenal juga sebagai fase  $G_0$

Re-epitelisasi:

Suatu tahapan pembentukan epitelisasi pada jaringan granulasi yang untuk menutupi luka.

Regenerasi:

Proses merestorasi struktur dan fungsi suatu jaringan/organ yang rusak/terganggu secara utuh untuk kembali menjadi normal.

Remodeling kromatin:

Modifikasi dinamik dari arsitektur kromatin sehingga memungkinkan mengakses DNA yang terkondensasi terutama area regulasi transkripsi sehingga mampu mengontrol ekspresi gen.

Reparasi:

Proses dinamis dalam memperbaiki sebagian struktur dan fungsi jaringan rusak.

Reprogramming :

Upaya mengubah kembali fenotip dan genotip suatu sel terdiferensiasi (matur) menjadi bentuk imatur sebelumnya yaitu sel embrionik pluripoten

Reseptor:

Sekelompok molekul protein kelas tertentu yang diekspresikan secara selektif pada permukaan membran sel dan atau intraseluler dengan fungsi mengikat molekul ligan yang sesuai.

Reseptor Fz :

Reseptor membran plasma yang membentuk reseptor famili terkait protein-G, dikenal *G-protein coupled receptors* (GPCRs).

Reseptor terkait enzim :

Protein membran dengan dua domain utama yaitu domain katalitik *single-transmembrane segment* (1-TMS) dan domain ekstraseluler.

Reseptor terkait protein G:

Protein membran integral yang memiliki 7 segmen (helical) transmembran dengan situs pengenalan ekstraseluler untuk mengikat ligan dan situs pengenalan intraseluler untuk protein pengikat GTP (GTP-binding protein).

Reseptor TLR :

Reseptor yang diekspresikan permukaan berbagai sel radang, termasuk MSC dengan fungsi mempromosikan sel radang termasuk MSC untuk bermigrasi keluar sirkulasi menuju area jaringan cedera.

Respon langsung :

Suatu respon protein molekuler intraseluler yang bersifat langsung, terkait aktivitas protein fungsional enzim dalam sel target.

Respon seluler :

Aktifitas seluler, baik fisiologik maupun patologik paska stimulasi kompleks protein sinyal transduksi ke dalam nukleus yang memicu proses transkripsi.

Respon tidak langsung :

Respon intraseluler jenis lambat terhadap sinyal ligan-reseptor, dengan tujuan terkait dengan ekspresi gen dan melibatkan control gen sevara ketat

*Retraction* atau retraksi :

Gerakan penarikan neutrofil/ MSC ke belakang hingga terlepas akibat pergeseran reseptor integrin ke arah belakang.

Rolling:

Pergerakan tertentu MSC berupa gerakan berguling (rolling) menuju area tepi endotel akibat stimulasi molekul kemoatraksi (SDF-1, TNF $\alpha$  dan IFN $\gamma$ ) yang dilepas jaringan cedera dan makrofag aktif.

Ronin :

Protein yang dalam mempertahankan pluripoten dengan cara menekan diferensiasi secara langsung melalui pengikatan dan supresi gen penginduksi diferensiasi.

SCF :

Marker ini berfungsi dalam promosi dan diferensiasi sel progenitor hematopoietik

SDF-1 :

*Small molekul chemoattractant* yang diekspresikan sel endothelial, myofibroblast dan keratinosit.

*Second messenger:*

Molekul pensinyal intraseluler yang dilepaskan sel sebagai respon terhadap paparan molekul pensinyal sebelumnya (*first messenger*) yang berada di ekstraseluler.

Sel dendritik imatur:

Sel yang memiliki karakteristik berupa aktivitas endositik tinggi namun potensi aktivasi sel-T rendah, sehingga secara terus menerus mendeteksi keberadaan berbagai antigen disekitar lingkungan mikroseluler untuk kemudian dilakukan fagosit, termasuk juga mencoba fagositosis sejumlah kecil membran sel dendritik itu sendiri, dikenal proses nibbling (belajar menggigit).

Sel dendritik matur :

Sel dendritik imatur yang teraktivasi dan terspesialisasi sehingga mampu mensekresi molekul sitokin aktif  $IFN\gamma$  atau  $TNF\alpha$  sebagai mediator inflamasi poten dan mengekspresi CD11c dan CD83 sebagai marker.

Sel dengan karakter sel punca :

Sekelompok sel matur yang mendapatkan kemampuan dan potensi serupa dengan sel punca embrionik.

Sel matur:

Sel spesifik yang telah kehilangan potensi diferensiasi dan pembaharuan diri.

Sel natural killer:

Sel efektor utama dari imun innate untuk mengeliminasi berbagai virus, mikroba dan sel tumor melalui aktifitas granzim B yang dilepas NK dengan dimediasi oleh sel limfosit sitotoksik, sehingga dikenal sebagai NK-mediated target cell lysis.

Sel progenitor:

Sel yang masih memiliki potensi diferensiasi namun lebih terbatas yaitu hanya menjadi turunan subpopulasi tertentu.

Sel punca dewasa:

Sel punca yang bersifat multipoten, yaitu mampu menghasilkan berbagai turunan sel terdiferensiasi, namun hanya terbatas pada salah satu lapisan asal germinal dimana sel punca tersebut berasal.

Sel punca embrionik:

Sel punca yang berasal dari jaringan embrionik pada tahapan embriogenesis.

Sel punca embrionik pluripotent:

Sel punca embrionik yang mampu menghasilkan seluruh tipe sel asal dari 3 lapisan germinal (endoderm, ektoderm dan atau

mesoderm)namun tidak mampu menghasilkan sel asal jaringan ekstra-embriionik

Sel punca embrionik totipoten :

Sel punca embrionik berupa 4-8 sel yang identik secara fenotip maupun genetik hasil pembelahan pertama oosit terfertilisasi (zygot) hingga fase morula (3-5 hari paska fertilisasi).

Sel Punca Kanker :

Subpopulasi sel kanker dalam suatu tumor dengan karakter seperti sel punca yaitu mampu memperbaharui diri dan berdiferensiasi menjadi berbagai sel tumor.

Sel Punca:

Sel yang memiliki kemampuan untuk mengeskpresikan CD tertentu sebagai marker stemness dan secara parakrin mampu mensekresi berbagai molekul growth faktor, sitokin dan chemokine tertentu sebagai molekul sinyal aktivasi bagi sel punca endogenous dan atau sel sekitar dalam rangka proses regenerasi.

Sel T<sub>H</sub>naif:

T yang telah berdiferensiasi dalam sumsum tulang dan kemudian lolos dalam proses seleksi positif dan negatif di thymus.

Seleksi negative :

Seleksi yang terjadi pada klon sel T yang mengenali MHC dan peptide sendiri secara over-reaksi/ berlebihan.

Seleksi positif:

Seleksi yang terjadi pada klon double positif (CD4+ dan CD8+) dengan tujuan untuk menghilangkan salah satu klon, melalui stimulasi TCR sel limfosit dengan MHC-I/II sel dendritik (konjugasi dengan benda asing).

Senescence:

Suatu keadaan dimana sel punca tidak mampu melakukan aktifitas proliferasi dalam jangka waktu panjang dan bersifat *irreversible*.

Siklin :

Famili protein yang berperan penting dalam mengontrol progresi sel pada setiap tahapan siklus sel dengan cara mengikat Cdk tertentu sehingga membentuk kompleks Cdk-siklin.

Siklus sel :

Serangkaian tahapan yang akan dilalui sel secara aktif dalam melakukan proses pembelahan dan replikasi DNA untuk menghasilkan dua turunan sel, sehingga juga dikenal sebagai siklus pembelahan.

Sinyal tingkat sitoplasmik :

Sinyal transduksi sebagai lanjutan sinyal membran yang secara kaskade terus bergerak menuju nukleus.

Sinyal transduksi :

Sinyal komunikasi kaskade intraseluler yang terjadi paskaberikatanya ligan-reseptor.

Sirkuit proliferasi sel punca :

Sirkuit yang mengatur proliferasi sel punca yang melibatkan interaksi berbagai molekul/jalur mulai faktor transkripsi pluripoten, faktor co-transkripsi, *soluble molecule* dan jalur proliferasi.

Sitokinesis:

Suatu fitur kedua fase mitosis dimana terjadi distribusi membran sel, sitoskeleton, organela, dan protein terlarut lainnya pada dua sel turunan.

*Soluble molecule*:

Molekul protein yang dilepas oleh berbagai sel/ komponen matriks sekitar secara parakrin atau autokrin dengan tujuan mempertahankan proliferasi.

*Soluble Molecule Extracellular* :

Protein soluble molekul yang dilepas secara parakrin atau autokrin oleh berbagai sel/ komponen matriks sekitar dengan tujuan mempertahankan ekspresi berbagai faktor transkripsi *stemness*

*Somatic Cell Nuclear Transfer*:

Teknik mentransfer nukleus sel somatik ke dalam oosit yang tidak dibuahi dan enucleated (nukleus oosit telah dibuang), yang kemudian lingkungan sitoplasma oosit melakukan *reprogramming* (program ulang) terhadap nucleus sel somatik baru yang ditransfer dan selanjutnya mengaktifkan pengembangan embrio.

Sox2 :

Protein faktor transkripsi yang dibutuhkan dalam mempertahankan *stemness* sel punca pluripoten melalui korporasi dengan protein Oct4

Spreading :

Gerakan memanjang neutrofil/ MSC membentuk lamellipodia dan filipodia akibat aktivasi cytoskeleton actin pasca pengikatan molekul adhesi dengan reseptor MSC/ leukosit

STAT3 :

Faktor transkripsi yang dikode gen STAT3 sebagai respon terhadap stimulus dari sitokine IL6 atau epidermal growth factor (EGF).

**Stemness:**

Properti sel punca berupa potensi pluripoten untuk memperbaharui diri dengan tetap mempertahankan status tidak diferensiasi.

**Tahapan maturasi awal sel T :**

Tahapan yang dimulai dengan diferensiasi prekursor sel T menjadi sel pro-T (thymocyte committed) yang ditandai dengan ekspresi CD2 (reseptor eritrosit domba) dibawah pengaruh hormon thymik dan tymopoetin yang disekresi epitel thymic.

**Tahapan migrasi prekursor sel T:**

Perkembangan sel T yang dimulai dengan migrasi precursor sel T (sel progenitor) asal sumsum tulang menuju regio kortek timus.

**Tahapan proliferasi:**

Tahapan penyembuhan luka berupa proses reparasi jaringan rusak secara terintegrasi baik melalui angiogenesis, epitelisasi maupun granulasi.

**Tahapan sel double positif:**

Pembentukan reseptor TCR dan CD3, di samping pembentukan CD4 dan CD8, sehingga sel thymocyte disebut sebagai sel dengan double positif, yang selanjutnya akan mengalami tahapan seleksi klonal.

**Tahapan seleksi klonal:**

Tahapan akhir seleksi melalui pengenalan dan pendidikan reseptor TCR sel limfosit di medula thymic, sehingga mampu mengenali antigen MHC sendiri, dikenal sebagai self tolerance, di samping non-MCH.

**TCF/LEF:**

Co/aktivator transkripsi dari suatu faktor transkripsi

**Telofase :**

Perakitan kembali membran inti disekitar dua set kromosom yang telah terpisah hingga terbentuk dua nukleus.

**TGF- $\beta$  :**

Molekul growth factor yang disekresi berbagai fase penyembuhan terutama oleh sel platelet dan makrofag aktif, disamping keratosit.

**TLR-3 :**

Protein reseptor anggota family TLR yang berada dalam sitoplasmik.

**TNF- $\alpha$  :**

Molekul sitokin proinflamatori (mediator inflamasi potent) yang berperan sebagai mediator inflamatori poten.

*Traction* atau traksi:

Gerakan penarikan tepi ujung neutrofil/ MSC akibat kontraksi, sehingga reseptor integrin dapat mengikat pada bagian depan selanjutnya.

Transdiferensiasi :

Kemampuan sel punca untuk mengubah sel yang telah terdiferensiasi sebelumnya menjadi bentuk sel yang lebih spesifik.

*Transit-amplifying progenitor*:

Turunan sel punca yang masih memiliki potensi berkembang secara ekstensif dalam menghasilkan turunan yang lebih spesifik.

Transmigrasi:

Pergerakan migrasi/perpindahan MSC/neutrofil sikuler yang sebelumnya telah melekat di endothel kemudian keluar dari pembuluh darah menuju area inflamasi secara amubiasid melalui sisi lateral sel endotel.

*Transmitter-gated ion channel*:

Reseptor seven-helix yang tersusun atas asosiasi subunit protein, dimana tiap asosiasi mengandung beberapa segmen transmembran.

TRIF :

Satu-satunya protein adaptor yang digunakan dalam aktivasi jalur TLR-3

Trombopoietin :

Marker yang berfungsi dalam aktifitas pembaharuan diri,

VEGF:

Molekul angiogenik growth factor kedua (sub-famili PDGF) yang disekresi fibroblast aktif (disampingmakrofag aktif, endothel dan platelet) dalam 4-7 hari cidera.

Wnt :

Molekul protein yang berperan penting dalam jalur sinyal proliferasi sel punca dan mampu mensupresi diferensiasi menjadi osteogenik.

Foto

## BIOGRAFI SINGKAT PENULIS

## DAFTAR ISI SINGKAT BUKU

adapun yang diwarkkan dalam buku ini adalah

Bab I konsep dasar sel punca'

Bab II Stemness dan reprogramming-transdiferensiasi

Bab III Aspek molekular sinyal transduksi

Bab IV Proliferasi sel punca

Bab V siklus sel punca

Bab VI Model komunikasi sel punca

Bab VII teknik purifikasi sel punca

Bab VIII MSC

Bab IX HSC

Bab X Imunoregulasi

Bab XI Proliferasi sel punca

Bab XII Homing MSC

Bab XIII Regenerasi jaringan rusak dan MSC

Penerbit

ISBN