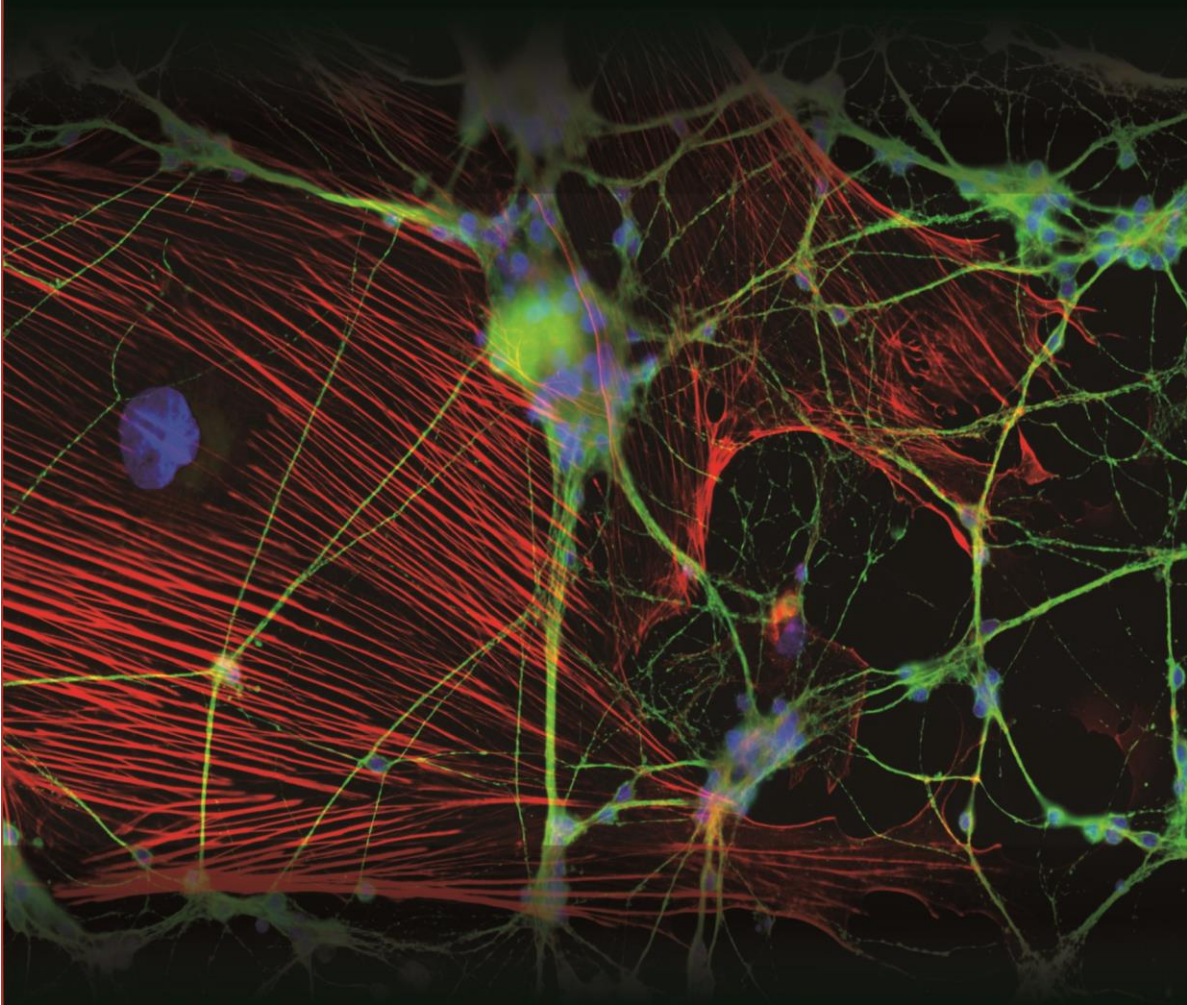


Unissula Press

BASIC MOLECULAR STEM CELL



Agung Putra

BASIC MOLECULAR STEM CELL

BASIC MOLECULAR STEM CELL

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

Editor

Prof. Amin Soebandrio dr., Ph.D, Sp.MK (K)

Yuyus Kusnadi, M.Sc., Ph.D

Penerbit

Unissula Press

BASIC MOLECULAR STEM CELL

Penulis

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

Editor

Prof. Amin Soebandrio dr., Ph.D, Sp.MK (K)

Yuyus Kusnadi, M.Sc., Ph.D

400 halaman 15 x 23 cm

ISBN 978-623-7097-06-8

Cetakan pertama, Februari 2019

Hak cipta 2019, pada penulis

Cover: Google

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 atas pengalaman hasil penelitian penulis selama bekerja di dalam lab SCCR dan telah dipublikasikan dalam beberapa jurnal internasional bereputasi dan jurnal nasional terakreditasi, disamping hasil telaah dan kajian berbagai sumber ilmu terkini baik berasal dari jurnal internasional maupun nasional.

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Kementrian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia, 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 kehadiran 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 baik yang berasal dari publikasi peneliti pada jurnal internasional terakreditasi maupun jurnal nasional akreditasi, disamping hasil pengalaman penulis pribadi bekerja di SCCR. Materi dalam buku ini diawali dengan konsep molekuler yang merupakan fundamental sel punca, dimulai dengan konsep dasar sel punca, isolasi dan kultur sel punca, epigentik dan faktor transkripsi, konsep sinyal, model komunikasi sel punca, jalur molekuler proliferasi, siklus sel punca, konsep terminologi MSC, HSC, molekul *danger*, imunoregulasi MSC, konsep *homing*, serta MSC dalam regenerasi jaringan cedera.

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

Buku ini saya persembahkan untuk:

Istri tercinta

Ninuk Indirawaty Deversiani

Putri tersayang

Putri Karenina Amalia Wulandari

Serta

Kedua orang tua

Alm. H. Ibrahim dan Hj. Rohani

Preface

In the past decade, modern medicine has gone through tremendous developments in many aspects from the discovery of new concepts in biomedical research that culminate to the clinical applications. The discovery of inducible pluripotent stem cells by the Japanese scientist, Shinya Yamanaka and the co-worker in 2006 not only revamped the concept of stem cells but secured the Nobel prize in 2012. Since then the research in stem cells or broadly known as ‘regenerative medicine’ fuelled up, and to date, more than 5000 clinical trials using stem cells were registered under the NIH, USA. This rapidly expanding stem cell research revealed new pieces of knowledge in understanding degenerative diseases from the aspects of gene expression, protein translation and potential use in various treatments.

However, the rapid evolution of stem cell research is not always accompanied by proper dissemination of knowledge or the scientific details to all level’s researchers, particularly the beginners in regenerative medicine. Thus, an elaborative textbook in regional language is mandatory to provide sufficient and updated scientific knowledge to the local researchers to understand the newly evolving field and nurture their interest in stem cells research. In line with this, Dr. Agung Putra, MD, M.Sc.Med. from Stem Cell and Cancer Research (SCCR) laboratory, UNISSULA, one of the pioneers in stem cell research in Indonesia, has taken a greater responsibility in dispatching the fundamental concepts and molecular mechanisms involved in stem cell biology through his great book “Basic Molecular Stem Cell”.

The “Basic Molecular Stem Cell” is an excellent compilation of the fundamental aspect of stem cells where the molecular mechanisms that govern important processes in stem cells namely self-renewal, growth and differentiation were precisely described. Along

with this, the practical guidance and tips for generating and expanding adult cells as well supplemented to facilitate the researchers to culture expand the stem cells. Besides, the therapeutical potentials of stem cells in the various medical applications such as in cardiology, neurology, haematology and immune disorders cater a new hope to the clinicians for exploring stem cells research as to find an alternate way to treat multiple diseases. Additionally, the current textbook also delivered special attention to the mesenchymal stem cells and their role in modulating immune responses.

In general, this book will serve an excellent reference to the readers, especially researchers to understand the basic and molecular biology of the stem cells, and such knowledge will be instrumental in relating the biological functions of stem cells in treating human diseases. On the contrary, the readers need to aware that the stem cell field is relatively new and most of the research findings are amid of investigation either in preclinical stages or undergoing clinical trials to be ratified as valid treatments. I wish all the best to the author for the brilliant piece of work, and believe that the readers will enjoy and assimilate the science of stem cells.

Assoc. Prof. Dr Rajesh Ramasamy

Faculty of Medicine and Health Sciences

Universiti Putra Malaysia

MALAYSIA

Date: 1st March 2019, Kuala Lumpur

Daftar isi

Basic Molecular Stem Cell

Kata pengantar	vi
Preface.....	viii
Daftar isi	x
Daftar istilah	xvii
Daftar tabel	xx
Daftar gambar	xxi
BAB I KONSEP DASAR SEL PUNCA	1
1. <i>Latar belakang</i>	2
2. <i>Konsep regenerasi</i>	3
3. <i>Konsep pembaharuan diri sel punca</i>	5
4. <i>Konsep diferensiasi sel punca</i>	9
5. <i>Konsep proliferasi</i>	11
6. <i>Potensi sel</i>	13
7. <i>Sel berkarakter seperti sel punca</i>	16
8. <i>Konsep niche</i>	18
9. <i>Konsep senescence dan quiescence</i>	20
10. <i>Terminologi sel punca</i>	24
11. <i>Klasifikasi sel punca</i>	27
12. <i>Sel punca embrionik</i>	28
13. <i>Sel punca dewasa</i>	29
BAB II ISOLASI DAN KULTUR SEL PUNCA	34
1. <i>Latar belakang</i>	35
2. <i>Prinsip dasar kultur sel</i>	36
3. <i>Kultur sel primer</i>	40
4. <i>Kondisi optimal kultur</i>	43
5. <i>Media kultur</i>	46
6. <i>Serum kultur</i>	48

7.	<i>Sistem buffer dan sodium bikarbonat</i>	49
8.	<i>Karakteristik pola pertumbuhan sel</i>	49
9.	<i>Teknik dasar kultur</i>	51
10.	<i>Protokol isolasi MSC asal darah</i>	54
11.	<i>Prosedur isolasi-kultur MSC asal tali pusat</i>	58
12.	<i>Panen MSC</i>	61
13.	<i>Perhitungan MSC (Cell counting)</i>	65
BAB III EPIGENETIK DAN FAKTOR TRANSKRIPSI : STEMNESS-REPROGRAMMING		68
1.	<i>Latar belakang</i>	69
2.	<i>Stemness sel punca</i>	70
3.	<i>Faktor transkripsi</i>	74
4.	<i>Epigenetik</i>	76
5.	<i>Modifikasi DNA</i>	78
6.	<i>Modifikasi histon</i>	79
7.	<i>Remodeling kromatin</i>	81
8.	<i>Non-coding RNA</i>	81
9.	<i>Peran faktor transkripsi dalam epigenetik</i>	82
10.	<i>Gen promosi diferensiasi</i>	84
11.	<i>Soluble molecule ekstraseluler</i>	85
12.	<i>Faktor transkripsi dalam pluripoten</i>	89
13.	<i>Reprogramming</i>	94
14.	<i>Introduksi faktor transkripsi (iPS)</i>	96
15.	<i>Somatic cell nuclear transfer (SCNT)</i>	97
16.	<i>Cell fusion</i>	98
17.	<i>Transdiferensiasi</i>	99
18.	<i>Dediferensiasi</i>	101
BAB IV KONSEP SINYAL TRANSDUKSI RESEPTOR-LIGAN		104
1.	<i>Latar belakang</i>	105

2.	<i>Ligan sinyal</i>	106
3.	<i>Reseptor</i>	111
4.	<i>Aktivasi reseptor</i>	113
5.	<i>Protein-G dan reseptor</i>	116
6.	<i>Reseptor terkait transmitter- ion channel</i>	119
7.	<i>Second messenger (cAMP)</i>	120
8.	<i>Sinyal transduksi</i>	122
9.	<i>Respon sel terhadap sinyal</i>	124
BAB V MODEL KOMUNIKASI SEL PUNCA PARAKRIN.....		128
1.	<i>Latar belakang</i>	129
2.	<i>Konsep komunikasi seluler</i>	130
3.	<i>Model komunikasi sel</i>	131
4.	<i>Komunikasi parakrin</i>	132
5.	<i>Komunikasi autokrin</i>	133
6.	<i>Komunikasi endokrin</i>	134
7.	<i>Model sinap (gap junction)</i>	135
8.	<i>Konsep parakrin sel punca</i>	137
BAB VI JALUR MOLEKULER PROLIFERASI SEL PUNCA		143
1.	<i>Latar belakang</i>	144
2.	<i>Sirkuit molekuler proliferasi sel punca</i>	145
3.	<i>Jalur proliferasi sel punca</i>	147
4.	<i>Jalur sinyal transduksi PI3K/Akt</i>	148
5.	<i>Reseptor c-MET</i>	151
6.	<i>Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)</i>	156
7.	<i>Jalur Akt</i>	157
8.	<i>NF-κB</i>	160
9.	<i>mTOR</i>	162
10.	<i>Jalur BMP/SMAD</i>	163
11.	<i>Jalur LIF/STAT3</i>	165

12.	<i>Jalur sinyal proliferasi embrionik</i>	166
13.	<i>Jalur notch</i>	166
14.	<i>Jalur Wnt</i>	167
15.	<i>Jalur sonic hedgehog (Hh)</i>	171
16.	<i>Jalur proliferasi RTK: FGF/MAPK</i>	172
17.	<i>Jalur protein integrin: non ikatan ligan-reseptor</i>	178
18.	<i>Sirkuit jalur proliferasi: RTK-transduksi-nukleus</i>	178
BAB VII SIKLUS SEL PUNCA		182
1.	<i>Latar belakang</i>	183
2.	<i>Siklus sel</i>	184
3.	<i>Cyclin dependent kinase (Cdk)</i>	186
4.	<i>Siklin</i>	187
5.	<i>Fase G₁</i>	188
6.	<i>pRB siklus sel</i>	191
7.	<i>Fase S</i>	193
8.	<i>Fase G₂ : Cdk-1 Siklin B</i>	196
9.	<i>Fase mitosis</i>	196
10.	<i>Sitokinesis</i>	198
11.	<i>Akurasi kontrol sinyal proliferasi</i>	199
12.	<i>Kontrol sinyal intrinsik: checkpoint</i>	200
13.	<i>Kontrol sinyal ekstrinsik proliferasi</i>	202
BAB VIII KONSEP DAN TERMINOLOGI MESENCHYMAL STEM CELL		206
1.	<i>Latar belakang</i>	207
2.	<i>Milestone MSC</i>	209
3.	<i>Terminologi MSC</i>	211
4.	<i>Pentingnya marker MSC</i>	213
5.	<i>Tinjauan definisi MSC kedepan</i>	214
6.	<i>Evolusi MSC: konsep soluble molecule</i>	215

7.	<i>Molekuler MSC dalam diferensiasi</i>	216
8.	<i>Konsep evolusi MSC: small molecule GF</i>	216
9.	<i>Konsep MSC terkini</i>	219
10.	<i>Sumber sel punca</i>	222
11.	<i>MSC dalam regenerasi dan restorasi</i>	223
12.	<i>Imunoregulasi MSC</i>	224
13.	<i>Konsep homing MSC</i>	228
14.	<i>Fusi MSC dalam reparasi dan regenerasi</i>	229
BAB IX HEMATOPOIETIC STEM CELL		233
1.	<i>Latar belakang</i>	234
2.	<i>Hematopoietic stem cell</i>	235
3.	<i>Kompleksitas marker HSC</i>	236
4.	<i>Perkembangan maturasi HSC</i>	238
5.	<i>Fisiologis dinamis hematopoiesis</i>	240
6.	<i>Ontogeni HSC</i>	241
7.	<i>Karakterisasi HSC berdasarkan uji CFU</i>	243
8.	<i>Sirkuit molekuler diferensiasi HSC</i>	247
9.	<i>HSC dalam aplikasi klinis</i>	248
BAB X MOLEKUL DANGER-TLR : SEL RADANG DAN MSC		251
1.	<i>Latar belakang</i>	252
2.	<i>Molekul danger</i>	253
3.	<i>Peran molekul danger</i>	255
4.	<i>Reseptor TLR</i>	257
5.	<i>Sel dendritik</i>	261
6.	<i>Sel limfosit</i>	263
7.	<i>MSC menghindari sistem imun</i>	267
8.	<i>MSC supresi sel dendritik</i>	269
9.	<i>MSC menginduksi polarisasi sel monosit</i>	269
10.	<i>MSC supresi limfosit</i>	270

11. MSC supresi sel leukosit.....	272
12. MSC supresi sel NK.....	273
BAB XI IMUNOREGULASI MSC : POLARISASI MSC DALAM INFLAMASI.....	277
1. Latar belakang.....	278
2. Polarisasi MSC.....	279
3. MSC tipe-2: imunosupresif.....	281
4. Mekanisme polarisasi MSC tipe-2	283
5. Respon initial MSC: polarisasi MSC tipe-1	284
6. Respon lanjut MSC: polarisasi MSC tipe-2	289
7. MSC tipe-1: Pro-inflamatori	291
8. MSC supresi proses inflamasi.....	293
9. MSC supresi inflamasi pada animal model.....	294
10. Sirkuit jalur inflamasi JAK-STAT.....	296
11. JAK-STAT dengan PI3K/AKT/mTOR	297
12. JAK-STAT dengan MAPK/ERK.....	297
BAB XII KONSEP HOMING MSC	301
1. Latar belakang.....	302
2. Konsep homing	303
3. Mekanisme molekuler homing MSC.....	305
4. Molekul-reseptor neutrofil dalam homing.....	306
5. Mekanisme molekuler homing leukosit.....	308
6. Molekul dan reseptor MSC dalam homing.....	309
7. Perbedaan homing MSC dan leukosit.....	311
8. Transmigrasi MSC/ neutrofil.....	312
BAB XIII PERAN MSC DALAM REGENERASI JARINGAN CIDERA	317
1. Latar belakang.....	318
2. Konsep molekuler dalam cedera.....	320
3. Molekuler hemostasis.....	321

4.	<i>Homing MSC menuju area cedera</i>	325
5.	<i>Molekuler inflamasi</i>	327
6.	<i>Tahapan peningkatan permeabilitas kapiler</i>	328
7.	<i>Molekuler sel neutrofil</i>	330
8.	<i>Gerakan motilitas neutrofil</i>	335
9.	<i>Aktivitas sel neutrofil</i>	336
10.	<i>Molekuler sel monosit</i>	338
11.	<i>Molekuler sel makrofag</i>	340
12.	<i>Molekuler sel limfosit</i>	344
13.	<i>MSC dan inflamasi</i>	347
14.	<i>Tahapan proliferasi</i>	348
15.	<i>Soluble molecule MSC</i>	349
16.	<i>MSC dan angiogenesis</i>	352
17.	<i>MSC dan Fibroblas</i>	354
18.	<i>MSC dan re-epitelisasi</i>	357
Indeks		361
GLOSARIUM		378

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	: Epidermal growth factor
ERK	: Extracellular 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 γ	: Interferon gamma
IGFR	: Reseptor-IGF
IKK	: IkB 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- κ B	: 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 α	: Tumor necrosis factor – α
VEGF	: Vascular endothelial growth factor

Daftar tabel

Tabel 1.	Marker MSC, HSC dan NSC	31
Tabel 2.	Well, flask dan disk	45
Tabel 3.	Modifikasi histon dan dampaknya dalam gen	83
Tabel 4.	<i>Second messenger</i> intrasel	122

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 quiescence	23
Gambar 13.	Terminologi sel punca	25
Gambar 14.	Terminologi klasik sel punca	25
Gambar 15.	Terminologi molekuler-fungsional Sel punca	27
Gambar 16.	Sel punca embrionik	29
Gambar 17.	Klasifikasi sel punca dewasa	30
Gambar 18.	Subkultur	37
Gambar 19.	<i>Feeder layer</i>	38
Gambar 20.	Teori hayflick terkait <i>senescence</i>	39
Gambar 21.	Morfologi <i>senescence</i>	40
Gambar 22.	Kultur sel primer	41
Gambar 23.	Teknik kultur eksplan jaringan primer	42
Gambar 24.	Kondisi optimal kultur	46
Gambar 25.	Fase lag, log dan stasional dalam pertumbuhan	50
Gambar 26.	<i>Stemness</i> sel punca	71
Gambar 27.	Regulasi <i>stemness</i>	73
Gambar 28.	Peran faktor transkripsi <i>stemness</i>	75
Gambar 29.	Epigenetik	77
Gambar 30.	Konsep molekuler epigenetik	78
Gambar 31.	Modifikasi DNA	79

Gambar 32.	Modifikasi histon	80
Gambar 33.	Peran faktor transkripsi dalam dimetilisasi	84
Gambar 34.	Gata6	85
Gambar 35.	BMP	86
Gambar 36.	LIF	87
Gambar 37.	Jalur FGF	89
Gambar 38.	Konsep pluripoten	90
Gambar 39.	Pluripotensi sel punca embrionik	93
Gambar 40.	Reprogramming iPS	94
Gambar 41.	iPS	97
Gambar 42.	SCNT	98
Gambar 43.	Fusi sel	99
Gambar 44.	Transdiferensiasi	100
Gambar 45.	Dediferensiasi	101
Gambar 46.	Membran bilayer	108
Gambar 47.	Molekul ligan hidrofilik	109
Gambar 48.	Molekul ligan difusi	111
Gambar 49.	Reseptor pengikat ligan	112
Gambar 50.	Aktivasi reseptor	114
Gambar 51.	Aktivasi protein-G	117
Gambar 52.	Inaktivasi protein-G	118
Gambar 53.	Reseptor terikat transmitter-ion channel	119
Gambar 54.	cAMP	121
Gambar 55.	Tiga jalur sinyal transduksi seluler	124
Gambar 56.	Respon transkripsi	126
Gambar 57.	Sinyal parakrin	133
Gambar 58.	Sinyal autokrin	134
Gambar 59.	Sinyal endokrin	135
Gambar 60.	<i>Gap junction</i>	136
Gambar 61.	Molekul parakrin MSC	139
Gambar 62.	Faktor co/transkripsi pluripotensi	147
Gambar 63.	Proliferasi sel punca	148
Gambar 64.	PI3K dan fosforilasi	149
Gambar 65.	<i>Independent</i> RTK dan modulator	150
Gambar 66.	Interaksi MET dengan jalur RAS dan STAT	154

Gambar 67.	Interaksi MET dengan jalur beta-catenin	155
Gambar 68.	Interaksi MET dengan jalur sinyal <i>notch</i>	155
Gambar 69.	Mekanisme kerja IGF-1	157
Gambar 70.	Mekanisme kerja akt terhadap NF-kB, mTOR dan GSK3	159
Gambar 71.	Aktivasi NF-Kb	161
Gambar 72.	Aktivasi mTOR	163
Gambar 73.	Mekanisme jalur BMP/SMAD	164
Gambar 74.	Mekanisme jalur LIF/STAT3	166
Gambar 75.	Wnt dan reseptor	168
Gambar 76.	Aktivasi jalur Wnt	170
Gambar 77.	Terikatnya GF pada reseptor RTK	173
Gambar 78.	Dimerisasi RTK	174
Gambar 79.	Pengikatan SH-2 pada fosfotirosin	174
Gambar 80.	Ikatan SOS-Gbr2-SH3	175
Gambar 81.	Aktivasi protein Ras	176
Gambar 82.	Aktivasi MAPK	176
Gambar 83.	Aktivasi faktor transkripsi jun-fos	177
Gambar 84.	Fosforilasi pRB	178
Gambar 85.	Sinyal transduksi dan siklus sel	179
Gambar 86.	Siklus sel	185
Gambar 87.	Molekuler siklus sel	186
Gambar 88.	Sintesis siklin D (fase G1)	188
Gambar 89.	Fase G ₁	190
Gambar 90.	pRB	191
Gambar 91.	Fosforilasi pRB/E2F-DP	192
Gambar 92.	Peranan Cdk2-siklin E pada fase S	194
Gambar 93.	<i>Checkpoint</i>	195
Gambar 94.	Fase mitosis dan sitokinesis	198
Gambar 95.	Keterlibatan molekul ATM dan p53-p21	202
Gambar 96.	Kontrol eksternal <i>signalling</i>	203
Gambar 97.	<i>Milestone</i> MSC	210
Gambar 98.	MSC	211
Gambar 99.	Diferensiasi dan pembaharuan diri MSC	212
Gambar 100.	Visualisasi marker	213
Gambar 101.	Molekuler MSC dalam berdiferensiasi	216
Gambar 102.	<i>Small molecule</i> GF MSC	217

Gambar 103.	Terminologi MSC	219
Gambar 104.	Terminologi klasik MSC	220
Gambar 105.	Terminologi fungsional MSC	222
Gambar 106.	Imunoregulasi MSC	224
Gambar 107.	Marker HSC	237
Gambar 108.	Marker kompleksitas molekuler HSC	238
Gambar 109.	HSC sumsum tulang	239
Gambar 110.	Hirarki HSC	241
Gambar 111.	Pembentukan molekuler HSC	243
Gambar 112.	Turunan HSC	247
Gambar 113.	<i>Danger molecule</i>	255
Gambar 114.	Respon <i>danger molecule</i>	257
Gambar 115.	<i>Danger molecule</i> dan reseptor TLR	259
Gambar 116.	Polarisasi fenotip	261
Gambar 117.	Maturasi sel limfosit	265
Gambar 118.	Seleksi klonal dan maturasi limfosit	266
Gambar 119.	Efek pleotropik MSC dalam supresi Sel inflamasi	268
Gambar 120.	Polarisasi MSC	279
Gambar 121.	TLR-3 dan TLR-4	281
Gambar 122.	<i>Soluble molecule</i> MSC Tipe-2	282
Gambar 123.	Reseptor MSC tipe 2	283
Gambar 124.	Aktivasi jalur NF-kB	284
Gambar 125.	Aktivasi jalur NF-kB via TNF- α /TNFR	286
Gambar 126.	Respon initial MSC: MyD88	287
Gambar 127.	Pengikatan IRAK dan TRAF-6	288
Gambar 128.	Respon initial MSC: IRAK/TRAF-6/TAK-1/TAB-1/2	289
Gambar 129.	Respon lanjut MSC: COX2 induksi PGE ₂	290
Gambar 130.	Polarisasi MSC	291
Gambar 131.	<i>Soluble molecule</i> MSC Tipe-1	292
Gambar 132.	Konsep <i>homing</i>	304
Gambar 133.	Mekanisme molekuler <i>homing</i> MSC	305
Gambar 134.	molekuler kemoatraktan dalam migrasi neutrofil	309
Gambar 135.	Pola pergerakan transmigrasi	314
Gambar 136.	Tahapan respon penyembuhan cedera	320

Gambar 137.	Molekuler hemostasis primer	322
Gambar 138.	Proses molekuler hemostasis sekunder	324
Gambar 139.	Mekanisme molekuler <i>homing</i> MSC	326
Gambar 140.	Tahapan inflamasi	328
Gambar 141.	Molekuler permeabilitas kapiler	330
Gambar 142.	Sistematika faktor migrasi sel neutrofil	332
Gambar 143.	Peranan molekuler adhesi sel neutrofil	334
Gambar 144.	Motilitas neutrofil	335
Gambar 145.	Aktivitas neutrofil aktif	337
Gambar 146.	Sistematika faktor migrasi sel monosit	338
Gambar 147.	Kompleksitas molekul makrofag	344
Gambar 148.	Imunoregulasi MSC	347
Gambar 149.	Peran MSC dalam mengontrol inflamasi	348

BAB I

KONSEP DASAR SEL PUNCA

Tujuan

Setelah membaca bagian pertama ini, diharapkan pembaca mengerti tentang konsep dasar sel punca terkait dengan regenerasi, pembaharuan diri, diferensiasi proliferasi dan potensi sel. Buku ini juga membahas potensi suatu sel punca mulai dari totipoten, pluripoten, multipoten, progenitor dan sel matur, termasuk sel dengan karakter seperti sel punca, yaitu sel punca kanker (SPK) dan *induced pluripotent stem cell* (iPS). Disamping itu, buku ini juga membahas konsep *niche*, *senescence* dan *quiescence*, yang merupakan bagian penting dalam sel punca.

Sel punca adalah sel regenerasi. Regenerasi berbeda dengan reparasi. Regenerasi merestorasi struktur dan fungsi suatu sel/jaringan secara utuh, sedangkan reparasi hanya partial. Secara hierarki, potensi sel dibagi menjadi totipoten, pluripoten, multipoten, progenitor hingga sel matur. Sel punca diklasifikasikan menjadi 2, yaitu sel punca embrionik dan sel punca dewasa. Secara terminologi sel punca didefinisikan menjadi 3, yaitu secara klasik yang didasarkan atas biologi (sel punca dengan kemampuan perbaharui diri dan diferensiasi), molekuler (marker CD) dan fungsional yang didasarkan atas konsep parakrin. Konsep pembaharuan diri sel punca akan menghasilkan turunan identik (pembelahan simetris atau asimetris), sedangkan konsep diferensiasi akan menghasilkan turunan sel spesifik. Niche berperan penting dalam aktivasi sel punca (sel punca quiescence). Sel punca sendiri mampu merespon setiap perubahan niche secara benar sehingga menjadi konsep dasar dalam homeostasis yang dalam keadaan normal berada pada posisi quiescence.

Catatan penulis

1. Latar belakang

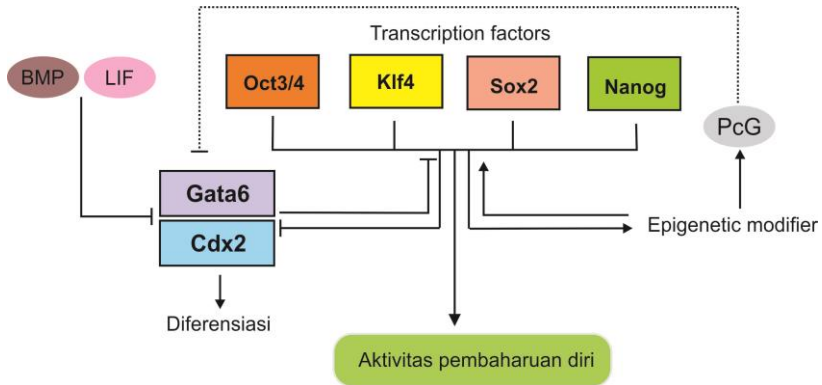
Setiap sel memiliki rentang waktu kehidupan tertentu, yang akan berakhir dengan kematian dan digantikan dengan sel baru. Peristiwa ini dikenal sebagai regenerasi. Kemampuan regenerasi setiap sel berbeda tergantung pada jenis dan tipe sel itu sendiri. Sel dengan potensi regenerasi terkuat adalah sel punca,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

Sel punca memiliki 2 karakteristik unik yaitu mampu melakukan pembaharuan diri dan berdiferensiasi. Konsep

tergantung pada keadaan *niche* sekitar sel punca. Sel punca dewasa secara umum berada dalam status *quiescence* (inaktif) pada sebagian besar jaringan tubuh.

3.2. Molekuler pembaharuan diri

Secara spesifik terdapat sekelompok protein penting yang berperan dalam meregulasi aktivitas pembaharuan diri sel punca. Protein tersebut berupa sekelompok faktor transkripsi pluripoten Oct4, Sox2, Klf4 dan Nanog yang saling terintegrasi sehingga membentuk sirkuit regulator yang dapat untuk mempertahankan aktivitas pembaharuan diri sel punca. Aktivitas pembaharuan diri sel punca diinhibisi oleh faktor diferensiasi, yaitu gen Gata6 dan Cdx2 serta *soluble molecule* BMP dan LIF. Sisi lain, faktor epigenetik juga berperan penting dalam proses pembaharuan diri. Sirkuit molekuler pembaharuan diri dijelaskan dalam gambar 4 di bawah ini.



Gambar 4. Konsep gen pembaharuan diri

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

3.3. Pembaharuan diri: stabilitas jumlah sel punca

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

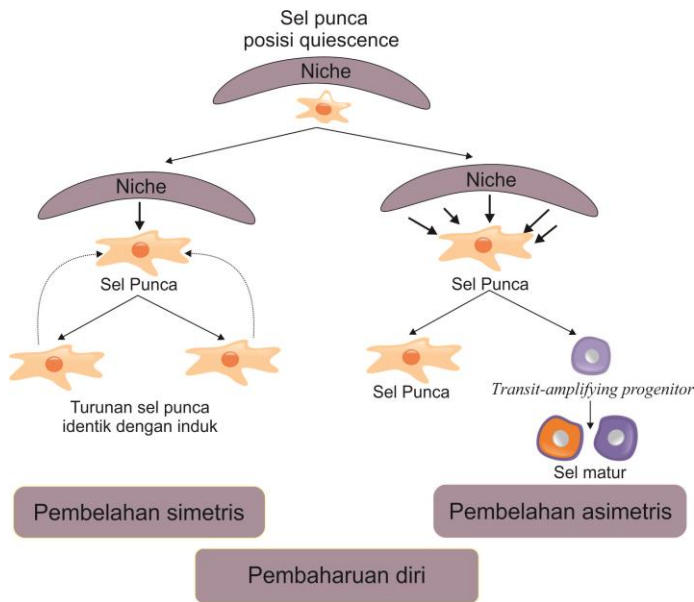
3.4. Arah nasib pembelahan sel punca

Sel punca dewasa dalam keadaan normal berada pada status *quiescence* (inaktif) di banyak jaringan tubuh. Sekalipun demikian status *quiescence* 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 stabilitas sel punca berubah dari inaktif menjadi aktif sehingga dapat memasuki siklus sel kembali. Hal ini menunjukkan *niche* mempengaruhi arah nasib suatu sel punca.

Secara spesifik sel punca dewasa akan didorong keluar dari *pool* sel punca untuk membelah secara asimetris sehingga menghasilkan satu turunan sel progenitor, dikenal sebagai *transit-amplifying progenitor* (turunan sel punca pertama), sementara turunan sel punca yang lain akan terus melakukan aktivitas pembaharuan diri. Hal ini menunjukkan bahwa keberadaan sel punca akan tetap stabil,

sekalipun sebagian besar sel punca telah berdiferensiasi menjadi sel progenitor dan terus menghasilkan turunan sel yang lebih spesifik.

Lebih lanjut aktivitas pembaharuan diri dijelaskan dalam gambar 5 di bawah 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 spesifik yang dibutuhkan dalam pembentukan berbagai komponen jaringan dan organ. Potensi diferensiasi sel punca embrionik terlihat dalam aktivitas 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 sekuen DNA, namun hanya pada tingkat epigenetik. Hal ini mengesankan bahwa sel punca yang berdiferensiasi tidak melakukan pembelahan sel dalam arti yang 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 punca dibagi 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.

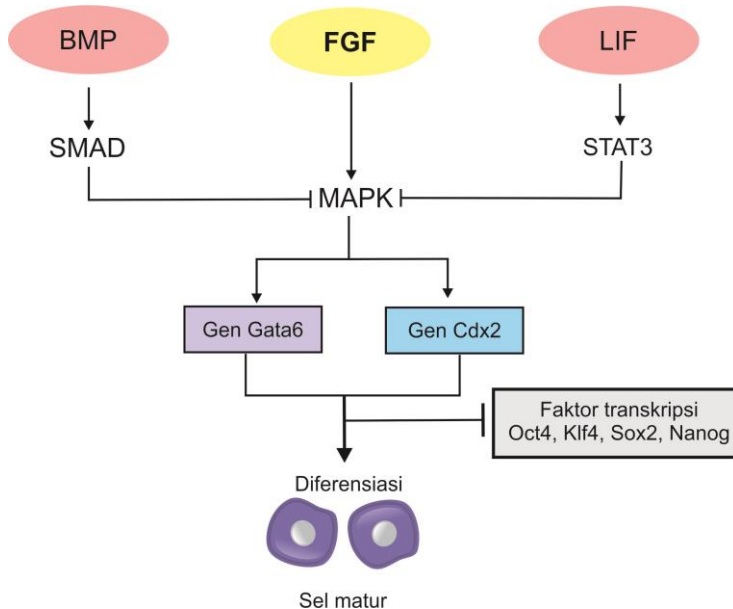
2. Stimulasi molekul *fibroblast growth factor* (FGF)

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

3. Inaktivasi LIF dan BMP

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

Molekuler diferensiasi sel punca dijelaskan dalam gambar 6 di bawah 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 kecepatan pembelahan sel (jenis apapun) secara terus menerus sehingga menghasilkan nilai rerata suatu kecepatan pembelahan suatu sel. Proliferasi suatu sel dapat diukur baik dengan menggunakan perhitungan hemositometer atau *automatic 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 otomatis menghasilkan turunan sel yang identik dengan induk, sedangkan pembaharuan diri selalu 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 atau NK matur tanpa pernah menghasilkan turunan sel progenitor limfoid itu sendiri.

5.3 Molekuler proliferasi

Aktivitas molekuler proliferasi merupakan konsep komunikasi seluler via 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 tahapan nukleus dapat berdampak pada kesalahan protein yang dihasilkan dan hal ini berkorelasi dengan manifestasi penyakit tertentu, terutama malignasi. Proses ini dijelaskan secara detail dalam bab siklus sel selanjutnya.

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, apakah berdiferensiasi, memperbaharui diri atau inaktif. 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. Komponen matriks ekstraseluler

Kedua komponen ini saling berinteraksi dengan melepas *soluble molecule* sehingga dapat mengubah ekspresi gen sel target (sel punca). Hubungan korporasi 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) pada 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 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. Secara spesifik *niche* yang kembali normal menyebabkan sel punca keluar siklus sel dan kembali memasuki fase G_0 (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.

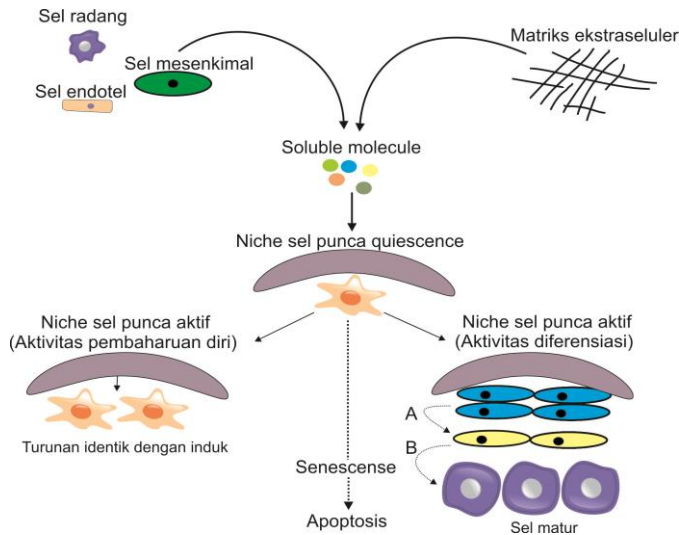
8.4 Molekuler *niche* dalam polarisasi sel punca

Perubahan *niche* sel punca dapat 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- α , IFN- γ) 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 perbaharuan diri dan atau diferensiasi. Perubahan *niche* dalam polarisasi sel punca dijelaskan dalam gambar 11.

9. Konsep *senescence* dan *quiescence*

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

Niche dan polarisasi sel punca dijelaskan pada gambar dibawah



Gambar 11. Perubahan *niche* terhadap polarisasi 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 progenitor, (B) diferensiasi progenitor menjadi sel matur.

9.1. Pengertian quiescence

Quiescence adalah suatu keadaan dimana sel punca berada dalam keadaan inaktif, sehingga 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 adalah bersifat sementara dan *reversible*. Oleh karena itu, karenanya sel punca dalam status ini berpeluang untuk 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 di fase akhir G1 siklus sel 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 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 aktivitas proliferasi dalam jangka waktu panjang dan bersifat *irreversible*. Sel punca dapat memasuki keadaan *senescence* ketika berada pada fase G₀ dalam waktu lama akibat stres intraseluler atau ekstraseluler yang ekksesif. Program *senescence* akan mengunci status pembelahan sel sehingga akan 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 SASP dapat mengubah perilaku sel fibroblas sekitar menjadi pro-inflamasi.

9.4. Faktor *senescence*

Proses *senescence* diinisiasi diinisiasi terlebih dahulu dari tahapan quiescence dengan tujuan mencegah penyebaran sinyal kerusakan pada sel turunan berikutnya. Berbagai faktor yang dapat memicu *senescence* seluler adalah :

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

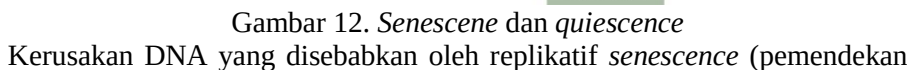
Replicative senescence adalah pembelahan sel yang berulang kali dan berkonsekuensi pada pemendekan telomer (*telomer uncapping*) hingga disfungsi telomer. Keadaan ini akan berdampak pada deteoriasi mitokondria (kemunduran fungsi mitokondria), gangguan kromatin (stres genotoksik) hingga kerusakan DNA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

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

Sinyal *growth-related oncogene- α* (GRO- α) adalah molekul hasil sekresi sel tumor yang dapat memicu berbagai sel normal di sekitar sel tumor menjadi *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 :

- Mekanisme molekuler jalur *senescence* dijelaskan pada gambar awah ini.



telomer) dan ROS akan memicu jalur p53-p21, di samping sirtuin-1 sehingga menyebabkan *senescence*. Sisi lain stres sel melalui aktivasi p16INK4a dan pRB akan memicu aktivasi p21 yang juga dapat memicu *senescence*.

9.6. Fenotipe baru SASP *senescence*

Sel *senescence* adalah sel yang tertahan secara permanen pada siklus sel (*cycle cell arrest*). Sel demikian mendapatkan fenotip baru berupa SASP yang memungkinkan mengubah perilaku berbagai sel (sel fibroblas) sehingga 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 dalam 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 13 di bawah ini.

10.1 Terminologi klasik sel punca

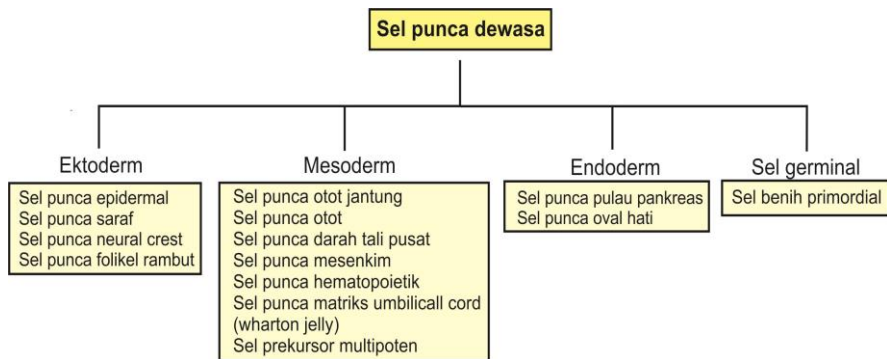
Terminologi klasik sel punca didasarkan atas gambaran morfologi sel punca berdasarkan pada aktivitas pembaharuan diri dan potensi berdiferensiasi. Secara spesifik pembaharuan diri menggambarkan kemampuan sel punca untuk menghasilkan turunan sel yang identik dengan induk baik melalui pembelahan simetris dan atau

13.1 Pengertian sel punca dewasa

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

13.2 Klasifikasi sel punca dewasa

Berdasarkan atas jaringan 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)

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- α 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- α induced MSCs on Suppressive Inflammation by Increasing TGF- β 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 kedua ini, diharapkan dapat memahami tentang prinsip dasar kultur, kultur sel primer, sel punca mesenkimal (MSC) asal darah, *wharton jelly*, proses panen dan perhitungan sel dan kondisi optimal kultur yang meliputi media, serum dan sistem buffer, disamping karakteristik pola pertumbuhan sel. Secara spesifik bab ini membahas teknik dasar kultur, protokol isolasi, termasuk sel punca.

Kultur sel adalah salah satu cara untuk menghasilkan produk rekayasa sel berbasis riset. Prinsip sel kultur adalah propagasi sel secara in vitro, subkultur, feeder layer dan optimasi kondisi optimal kultur. Secara spesifik kondisi optimal berupa keadaan fisiologis (suhu, pH, CO₂) dan lingkungan mikroseluler (disk dan medium). Hasil sel kultur adalah konsisten dan presisi. Terdapat 2 metode dalam isolasi dan kultur jaringan primer, yaitu teknik eksplan dan disosiasi, sedangkan isolasi MSC asal darah dengan sentrifuge bertingkat menggunakan ficoll, berdasarkan atas perbedaan gradien. Berbagai proses teknik kultur sel perlu dikuasai, mulai preparasi sampel, ruang kerja aseptis dalam laboratorium class 2, beberapa protokol isolasi mulai dari kultur hingga panen sel, cell counting subkultur dan preparasi untuk aplikasi klinis.

Catatan penulis

1. Latar belakang

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

Studi *in vivo* baik yang melibatkan hewan coba dan atau relawan manusia seringkali mendapatkan hasil yang berbeda tiap laboratoriumnya. Perbedaan hasil ini diduga karena adanya variasi pada subjek penelitian terutama pengaruh faktor epigenetik, sekalipun telah dilakukan proses homogenisasi sebelumnya. Kultur sel menjadi salah satu konsep solusi dalam hal homogenisasi suatu penelitian

12.1 Konsep panen MSC

Panen MSC merupakan aktivitas 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 atau sintetik menggunakan *tryple*.

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 konfluen 80%
3. Medium komplit
4. Mikropipet 100-1000 μL dengan *blue tip*
5. PBS

12.3 Prosedur panen MSC

1. Ambil Flask yang berisi sel kultur (MSC) dari inkubator CO_2 , kemudian amati morfologi sel dan tanda kontaminasi dengan *microscope 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.

BAB III

EPIGENETIK DAN FAKTOR

TRANSKRIPSI: *STEMNESS* - *REPROGRAMMING*

Tujuan

Setelah membaca bagian ketiga ini, diharapkan pembaca mengerti tentang *stemness* sel punca, regulasi *stemness*, peran faktor transkripsi dalam *stemness*, termasuk gen promosi diferensiasi dan *soluble molecule* ekstraseluler, disamping itu memahami konsep epigenetik, modifikasi DNA dan histon, *remodelling* kromatin, *non-coding* RNA, peran faktor transkripsi dalam epigenetik, gen promosi diferensiasi, *soluble molecule* ekstraseluler dan pada akhir memahami konsep *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 sel punca dalam pembaharuan diri yang melibatkan protein faktor transkripsi. Pembaharuan diri sel punca merupakan aktivitas sirkuit regulator faktor transkripsi Oct4, Sox2, Klf4 dan Nanog yang mensupresi gen promosi diferensiasi Gata4, Gata6 dan Cdx2 serta peranan PcG sebagai faktor epigenetik. Faktor ekstrinsik ikut terlibat aktivitas stemness melalui pelepasan soluble molekul LIF dan BMP untuk mensupresi diferensiasi, serta hambatan 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 setiap jaringan yang bukan asalnya sekalipun. 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 yang 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 pelepasan protein PcG dan *soluble molecule* BMP dan LIF yang disekresi sel punca secara autokrin. Secara spesifik

epigenetik dipengaruhi oleh modifikasi DNA, histon, *remodelling* kromatin dan *non-coding* RNA, yang terlibat kuat dalam mempengaruhi arah faktor transkripsi.

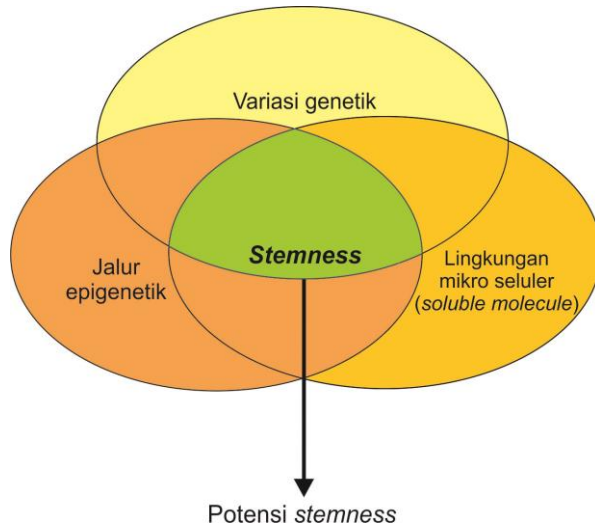
Penelitian ontogenesis sebelumnya mengungkapkan bahwa arah nasib suatu sel adalah berjalan searah, sehingga program diferensiasi akan berjalan dari sel punca menuju sel matur bukan sebaliknya. Sekalipun demikian hasil penelitian terkini melaporkan bahwa faktor transkripsi yang terekspresi secara kuat dalam suatu sel akan berdampak pada peningkatan potensi *stemness* sel tersebut. Teori ini membuktikan bahwa arah ontogenesis dapat dirubah melalui induksi serangkaian faktor transkripsi dan proses epigenetik. Sisi lain memungkinkan untuk melakukan program ulang 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 *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, berbagai faktor transkripsi regulasi molekuler hingga bentuk epigenetik yang dipengaruhi oleh modifikasi DNA, histon, struktur kromatin hingga teknik *reprogramming* sebagai aplikasi teori *stemness*.

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 terkait 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 dan berdampak pada peningkatan potensi *stemness*. 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 dengan tetap 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. Sel punca dikatakan poten ketika mampu melakukan aktivitas pembaharuan diri sekalipun *niche* didominasi oleh faktor diferensiasi. Secara spesifik aktivitas *stemness* sel punca akan terus membelah dan memperbaharui diri (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 molekuler *stemness*

Regulasi *stemness* menentukan arah pembelahan sel punca, apakah menuju proses pembaharuan diri dan atau diferensiasi. Secara spesifik regulasi *stemness* terjadi melalui supresi jalur diferensiasi dan meningkatkan 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:

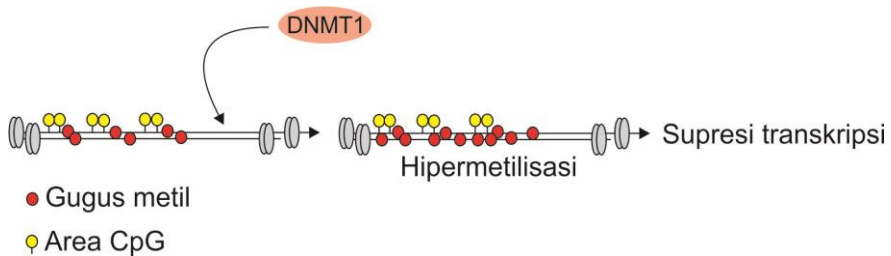
1. Faktor transkripsi pluripoten utama:

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

1. Proses membutuhkan *DNA methyltransferase-1* (DNMT-1)
 2. Terjadi pada area promotor gen (sitosin dinukleotida CpG)
 3. Enzim DNMT-1 memfasilitasi pengikatan gugusan metil pada area promotor gen, berfungsi sebagai demetilasi DNA
 4. Terjadi tambahan gugusan metil pada sekuen DNA sehingga terjadi hipermetilisasi
 5. Fungsi transkripsi gen terganggu (tersupresi)
- Modifikasi DNA dijelaskan pada gambar di bawah ini.



Gambar 31. Modifikasi DNA

DNMT melakukan 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 gen yang beragam mulai dari aktivasi atau inaktivasi transkripsi, kerusakan DNA, perbaikan DNA dan kromosom *packing*.

6.1 Pengertian histon

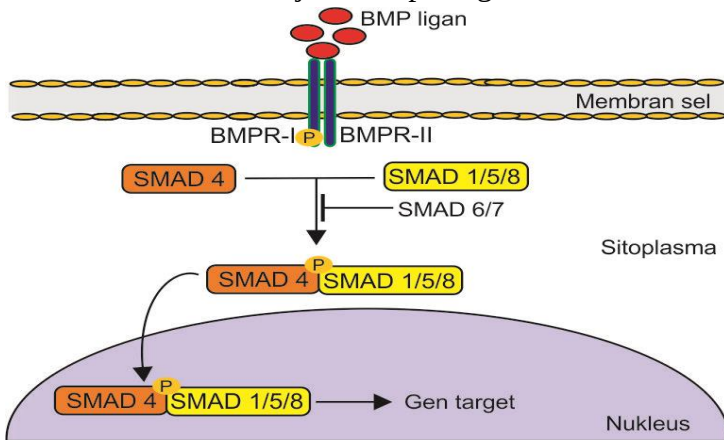
Histon adalah protein yang berperan dalam mengondensasi atau memadatkan DNA sehingga dapat membungkus DNA ke dalam kromosom secara baik. Secara spesifik histon membungkus DNA

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 berfungsi sebagai sitokin dan metabologen. BMP pada awalnya diidentifikasi berdasarkan atas kemampuannya dalam menginduksi pembentukan tulang dan kartilago. Seiring dengan waktu BMP juga diketahui berperan sentral sebagai sinyal morfogenik dan ikut merancang perkembangan morfologi jaringan jantung, sistem saraf dan kartilago. Sisi lain BMP berperan 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 kemudian menghambat pada MAPK, sehingga mendorong aktivitas pembaharuan diri.

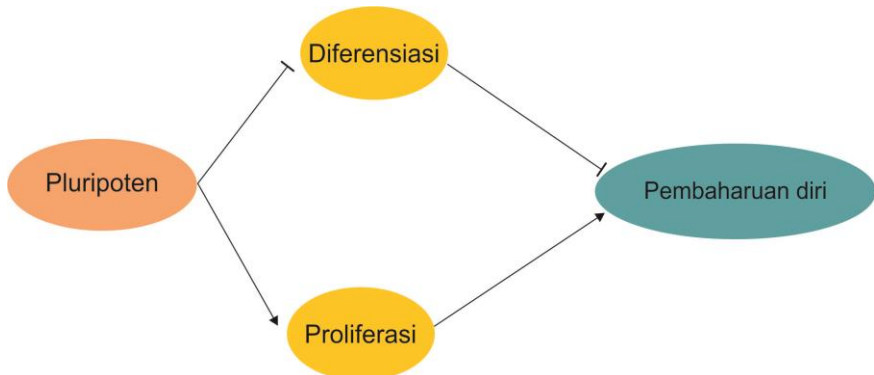
Jalur molekul BMP dijelaskan pada gambar di bawah ini.



Gambar 35. BMP

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

Konsep pluripoten dijelaskan dalam gambar dibawah ini:



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 *wild type* kurang dari 50% akan mendorong sel embrionik berdiferensiasi menjadi TE dalam 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 totipoten berdiferensiasi menjadi sel primitif *endoderm-like*. Ekspresi berlebihan Oct3/4 menyebabkan supresi ekspresi Cdx2, sehingga mencegah diferensiasi.

2) Mencegah diferensiasi trofektoderm

Oct3/4 berinteraksi langsung dengan Cdx2, membentuk kompleks *repressor* (penekan) yang mengganggu autoregulasi protein sehingga menimbulkan *reciprocal inhibition system* (pengaturan fungsi timbal balik). Interaksi ini secara spesifik menghambat 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 Tcf1 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 mengaktivasi 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 akan segera mati setelah implantasi.

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, namun juga 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 pluripoten 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 :

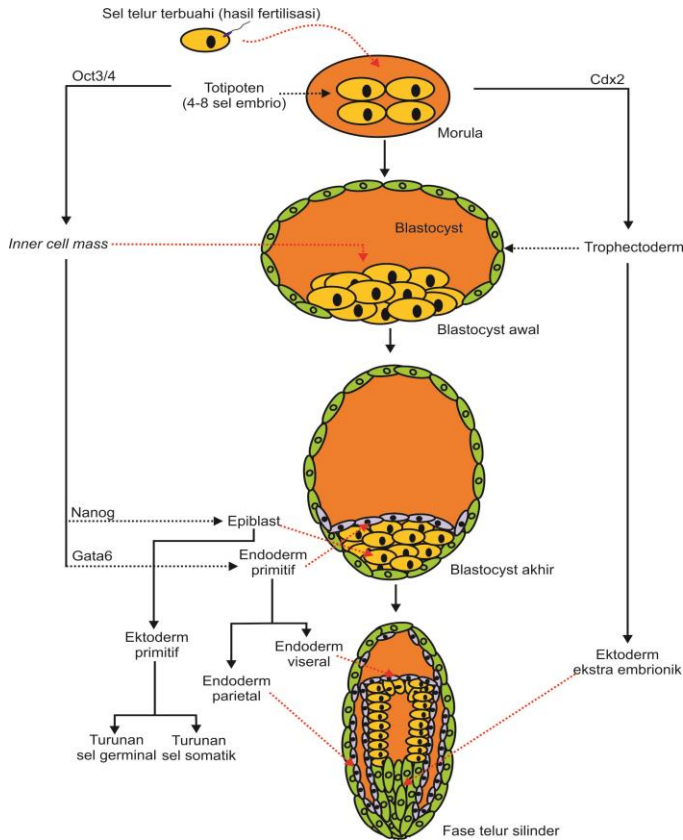
1. Nanog mempertahankan pluripoten dan mencegah diferensiasi

Nanog sebagai penjaga gerbang untuk mencegah sel embrionik berdiferensiasi menjadi endoderm primitif. Nanog juga dapat memblokir diferensiasi neuron ketika dibuang *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 dapat mengaktifkan ekspresi Nanog. Hal ini menunjukkan bahwa umpan balik negatif terlibat dalam keseimbangan antara pembaruan diri dan diferensiasi mesodermal.



Gambar 39. Pluripotensi sel punca embrionik

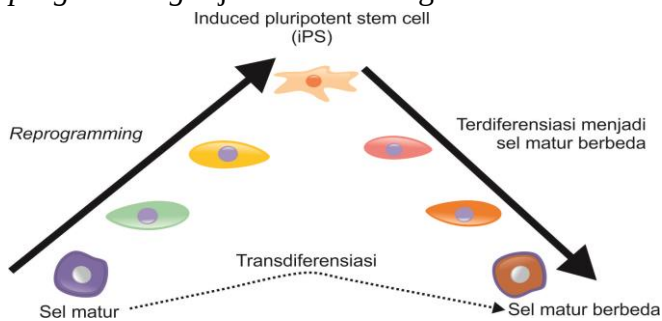
Penghambatan aktivitas Stat3 dan ekspresi berlebih dari Oct3/4 menstimulasi sel embrionik berdiferensiasi menjadi sel primitif *endoderm like*. Ini didukung oleh bukti bahwa efek Oct3/4 yang berlebihan pada diferensiasi sel embrionik tidak memerlukan aktivitas pengikatan DNA Oct3/4. Gen target dari kompleks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

3. Nanog dalam *reprogramming*

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

13. *Reprogramming*

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 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 untuk kembali menjadi embrionik dengan cara meningkatkan ekspresi gen pembaharuan diri dan supresi gen promosi diferensiasi. Faktor trankripsi berperan penting dalam menjaga potensi *stemness* suatu sel punca. *Reprogramming* dijelaskan dalam gambar di bawah ini.



Gambar 40. *Reprogramming* iPS

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

13.1 Pengertian *reprogramming*

Reprogramming (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, namun 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 mengubah nasibnya. Pendekatan ini dilakukan 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 yang telah terdiferensiasi (matur) menjadi bentuk 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 *in vitro* dalam waktu yang lebih pendek daripada sel iPS, oleh karena itu peluang akumulasi dari 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

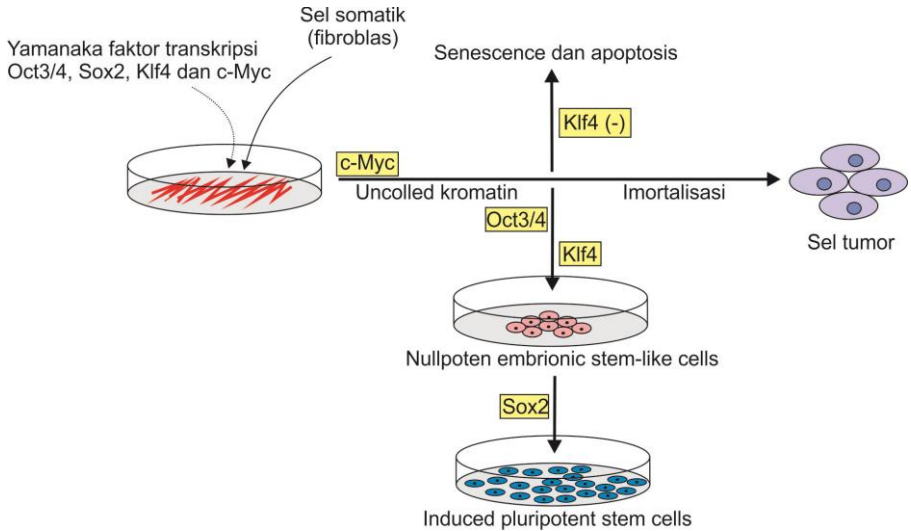
14. Introduksi faktor transkripsi (iPS)

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 Tuan 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 iPS akan ditransplantasikan pastikan 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 di bawah ini.



Gambar 41. 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 dapat mendorong sel T 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). Lingkungan sitoplasma oosit melakukan *reprogramming* (program ulang) terhadap nukleus sel somatik baru yang ditransfer sehingga terjadi aktivasi berbagai jalur pengembangan embrio.

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

BAB IV

KONSEP SINYAL TRANSDUKSI RESEPTOR-LIGAN

Tujuan

Setelah membaca bagian empat ini, diharapkan pembaca mampu memahami konsep sinyal transduksi mulai reseptor, ligan, aktivasi reseptor-ligan, reseptor G, reseptor terkait transmitter-ion *channel*, cAMP hingga sinyal transduksi sitoplasmik yang berdampak pada respon sel.

Setiap sel mampu berkomunikasi dengan menggunakan small molecule yang 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 ikut 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

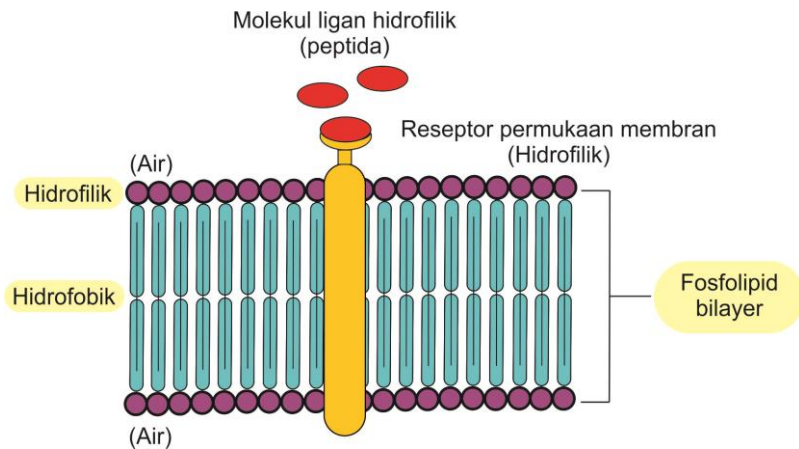
Komunikasi seluler dimulai dengan terikatnya ligan (substansi pembawa sinyal) pada reseptor yang sesuai (protein penerima sinyal). Kemampuan setiap sel untuk menerima sinyal dan meresponnya secara benar adalah konsep dasar dalam aktivitas seluler baik aktivitas pertumbuhan, pembelahan, apoptosis, reparasi maupun regulasi sistem imun. 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) maka 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

2.4 Molekul ligan terikat reseptor membran (non-difusi)

Ligan-non difusi adalah sekelompok molekul ligan yang dalam menginduksi sinyal komunikasi intraseluler tidak melalui proses difusi membran lipid bilayer, namun dengan cara mengikat reseptor permukaan membran sel tersebut. 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 di bawah ini.



Gambar 47. 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

hidrofobik (terlarut dalam lipid) akan langsung berdifusi ke dalam membran intraseluler untuk mengikat reseptor intrasel, 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, 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 dalam bentuk formasi kimia 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

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 dalam 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. Subunit- α (45 to 47 kD)

Subunit- α dapat mengikat GDP atau GTP dan memiliki aktivitas intrinsik GTPase lambat.

2. Subunit β (35 kD)

3. Subunit γ (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 nukleotida GDP. Aktivasi protein-G terjadi melalui tahapan sebagai berikut:

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

Pengikatan hormon *acetylcholin* pada reseptor terkait protein-G menyebabkan perubahan konformasi reseptor terkait protein-G yang

kemudian secara kaskade mengaktifkan rangkaian protein efektor berikutnya.

2. Pengikatan GDP menjadi GTP

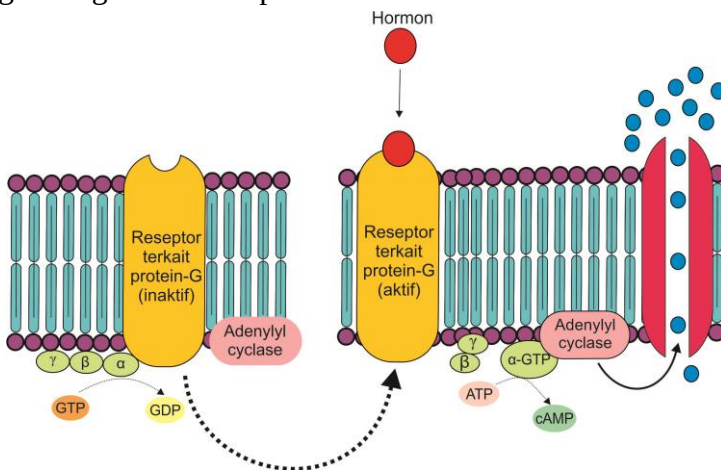
Reseptor yang terkonformasi akan menginduksi (katalisis) pergantian GDP yang ada pada subunit- α (komponen enzimatik) protein-G dengan GTP sehingga subunit- α protein-G menjadi aktif.

3. Aktivasi *adenylyl cyclase*

Subunit- α protein-G aktif akan berdisosiasi dari subunit- β dan γ 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.

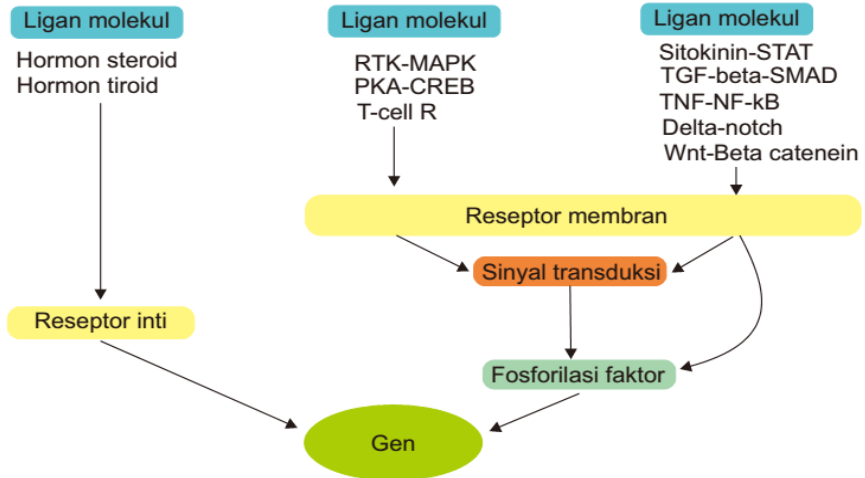


Gambar 51. Aktivasi protein-G

Protein-G dalam keadaan normal inaktif, dimana kompleks subunit $\alpha\beta\gamma$ protein-G terikat pada GDP. Aktivasi protein-G terjadi melalui pengikatan ligan hormon pada reseptor yang menyebabkan perubahan konformasi reseptor hingga mampu mengganti GDP pada subunit- α dengan GTP dan

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 di bawah ini.



Gambar 55.Tiga jalur sinyal transduksi seluler

Inisiasi pembentukan sinyal transduksi melalui tiga jalur yaitu (1) ligan steroid proses difusi menuju intraseluler untuk mengikat reseptor nukleus dalam 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 mengkontrol ekspresi gen secara ketat. Secara spesifik proses dimulai dengan pengikatan molekul ligan-reseptor hingga terbentuk kompleks ligan-reseptor teraktivasi. Proses selanjutnya melibatkan aktivasi banyak protein substrat yang bertujuan saling mengaktivasi protein efektor lain (enzim) secara berantai sehingga membentuk jalur sirkuit sinyal transduksi sitoplasmik hingga memasuki nukleus.

Respon nukleus terhadap sinyal transduksi adalah aktivasi proses transkripsi sesuai dengan perintah sinyal ligan sebelumnya sehingga menimbulkan respon seluler. Interaksi ligan-reseptor ini dapat meregulasi aktivitas gen tertentu, sehingga terjadi perubahan aktivitas fisiologi suatu sel.

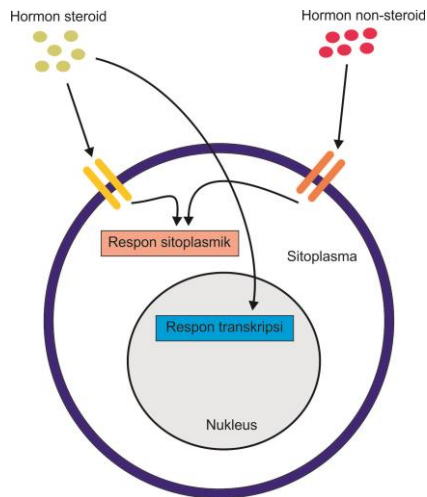
2. Respon langsung

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 56. Respon transkripsi

Daftar pustaka

1. Uings IJ, Farrow SN. Cell receptors and cell signalling. *J Clin Pathol - Mol Pathol*. 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, Zörn 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.
5. Loria-Hayon I. Signal, transduction, and the hematopoietic stem cell. *Rambam Maimonides Med J*. 2014;5(4):e0033.
6. Liu H, Chen X, Focia PJ, He X. Structural basis for stem cell factor-KIT signaling and activation of class III receptor tyrosine kinases. *EMBO J*. 2007;26(3):891–901.
7. Heasley LE, Petersen BE. Signalling in stem cells: meeting on signal transduction determining the fate of stem cells. *EMBO Rep*. 2004;5(3):241–4.
8. Mahdavi A, Davey RE, Bhola P, Yin T, Zandstra PW. Sensitivity analysis of intracellular signaling pathway kinetics predicts targets for stem cell fate control. *PLoS Comput Biol*. 2007;3(7):e130.
9. Kim AD, Stachura DL, Traver D. Cell signaling pathways involved in hematopoietic stem cell specification. *Exp Cell Res*. 2014;329(2):227–33.

BAB V

MODEL KOMUNIKASI SEL PUNCA PARAKRIN

Tujuan

Setelah membaca bagian kelima ini, diharapkan pembaca mengerti tentang konsep komunikasi seluler, model komunikasi seluler, parakrin, autokrin, endokrin dan model sinap (*gap junction*), disamping 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 adalah komunikasi 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

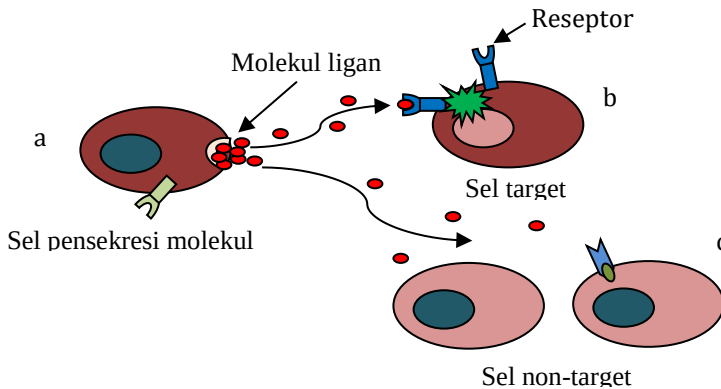
Setiap organisme harus mampu berinteraksi dalam aktivitas kehidupan dasar menuju keadaan homeostasis. Interaksi ini merupakan bentuk komunikasi molekuler antar sel, yang diperankan oleh protein sinyal aktif hasil ekspresi gen suatu sel. Komunikasi seluler terjadi melalui pelepasan molekul tertentu, tergantung pada karakteristik sel dan *niche*-nya. Molekul 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 suatu sistem harus selalu dilakukan dengan cara setiap sinyal yang memicu aktivitas 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

molekul 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



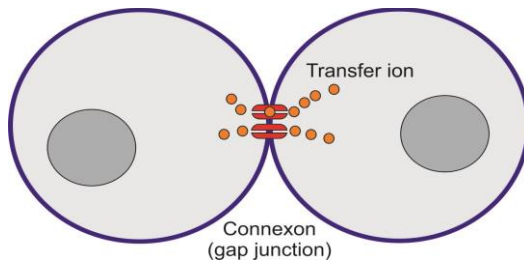
Gambar 57. Sinyal parakrin

(a). Molekul ligan yang disekresi sel menuju ke-reseptor sel target (reseptor dengan karakteristik yang 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. Komunikasi autokrin

Autokrin adalah bentuk komunikasi intraseluler yang unik, karena sebagian substansi molekul ligan telah disekresikan ke ekstraseluler namun sebagian juga dapat digunakan kembali oleh sel tersebut dengan mengikatnya pada reseptor sendiri. Hal ini menyebabkan ligan yang dihasilkan sel disamping mempengaruhi sel target (sel lain) juga akan mempengaruhi aktivitas dirinya.

Komunikasi autokrin merupakan bentuk kontrol terhadap homeostasis mikro-seluler, yang berfungsi untuk memastikan



Gambar 60. *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 terbentuknya saluran yang saling terhubung via sitoplasma antar seluler sehingga membentuk bangunan silinder dengan sebuah pori disentral dan menonjol melewati membran sel berdekatan lalu berintraksi membentuk *gap junction*. Hal ini disebabkan oleh 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 kontraksi 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 secara merata, sehingga kontraksi jantung selalu dalam terkordinasi.

2. Sel otak

Transfer sinyal dalam otak memerlukan ketepatan dan keteraturan 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. Parakrinisasi bertujuan untuk memicu aktivasi, inhibisi, diferensiasi dan atau proliferasi sel target.

8.1 Fakta dasar teori parakrin MSC

Konsep dan teori parakrin MSC secara cermat diamati dari berbagai hasil penelitian, dimana terdapat beberapa hasil penelitian yang tidak sesuai dengan konsep diferensiasi sel punca (terminologi klasik).

1. Injeksi MSC langsung pada *infark miokard*

1) Kecepatan sembuh lebih cepat dibandingkan teori regenerasi

Penelitian pada model hewan coba dengan infark jantung, melaporkan bahwa terdapat 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 cidera

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

3) MSC supresi inflamasi dan regenerasi

Penelitian lain menunjukkan bahwa terjadi efek anti-inflamasi

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 cardiomyosit 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.

Semua fakta diatas menunjukkan bahwa terdapat mekanisme lain dalam meregenerasi jaringan cedera yaitu melalui parakrinisasi dan diferensiasi. 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 $\text{TNF}\alpha$, IL-1 dan $\text{IFN}\gamma$ maka akan melepas berbagai molekul anti-inflamasi, yaitu:

1) IL-10

2) $\text{TGF-}\beta$

3) IL-1ra

4) TSG-6

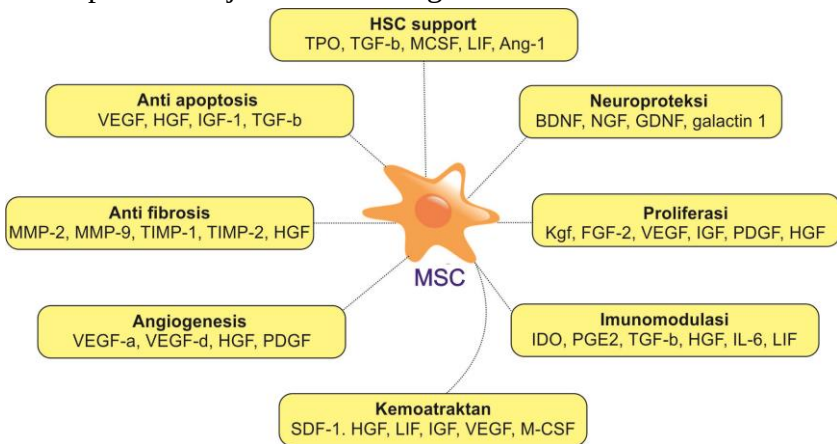
2. Molekul pro-regenerasi:

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 61. 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 aktivitas sel in-vitro
 - 1) Aktivitas *stemness*

Molekul yang dilepas MSC pada keadaan tertentu (hipoksik) dapat memicu aktivitas *stemness* sehingga turunan yang dihasilkan

HGF dimana pada tikus dengan *myocard infark* memberikan hasil yang baik. Peran HGF adalah mengaktivasi ras-ERK1/2 dan p38 MAPK sekaligus jalur PI3K/Akt. Jalur PI3K/Akt dan MAPK diaktivasi pula oleh sekresi TGF- α dan VEGF yang dirangsang oleh TGF- β . 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 α 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. 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.

BAB VI

JALUR MOLEKULER

PROLIFERASI SEL PUNCA

Tujuan

Setelah membaca bagian keenam ini, diharapkan pembaca mengerti tentang sirkuit molekuler proliferasi sel punca, jalur proliferasi sel punca, jalur sinyal transduksi PI3K/Akt, reseptor cMET, IGF-1, NF-kB, 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 tingkat membran, dilanjutkan dengan pembentukan sinyal transduksi sitoplasmik, sebagai sinyal transduksi sitoplasmik, dan akhirnya transduksi menuju nukleus, dikenal sebagai sinyal nukleus yang kemudian menimbulkan respon seluler. Secara spesifik sirkuit sinyal proliferasi terdiri atas PI3K/Akt, reseptor cMET, IGF-1, NF-kB, mTOR, jalur BMP/SMAD, LIF/STAT3, sinyal proliferasi embrionik, notch, Wnt, sonic hedgehog dan proliferasi RTK: FGF/MAPK. 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 terintegrasi dengan *soluble molecule* BMP dan LIF serta jalur diferensiasi/ 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 perbaharuan 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, Tcl1, 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.

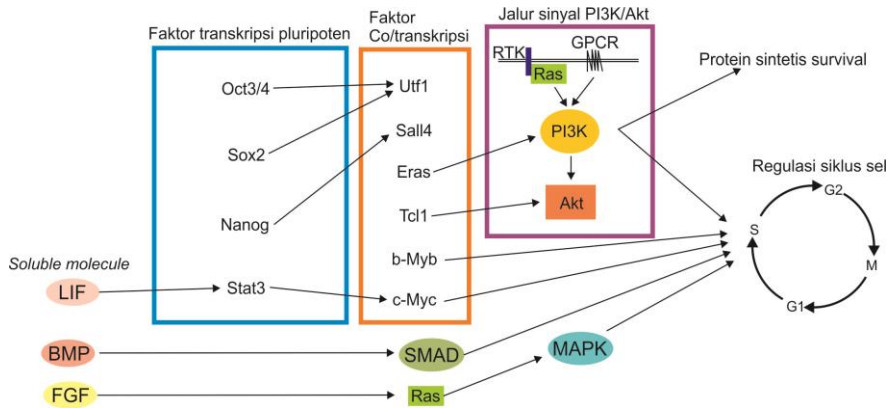
2.5 Pengertian jalur proliferasi sirkuit proliferasi

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-3phosphatasekinase* (PI3K), BMP-R/ SMAD dan LIF-R/ STAT3 dalam aktivitas selular berupa 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) berakibat pada ekspresi protein faktor transkripsi (co-transkripsi) Utf1 dan Sall4 untuk proliferasi, di samping Eras dan Tcl1 yang dapat memicu jalur diferensiasi. PI3K/Akt serta protein b-Myc dan c-Myc juga berperan penting dalam regulasi siklus sel.

Faktor co/transkripsi pluripoten tersebut dijelaskan gambar di bawah ini.



Gambar 62. Faktor co/transkripsi pluripotensi

Pelepasan faktor transkripsi pluripoten Oct3/4, Sox2 dan Nanog berakibat pada ekspresi protein (co-transkripsi) Utf1 dan Sall4 untuk proliferasi, di samping Eras dan Tcl1 yang memicu jalur sinyal PI3K/Akt serta protein b-Myb 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 sel punca pada fase G₁-S siklus sel dan 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 terinterkoneksi 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.

organogenesis, dan 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 ke arah perbaharuan diri dengan mengaktivasi jalur PI3K. Reseptor c-MET dikode gen MET (termasuk dalam kelompok RTK) yang juga dikenal sebagai *hepatocyte 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 mengaktivasi jalur PI3K. Sekali HGF mengikat reseptor c-MET maka terjadi dimerisasi dan katalisasi reseptor MET kinase, yang dapat memicu transfosforilasi tirosin Tyr 1234 dan Tyr 12345 (aktif). Kedua tirosin aktif ini merupakan situs *docking* multi-substrat intraseluler MET bagi berbagai sinyal transduser. Secara spesifik *situs docking* c-MET berinteraksi dengan banyak sinyal *transducer* intraseluler yaitu:

1. Secara langsung

Situs *docking* intraseluler MET secara langsung direkrut dan berinteraksi dengan berbagai sinyal *transducer* 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 GABA₁ sebagai koordinator respon sel. GABA₁ mengkoordinasikan situs *docking* intraseluler MET dengan berbagai

membutuhkan protein intraseluler SMAD. SMAD terbagi menjadi SMAD1, SMAD2, SMAD5, SMAD7 dan SMAD9.

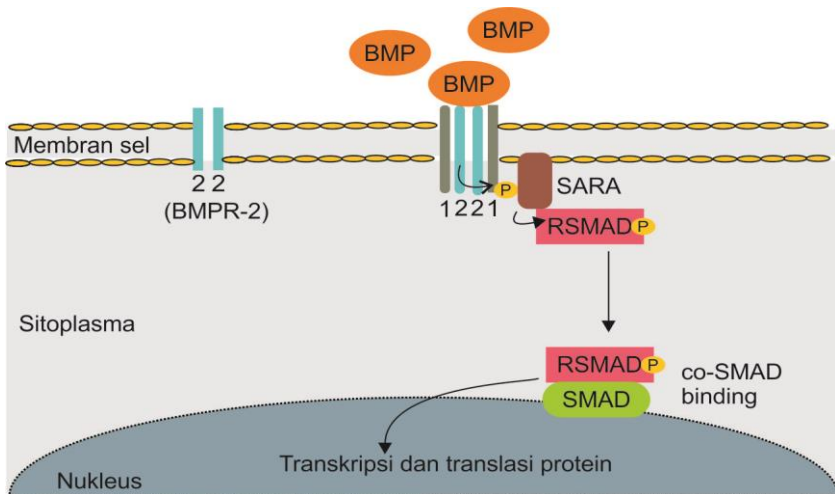
Secara sistematis super famili TGF- β terdiri atas kelompok protein ligan tertentu, yaitu:

1. BMP,
2. *Growth and differentiation* (GDF)
3. Aktivin (aktivin a, b dan ab)
4. Famili TGF- β 1,2,3

10.2 Mekanisme jalur BMP/SMAD

Mekanisme jalur BMP/ SMAD dimulai dengan terikatnya ligan BMP (super famili TGF- β) pada reseptor dimer BMPR₂ (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 memfosforilasi residu *serine* dari reseptor tipe 1 yang mengakibatkan aktivasi reseptor tipe 1..

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.

Reseptor yang terfosforilasi akan mengaktivasi 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

11. Jalur LIF/STAT3

11.1 Pengertian jalur LIF/STAT3

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

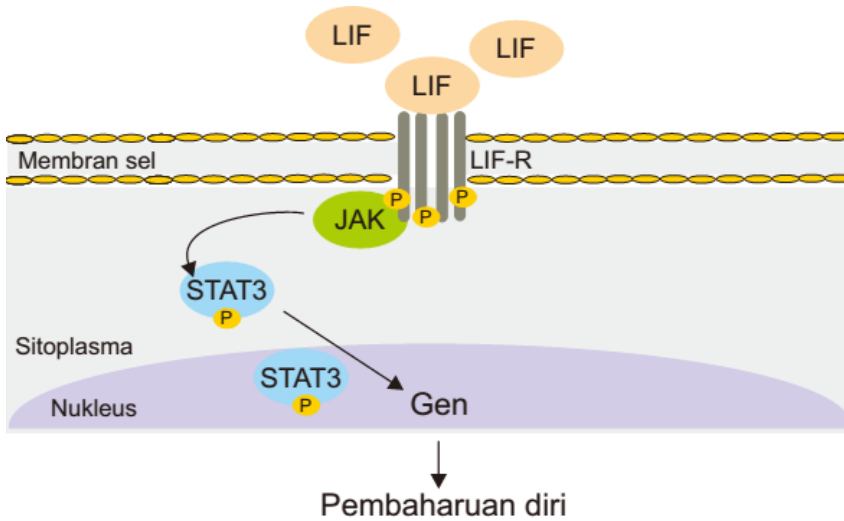
11.2 Pengertian STAT3

STAT3 adalah faktor transkripsi yang dikode gen STAT3 sebagai respon terhadap stimulus dari sitokine IL-6 atau *epidermal growth factor* (EGF). Aktivasi STAT3 diperlukan untuk pembaharuan diri sel punca embrionik, oleh karena itu LIF dibutuhkan untuk mempertahankan status non-diferensiasi sel punca. Sisi lain STAT3 juga esensial dalam 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.

Mekanisme LIF dijelaskan pada gambar 73 dibawah ini.



Gambar 73. Mekanisme jalur LIF/STAT3

LIF dapat mengikat reseptor LIFR, sehingga mengaktifasi 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. Sirkuit regulator *stemness* berupa peningkatan gen perbaharui diri dan penekanan gen diferensiasi. 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. Aktivasi jalur sinyal *notch* merupakan hasil ekuilibritas kuantitatif proses induksi dan inhibisi proses pembaharuan diri. Sebagai contoh aktivasi 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. Terdiri atas 4 reseptor *notch* yaitu *notch* 1, 2, 3 dan 4. Reseptor *notch* adalah protein transmembran *single-pass*. *Notch* dan banyak ligannya adalah protein transmembran sehingga sel yang mengekspresikan ligan *Notch* harus berdekatan dengan reseptor sel terkait.

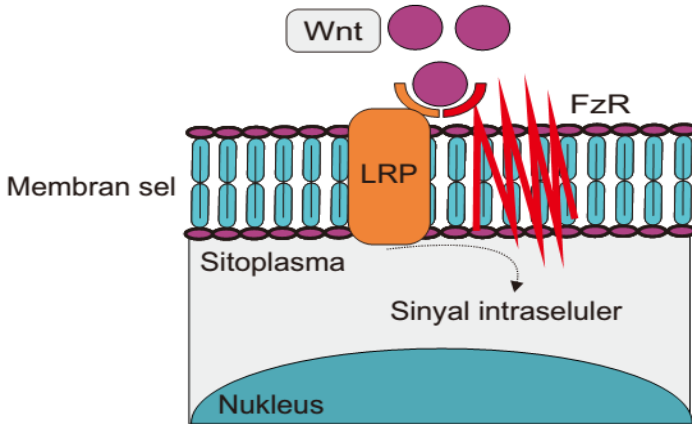
14. Jalur Wnt

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. Aktivasi 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, dikenal sebagai 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 ekstraseluler 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

Aktivasi jalur Wnt dimulai dengan pengikatan ligan protein-Wnt pada reseptor family *Frizzled* (Fz) di area domain 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 β -catenin, sehingga tanpa Wnt, maka β -catenin tidak akan terakumulasi dalam sitoplasma dan menimbulkan sinyal di nukleus. Sekalipun demikian terdapat jalur sinyal Wnt yang tidak tergantung pada β -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 mengatur sitoskeleton yang berperan dalam morfologi bentuk sel.

3. Jalur *non-canonical* Wnt / kalsium

Jalur ini mengatur kalsium dalam sel.

Perbedaan ketiga jalur Wnt tersebut adalah keterlibatannya pada protein β catenin, dimana jalur *canonical* menggunakan β -catenin secara dependen, sedangkan jalur *non-canonical* secara independen, sehingga secara praktis jalur Wnt dibagi menjadi 2 yaitu:

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

14.3 Mekanisme jalur *canonical*-Wnt

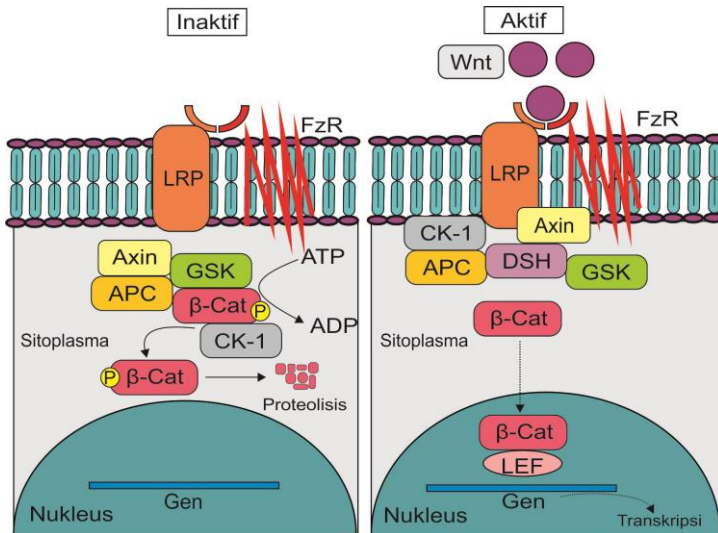
Sekali reseptor teraktivasi, sinyal dikirim ke fosfoprotein *Dishevelled* (Dsh), yang berada di sitoplasma. Sinyal ini ditransmisikan melalui interaksi langsung antara Fz dan Dsh. Domain yang berbeda ini penting karena setelah Dsh, sinyal Wnt dapat bercabang menjadi beberapa jalur dan setiap jalur berinteraksi dengan kombinasi yang berbeda dari ketiga domain tersebut. Jalur *canonical* Wnt, dikenal sebagai jalur Wnt/ β -catenin adalah jalur Wnt yang dapat menyebabkan β -catenin terakumulasi dalam sitoplasma yang kemudian translokasi menuju nukleus berperan sebagai *co-activator* transkripsional faktor transkripsi yang termasuk family TCF/ LEF.

Terdapat kompleks protein destruksi yang akan mendegradasi protein β -catenin yang memasuki sitoplasma, sehingga kompleks protein ini harus diinaktivasi terlebih dahulu. Kompleks protein destruksi mendegradasi β -catenin dengan mentarget ubiquinisasi dan akan mengirimkan pada proteosom 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 α* (CK1 α)

Aktivasi jalur Wnt dijelaskan pada gambar 75 dibawah ini.



Gambar 75. Aktivasi jalur Wnt

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

Sekali Wnt mengikat reseptor Fz dan LPR5/6 maka komplek protein destruksi menjadi inaktif (terganggu) disebabkan karena Wnt menyebabkan translokasi regulator negatif (axin) sehingga terjadi destruksi kompleks pada membran plasma. Fosforilasi protein destruksi kompleks protein selanjutnya mengikat axin pada reseptor LRP5/6 area sitoplasmik sehingga axin di defosforilasi. Dsh kemudian menjadi aktif melalui fosforilasi dan domain DIX dan PDZ menghambat aktivitas GSK3. Hal ini memungkinkan β -catenin terakumulasi dan terlokalisasi pada nukleus yang selanjutnya menginduksi respon seluler melalui transduksi gen sepanjang TCF/LEF (T-cell factor/ limfoid enhancing factor). β -catenin

kemudian merekrut *co-activator* transkripsi lain seperti BCL9, Pyopus dan Parafibromin/ hyrax.

15. Jalur *sonic hedgehog* (Hh)

Jalur *hedgehog* (Hh) berperan penting dalam proses embriogenesis. Bagian berbeda dari embrio memiliki konsentrasi protein sinyal Hh yang berbeda. Jalur Hh juga berperan dalam 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 baik.

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 secara 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 paska 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*). Sekalipun demikian fungsi protein asesoris ini masih tumpang tindih.

Secara spesifik pengikatan Hh ke Ptch1 akan mengurangi kemampuan merepresi Ptch1 pada *Smoothened* (Smo), yaitu protein 7-pass trans membran kemudian memicu serial kaskade sinyal *downstream* dari Smo. Aktivasi *sonic hedgehog* mampu mempromosikan proses pembaharuan diri HSC, MSC, NSC dan sel punca epidermal, melalui mekanisme BMP-4 dependen. Rute sinyal TGF- β / BMP melalui SMAD merupakan penghambatan paling poten 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. Model sirkuit Boolean random adalah cara permodelan sirkuit yang terdiri dari beberapa faktor yang memiliki banyak input dalam sistem kompleks.

16. Jalur proliferasi RTK: FGF/MAPK

16.2 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.

16.3 Jalur sinyal RTK

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

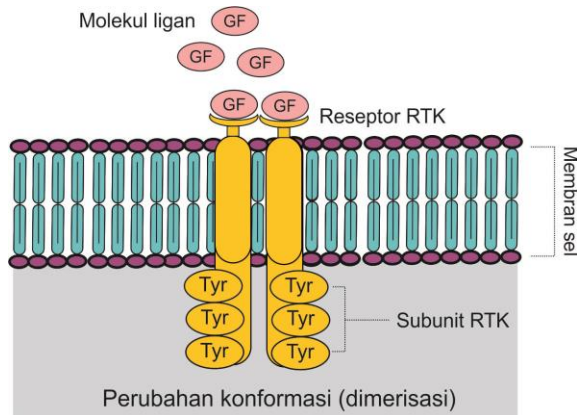
1. Tingkat membran
2. Tingkat sitoplasma
3. Tingkat nukleus

16.4 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 proses :

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 76 dibawah.



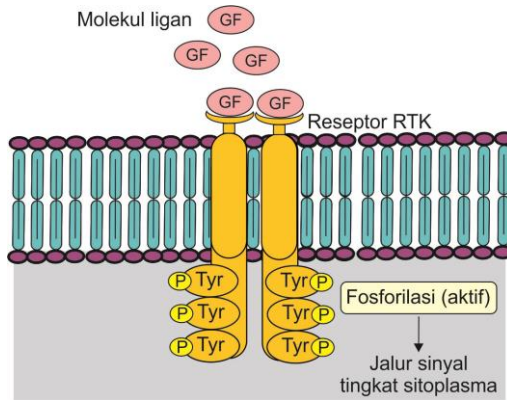
Gambar 76. Terikatnya GF pada reseptor RTK

2. Dimerisasi RTK

Dimerisasi reseptor merupakan proses aktivasi reseptor RTK paska terikat ligan, yaitu berupa autofosforilasi atau transfosforilasi pada kedua reseptor domain spesifik tirosin kinase residu (*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 77.

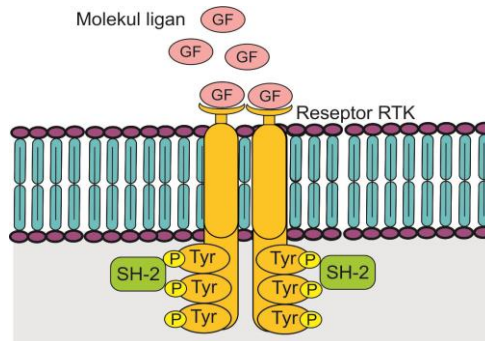


Gambar 77. Dimerisasi RTK

16.5 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 teraktivasi). Pengikatan fosfotirosin pada SH2 dijelaskan pada gambar di bawah ini.



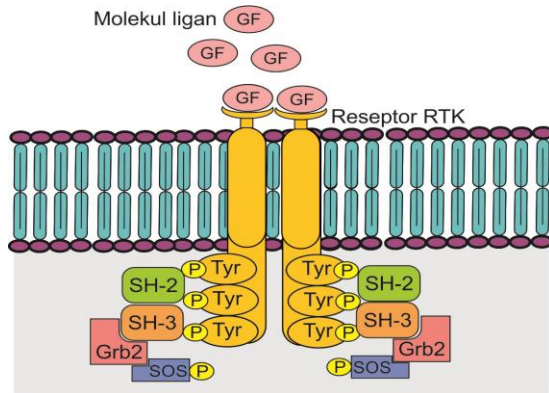
Gambar 78. Pengikatan SH-2 pada fosfotirosin

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 kompleks protein 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 teraktivasi seperti dijelaskan gambar dibawah ini.

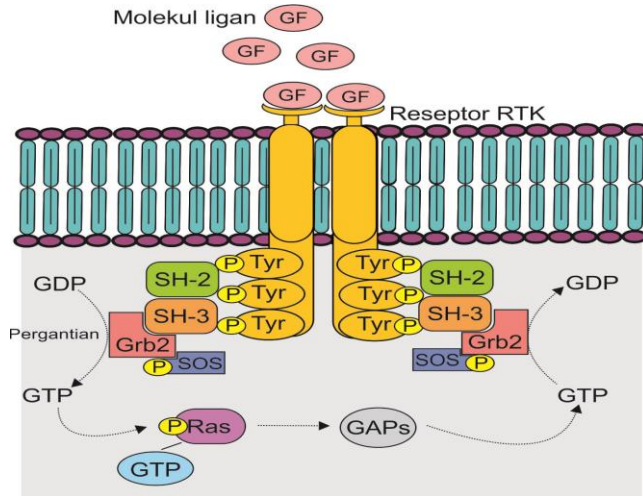


Gambar 79. Ikatan SOS-Gbr2-SH3

4. Aktivasi protein Ras

Komplek protein SOS-Grb-2 yang teraktivasi menyebabkan posisi GDP diganti dengan GTP pada protein G (Ras). Hal ini mengakibatkan Ras terfosforilasi dan menjadi aktif. Sisi lain Ras teraktivasi juga dapat mengaktivasi *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).

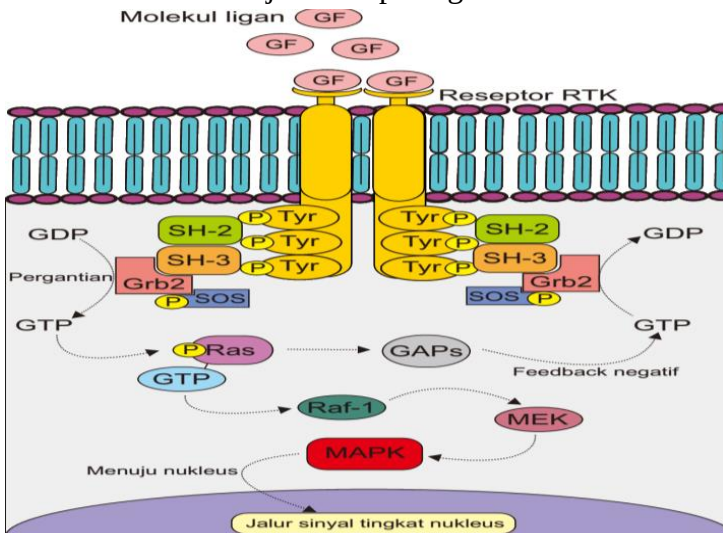
Aktivasi protein Ras dijelaskan pada gambar di bawah ini.



Gambar 80. Aktivasi protein Ras

5. Aktivasi Raf-1 dan kompleks MAPK

Ras teraktivasi secara kaskade akan mengaktivasi protein Raf-1. Yang kemudian secara kaskade akan mengaktivasi protein MEK sehingga membentuk kompleks MAPK yang mampu memasuki nukleus. Aktivasi MAPK dijelaskan pada gambar dibawah ini.



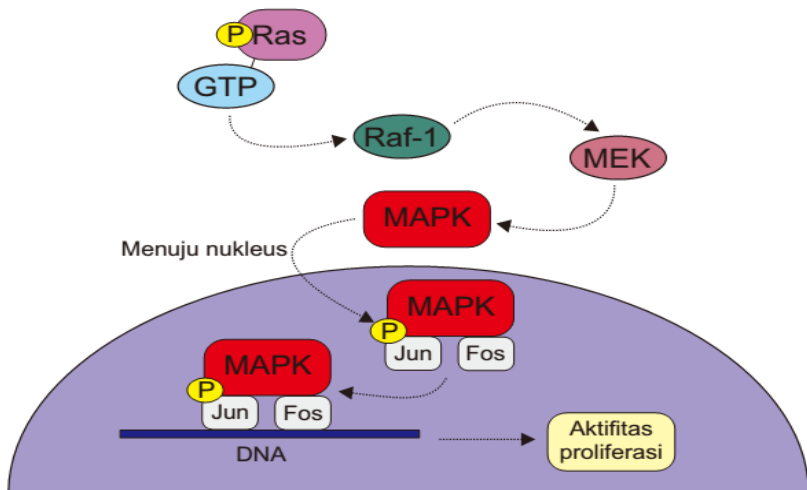
Gambar 81. Aktivasi MAPK

16.6 Mekanisme jalur sinyal RTK tingkat nukleus

1. Aktivasi faktor transkripsi jun-fos

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

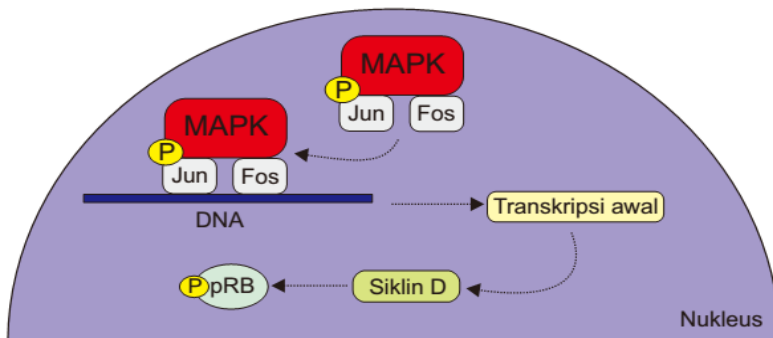
Aktivasi faktor transkripsi jun-fos dijelaskan pada gambar dibawah ini.



Gambar 82. Aktivasi 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.



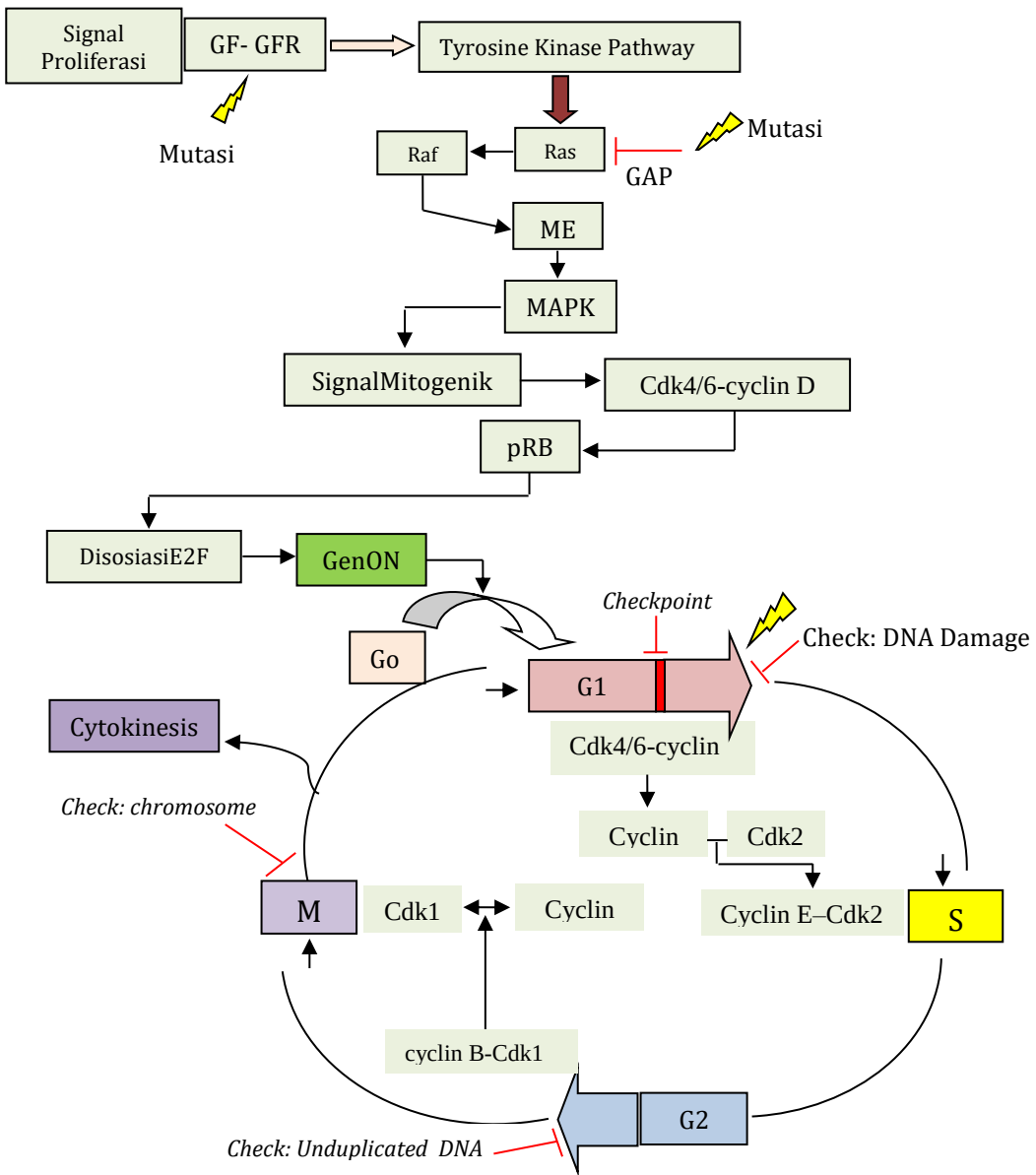
Gambar 83. Fosforilasi pRB

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 substrat 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. Dengan demikian jalur protein integrin juga menjadi komunikasi.

18. 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

receptor 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).

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.

BAB VII

SIKLUS SEL PUNCA

Tujuan

Setelah membaca bab ke tujuh ini, diharapkan pembaca mengerti tentang siklus sel punca, meliputi siklus sel, Cdk, Siklin, fase G_1 , pRB, Fase S, fase G_2 , 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 G₁ awal yang ditandai dengan sintesis protein siklin D berupa perlekatan protein p21/p27 dengan Cdk4 sehingga membentuk kompleks sinyal Cdk4-siklin D-p21/p27. kompleks sinyal tersebut dilakukan checkpoint di fase G₁ akhir sebagai molecular 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 DNA. Secara spesifik tahapan interfase dibagi menjadi fase G₁, S dan G₂. Fase G₁ terbagi atas G₁ awal, G₁ tengah dan G₁ akhir. Fase G₁ awal merupakan inisiator awal bagi sinyal transduksi MAPK-ERK dalam memulai siklus sel terutama dengan mensintesis siklin D (akselerator utama perpindahan fase G ke S). Fase G₁ akhir merupakan hal krusial 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 G₂.

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

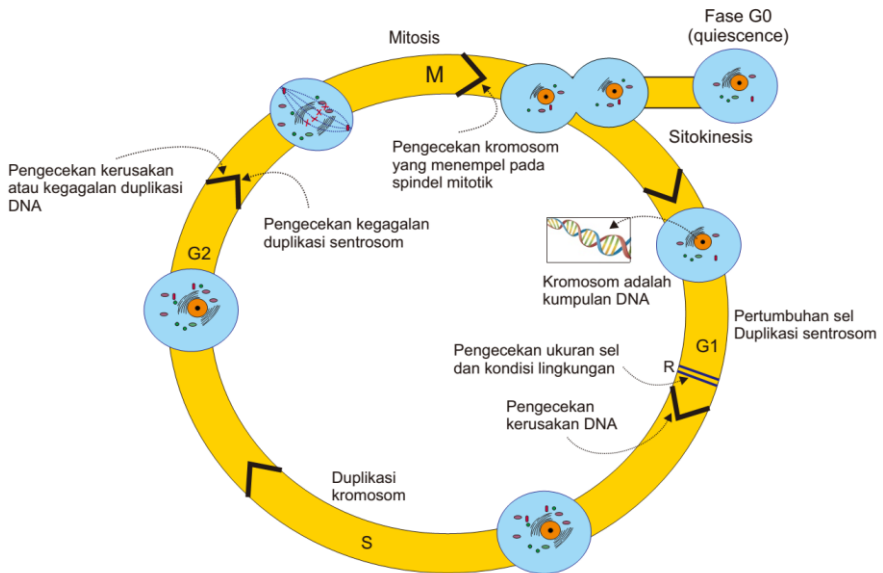
nucleotide ditingkatkan untuk menyiapkan ketersediaan NTP dalam membantu *replication fork* yang terhenti.

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 untuk promosi masuk fase mitosis.

3. Checkpoint fase S

Jalur ini untuk mendeteksi *double strand break* (DSB) yaitu deteksi kerusakan untai 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 inhibitor dari CDK).



Gambar 92. Checkpoint

8. Fase G₂ : Cdk-1 Siklin B

8.1 Pengertian G₂

Fase G₂ adalah suatu tahapan dari siklus sel dimana terjadi pertumbuhan cepat sel disamping sintesis protein untuk preparasi memasuki fase selanjutnya (mitosis). Beberapa tipe sel dan kanker justru tidak memerlukan fase G₂ ini karena proses berjalan secara langsung dari replikasi DNA menuju mitosis tanpa melewati fase G₂. Fase G₂ dimulai ketika terdapat siklin B yang mengikat Cdk-1 sehingga menjadi siklin B-Cdk1 yang mempromosikan fase G₂ masuk kedalam fase M.

8.2 Deteksi kerusakan DNA G₂/M

Checkpoint kerusakan DNA G₂/M merupakan pemeriksaan sinyal sel pada G₂ sebelum memasuki mitosis sebagai respon atas stress genotoksik (radiasi UV, oksidative stress dan agen interkalasi DNA) baik melalui pola p53-dependen maupun p53-independen. Secara spesifik sinyal DNA *damage* menyebabkan aktivasi faktor transkripsi p53. Cdk-1 secara langsung dihambat oleh 3 target transkripsi p53 yaitu p21, Gadd45 dan 14-3-3 α . Sekali siklin B1-Cdk1 terisolasi dalam nuklues oleh p21 maka menjadi inaktif, sebaliknya ketika terisolasi dalam sitoplasma oleh 14-3-3 α 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 yang 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 sebelumnya tampak sebagai kromosom yang mengalami kondensasi berupa untaian panjang DNA secara bertahap mengerut dan menebal. Terbentuk *spindle mitotic* (struktur sitoskeletal). Struktur ini tersusun atas mikrotubul yang melekat pada kromosom, sehingga secara fisik memudahkan menarik hingga memisahkannya ke dalam sel turunan.

9.2 Tahapan mitosis

Secara sistematis tahapan mitosis dibagi menjadi 5 tahap yang secara berurutan yaitu:

1. Profase

Kromosom yang telah bereplikasi sebelumnya, kemudian mengalami kondensasi dan *spindle mitotic* mulai dirakit di luar 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*.

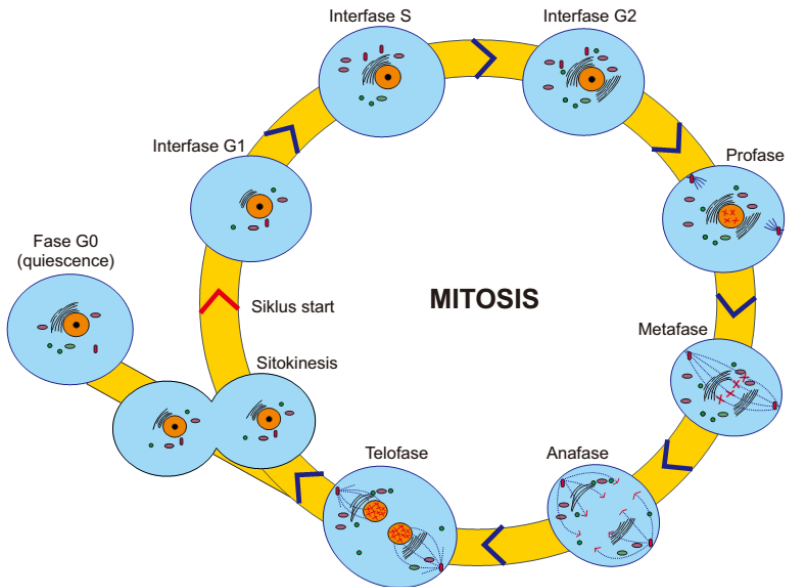
4. Anafase

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 dekontensasi 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, ditandai dengan kondensasi kromosom dilanjut dengan prometafase berupa menyatunya membran nukleus. 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, 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 dan pengkerutan membran sel pada setiap sel turunan. Hal ini disebabkan karena adanya cincin kontraksi (struktur sitoskeleton) yang menegang searah pengkerutan sesuai

tarikan *spindle mitotic* (menarik kromosom) ke sisi berlawanan sel. Tarikan kontraksi secara terus menerus semakin mengencang hingga menjepit sel menjadi dua bagian sel, sehingga terbentuk dua sel turunan yang identik dan dimana setiap sel turunan mengandung satu nukleus. Cincin secara spesifik tersusun atas tipe molekul filament yaitu filament aktin dan miosin yang saling memendek untuk menghasilkan kekuatan pengencangan. Kekuatan yang dihasilkan cukup untuk membengkokkan jarum halus yang diinsersi dalam sel. Struktur secara bertahap semakin mengecil ketika proses sitokinesis berlanjut dengan terbelah lengkap 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 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 sinyal proliferasi dan sinyal inhibisi secara simultan dan terus-menerus dilakukan dalam rangka menjaga homeostasis subseluler. Hal ini untuk menentukan apakah sinyal 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

11.2 Kontrol sinyal intrinsik-ekstrinsik

Kontrol sinyal proliferasi merupakan upaya seluler untuk memastikan bahwa sinyal mitogenik yang memasuki tahapan siklus sel dalam nukleus masih dalam 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, reparasi 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, sehingga hampir seluruh penyakit keganasan dimulai dari kondisi instabilitas genomik karena berpotensi untuk 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 defisiensi terhadap asam amino, serum atau fosfat. Keadaan ini menyebabkan pertumbuhan sel terhenti pada fase G_1 siklus sel, namun ketika defisiensi tersebut diperbaiki, maka sel kultur tersebut melanjutkan kembali memasuki fase S. Hal membuktikan bahwa terdapat area *checkpoint* (pengecekan) pada fase G_1 siklus sel.

12.2 *Checkpoint* setiap fase siklus sel

Sinyal intrinsik mitogenik yang datang memasuki siklus sel akan melewati serangkaian *checkpoint* (posisi pengecekan) tiap fase siklus sel. Tingkat akurasi *checkpoint* sangatlah presisi, baik dalam hal pelepasan sinyal *growth-promoting* untuk melanjutkan ke-siklus sel berikutnya, maupun dalam perintah inhibisi sinyal. Pemantauan sinyal

mitogenik tergantung pada setiap fase dalam siklus sel. Monitor di fase S dilakukan terhadap sekuen DNA namun ketika pada fase M dilakukan terhadap kesesuaian ukuran sel. Secara spesifik *checkpoint* setiap fase dibagi menjadi:

1. *Checkpoint* fase G_0 - G_1 : memastikan kelayakan sinyal

Area *checkpoint* akan memastikan bahwa sinyal yang masuk dan diterima tersebut adalah *compatible* dengan struktur protein sinyal sehingga bisa diteruskan ke fase siklus sel selanjutnya. Secara spesifik sel dalam fase G_0 yang kemudian mendapatkan sinyal proliferasi cukup untuk dapat melewati fase G_1 , maka sebelum memasuki fase S, sel tersebut harus membuat keputusan terutama di G_1 akhir. Titik dimana sel tersebut membuat keputusan di akhir fase G_1 dikenal sebagai *restriction point*

2. *Checkpoint* fase G_2 : deteksi kerusakan DNA

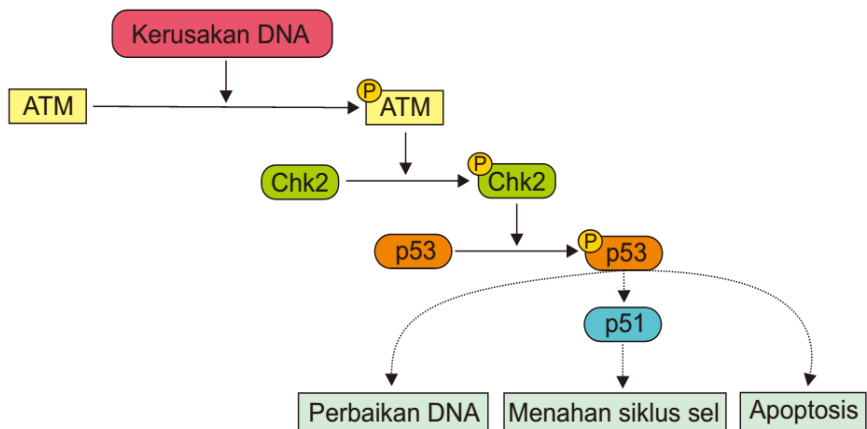
Area *Check point* G_2 akhir berfungsi dalam mendeteksi setiap kerusakan DNA sub seluler yang terjadi atau terhadap duplikasi DNA. Fungsi deteksi ini sangat penting dalam menjaga integritas dan stabilitas genomik. Setiap area DNA yang terdeteksi kerusakan akan diikuti dengan langkah penahanan kelanjutan 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 disajikan 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 aktivitas kontrol sinyal mitogenik ekstrinsik dilakukan dengan cara:

1. Peningkatan ekspresi TGF- β

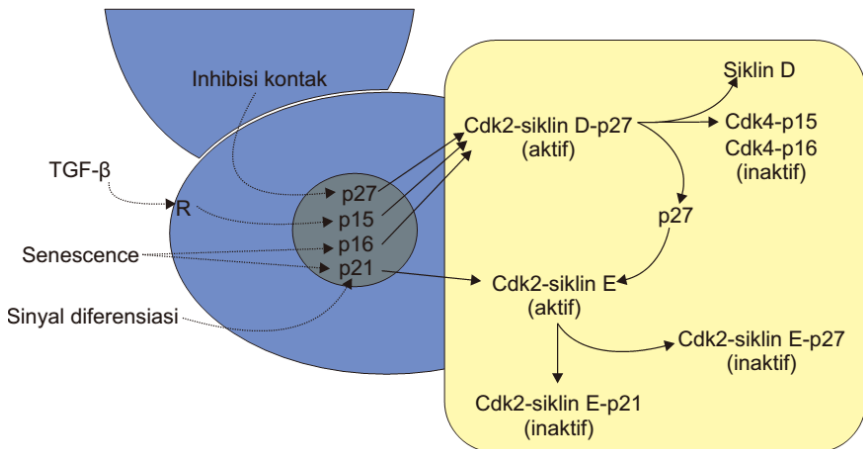
TGF- β (*Transforming growth factor- β*) adalah protein yang berperan sentral dalam diferensiasi dan morfogenesis. Secara spesifik TGF- β yang berikatan dengan reseptor serin/ threonin kinase,

menyebabkan induksi ekspresi protein p15 (*Cdk-inhibiting/ InK4b*). Aktivasi 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 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 sinyal eksternal dijelaskan dalam gambar dibawah ini.



Gambar 95. Kontrol eksternal *signalling*

4. Pentingnya marker 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 yang sedikit berbeda. 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 melaporkan bahwa didapatkan berbagai MSC asal sumber jaringan lain. sekalipun demikian tidak ditemukan karakteristik MSC secara pasti pada populasi tersebut. Sisi lain perkembangan molekuler memungkinkan untuk memunculkan definisi terkini terkait karakteristik molekul MSC. Berbagai fakta terkini terkait 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 perbahaaruan diri dan diferensiasi.
3. Perbedaan karakteristik dalam tiap populasi 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 ditemukan berdiferensiasi menjadi :

1. Turunan ektodermal seperti: neuron, keratosit dan keratinosit.
2. Turunan endodermal seperti: hepatosit dan sel β 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. Sel sekretom (konsep parakrin)
2. Sel pretotom
3. 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 dan atau mendorong proses diferensiasi 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 mereparasi dan meregenerasi jaringan. Secara teoritis berbagai jaringan tertentu memiliki kemampuan untuk meregenerasi diri pasca terjadi cedera seperti hati, otot, tulang dan tulang rawan. Regenerasi ini melibatkan aktivitas 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.

6.2 MSC sebagai konsep transdiferensiasi

Konsep transdiferensiasi sel progenitor hematopoietik menjadi sel kardiak sebagai fenomena dalam *cell fusion* dan konsep *reprogramming* MSC yang dapat terjadi dua arah turunan seperti dibahas dalam bab 2 sebelumnya.

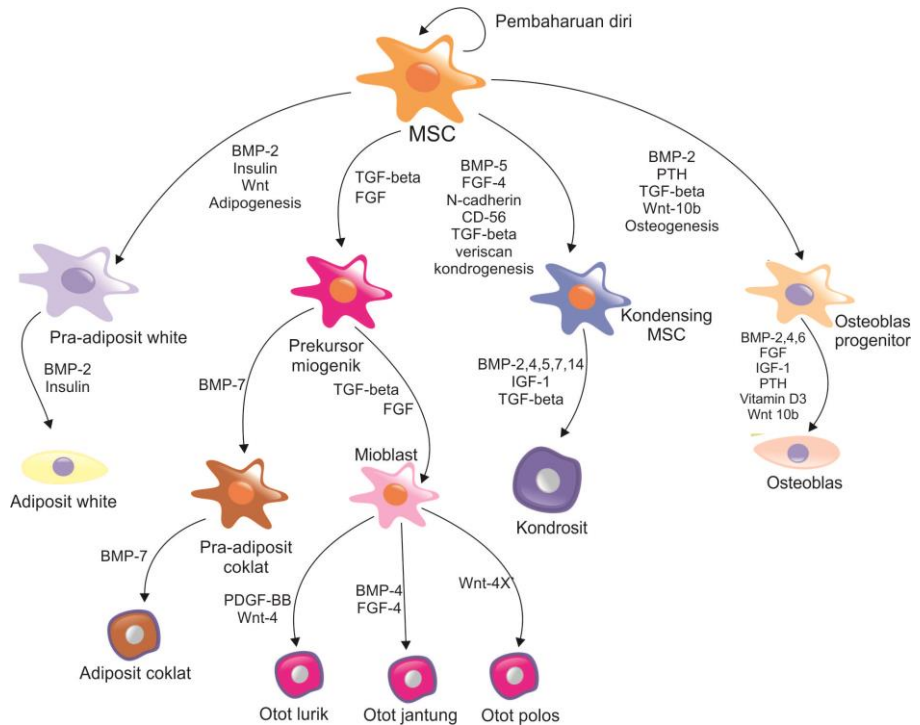
6.3 MSC sebagai sel parakrin : *small molecule GF*

Karakteristik "*paracrine effect*", adalah sel yang dipersepsikan 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

Proses deferensiasi MSC menjadi berbagai sel spesifik, melibatkan berbagai molekul tertentu seperti pada gambar. Secara spesifik molekul ini berfungsi sebagai ligan yang dapat mengikat pada reseptor MSC tertentu sehingga terjadi proses diferensiasi.

8. Konsep evolusi MSC: *small molecule* GF

Berbagai laporan penelitian terkini melaporkan bahwa keberadaan *small molecule* yang diinduksi MSC pada kondisi tertentu

2. Waktu paruh kehidupan MSC yang singkat

Berbagai hasil penelitian melaporkan bahwa waktu paruh kehidupan MSC ketika berintegrasi dalam jaringan cedera paska transplantasi adalah singkat, sehingga kemungkinan MSC melakukan fungsi regenerasi tidak optimal. Berbagai faktor internal yang terjadi dalam 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* (tidak menimbulkan oklusi vaskuler). Sekalipun demikian, MSC yang terjebak tersebut tetap melepas berbagai molekul anti-inflamasi, disamping pro-regenerasi. Hal ini memunculkan spekulasi 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- α dapat melepas berbagai molekul anti-inflamasi, seperti penulis telah bahas dalam bab sebelumnya.

2. Induksi MSC dengan teknik hipoksia

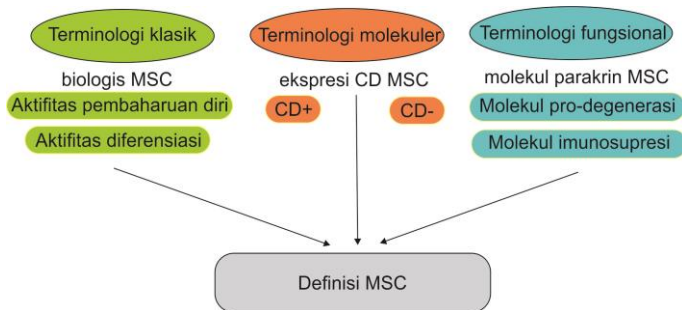
MSC yang diinkubasi dalam keadaan hipoksia akan melepas berbagai molekul pro-regenerasi. Hal ini memunculkan teori *hypoxic-preactivated-MSC-induced-soluble molecule* yaitu berbagai molekul terlarut dalam medium dilepas MSC yang mengalami hipoksia.

9. Konsep MSC terkini

Terminologi MSC yang didasarkan atas kemampuan dalam pembaharuan diri dan diferensiasi dirasakan belum dapat membedakan antara MSC dengan sel yang membelah lainnya, sekalipun definisi ini lebih praktis dan banyak digunakan. Kriteria tambahan yang ketat untuk memperkuat definisi MSC diperlukan, yaitu ekspresi marker spesifik pada permukaan membran MSC. Hal lain yang penting adalah kontribusi substansial MSC dalam meregenerasi jaringan yang melahirkan konsep evolusi MSC sebagai *soluble molecule* GF-MSC.

Berdasarkan hal tersebut, maka penulis mengusulkan definisi MSC berdasarkan atas :

1. Terminologi klasik MSC
2. Terminologi molekuler MSC
3. Terminologi fungsional MSC



Gambar 102. Terminologi MSC

9.1 Terminologi klasik MSC

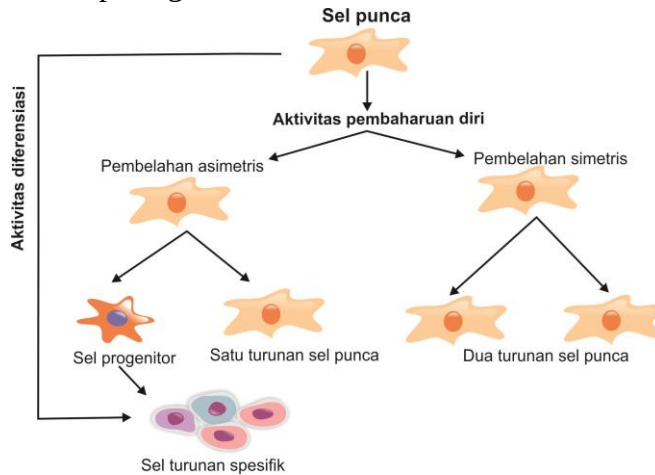
Terminologi klasik MSC merupakan definisi minimal MSC yang didasarkan atas gambaran morfologi MSC terhadap :

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 di bawah ini.



Gambar 103. 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 dan 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 :

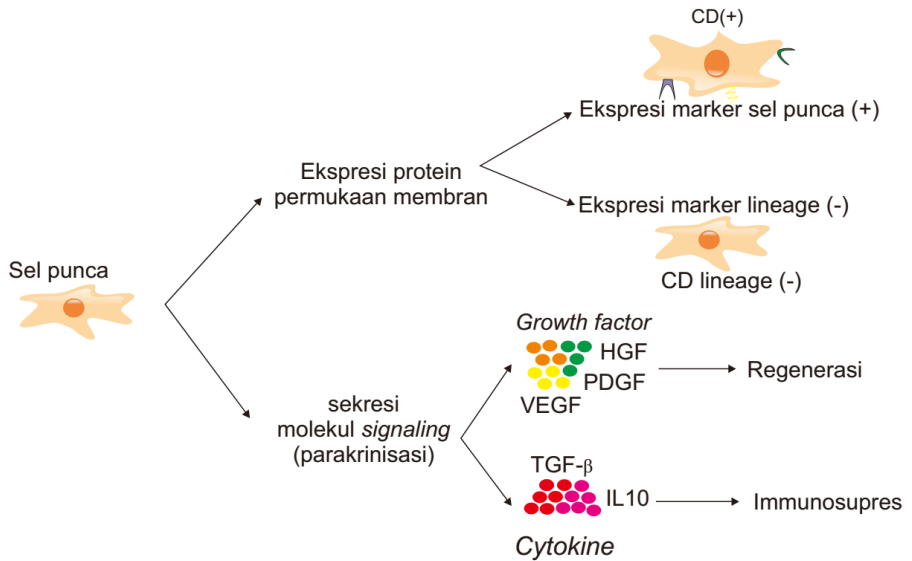
- 1) VEGF
- 2) PDGF
- 3) IGF
- 4) FGF-2
- 5) Ang-1

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 di bawah ini.



Gambar 104. 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, PGE₂, 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* diduga masih memiliki karakter pluripoten, sehingga kemampuan diferensiasi lebih kuat dibandingkan MSC asal jaringan stromal lain.

11. MSC dalam regenerasi dan restorasi

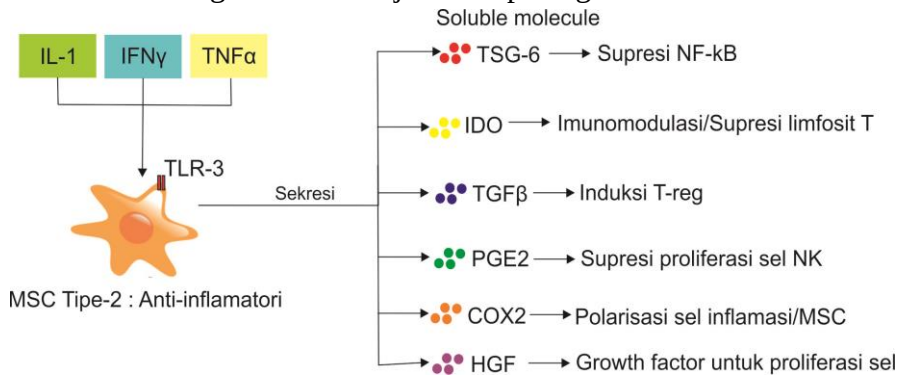
Kemampuan berdiferensiasi menjadi berbagai sel jaringan membuat MSC menarik secara klinik. Berbagai jurnal penelitian melaporkan MSC terlibat kuat dalam restorasi dan regenerasi berbagai kerusakan dan atau degenerasi jaringan, diantaranya adalah:

1. Neurodegeneratif:
 - a. Penyakit stroke
 - b. Parkinson,
 - c. Alzheimer
 - d. Huntington
2. Lesi kardiovaskuler:
 - a. Miokard infark
 - b. Periperal vaskuler iskemia
3. Disfungsi dan disuffisiensi hormonal
 - a. Diabetes melitus
4. Imun sistem:
 - a. Autoimmune
5. Muskuloskeletal
 - a. Fraktur
 - b. Osteoporosis
 - c. Osteoarthritis
6. Luka kulit kronis, ulkus kornea mata.

12. Imunoregulasi MSC

Kemampuan MSC dalam menghindarkan diri terhadap deteksi sistem imunitas tubuh pada awalnya cukup membingungkan diantara para ilmuwan imunologis. Regulasi imunologis yang 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 di bawah ini.



Gambar 105. 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 halnya sel dendritik. Keberadaan sel dendritik menjadi sentral karena mampu mengenali dini terhadap peptida dari jaringan allogenik untuk dipresentasikan pada sel T *naive* melalui MHC.

Setiap benda asing yang masuk tubuh maka semua akan mengalami proses yang sama yaitu proses alloreaksi, kecuali pada *fetal allograft*. Jaringan fetal ini mampu menghindari reaksi 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 reaksi 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 menghambat 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) pasca terpapar sitokin $\text{TNF}\alpha$ dan $\text{IFN}\gamma$ dalam jumlah besar. Inflamasi menyebabkan sel T

limfosit teraktivasi, menghasilkan sitokin pro-inflamatori, sehingga mendorong 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- β 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- γ menurun, sehingga menyebabkan peningkatan produksi IL-4 oleh sel TH2 (anti-inflamasi). Pergeseran status pro-inflamasi (yang dimotori IFN- γ) 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 aktivitas 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 dalam 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 mengeminilasi 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 dieskpresikan sel target. MSC tidak mengekspresikan MHC kelas I, sehingga MHC tidak dikenali sebagai program lisis dari sel NK, baik MSC yang berasal dari 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) Protaglandin 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 group 2, 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 dan atau *soluble molecule* yang dilepas sel radang aktif, terutama sel neutrofil, makrofag dan 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- α

TNF- α 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- γ

IFN γ 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 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/ MSC 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, PGE₂, TGFβ dan TSG-6, 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- α Serial Doses dalam Peningkatan VEGF dan PDGFMesenchymal Stem Cells. 2018. MKB. 50(2):67–73.
6. Robey P. "Mesenchymal stem cells": fact or fiction, and implications in their therapeutic use. *F1000Res*. 2017;6:F1000 Faculty Rev-524.
7. 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.
8. Spees JL, Lee RH, Gregory CA. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7(1):125. Published 2016 Aug 31. doi:10.1186/s13287-016-0363-7
9. Putra A, Ridwan FB, Putridewi AI, et al. The Role of TNF- α induced MSCs on Suppressive Inflammation by Increasing TGF- β and IL-10. *Open Access Maced J Med Sci*. 2018;6(10):1779-1783.
10. Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name!. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(6):1445-1451.
11. Choi YS, Park YB, Ha CW, et al. Different characteristics of mesenchymal stem cells isolated from different layers of full term

- placenta. PLoS One. 2017;12(2):e0172642. Published 2017 Feb 22. doi:10.1371/journal.pone.0172642
12. Murray IR, Péault B. Q&A: Mesenchymal stem cells - where do they come from and is it important?. BMC Biol. 2015;13:99. Published 2015 Nov 23. doi:10.1186/s12915-015-0212-7
 13. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. Cell Stem Cell. 2008;2(4):313-9.
 14. Ikebe C, Suzuki K. Mesenchymal stem cells for regenerative therapy: optimization of cell preparation protocols. Biomed Res Int. 2014;2014:951512.
 15. Ma T. Mesenchymal stem cells: From bench to bedside. World J Stem Cells. 2010;2(2):13-7.
 16. Rastegar F, Shenaq D, Huang J, et al. Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications. World J Stem Cells. 2010;2(4):67-80.

BAB IX

HEMATOPOIETIK STEM CELL

Tujuan

Setelah membaca bagian sembilan 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.

menganalisis lebih lanjut keberadaan HSC dan turunan secara in-situ, baik dalam menganalisis fisiologi hematopoiesis maupun rekonstitusi sistem hematopoiesik.

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*

HSC adalah sel punca dewasa yang berasal dari sistem hematopoietik (sumsum tulang) yang mengekspresikan CD34⁺, CD133⁺, Thy1⁺ dan tidak mengekspresikan CD38⁻, CD33⁻. HSC mampu berdiferensiasi secara aktif 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 tertentu 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-. Penggunaan *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.

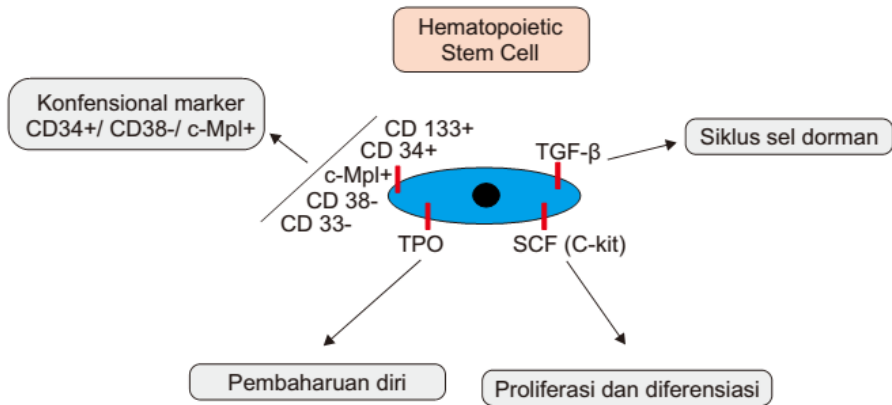
2. CD133+

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 kompleksitas molekuler HSC dijelaskan pada gambar di bawah ini.



Gambar 107. Marker kompleksitas molekuler HSC
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 aktivitas *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. 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

Gambar 108. Hierarki HSC

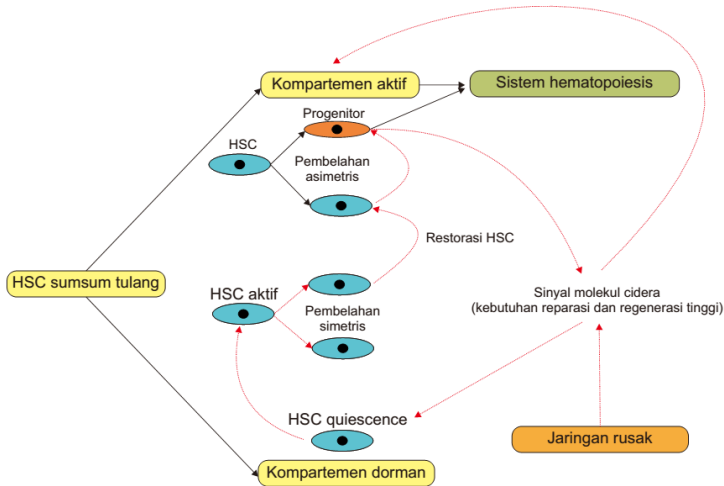
LT-HSC	: long term-hemopoietic stem cell,
ST-HSC	: short-term hematopoietic stem cell
MPP	: <i>multipotential progenitor</i>
CLP	: <i>common lymphoid progenitor</i>
CMP	: <i>common myeloid progenitor</i>
CFU-GEMM	: <i>colony-forming unit-granulocyte/ erythrocyte/ macrophage/ megakaryocyte</i>
BFU-E	: <i>burst-forming unit-erythroid</i>
CFU-E	: <i>colony-forming unit-erythroid</i>
CFU-Mk	: <i>colony-forming unit-megakaryocyte</i>
CFU-GM	: <i>colony-forming unit-granulocyte/Macrophage</i>
CFU-G	: <i>colony-forming unit-granulocyte</i>
CFU-M	: <i>colony-forming unit-macrophage</i>

5. Fisiologis dinamis hematopoiesis.

Aktivitas HSC in-vivo dapat dikarakterisasi 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 G_0 atau status *quiescence*. Status G_0 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 G_1 secara ireversibel yang dikenal sebagai *senescence*.

Peranan sel punca, termasuk HSC didukung pada analisis jaringan dengan tingkat pergantian sel yang 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 pada proses hematopoiesis menuju keadaan stabil, sedangkan kompartemen dorman 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, namun juga dapat melakukan 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 cedera memicu HSC *quiescence* kompartemen dorman menjadi aktif membelah secara simetris untuk merestorasi HSC. Sisi lain kompartemen aktif yang (yang sudah terlebih dahulu aktif) akan membelah secara asimetris untuk memenuhi kebutuhan regenerasi jaringan yang rusak, disamping tetap mempertahankan sistem hematopoiesis.

6. Ontogeni HSC

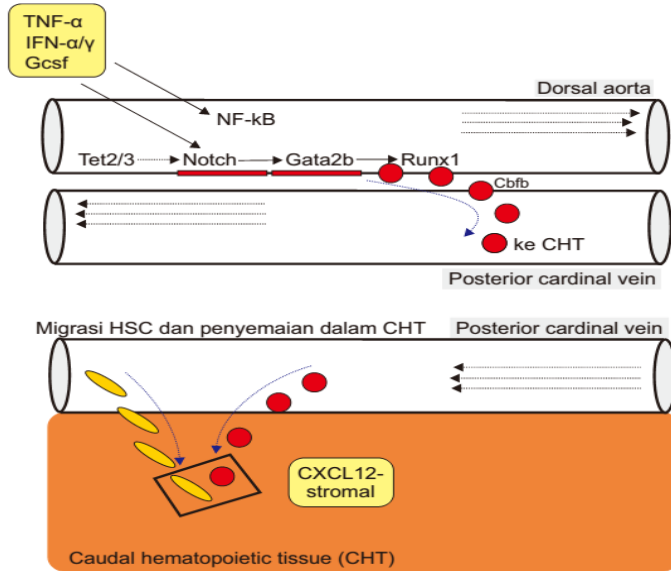
Kemunculan dan spesifikasi HSC memerlukan integrasi faktor intrinsik dan jalur sinyal transduksi yang berbeda, mulai awal prekursor mesoderm hingga terbentuk HSC pada sumsum tulang. Beberapa jalur regulasi terhadap kemunculan HSC telah diidentifikasi melalui hewan coba, yaitu jalur *vascular endothelial 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 plate mesoderm* (PLM) yang bermigrasi menuju regio media embrio untuk menghasilkan *vascular cord*, yang akan menjadi bagian dorsal 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 perberkembangan selanjutnya.

Proses dimulai dengan pelepasan molekul sinyal pro-inflamasi TNF- α dan IFN- α/γ oleh sel efektor *myeloid* yang dapat mendorong kemunculan HSC via jalur sinyal NF- κ 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- β 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.

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.

Pembentukan molekuler HSC dijelaskan pada gambar dibawah ini.



Gambar 110. Pembentukan molekuler HSC

Proses pembentukan HSC dimulai dengan pelepasan TNF-α dan IFN-α/γ mengaktifkan jalur sinyal NF-κB dan *Notch*. Bersama dengan protein Tet 2/3 memicu ekspresi Gata2-b dan runx1 sel endotelial hemogenik dan bersama molekul Cbf-β 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.

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.

7.3 Karakterisasi HSC (sel progenitor)

Berbagai pemeriksaan telah dikembangkan dalam menentukan karakteristik HSC/ progenitor baik. Secara sistematis dibagi menjadi 2, yaitu:

1. Penentuan HSC berdasarkan atas aktivitas HSC dalam populasi.

1) *In vitro* assay, terdiri atas:

1. *Long-Term Culture- Initializing Cell* (LTC-IC) assay
2. Cobble-stone Area Forming Cell (CAFC)

2) *In vivo* assay, terdiri atas:

1. *Short-term assay* atau Till and McCulloch' s classical CFU-S assay
2. *Reconstitution assay*

2. Penentuan HSC berdasarkan marker.

1. *Long-Term Culture- Initializing Cell* (LTC-IC) assay:

Pemeriksaan LTC-IC didasarkan atas kemampuan HSC untuk menginisiasi dan mempertahankan sel progenitor dengan potensi klonogenik (HSC membagikan properti fenotipe dan fungsi pada turunan), namun bukan sel progenitor *committed/* yang lebih matur) setidaknya selama 5 minggu periode kultur pada kondisi kultur tertentu. Hal ini memungkinkan untuk deteksi dan kwantifikasi colony-forming unit (CFU) sebagai turunan LTC-I secara *in vitro*.

2. *Cobble-stone Area Forming Cell* (CAFC)

Pemeriksaan CAFC didasarkan atas kemampuan HSC untuk mempertahankan cara pertumbuhan yang spesifik dan dapat dideteksi dengan mudah di bawah kondisi sel stromal selama 5-7 minggu setelah penyemaian.

3. *Short-term assay* atau Till and McCulloch' s classical CFU-S assay

Pemeriksaan CFU-S didasarkan atas kemampuan HSC untuk membentuk koloni besar (termasuk sel progenitor pembentuk darah) dalam jaringan limfa yang telah diradiasi secara letal dalam waktu singkat (12 hari). *CFU assay* merupakan cara mengukur kemampuan HSC dalam membentuk koloni.

4. *Reconstitution assay*

Pemeriksaan rekonstitusi adalah pemeriksaan untuk menentukan HSC secara benar, dimana tikus diprakondisikan dahulu sebelumnya dengan iradiasi letal agar dapat menerima HSC baru yang

dinjektikan baik populasi HSC murni maupun tidak murni namun mengandung HSC. HSC baru akan merepopulasikan sistem hematopoetik host tikus untuk hidup. Pemeriksaan ini menggunakan marker yang berbeda tipe untuk menentukan sel yang berasal dari donor donor dan atau yang berasal dari host.

Salah satu cara kuat dalam membedakan sel asal donor atau host adalah memeriksa *allele* yang membedakan gen tertentu, baik melalui analisis sekwen DNA secara langsung atau berdasarkan atas protein yang diekpresikan *allele*.

Secara spesifik protein ekspresi tersebut adalah protein permukaan sel yang dapat dikenali oleh antibodi monoklonal spesifik sehingga dapat membedakan antara varian gen misalnya CD45. Pemeriksaan lain menggunakan PCR didasarkan atas fakta bahwa kromosom Y sel pria dapat dideteksi dalam sel host perempuan.

5. Marker HSC

Berbagai marker telah ditemukan untuk membantu mendeteksi dan mengisolasi HSC. Upaya penentuan marker pada awal difokuskan pada hanya menentukan ukuran sel dan densitas oleh lektin (protein yang dapat mengikat karbohidrat). Upaya tekini difokuskan terutama dengan menentukan marker protein permukaan sel menggunakan antibodi monoklonal. Teknik ini dapat menentukan protein permukaan sel yang diekspresikan oleh turunan hematopoetik terdiferensiasi, seperti sel turunan sel darah merah dan makrofag, yang secara kolektif dikenal sebagai lin.

Marker Lin tikus :

- Sca-1, CD27, CD34, CD38, CD43, CD90.1 (Thy-1.1), CD117 (c-Kit), AA4.1, dan MHC class I dan CD150

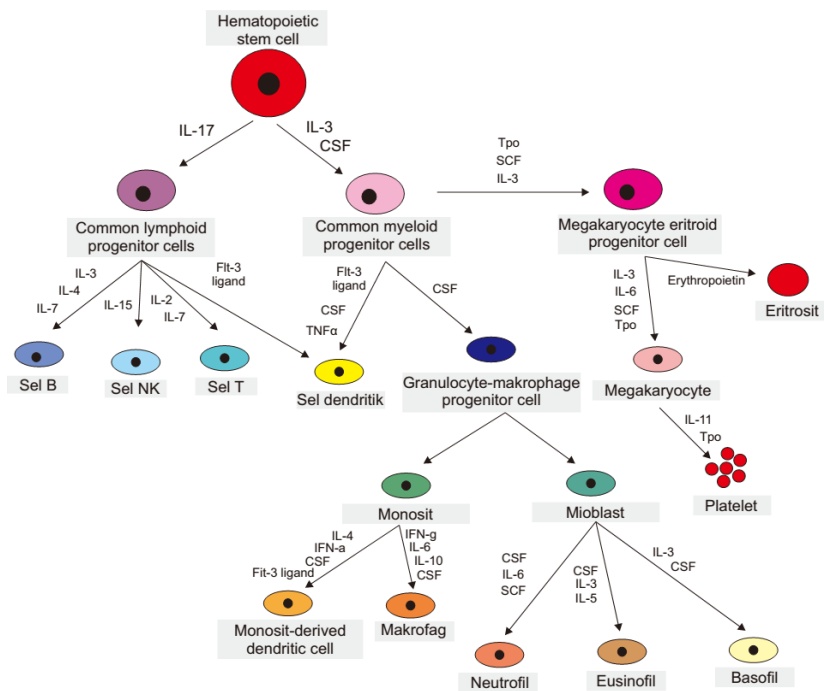
Marker Lin Human:

- CD34, CD38, CD43, CD45RO, CD45RA, CD59, CD90, CD109, CD117, CD133, CD166 and HLA DR (human).

Pemeriksaan ini penting ketika digunakan dalam analisis sel manusia karena pemeriksaan transplantasi pada sel manusia masih terbatas.

8. 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 oligopoten). Turunan HSC dijelaskan pada gambar di bawah ini.



Gambar 111. Turunan HSC

Model pengembangan garis turunan HSC. HSC berdiferensiasi menjadi *common lymphoid progenitor cell* dan *common myeloid progenitor cell*.

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 eritroid progenitor cell* akan menghasilkan eritrosit dan platelet.

9. 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 dekade 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 diferensiasi menghasilkan seluruh jenis sel darah yang berbeda selama proses hematopoiesis, mulai limfosit, granulosit, dan makrofag dari sistem imunitas tubuh serta eritrosit dan trombosit yang bersirkulasi.

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- α Serial Doses dalam Peningkatan VEGF dan PDGF Mesenchymal Stem Cells. 2018. *MKB*. 50(2):67–73.
8. Nugraha A, Putra A. Tumor necrosis factor- α -activated mesenchymal stem cells accelerate wound healing through vascular endothelial growth factor regulation in rats. *Univmed*. 2018; 37(2):135-42.
9. Seita J, Weissman IL. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2010;2(6):640-53.
10. Beerman I, Rossi DJ. Epigenetic regulation of hematopoietic stem cell aging. *Exp Cell Res*. 2014;329(2):192-9.
11. Gao X, Xu C, Asada N, Frenette PS. The hematopoietic stem cell niche: from embryo to adult. *Development*. 2018;145(2):dev139691.
12. Gschweng E, De Oliveira S, Kohn DB. Hematopoietic stem cells for cancer immunotherapy. *Immunol Rev*. 2014;257(1):237-49.
13. Mezey É. On the origin of blood cells--hematopoiesis revisited. *Oral Dis*. 2016;22(4):247-8.
14. Eaves CJ. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood*. 2015;125(17):2605-13.
15. Sugimura R, Jha DK, Han A, et al. Haematopoietic stem and progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Nature*.

BAB X

MOLEKUL DANGER-TLR :

SEL RADANG DAN MSC

Tujuan

Setelah membaca bagian sepuluh 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 menjadi aktif paska paparan molekul sinyal danger yang dilepas jaringan rusak, berupa molekul damage molecular associated pattern (DAMP) dan atau oleh mikro organism patogenik berupa molekul 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 homeostasis jaringan. Inflamasi diinisiasi oleh sel radang akibat stimulasi molekul sinyal *danger* yang dilepas sesaat terjadi kerusakan jaringan atau substansi tertentu melalui mikroorganisme patogenik. Secara spesifik molekul ini dikenal sebagai molekul *danger*, baik berupa *damage-associated molecular pattern* (DAMP) atau *pathogenic-associated molecular patterns* (PAMP). Molekul *danger* berperan sebagai inisiator kuat dalam aktivasi sel radang, terutama dalam menciptakan suasana awal inflamasi. Sel radang merespon molekul *danger* ini melalui reseptor *Toll-like*

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.

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 sel radang, melalui:

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- α , IL-6, IL-8

3. Aktivasi sel endotel

HMGB1 memicu peningkatan 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 intact). Hal ini mendorong reseptor TLR-3 mengikat molekul RNA tersebut sehingga menyebabkan aktivasi jalur JAK-STAT dengan target sekresi molekul proinflamasi seperti TNF- α dan IL-6. Hal ini akan menginisiasi proses inflamasi sekitar kulit.

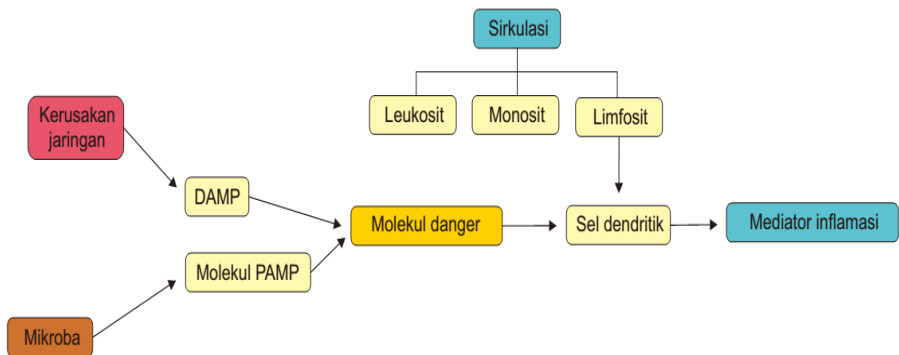
3.3. Molekul *danger* fragmen *hyaluronan*

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. Sistematis respon imun dan sel yang terlibat diilustrasikan dalam gambar dibawah ini.



Gambar 113. 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

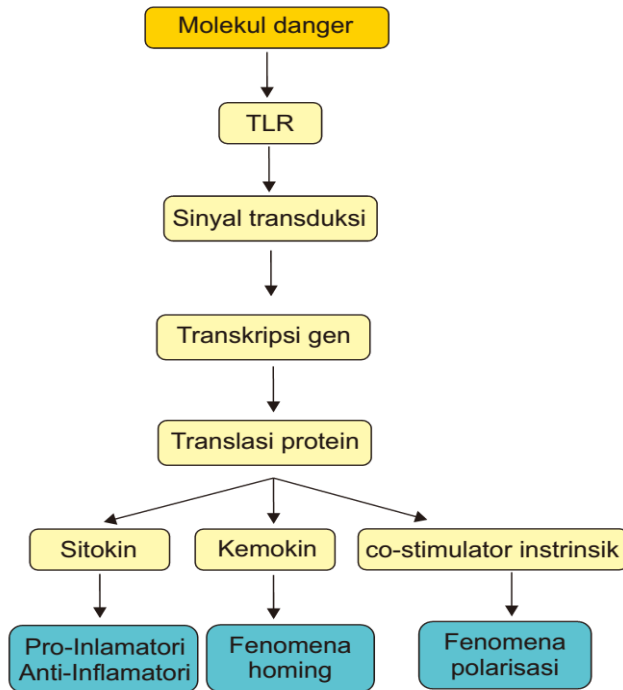
Secara struktural reseptor TLR merupakan protein transmembran yang terdiri atas 2 domain, yaitu:

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 mengaktifasi jalur JAK-STAT yang dapat menstimulasi berbagai produk sitokin dan substansi mikrobisidal dalam respon imunologik.



Gambar 114. *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 resptor 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

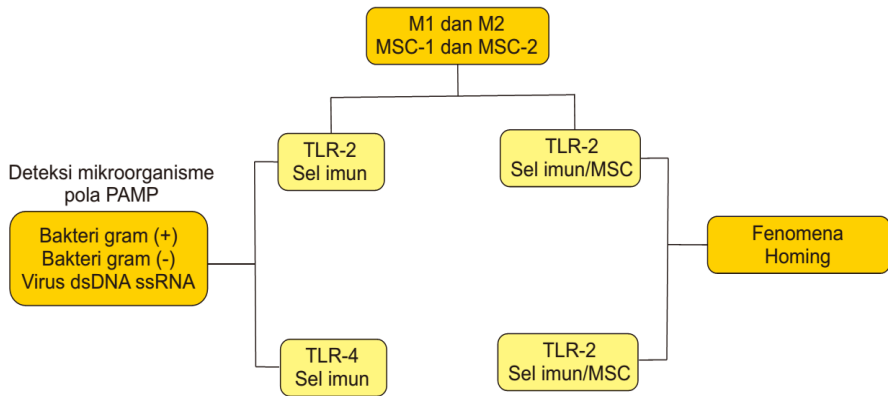
TLR berperan kuat dalam polarisasi berbagai sel radang termasuk MSC. Polarisasi dimulai ketika terjadi ligasi molekul *danger* pada reseptor TLR yang berakibat pada perubahan fenotip sel radang/ MSC dari pro-inflamatori menjadi anti-inflamatori atau sebaliknya tergantung pada tipe dan kadar molekul penstimulasinya.

4. Modulasi sel inaktif

Reseptor TLR mampu memodulasi berbagai sel imun fase *innate* menjadi bentuk aktif ketika reseptor TLR yang dieskpresikan 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, PGE₂, TGF- β dan TSG-6, 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 immunomodulasi.



Gambar 115. 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 hamatopoietik. 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 difagositosis 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 γ atau TNF- α 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-1 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 γ yang disekresi dan menjadi T_H -2 ketika IL-4, IL-10, dan IL-13. Sel T_H 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⁺ sendiri berperan sebagai sel T_H karena berfungsi memberikan bantuan kepada sel limfosit T lain atau kepada limfosit B penghasil *immunoglobulin*, sedangkan sel limfosit T CD8⁺ sebagai *T cytotoxic cell* (T_C) atau T_S, karena berfungsi sebagai sitotoksik/ supresi terhadap sel yang terinfeksi virus atau sel tumor.

6.5 Pematuran dan seleksi sel limfosit

Tahapan pematuran limfosit ditentukan oleh sitokin IL-2 dan IL-7 yang dilepas sel stromal, yang memiliki aktivitas *growth factor* sehingga mampu mendorong *thymocyte* imatur 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 prekursor sel T (sel progenitor) asal sumsum tulang menuju regio kortek timus.

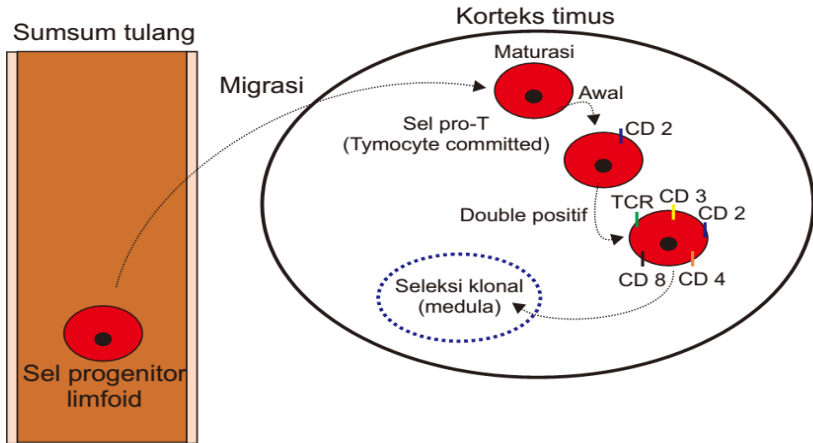
2. Tahapan pematuran awal: sel pro-T

Tahapan ini 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 *thymopoietin* 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 selanjut akan mengalami tahapan seleksi klonal.



Gambar 116. 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 "*edukasi 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

8. MSC supresi sel dendritik

MSC menyebabkan sel dendritik aktif mensekresikan TNF- α dan IFN- γ 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 menginhibisi maturasi monosit sehingga sel dendritik matur tidak terbentuk. Hal ini penting karena sel dendritik matur sebagai produsen utama pelepasan mediator inflamasi poten TNF- α dan IFN- γ , 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 α atau IFN γ 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- α , IFN- γ , IL-1 dan IL-6 dalam konsentrasi tinggi dan molekul anti-inflamasi IL-10 dan TGF- β 1 dalam konsentrasi rendah.

2. Makrofag tipe M-2

Makrofag tipe M-2 adalah makrofag yang mensekresi molekul anti-inflamasi IL-10 dan TGF- β 1 dalam konsentrasi tinggi dan molekul pro-inlamasi IL-1, IL-6, TNF- α dan IFN- γ 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 eksprimen *co-culture* MSC dengan sel monosit. Sisi lain MSC sendiri dapat terpolariasi 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 polariasi 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- α dan IFN- γ dalam jumlah besar. Inflamasi menyebabkan sel T limfosit teraktivasi sehingga menghasilkan sitokin pro-inflamatori TNF- α , IFN- γ dan IL-1 dalam jumlah besar. Hal ini menyebabkan MSC terpolarisasi menjadi tipe-2 dengan fungsi sebagai imunosupresi.

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 HLA II, 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- β 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 pergesaran sel T menjadi TH2

Proliferasi sel T Yng menurun paska dihambat MSC tipe-2 menyebabkan penurunan sekresi IFN- γ (mediator pro-inflamasi). Hal ini akan menyebabkan peningkatan produksi IL-4 oleh sel TH2 (anti-inflamasi) sehingga terjadi pergesaran status sel T dari pro-inflamasi yang dimotori IFN- γ 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 antibody*) tidak berpengaruh terhadap supresi NO. Hal ini mengesankan bahwa efek supresi sel T tergantung pada MSC.

Pelepasan sitokin pro-inflamasi akan mengaktifkan sel radang yang kemudian melepaskan 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

- [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 sebelas ini, diharapkan pembaca dapat memahami tentang polarisasi MSC, MSC tipe-2 imunosupresif, 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- α atau IFN- γ akan segera mensekresi molekul anti-inflamasi (IL-1ra, IL-10, TGF- β 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- κ 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- β . 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

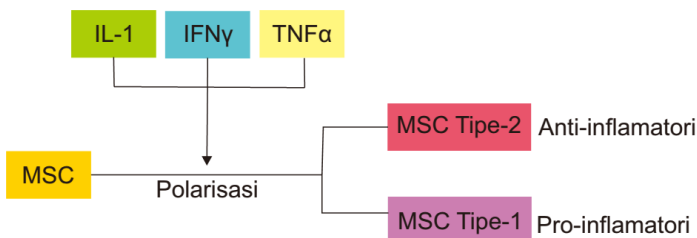
singkat ini, tetap terjadi perbaikan jaringan secara bermakna. Hal ini menunjukkan bahwa MSC tetap mampu melakukan komunikasi *crosstalk* dengan berbagai molekul yang dilepas sel radang sekitar area cedera, sekalipun dalam waktu singkat.

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- γ / TNF- α) yang menstimulasi. Kadar mediator inflamatori tinggi mendorong MSC terpolarisasi menjadi MSC tipe-2 dan sebaliknya. Polarisasi MSC dijelaskan pada gambar di bawah ini.



Gambar 119. Polarisasi MSC

Paparan molekul stimulator (IL-1, IFN- γ dan TNF- α) 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- γ dan TNF- α (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- α , IFN- γ atau IL-1 dan dsRNA

Konsentrasi TNF- α , IFN- γ 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

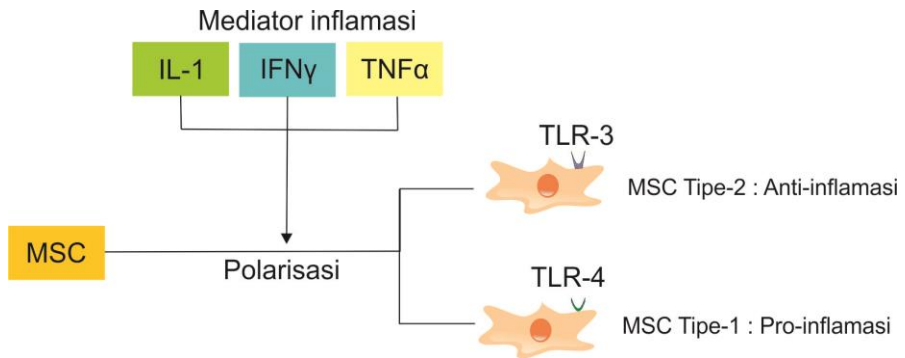
Reseptor TLR diekspresikan MSC dengan tujuan untuk mendeteksi keberadaan molekul inflamasi, kemudian mengikatnya. Komplek pengikatan TLR-molekul inflamasi ini secara kaskade akan mengaktivasi jalur inflamasi hingga kemudian menginduksi polarisasi MSC. Polarisasi MSC dimulai dengan menjadi MSC tipe-1 menggunakan reseptor TLR-4 dan berlanjut menjadi MSC tipe-2 melalui reseptor TLR-3.

2.3 Bentuk polarisasi MSC

Berdasarkan konsentrasi molekul IL-1, TNF- α dan IFN- γ 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 120. TLR-3 dan TLR-4

Paparan mediator inflamatori poten (IL-1, IFN- γ dan TNF- α) 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- α atau IFN- γ 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- α sehingga dapat mengaktivasi jalur utama inflamasi NF- κ 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 mengaktivasi jalur TRIP-TRAM yang berakhir dengan sekresi IL-1ra, IL-10 dan TGF- β . Polarisasi MSC tipe demikian dikenal sebagai MSC tipe-2.

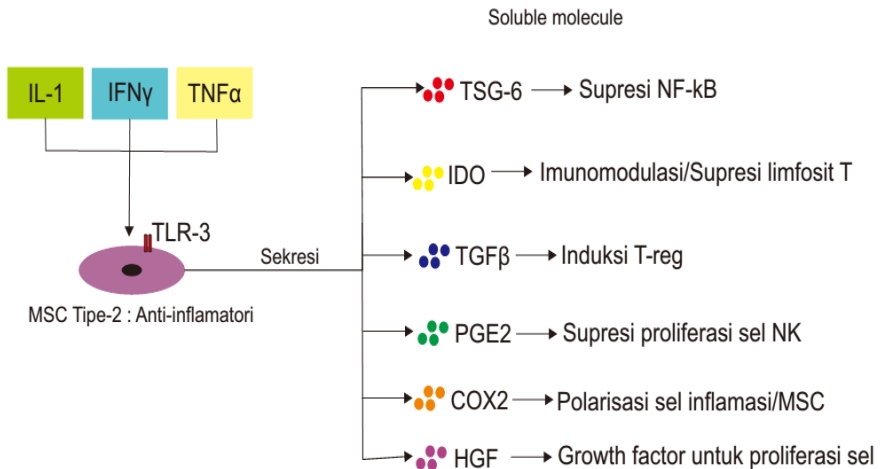
3.1 Pengertian MSC tipe-2

MSC tipe-2 adalah MSC yang terpolarisasi menjadi tipe-2 dengan ekspresi TLR-3 yang berkarakteristik immunosupresif (anti-inflamatori terutama terhadap proliferasi sel T) paska paparan IL-1, TNF- α atau IFN- γ 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- α atau IFN- γ) 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.

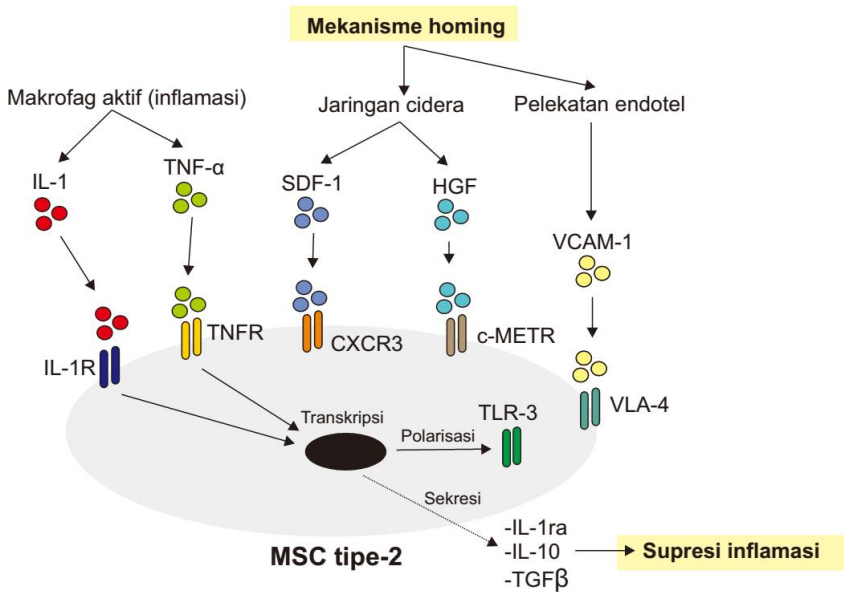


Gambar 121. *Soluble molecule* MSC Tipe-2

MSC tipe-2 paska terpapar IL-1, TNF- α dan IFN- γ akan mensekresi TSG-6 dengan fungsi mensupresi jalur NF- κ B, IDO untuk mensupresi limfosit T, TGF- β 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 122. 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-α, 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

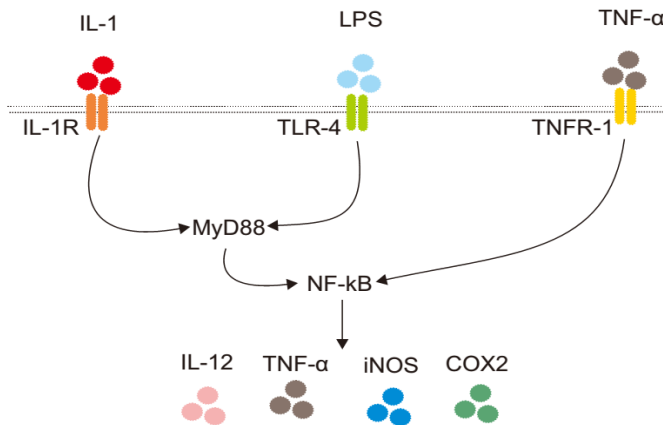
5. Respon *initial* MSC: polarisasi MSC tipe-1

Hasil penelitian terkini mengungkapkan bahwa inflamasi diinisiasi oleh 2 molekul utama yaitu:

1. Pelepasan IL-1 α yang berperan sentral dalam inflamasi steril melalui stimulasi molekul *danger* DAMP (jaringan luka steril)
2. Pelepasan TNF- α 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- α oleh TNFR yang diekspresikan MSC. Secara spesifik pengikatan IL-1 dan LPS akan mengaktifasi jalur NF- κ B via protein MyD88, sedangkan TNF- α dapat secara langsung mengaktifasi jalur NF- κ B. Hal ini menunjukkan bahwa jalur NF- κ B menjadi sentral dalam inisiasi proses polarisasi MSC.



Gambar 123. Aktivasi jalur inflamasi NF- κ B

NF- κ B teraktivasi oleh jalur MyD88 via stimulasi IL-1 dan LPS dan atau jalur TNFR-1/TNF- α . Jalur NF- κ B teraktivasi akan mentranskripsi sitokin proinflamasi TNF- α , IL-12, COX-2 dan iNOS.

5.2 Respon *initial* MSC: konsep NF- κ B

NF- κ B merupakan heterodimer (protein Rel dan p50) yang dalam keadaan normal berada pada posisi inaktif di dalam sitosol. Sekalipun demikian NF- κ B tidak membutuhkan protein lain dalam menjalankan aktivitasnya, sehingga termasuk kelompok *rapid-acting molecule*. NF- κ B teraktivasi akan memasuki nuklues untuk mentranskripsi berbagai gen target yang bersifat pro-inflamasi. NF- κ B berperan dalam proses inflamasi dengan mentranskripsi sitokin proinflamasi TNF- α , IL-12, COX-2 dan iNOS.

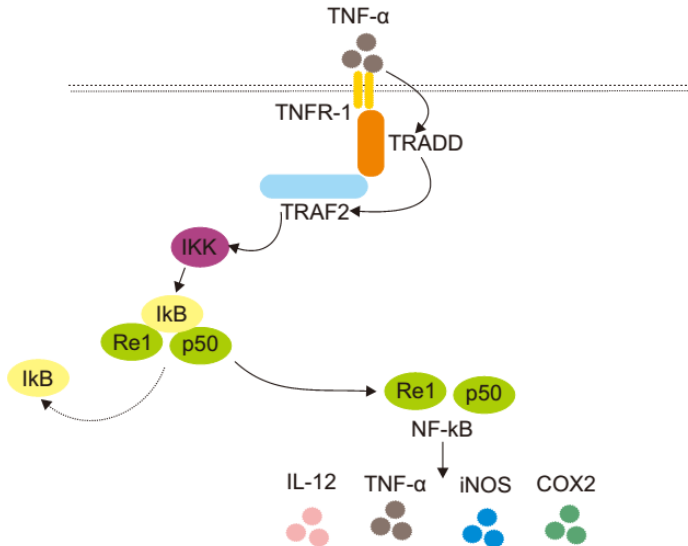
Secara spesifik NF- κ B dapat teraktivasi oleh berbagai molekul ligan ekstraseluler yang dilepas sel radang (disamping radiasi ionisasi dan Ros), yaitu:

1. IL-1 dan LPS melalui jalur inflamasi MyD88
2. TNF- α melalui jalur inflamasi TNFR

5.3 Respon *initial* MSC: jalur TNF- α / TNFR

Secara teoritis TNF- α merupakan molekul sitokin pro-inflamatori poten yang berperan penting dalam mengaktivasi jalur NF- κ B. Secara spesifik proses aktivasi jalur NF- κ B dimulai dengan pengikatan TNF- α 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- κ B menjadi molekul bebas dan aktif memasuki nukleus untuk mentranskripsi protein proinflamasi. Berbagai molekul inflamasi yang disekresi diantaranya adalah sitokin TNF- α , IL-12, COX-2 dan iNOS.

Aktivasi jalur NF- κ B via TNF- α /TNFR dijelaskan pada gambar di bawah ini.



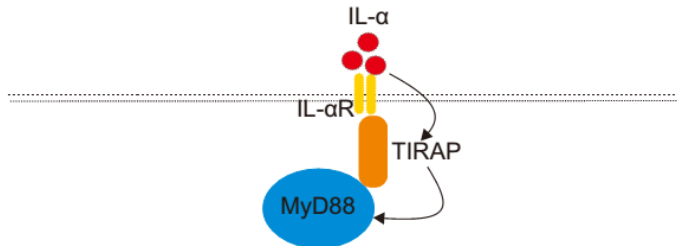
Gambar 124. Aktivasi jalur NF- κ B

Pengikatan TNF- α pada TNFR-1 menyebabkan disosiasi protein TRADD. Protein TRADD kemudian merekrut TRAF2 yang dapat memicu aktivasi IKK sehingga dapat memecah NF- κ B menjadi molekul aktif yang dapat memasuki nukleus untuk mentranskripsi berbagai molekul proinflamasi seperti sitokin TNF- α , IL-12, COX-2 dan iNOS.

5.4 Respon initial MSC: jalur IL-1 α

Pengikatan IL-1 α dengan reseptor IL-1 α R menyebabkan reseptor IL-1 α 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 125. 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-

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 5×10^5 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 (2×10^6 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 2×10^6 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- α 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 (1×10^6 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. Sirkuit 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 tissuereneration. *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. *Advances 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- α -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 cidera 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 α , dan IFN γ . 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 (cidera) 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 cidera. 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 cidera 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 dilepas 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- α dan IFN- γ .

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.

dengan berbagai molekul sitokin/ kemokin atau *soluble molecule* yang dilepas sel radang aktif terutama sel neutrofil dan makrofag dan atau jaringan cidera.

6.1 Molekul kemoatraksi MSC

1. TNF- α

TNF- α 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 cidera/ inflamasi, disamping sebagai pengaktivasi berbagai sel radang termasuk MSC. Peningkatan kadar TNF- α secara berlebihan dapat memicu kegagalan organ multi-sistem, disamping menyebabkan proses kronis.

2. IFN- γ

IFN- γ 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 cidera, 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/ cidera. 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 cidera/ 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 bersifat immunosupresif, yaitu mampu mensekresi berbagai molekul aktif anti-inflamatori terutama IL-1ra, PGE2, TGF- β dan TSG-6, 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- α dan IFN- γ

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- α dan IFN- γ) 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 leukopesis 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 α dan IFN γ) 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, fibronectin 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.

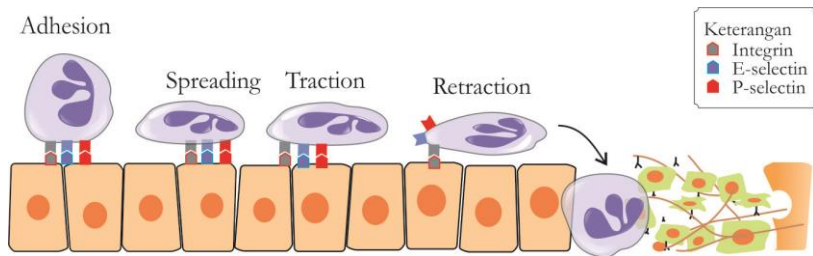
4 *Traction*

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 134. Pola pergerakan transmigrasi

Daftar pustaka

1. Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A newmesenchymal stem cell (MSC) paradigm: Polarization into a proinflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype.PLoSOne.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, FigueiredoNeto M, Figueiredo ML.The immunomodulatory effects of mesenchymal stem cellpolarization within the tumor microenvironment niche. Stem CellsInt. 2017;2017.
4. Yang S, Wang Y, Chao C, Chuang Y, Lan C, Chen B. Dynamiccross-talk analysis among TNF-R, TLR-4 and IL-1R signalings inTNFa-induced inflammatory responses. Med genomic.2010;3(19):2–19.
5. Wu Y, Zhou BP. TNF-a/NFκ-B/Snail pathway in cancer cellmigration and invasion. Br J Cancer. 2010;102(4):639–44.
6. 69. Lin CC, Lee IT, Yang YL, Lee CW, Kou YR, Yang CM.Induction of COX-2/PGE2/IL-6 is crucial for cigarette smokeextract-induced airway inflammation: Role of TLR4-dependentNADPH oxidase activation. Free RadicBiol Med [Internet].2010;48(2):240–54.
7. Kyurkchiev D. Secretion of immunoregulatory cytokines bymesenchymal stem cells. World J Stem Cells [Internet].2014;6(5):552.
8. Kim B-S, Ko I-K. Mesenchymal Stem Cells for Treatment ofMyocardial Infarction. Int J Stem Cells [Internet]. 2008;1(1):49–54.
9. Thomas SJ, Snowden JA, Zeidler MP, Danson SJ. The role ofJAK/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, Chatziandreou I, Boviatsis E, Saetta AA, SpyropoulouA, Samaras V, et al. Complex interactions between thecomponents of the PI3K/AKT/mTOR pathway, and withcomponents of MAPK, JAK/STAT and Notch-1 pathways,indicate their involvement in meningioma development. VirchowsArch. 2014;465(4):473–85.
12. Becker A De, Riet I Van. Homing and migration of mesenchymalstromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? WorldJ Stem Cells [Internet]. 2016;8(3):73.

13. Sohni A, Verfaillie CM. Mesenchymal stem cells migrationhoming and tracking. *Stem Cells Int.* 2013;2013:14–6.
14. Warnock RA, Askari S, Butcher EC, Von Andrian U. Molecularmechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *JExp Med [Internet]*. 1998;187(2):205–
15. Nourshargh S, Alon R. Leukocyte Migration into InflamedTissues. *Immunity [Internet]*. 2014;41(5):694–707.
16. Hocking AM. The Role of Chemokines in Mesenchymal StemCell Homing to Wounds. *Adv Wound Care.* 2014;4(11):623–30.
17. Park S, Jang H, Kim BS, Hwang C, Jeong GS, Park Y. Directionalmigration of mesenchymal stem cells under an SDF-1a gradienton 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—Insightsinto Homing and Transendothelial Migration. *Stem Cells[Internet]*. 2017;35(6):1446–60.
19. Teo GSL, Ankrum JA, Martinelli R, Boetto SE, Simms K, SciutoTE, et al. Mesenchymal Stem Cells Transmigrate Between and DirectlyThrough TNF- α -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. *Advaces in Biomolecular Medicine: Proceedings of the 4thBIBMC.* 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- α -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 tiga belas 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 cidera. 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 cidera.

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, parenkim 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 MSC 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, prolifreasi 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.

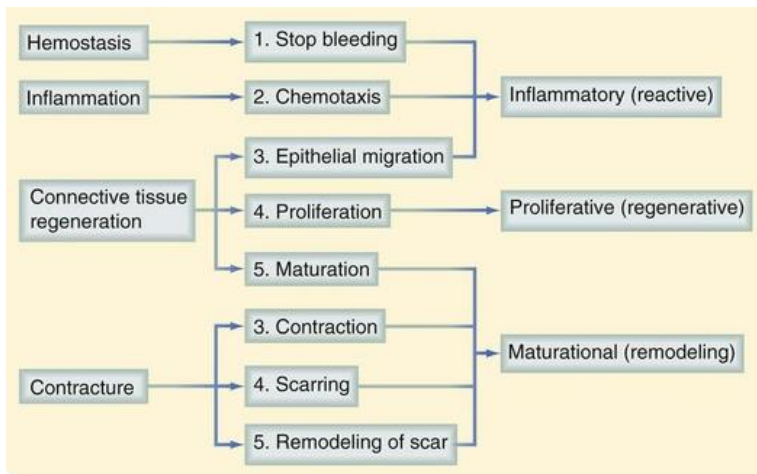
2.1 Pengertian cedera

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*



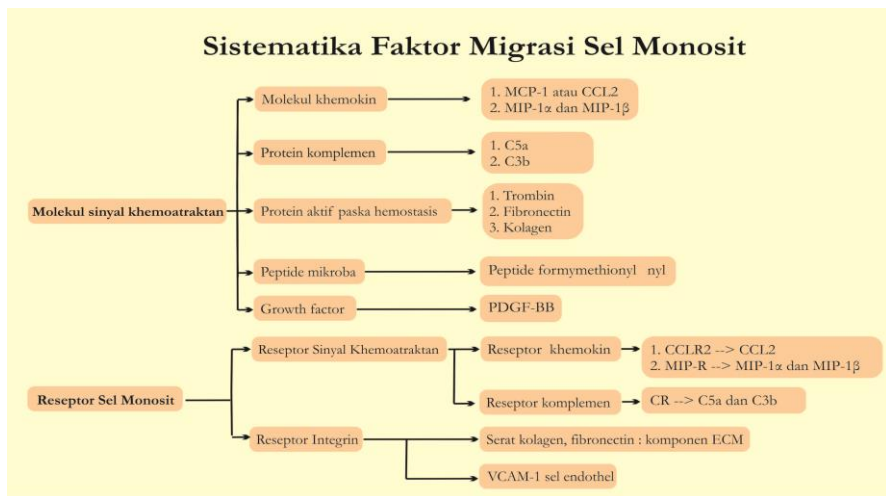
Gambar 135. Tahapan respon penyembuhan cedera

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 di bawah ini.



Gambar 145. 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 α dan MIP-1 β

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 melepaskan 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 anaphilatoksin.

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 α dan MIP-1 β -MIPR
Reseptor β -MIPR sel monosit akan mengikat ligan MIP-1 α dan MIP-1 β .
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 β , 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- α

TNF- α adalah mediator inflamasi poten yang terdeteksi dalam 12 jam paska cedera dengan puncak 72 jam. TNF- α 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- α 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- α), 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- α dan IL-6)
- 4) Sintesis protein akut liver berupa CRP, faktor komplemen, fibrinogen, *mannose binding protein* (M-bp) (bersama TNF- α , 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- α / IL-1)
- 2) Sintesis PGE₂ hipotalamus (induksi febris), sebagai molekul pirogen endogenous (bersama TNF- α 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- α , 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- α , 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) Neurotrasmitter 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- γ dan TNF- α ,

2) Aktivasi sel NK dan limfosit T CD8 sitotoksik, sehingga mensekresi IFN- γ dan TNF- α .

3) Menurunkan sekresi IL-4 yang dihasilkan

7. Metabolit aktif: tromboxan A₂, PGF₂ α , leukotrien B₄ dan C₄

Makrofag aktif menginduksi *phosfolipase* yang berakibat degradasi membran fosfolipid sel makrofag, sehingga menyebabkan pelepasan protein tromboxan A₂, PGF₂ α , leukotrien B₄ dan C₄

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- β

TGF- β 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.

3. CXCL12 (SDF-1)

4. CXCR3

1. Ekspresi ICAM-1

ICAM-1 sebagai molekul adhesi limfosit yang diekspresikan endotel pasca 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- γ

IFN- γ adalah sitokine proinflamatori yang disekresikan oleh limfosit T aktif sebagai respon terhadap stimulasi IL-12 yang disekresi oleh sel makrofag aktif. Secara spesifik IFN- γ 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- α .
- 2) Menurunkan sintesis prostaglandin (molekul anti-inflamasi), sehingga efek mediator inflamasi meningkat.
- 3) Menahan sel makrofag agar tetap dalam area cedera.
- 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

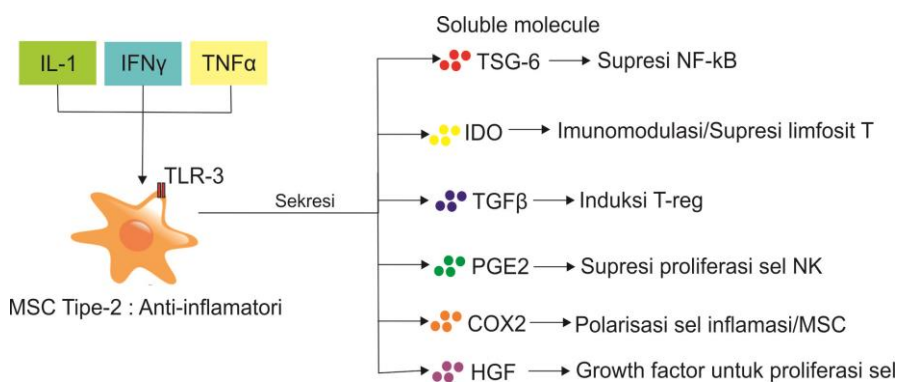
IL-4 berperan penting dalam inflamasi kronis, terutama dengan mengubah aktivasi makrofag (polarisasi) melalui jalur alternatif, sehingga menghasilkan M2. Secara teoritis keberadaan IL-4 dengan sitokin anti-inflamasi (IL10 dan

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 147. Imunoregulasi MSC

13.2 Mekanisme imunosupresi 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- β 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

15.1 FGF-1 dan FGF-2

FGF-1 dan FGF-2 adalah molekul angiogenik *growth factor* pertama (sub-famili FGF) yang disekresi oleh MSC dan fibroblas aktif secara autokrin (paska stimulasi PDGF), disamping oleh makrofag aktif, endotel dan sel mast dalam 3 hari pertama cedera. 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 (*vascular endothelial growth factor*)

VEGF adalah molekul angiogenik *growth factor* kedua (sub-famili PDGF) yang disekresi oleh MSC, disamping fibroblast aktif, makrofag, endothel dan platelet dalam 4-7 hari cedera. 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- β

TGF- β merupakan molekul *growth factor* yang disekresi berbagai fase penyembuhan terutama oleh MSC, disamping platelet, makrofag aktif dan keratosit. TGF- β berperan sebagai sinyal khemotaktis makrofag diawal inflamasi dan sebaliknya menghambat aktivasi makrofag pada fase proliferasi. TGF- β secara tidak langsung juga berperan pada angiogenesis dengan cara mengaktivasi fibroblast sehingga mampu menghasilkan FGF secara autokrin. TGF- β merupakan sensor terhadap peningkatan produksi kolagen, proteoglikan dan fibronectin (komponen ECM) dengan menurunkan sekresi protease MMP (enzim degradasi matriks ECM) serta *growth factor* yang disekresi oleh sel makrofag aktif, disamping sel keratosit dengan peranan mengaktivasi sel fibroblast disamping angiogenesis. TGF- β 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 pendegradasi matriks ECM atau 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 oleh MSC, disamping sel platelet aktif (dalam granula alpha), makrofag dan endothel aktif dengan fungsi proliferasi, diferensiasi, morfogenesis, migrasi dan angiogenesis. PDGF berperan sebagai mitogenik potent (agen pembelahan baik proliferasi, diferensiasi dan morfogenesis) mesenkimial 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 dan 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 stella hepar dalam proses fibrogenesis.

15.5 EGF atau IGF-1

EGF atau IGF-1 merupakan *growth factor* yang disekresi sel oleh MSC, disamping makrofag aktif, sel keratinosit dengan peranan sebagai agen proliferasi, diferensiasi, migrasi bagi sel fibroblast dan keratinosit serta terlibat aktif pada pembentukan jaringan granulasi.

15.6 Keratinocyte growth factor (KGF)

KGF merupakan *growth factor* yang disekresi oleh MSC, disamping sel keratinosit dan 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 neovaskulerisasi 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 cidera akibat stimulasi molekul angiogenesis (bFGF, PDGF, VEGF)

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 epitelium yang berasal dari migrasi basal tepi luka beberapa jam pasca hemostasis tercapai hingga hari 2-3. Sel keratinosit ini berproliferasi pada tepi luka dan berhenti ketika saling bertemu di tengah. Sel keratinosit 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 reepitelisasi 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 epitelial 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, Honnagowda 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. Hasan A, Deeb G, Rahal R, et al. Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Traumatic Brain Injury. *Front Neurol.* 2017;8:28. Published 2017 Feb 20. doi:10.3389/fneur.2017.00028
11. 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
12. Qu J, Zhang H. Roles of Mesenchymal Stem Cells in Spinal Cord Injury. *Stem Cells Int.* 2017;2017:5251313.

13. Nugraha A, Putra A. Tumor necrosis factor- α -activated mesenchymal stem cells accelerate wound healing through vascular endothelial growth factor regulation in rats. *Univmed*. 2018; 37(2):135-42.
14. Rennert RC, Sorkin M, Garg RK, Gurtner GC. Stem cell recruitment after injury: lessons for regenerative medicine. *Regen Med*. 2012;7(6):833-50.
15. Xi J, Yan X, Zhou J, Yue W, Pei X. Mesenchymal stem cells in tissue repairing and regeneration: Progress and future. *Burns Trauma*. 2015;1(1):13-20. Published 2015 Jun 26. doi:10.4103/2321-3868.113330

GLOSARIUM

1-TMS :

Protein 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 transduksi 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 sel leukosit

Attaching MSC:

Proses penempelan MSC dengan cara mengikat molekul adhesi P-selektin dan VCAM-1 melalui CD-44 dan VLA-4

Autokrin :

Bentuk komunikasi intraseluler yang unik, dimana sebagian substansi molekul komunikator (ligan) yang telah disekresikan ke ekstraseluler oleh tersebut masih dapat berikatan dengan reseptor sendiri.

BMP :

Molekul ligan anggota super famili TGF- β yang mengikat BMPR2 dan berdampak pada proliferasi sel termasuk osteogenesis, embriogenesis dan proliferasi sel

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 G1 dan G2 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 diserat kolagen (matriks sekitar) tersebut berkoneksi dengan pembuluh darah sekitar.

Feeder layer:

Komponen penunjang bagi aktivitas 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 diarea 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 substansi dasar (substansi 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 mengaktivasi 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 kemoatraksi ($\text{IFN}\gamma$, $\text{TGF}\alpha$ dan SDF-1) yang dilepas sel radang terutamasel makrofag sekitar area cidera.

HSC :

Sel punca dewasa yang berasal dari sistem hematopoetik (sumsum tulang) yang mengekspresikan marker CD34^+ , CD133^+ , Thy1^+ dan tidak mengekspresikan marker CD38^- , CD33^- .

$\text{IFN}\gamma$:

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 cidera, 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 sel serta inhibisi apoptosis.

IL-8 :

Small molekul chemoattractant yang diekspresikan oleh luka akut dan kronik

iPS (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 system 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 β -catenin terakumulasi dalam sitoplasma yang kemudian translokasi menuju nukleus berperan sebagai co-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 aktivitas 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 penyesuaian 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/enzimatis.

Leukotrien 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 $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, IL-1 dan IL-6 dalam konsentrasi tinggi dan anti-inflamasi dalam konsentrasi rendah (IL-10 dan $\text{TGF-}\beta 1$).

Makrofag tipe M-2:

Makrofag yang mensekresi molekul anti-inflamasi dalam konsentrasi tinggi yaitu IL-10 dan $\text{TGF-}\beta 1$ dan molekul pro-inlamasi dalam konsentrasi rendah yaitu IL-1, IL-6, $\text{TNF-}\alpha$ dan $\text{IFN-}\gamma$ secara bersama.

Malignansi :

Salah bentuk disregulasi dari sistem autokrin

MCP-1 :

Small molekul chemoattractant yang dilepas sel keratinosit paska cedera

Media kultur sel:

Campuran komplek 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 subseleuler demi mencapai keadaan homeostatis.

Mesenkimal :

Sel/jaringan embrional yang terbentuk saat pembentukan embrio

Metafase:

Kondisi dimana seluruh kromosom bergerak dan berkumpul dipusat spindle mitotik sehingga tampak sebagai *equatorial plate*.

Metilasi DNA :

Proses dimana sekelompok gugus metil berikatan pada molekul DNA sehingga aktivitas segmen DNA tersebut berubah namun urutan DNA tetap.

Migrasi sel secara kemotaksis:

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 protein efektor :

Proses aktivasi 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 mesenchymal atau stromal pasca 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- κ 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

Nitric 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 :

Aktivitas pelepasan sel kultur (MSC) yang melekat pada permukaan flask secara mekanik/ enzimatis pada kondisi tertentu.

Panen sel kultur :

Aktivitas yang terjadi ketika sel telah mencapai konfluensi 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 ($\text{TNF}\alpha$, IL-1 dan $\text{IFN}\gamma$).

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 mediator 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 1 :

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 menjadi bentuk 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 *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).

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 pluripotent

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 intaseluler 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 :

Aktivitas 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 kontrol gen secara 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 α dan IFN γ) 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 hematopoietic

SDF-1 :

Small molekul chemoattractant yang diekspresikan sel endothelial, myofibroblast dan keratinosit.

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 ko-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 nukleus 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).

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 aktivitas pembaharuan diri,

VEGF:

Molekul angiogenik growth factor kedua (sub-famili PDGF) yang disekresi fibroblast aktif (disamping makrofag aktif, endothel dan platelet) dalam 4-7 hari cedera.

Wnt :

Molekul protein yang berperan penting dalam jalur sinyal proliferasi sel punca dan mampu mensupresi diferensiasi menjadi osteogenik.



Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Med., lahir di Bandar Lampung, menyelesaikan pendidikan Profesi Dokter di FK UNISSULA tahun 1997, pendidikan Magister Ilmu Biomedik FK UNDIP tahun 2011 dan Program Doktor bidang Ilmu Kedokteran Dasar FK UNDIP tahun 2016.

Saat ini menjabat sebagai Kepala Bagian Patologi Anatomi FK UNISSULA, Ketua SCCR Laboratory, Staf Pengajar Program Pascasarjana Ilmu Biomedik FK UNISSULA dan aktif membimbing mahasiswa Program Doktor.

Penulis terlibat aktif dalam berbagai penelitian stem cell yang telah dipublikasikan di Jurnal Internasional Bereputasi dan Nasional Terakreditasi.

Penulis meraih Program Hibah Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi DIKTI, Hibah Fundamental dan Bersaing DIKTI untuk mendukung riset di bidang stem cell.

Buku ini menyajikan ulasan tentang Sel Punca, mulai dari dasar hingga molekuler, meliputi hal-hal sebagai berikut :

- ♦ Konser Dasar Sel Punca.
- ♦ Isolasi dan Kultur Sel Punca.
- ♦ Epigenetik dan Faktor Transkripsi : Stemness-Reprogramming.
- ♦ Konsep Sinyal Transduksi Reseptor-Ligan.
- ♦ Model Komunikasi Sel Punca Parakrin.
- ♦ Jalur Molekuler Proliferasi Sel Punca.
- ♦ Siklus Sel Punca.
- ♦ Konsep dan Terminologi Mesenchymal Stem Cell
- ♦ Hematopoetic Stem Cell
- ♦ Molekul Danger-TLR : Sel Radang dan MSC.
- ♦ Imunoregulasi MSC : Polarisasi MSC dalam Inflamasi
- ♦ Konsep Homing MSC.
- ♦ Peran MSC dalam Regenerasi Jaringan Cidera.

Unissula Press

Jl. Raya Kaligawe Km. 4 Semarang
Telp. (024) 6583584
Fax. (024) 6582455

Molekuler

ISBN: 976-623-7097-06-8



9 786237 097068