

Edisi 1

2016

# STEM CELL EPIGENETIK

**Profesor Hadyanto Lim,  
Dr. dr. M.Kes, SpFK, FESC, FIBA, FAHA**

Professor of Pharmacology and Molecular Sciences,  
Cardiovascular Division, Department of Pharmacology and Molecular Biology  
Faculty of Medicine, Methodist University of Indonesia (UMI), Medan  
Cardiovascular Molecular Biology Research, Postgraduate Program,  
Faculty of Medicine, University of Sumatra Utara (USU), Medan.



**PT. SOFMEDIA**



**PT. SOFMEDIA**

**Hak Cipta dilindungi Undang-Undang.** Dilarang memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini dalam bentuk apapun, baik secara elektronik maupun mekanik, termasuk memfotokopi, merekam, atau dengan menggunakan sistem penyimpanan lainnya, tanpa izin tertulis dari Penerbit.

**UNDANG-UNDANG NOMOR 19 TAHUN 2002 TENTANG HAK CIPTA**

1. Barangsiapa dengan sengaja dan tanpa hak menggunakan atau memperbanyak suatu ciptaan atau memberi izin untuk itu, dipidana dengan pidana penjara paling lama 7 (tujuh) tahun dan/atau denda paling banyak Rp 5.000.000.000,00 (lima milyar rupiah).
2. Barangsiapa dengan sengaja menyiarkan, memamerkan, mengedarkan, atau menjual kepada umum suatu ciptaan atau barang hasil pelanggaran Hak Cipta atau Hak Terkait sebagaimana dimaksud pada ayat (1), dipidana dengan pidana penjara paling lama 5 (lima) tahun dan/atau denda paling banyak Rp 500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).

---

**SM. MD.**

---

**Prof. Dr. dr. Hadyanto Lim, M.Kes, Sp.FK, FESC, FIBA, FAHA**  
**Stem Cell Epigenetik Edisi 1**

---

Alamat Distributor : Jl. Karya - Sei Agul, Komplek Karya Centre,  
P.T. SOFMEDIA No. A2, A3, A4, Kelurahan Sei Agul, Medan.

---

Editor : Tim P.T. SOFMEDIA

---

Desain Sampul

Setting & Layout Isi : Tim P.T. SOFMEDIA

---

Diterbitkan & dicetak oleh P.T. SOFMEDIA - Jakarta  
E-mail: sofmedia@hotmail.com

---

Cetakan Pertama : 2016

---

ISBN : 978-602-8604-...

---

Isi tulisan dalam buku tanggung jawab Penulis

---

# DIPERSEMBAHKAN UNTUK

**SOPHIA HADYANTO, S.H., M.H.**

Istri saya senantiasa memberi semangat dan kedamaian

**VINA HADYANTO, STEVEN HADYANTO,  
RICHARD HADYANTO**

Anak-anak saya yang memberi energi dalam kehidupan



## KATA PENGANTAR

Dalam laporan awal artikel Human Genome Project yang dimuat di jurnal terkemuka dunia, *Nature* tahun 2011, oleh satu konsorsium melibatkan 20 kelompok peneliti dari 6 negara besar mengemukakan “*it is has not escaped our notice that the more we learn about the human genome, the more there is to explore.*” ‘Tidak luput dari perhatian kami bahwa semakin banyak kita pelajari tentang genom manusia, semakin banyak pula harus kita eksplorasi.’ Ungkapan yang mirip dengan kalimat yang amat terkenal disampaikan pertama kali oleh Watson dan Crick dalam artikel “Struktur DNA” di jurnal yang sama, tahun 1953 “*It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material.*” “Tidak luput dari perhatian kami bahwa pasangan basa spesifik yang kami postulasikan dapat menjelaskan mekanisme replikasi materi **genetik**.” Kalimat yang diungkapkan ini menjadi batu loncatan perkembangan ilmu biologi molekuler, bukan mega proyek yang mengungkapkan berbagai mekanisme kejadian patobiologi pada tingkat genom, melainkan kemajuan pengetahuan yang akhirnya sampai pada tingkat pengetahuan “EPIGENETIK”, yang menjelaskan semua perubahan ekspresi gen yang mendasari perubahan fenotipe penyakit tanpa mengubah sekuensi gen, sampai pada diferensiasi stem cell.

EPIGENETIK adalah hasil perkembangan penelusuran genom yang belum lengkap, sehingga “ILMU BARU GENETIK’ pantas disandang oleh “EPIGENETIK” , untuk menjelaskan permasalahan yang tidak dapat diungkapkan oleh “ILMU GENETIK”. Oleh sebab itu, perubahan fenotipe pada tingkat stem cell, tidak luput dari pengaruh dinamika lanskap epigenetik. Sehingga mekanisme stem cell baik pluripotensi, diferensiasi, **dediferensiasi**, *reprogramming*, yang merupakan bagian **plastisitas** stem cell dapat dijelaskan, dan menjadi landasan dalam pengembangan terapi stem cell untuk proses perbaikan dan regenerasi jaringan yang rusak akibat proses penyakit neurodegeneratif, seperti penyakit kardiovaskuler, stroke, diabetes melitus, dan penyakit Alzheimer.

Buku Stem Cell Epigenetik ini tersusun atas 6 bab. Bab 1, memaparkan tentang penemuan sel, ilmu stem cell sampai pada epigenetik, sehingga dapat dirangkaikan proses perkembangan pengetahuan. Pada **bab 2**, menjelaskan bahwa epigenetik adalah suatu ilmu baru yang mengungkapkan proses yang terjadi di dalam genetik yang berpengaruh pada fenotipe. Bab 3, memaparkan stem cell *self-renewal* sebagai salah satu sifat stem cell dengan penjelasan mekanisme pada tingkat epigenetik. Bab 4, mengungkapkan bagaimana diferensiasi stem cell berperan penting terhadap proses perbaikan dan regenerasi pada jaringan yang mengalami injuri dan inflamasi. Dengan berlandaskan pada penjelasan epigenetik, maka proses pemahaman menjadi lebih detail. Bab 5, memaparkan pengetahuan diferensiasi sel yang direprogram menjadi tipe sel pada turunan yang berbeda. Penelitian *reprogramming* direk secara *in vivo* saat ini menjadi trend penelitian dunia, yang berupaya untuk mengubah sel yang abnormal menjadi normal kembali dalam tubuh manusia dengan mengubah identitas sel. Sedangkan bab terakhir memfokuskan pada kemampuan stem cell berubah menjadi tipe sel lain pada garis turunan berbeda pada berbagai organ tubuh.

Buku ini tidak akan dapat diselesaikan tanpa dorongan dan pengertian dari berbagai pihak. Kepada PT. Sofmedia yang senantiasa mendorong dan bersedia menerbitkan buku ini, saya ucapkan banyak terima kasih.

Kepada istri saya, Sophia dan anak-anak saya, Vina Hadyanto, Steven Hadyanto, dan Richard Hadyanto, yang selalu memberikan kedamaian, kebanggaan, dan sukacita dalam kehidupan ini, saya sampaikan terima kasih.

Akhir kata, kami mengharapkan kontribusi kami yang kecil ini dapat menambah khazanah ilmu pengetahuan kepada semua pembaca baik kalangan ilmuwan, dokter dan spesialis, para mahasiswa kedokteran dan kesehatan, serta bagian farmasi yang ingin mengembangkan pengetahuan dan penelitian di bidang keilmuan stem cell. Semoga bermanfaat !

**Hadyanto Lim**

# DAFTAR ISI

Kata Pengantar .....	iv
Daftar Isi .....	v
1. Sel, Stem Cell dan Epigenetik .....	1
2. Epigenetik : Ilmu Baru Genetik .....	42
3. Stem Cell : Self- Renewal.....	68
4. Stem Cell : Differensiasi.....	89
5. Differensiasi : Reprogram Sel.....	109
6. Stem Cell : Plastisitas dan Dediferensiasi.....	135
Indeks .....	160



## 1

# Sel, Stem Cell dan Epigenetik

PENDAHULUAN	1
PEMBELAHAN SEL	4
Siklus sel	5
STEM CELL	9
JENIS STEM CELL	10
EMBRYONIC STEM CELL	10
ADULT STEM CELL	12
Bone marrow-derived stem cell	12
Hematopoietic stem cell	12
Nonhematopoietic stem cell	19
Mesenchymal stem cell	19
MSC jaringan <b>adiposa</b>	22
Unfractionized bone marrow- <b>derived</b> stem cell	22
Cardiac Stem Cell	27
Cardiosphere dan Cardiosphere-derived cell	28
INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL	29
EPIGENETIK	29

*"We shall not cease from exploration. And the end of all our exploring will be to arrive where we started, and know the place for the first time."*

- T. S. Eliot -

## PENDAHULUAN

Setiap organisme hidup yang bermukim di muka bumi; manusia, hewan, tumbuh-tumbuhan, fungi atau mikroorganisme dibentuk oleh sel. Sel adalah unit dasar **biologik**, karena sel mampu tumbuh dan berkembang biak, memperbanyak diri, berespon terhadap stimuli serta beradaptasi terhadap lingkungan. Hal ini menunjukkan sel bersifat dinamis dan mampu menyesuaikan diri terhadap lingkungan mikro (niche). Karena itu, sel disebut sebagai pembentuk kehidupan makhluk hidup.

Pemahaman sel sebagai unsur pembentuk organ tubuh yang menunjang kehidupan didasarkan atas penemuan sel pada tahun 1665. Ilmuwan Inggris Robert Hooke, seorang kurator instrumen di Royal Society, London pertama kali mengamati potongan gabus di bawah mikroskop hasil ciptaannya dengan pembesaran 30 x. Beliau mengamati bagian kecil gabus tersusun menyerupai sarang lebah, sehingga ia menamakannya sebagai *cell*, dalam bahasa Latin, *cellula*, berarti "ruang kecil." Penemuan Hooke dituliskan dalam buku "*Micrographia*" hasil pengamatan berbagai miniatur objek mulai dari sel

hingga berbagai serangga kecil, dengan tujuan untuk membuka cakrawala pemikiran dibawah objek yang tidak terlihat.<sup>1</sup>

Beberapa tahun kemudian, Antonie van Leeuwenhook, seorang pedagang tekstil dari Belanda, menciptakan sebuah lensa mikroskop dengan pembesar 300 x. Dengan pembesaran lensa yang lebih superior, van Leeuwenhook dapat mengamati sel hidup, termasuk bakteri, sel darah, sel sperma, berbagai organisme bersel tunggal seperti protozoa dan algae. Meskipun beliau sanggup mengamati sel hidup, struktur sel secara detail belum mampu diungkapkan pada abad ke-17. Pada abad ke 19, baru ditemukan mikroskop kombinasi menggabungkan pembesaran pada lensa pengamatan terhadap lensa objektif dan lensa okular, sehingga didapati pembesaran yang lebih jelas dan besar.

Namun, kontribusi penemuan mikroskop pertama oleh Hooke meletakkan dasar bagi pengembangan penemuan yang lebih baik. Karena itu, untuk memperingati 350 tahun penemuan sel oleh Robert Hooke, the Royal Society, London, mengadakan seminar *Cell – dari Robert Hooke hingga terapi stem cell* –diadakan tanggal 5-6 Oktober 2015. Dalam pertemuan yang dihadiri para ilmuwan, saya diundang untuk menyaksikan betapa besar pengaruh selama perjalanan 350 tahun terhadap pemahaman sel hingga stem cell yang digunakan dalam terapi untuk menyembuhkan penyakit yang sulit disembuhkan melalui obat-obatan.

Untuk mengetahui bagaimana sel digunakan sebagai pemahaman awal hingga pada tingkat pemahaman stem cell, perlu diketahui tentang teori sel hingga anatomi dan fungsi sel.

Teori sel pertama kali dikemukakan oleh Matthias Schleiden berdasarkan pengamatan bahwa semua jaringan tumbuh-tumbuhan disusun oleh sel dan tumbuhan embrio dibentuk oleh sel tunggal. Hasil pengamatan beliau dikonfirmasi oleh ahli sel Jerman yaitu Theodore Schwann pada jaringan hewan. Hal ini menunjukkan bahwa baik sel tumbuh-tumbuhan maupun sel hewan dibentuk oleh sel. Dari hasil pengamatan ini, disusun postulasi oleh Schwann bahwa semua organisme tersusun atas satu atau lebih sel dan sel adalah unit dasar pembentuk semua organisme hidup. Berdasarkan pengamatan oleh Robert Brown bahwa di dalam setiap sel tumbuh-tumbuhan didapati struktur bulat di dalamnya yang dinamakan nukleus, maka Karl Nagali menambahkan bahwa sel mampu membelah. Karena itu, Rudolf Virchow tahun 1855 menyatakan bahwa

sel dibentuk oleh hasil pembelahan sel sebelumnya. Dalam bahasa Latin dikenal dengan sebutan : *omnis cellula e cellula*.

Sebagai unit dasar pembentuk organisme dan reproduksi, sel bersifat amat dinamis, baik struktur yang beragam, dari bentuk spiral pada bakteri *Treponema* hingga berbentuk cakram pada sel darah merah manusia. Bentuk sel dapat memberikan gambaran fungsi. Sel saraf manusia bercabang memberi petunjuk bahwa sel ini berinteraksi dengan berbagai sel saraf (neuron) lain.

Dengan perkembangan teknologi yang amat pesat dalam abad ke 21 ini, maka dapat diciptakan berbagai jenis mikroskop baik mikroskop optik (cahaya), yang mampu mengamati sel hidup hingga beresolusi 200 nanometer, mikroskop elektron mampu mengamati sel hingga 100.000 x pembesaran.

Dengan menggunakan mikroskop elektron transmisi, dapat diukur besarnya struktur sel dalam skala 100 nanometer. Dengan mikroskop elektron voltase tinggi, dapat dipelajari struktur subseluler dengan ketebalan 1 $\mu$ m. Untuk menampakkan permukaan sel dan organel, dibutuhkan mikroskop elektron scanning. Dengan mikroskop elektron transmisi dapat diamati membran retikulum endoplasmik di dalam sitoplasma dalam bentuk dua dimensi sedangkan mikroskop elektron *scanning* dapat menampakkannya dalam bentuk tiga dimensi, sehingga struktur subseluler tampak lebih nyata.

Bagaimana sel melaksanakan fungsi pertumbuhan yang bersifat dinamis ? Apa yang terkandung dalam struktur sel yang memberikan kemungkinan tersebut? Bentuk molekul apa yang memberikan replikasi yang amat akurat dan tak terbatas sehingga dapat mengarahkan perkembangan organisme dan kehidupan sel ? Jawaban terhadap pertanyaan ini mulai muncul tahun 1940-an, ketika ilmuwan menemukan bahwa informasi genetik terutama berfungsi sebagai instruksi pembentuk protein. Karena protein adalah unsur pembentuk sel, membentuk enzim yang mengkatalisis reaksi kimia sel, mengatur ekspresi gen, memungkinkan komunikasi antara satu sel dengan sel lain sehingga timbul proses pergerakan.

Informasi genetik hasil pengamatan pada akhir abad 19 dilaksanakan oleh kromosom, struktur seperti benang di dalam nukleus sel eukariot yang dapat dilihat di bawah mikroskop cahaya ketika sel



mengalami pembelahan, pertama kali dilaporkan oleh ahli biologi Jerman Walther Flemming. Beliau menyebut proses pembelahan sel sebagai *mitosis*, yang berasal dari kata Yunani berarti benang.

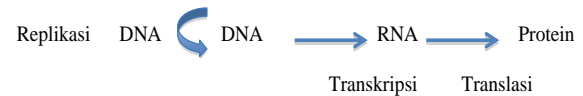
Hasil analisis biokimia mendapatkan bahwa kromosom terdiri dari asam **deoksiribonukleat** dan protein. Tahun 1930, DNA telah dikenal tersusun oleh 4 nukleotida, sedangkan protein tersusun oleh 20 asam amino yang berbeda. Sebenarnya hingga pertengahan abad ke 20, masih terdapat pemikiran bahwa protein adalah pembawa informasi genetik karena merupakan komponen nukleas satu-satunya yang memiliki beragam komponen yang bersesuaian dengan beragam gen.

Dalam studi bakteri yang dilaporkan ahli biokimia dari Kanada, Oswald Avery Collin McLeod dan ilmuwan Amerika Maclyn McCarty, sama –sama bekerja di Universitas Rockefeller, mendapatkan bahwa DNA dapat mentransformasikan *strain* bakteri nonpatogen menjadi *strain* patogen. Delapan tahun kemudian, Alfred Hersley dan Martha Chase, ahli biokimia Amerika, menunjukkan bahwa DNA, bukan protein, masuk ke dalam sel bakteri ketika terinfeksi dan secara genetik diubah oleh virus. Tahun 1940, George Beadle dan Edward Tatum, bekerja menggunakan *Neurospora crassa*, merumuskan konsep “satu gen –satu enzim” yaitu satu gen mengatur pembentukan protein.

Dari pemaparan di atas, telah ditemukan bahwa DNA adalah pembawa informasi genetik, namun belum diketahui bagaimana informasi ini dicopy dan dihantarkan dari satu sel ke sel lain. Tahun 1953, misteri ini dapat dipecahkan melalui penjelasan James Watson dan Francis Crick, yaitu ditemukan struktur DNA, dengan menggunakan *X-ray crystallography* yang dihasilkan Rosalind Franklin. Dengan diketahui bahwa DNA tersusun atas untai ganda (*double helix*), maka problem tentang cara replikasi molekuler dapat diketahui. Satu untai DNA saling berkomplementer dan terpilin satu sama lain dengan pasangan basa di dalamnya dan ditopang oleh *sugar phosphate*.

Tahun 1960 ditemukan enzim polymerase yang mensintesa DNA dan RNA dan diketahui “kode genetik” yang mengemukakan hubungan urutan nukleotida di dalam DNA atau RNA dan urutan asam amino di dalam protein. Ahli biokimia Jacques Monod dan ahli Genetika Francois Jacob mengemukakan mekanisme yang mendasari pengaturan ekspresi gen pada bakteri.

Setelah penemuan struktur DNA tahun 1953, Francis Crick menyampaikan model informasi genetik yang dinamakan sebagai dogma sentral biologi molekuler.



Informasi **genetik** melibatkan replikasi DNA untuk menghasilkan dua *copy* identik, yaitu dua untai ganda (*double helix*) yang saling komplementer. Ketika terjadi proses transkripsi, kedua untai DNA terbuka oleh enzim *helicase* polymerase DNA seperti terbukanya zigzag untai DNA. Untai induk akan menjadi “*template*” bagi untai baru, dengan demikian akan terbentuk dua untai baru. Proses pembentukan dua untai baru DNA yang berlangsung secara semikonservatif, dimana satu untai menjadi cetakan bagi pembentukan untai baru merupakan suatu proses replikasi DNA.

Sedangkan informasi transkripsi dari DNA dalam pembentukan RNA dan translasi informasi RNA menjadi protein adalah proses untuk pembentukan sel. Transkripsi menunjukkan bahwa sintesis RNA menggunakan DNA sebagai *template*, karena ekspresi gen hanya berupa pemindahan informasi dari satu asam nukleat menjadi yang lain. Sedangkan dari asam nukleat menjadi urutan molekul RNA yaitu urutan asam amino dari rantai polipeptida dilaksanakan melalui proses translasi.

Dari pemaparan di atas, dapat dipahami bahwa sel sebagai unit dasar pembentuk kehidupan dibentuk dari informasi **genetik** yang terkandung di dalam DNA, yang terdapat di dalam inti sel (nukleus), maka dapat dikemukakan beberapa sifat dasar sel yang menunjang kehidupan :

#### 1. Sel adalah struktur yang kompleks

Meskipun seluruh sel tubuh dibentuk dengan informasi genetik yang sama, fungsi masing-masing sel mengemban tugas berbeda. Misalnya, sel jantung seperti kardiomyosit berfungsi untuk berdenyut. Dengan kesatuan sel membentuk jaringan jantung, berarti sel jantung berfungsi sebagai pompa untuk memompakan darah ke seluruh tubuh. Sedangkan sel epitel usus yang melapisi usus tersusun dengan sangat rapat menyerupai susunan batu bata berfungsi mengabsorpsi **nutrien** makanan, karena pada ujung (*apical* sel) terdapat mikrovili yang memudahkan proses absorpsi. Pada bagian basal (bawah) sel usus ini mempunyai sejumlah besar mitokondria yang memberikan energi untuk kebutuhan proses transportasi membran, karena masing-masing

## 1. Sel, Stem Cell dan Epigenetik

mitokondrion tersusun atas sejumlah protein, termasuk enzim yang mensintesis ATP (adenosin trifosfat). Karena itu, struktur sel yang berbeda mengemban fungsi yang berbeda pula.

## 2. Sel memiliki program genetik

Pembentukan sel adalah berasal dari informasi genetik, yang tersimpan di dalam satu set kromosom yang menempati ruangan inti sel. Gen adalah unit terkecil penyimpan informasi genetik sebagai *blueprint* pembentuk struktur sel. Program pembentukan sel tersimpan dalam bentuk faktor transkripsi, menghasilkan berbagai bentuk sel berbeda, untuk mengemban tugas berbeda dalam jaringan berbeda, seperti diuraikan di atas. Sel jantung berfungsi untuk berdenyut, sel usus sebagai pengabsorpsi makanan.

## 3. Sel dapat berproliferasi untuk memperbanyak diri dan berdiferensiasi

Melalui proses pembelahan, satu sel induk menghasilkan dua sel anak. Pembelahan secara simetrik menghasilkan dua sel anak dengan volume yang hampir sama. Juga terdapat pembelahan asimetrik, dimana satu sel induk menghasilkan satu sel induk baru disebut proliferasi dan satu sel anak yang akan berdiferensiasi membentuk sel yang sama sesuai dengan lingkungan mikro sel anak ini berada. Plastisitas sel ini merupakan salah satu upaya sel untuk menggantikan sel yang mengalami kerusakan, melalui proses regenerasi.

## 4. Sel dapat menghasilkan dan menggunakan energi

Sumber energi yang diperoleh dari sinar matahari dapat disimpan melalui pigmen pengabsorpsi cahaya yang berada di dalam membran sel fotosintesis. Energi cahaya diubah menjadi energi kimia melalui proses fotosintesis, disimpan dalam bentuk sukrosa, karbohidrat kaya energi. Pada manusia, glukosa yang disimpan di dalam hati masuk ke dalam darah untuk memberikan energi kimia bagi semua sel tubuh. Di dalam sel tubuh, energi ini disimpan dalam bentuk ATP, yang digunakan dalam bentuk energi.

## 5. Sel melaksanakan fungsi reaksi kimia

Sel mampu melaksanakan berbagai fungsi transformasi kimia karena adanya enzim. Enzim dapat meningkatkan kecepatan reaksi kimia. Metabolisme sel menggambarkan besarnya reaksi kimia yang terjadi di dalam sel. Semakin besar metabolisme yang diemban oleh sel, semakin besar

pula reaksi kimia terjadi.

## 6. Sel mampu melakukan berbagai aktivitas sel

Sel bersifat dinamik dalam fungsi atau aktivitasnya. Perubahan mekanik terjadi di dalam sel diawali perubahan bentuk protein sebagai motor penggerak. Protein penggerak hanya merupakan salah satu tipe mesin molekuler penggerak sel dalam melaksanakan aktivitas mekanik.

## 7. Sel mampu memberikan respon terhadap stimuli

Sel mempunyai reseptor terhadap hormone, faktor pertumbuhan, dan materi ekstraseluler dan substansi dari sel lain. Karena itu, sel dapat memberikan respon melalui sel reseptor terhadap rangsangan yang mengubah aktivitas metabolisme, pembelahan sel dan pergerakan serta bunuh diri.

## 8. Sel mampu mengatur sendiri

Bukti pengaturan sel dapat dilihat ketika terjadi kerusakan. Kegagalan koreksi pada tingkat sel dapat terjadi akibat kegagalan duplikasi pada DNA, sehingga terjadi mutasi, yang mengakibatkan gangguan pada pengaturan pertumbuhan sel yang dapat berubah menjadi sel kanker. Karena itu, semua informasi dari sel berada di dalam asam nukleat, yang menghasilkan protein yang membentuk sel.

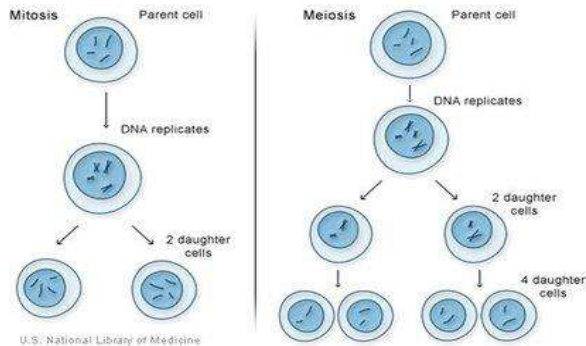
## 9. Sel dapat berkembang

Perkembangan sel dapat dilihat dari struktur yang berbeda antara sel yang lebih sederhana, seperti sel prokariotik pada bakteri. Sel yang lebih kompleks seperti sel eukariotik, termasuk gunfi, tumbuh-tumbuhan, dan hewan. Sel prokariotik pertama kali muncul dimuka bumi sekitar 2,7 miliar tahun yang lalu, seperti pada mikroba yang telah menjadi fosil, termasuk sianobakteri. Sedangkan sel eukariotik diperkirakan telah ada di bumi lebih dari 1 miliar tahun lalu.

## PEMBELAHAN SEL

Jumlah sel dalam tubuh seseorang kurang lebih 100 triliun sel. Pertumbuhan dan reproduksi adalah sifat dasar semua makhluk hidup. Ketika protein, asam nukleat, karbohidrat, dan lipid dibentuk yang baru, volume sel bertambah, membran plasma mengembang untuk mencegah sel pecah. Namun, ukuran pertambahan sel mencapai satu ukuran maksimal ketika sel terus tumbuh berkembang, hingga rasio permukaan dan volume mengecil

dengan kapasitas pertumbuhan dipengaruhi lingkungan.<sup>1</sup> Karena itu, pertumbuhan sel diikuti dengan pembelahan, dengan menghasilkan dua sel anak (Gambar 1).



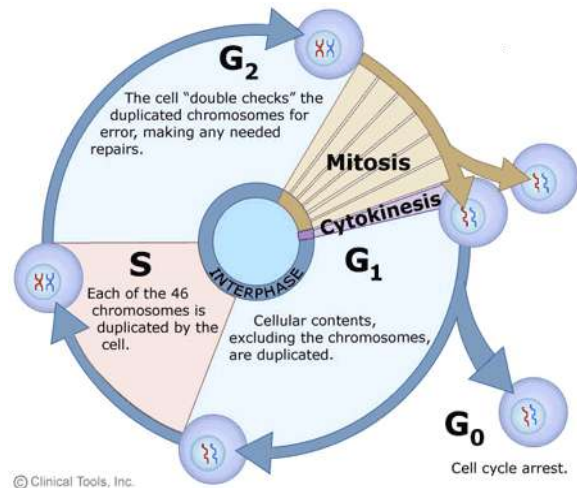
**Gambar 1.** Skema pembelahan mitosis dari satu sel induk menghasilkan dua sel anak melalui proses replikasi DNA secara semikonservatif. Pembelahan meiosis adalah pembelahan dari satu sel induk disebut stem cell yang berada di dalam zigot dapat membelah menjadi satu sel induk lain dan sel anak. Proses pembelahan dari satu sel induk menjadi sel induk lain disebut proliferasi untuk mempertahankan identitas sel sedangkan sel anak akan berdiferensiasi membentuk sel lain sesuai dengan lingkungan mikro, bertujuan untuk proses regenerasi.

## Siklus sel

Siklus sel dimulai ketika dua sel baru yang dibentuk dari hasil pembelahan satu sel induk dan berakhir ketika salah satu sel anak membelah menjadi dua sel. Keseluruhan siklus pembelahan sel dapat terjadi di dalam tubuh atau pada piring kultur.

Siklus sel dibagi atas 2 fase berdasarkan aktivitas sel yang tampak di bawah mikroskop cahaya yaitu fase M dan interfase. Fase M terjadi ketika terjadi proses pembelahan nukleus diikuti pembelahan sitoplasma. Pembelahan nukleus disebut mitosis (Gambar 2), dan pembelahan sitoplasma dikenal sebagai pembelahan menghasilkan dua sel anak disebut sitokinesis. Sedangkan interfase adalah periode di antara pembelahan sel, yaitu terjadi pertumbuhan sel karena adanya aktivitas metabolik, yang berlangsung dalam hitungan hari, minggu atau lebih lama, bergantung pada tipe dan kondisi sel.

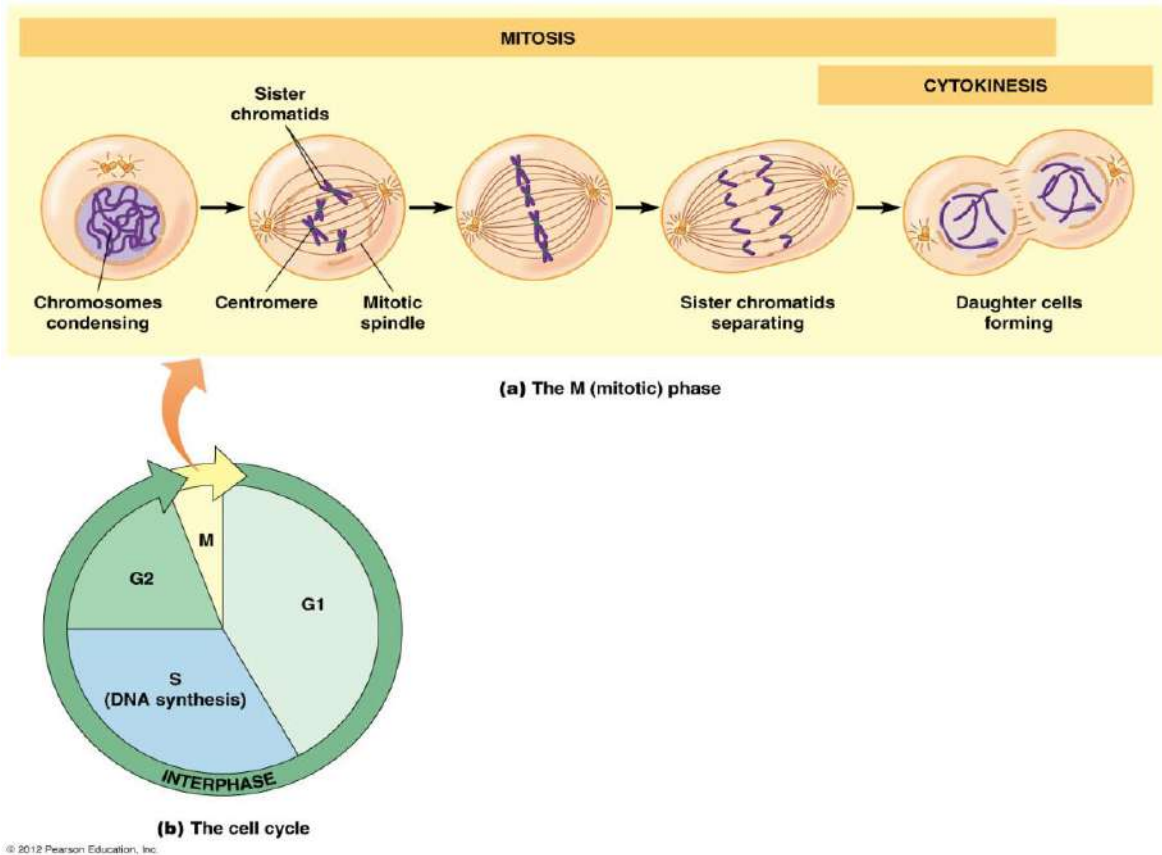
Inti pembelahan mitosis terdapat di dalam kromosom. Mitosis diawali dengan kondensasi kromosom yaitu melingkar dan melipat dari kromatin sel (Gambar 3).<sup>1</sup> yang membentuk kromosom yang dapat dilihat di bawah mikroskop cahaya.



**Gambar 2.** Empat fase siklus sel. Fase G (gaps) memisahkan kejadian pada fase S dengan fase M. G<sub>1</sub> adalah gap antara fase M dan fase S, sedangkan G<sub>2</sub> gap antara fase S dan fase M.

Dua kromosom yang terbentuk dari hasil pembelahan dikenal *sister chromatid*. Kromatid membentuk *mitotic spindle* yang dapat terpisah membentuk dua kromosom karena saling bergerak ke arah berlawanan. Ketika proses mitosis telah selesai, diikuti sitokinesis membentuk dua sel anak.

Secara rinci, fase M terdiri dari 5 fase. Awal mitosis dikenal sebagai profase, ketika kromosom berkondensasi pada satu tempat yang dapat dilihat di bawah mikroskop cahaya. Karena molekul DNA kromosom telah mengalami replikasi pada fase S, kromosom profase tersusun atas dua *sister chromatid*, melekat kuat satu sama lain. Pada awal profase, sentrosom yang mengalami duplikasi pada fase S mulai terpisah satu sama lain dan bergerak ke arah berlawanan dari nukleus dan kedua kromosom tersusun atas dua *sister chromatid*. Pada fase prometaphase, *sister chromatid* melekat pada *mitotic spindle*, suatu microtubule pada kedua kutub. Terjadi fragmentasi membran nukleus envelope. Fase metaphase terjadi ketika *sister chromatid* melekat pada kutub berlawanan dari *spindle*. Kohesi *sister chromatid* terlepas sehingga terbentuk fase anafase, yang memisahkan *sister chromatid*. Fase anafase merupakan fase paling singkat, berlangsung beberapa menit. *Spindle* atau benang kromatin yang terpisah namun kromosom menyatu dalam satu nukleus yang terpisah dikenal fase telofase. Pada fase ini, kromosom anak telah mencapai kutub *spindle*. Pada sitokinesis, sel terpisah menjadi dua, sehingga terbentuk dua nukleus yang mewarisi satu dari dua nukleus (Gambar 4).<sup>2</sup>



**Gambar 3.** Siklus sel eukariotik. (a) Fase M (mitotik), fase pembelahan sel merupakan fase terdiri dari proses saling tumpang tindih antara mitosis dan sitokinesis. Pada mitosis, benang mitotik berkumpul dari kromosom kondensasi menjadi dua nuklei sel anak ; sedangkan pada sitokinesis, sitoplasma membelah menjadi dua sel anak yang identik. (b) Antara pembelahan. Sel dalam interfase, adalah ketika fase S (antara replikasi nukleus DNA) dan dua fase “gap” yaitu G1 dan G2. Sel mengalami pertumbuhan sepanjang interfase, karena aktivitas metabolik tinggi.  
 Dikutip dari Hardin J and Bertoni G. *Becker’s world of the cell. The cell cycle and mitosis. 9 ed. Pearson Education, Inc. , USA 2016; p. 714- 745.*

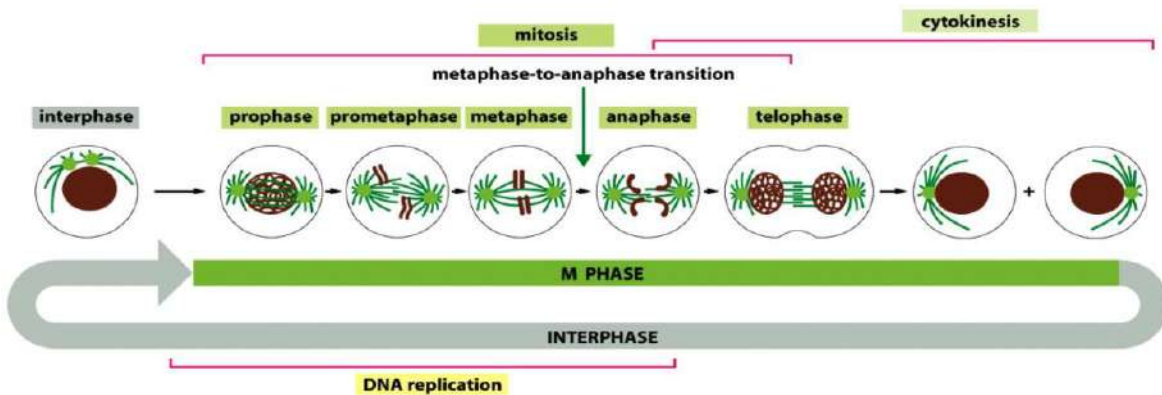


Figure 17-3 *Molecular Biology of the Cell 5/e* (© Garland Science 2008)

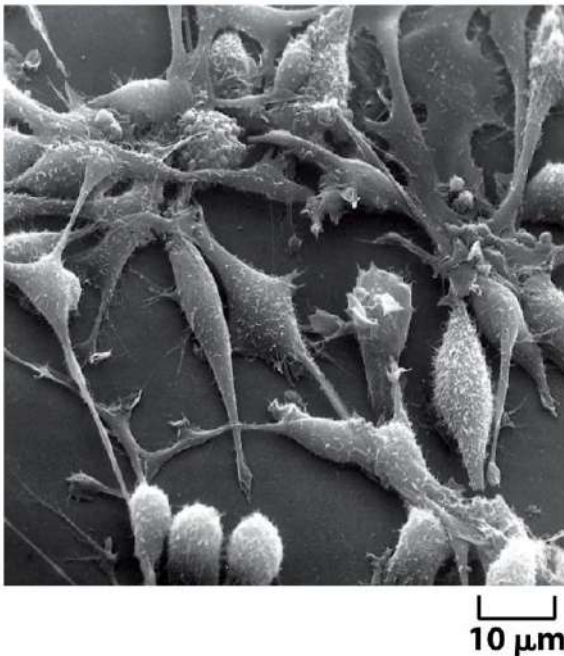
**Gambar 4.** Fase M (mitosis) terbagi atas 5 fase; profase, prometafase, metafase, anafase, dan telofase. Pada masa transisi metafase ke anafase, terjadi perubahan biokimiawi yang cepat. Sel bisa berhenti pada metafase sebelum masa transisi ini, tetapi jika fase ini bisa dilewati, proses mitosis dapat berakhir pada seluruh fase termasuk sitokinesis dan masuk ke interfase.  
 Dikutip dari Alberts B et eds. *Molecular biology of the cell. 5 ed. Garland Science. 2008, p. 1053-1114.*



Pada sel mamalia, fase M hanya berlangsung kurang dari 1 jam. Fase interfase berlangsung jauh lebih lama, meliputi fase S (Sintesis), fase G1 terjadi sebelum fase S, dan G2 memisahkan fase S dengan fase M berikutnya (Gambar 3).<sup>1</sup>

Seluruh siklus sel di dalam kultur pada sel mamalia berlangsung 18-24 jam. Dengan diketahui waktu siklus total, maka dapat ditentukan waktu masing-masing fase berlangsung. Sel dipaparkan secara radioaktif dengan DNA diberi label radioaktif (3H-thymidine) dalam waktu singkat, dan diperiksa di bawah autoradiografi. Dengan pemeriksaan radioaktif ini, biasanya fase S pada kultur berlangsung sekitar 0.33, artinya panjang fase S 6-8 jam. Fase M dapat ditentukan dari perkalian lamanya waktu total dengan persentase sel pada masa pembelahan. Persentase ini disebut indeks mitotik. Indeks mitotik untuk sel mamalia berkisar 3-5% artinya fase M berlangsung 30-45 menit.

Dengan mempelajari siklus sel dari sel normal atau sel kanker yang diisolasi dan ditumbuhkan di dalam piring kultur plastik dengan media kultur yang diberi nutrisi dan faktor lain, maka dapat dipelajari fase pembelahan (Gambar 5).<sup>2</sup> Contoh, sel fibroblast manusia akan berhenti pembelahan secara permanen setelah 25-40 kali proses pembelahan, suatu proses dikenal sebagai *replicative cell senescence*.



**Gambar 5.** Sel mamalia berproliferasi di dalam kultur. Sel fibroblast tikus dilihat di mikroskop elektron.

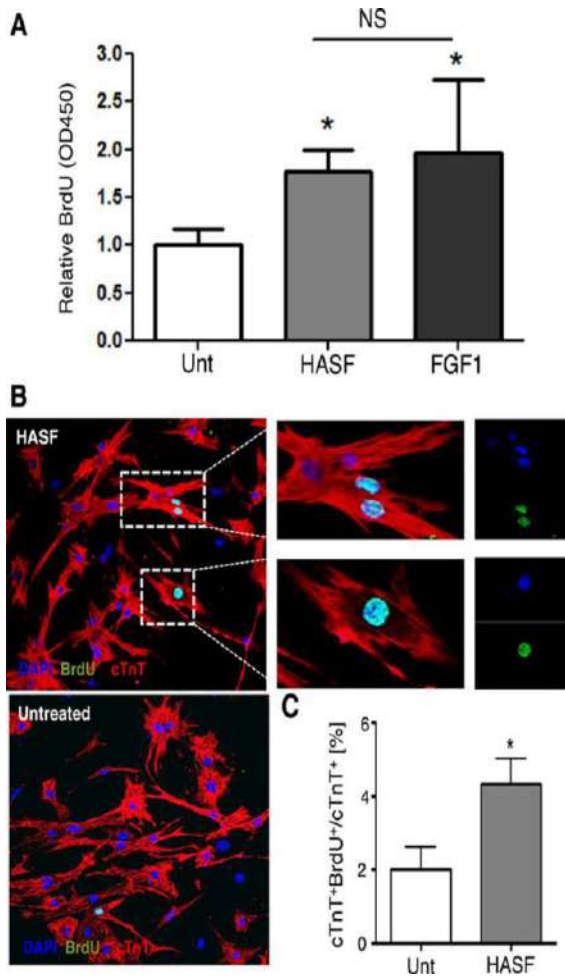
Dikutip dari Alberts B et eds. *Molecular biology of the cell*. 5 ed. Garland Science. 2008, p. 1053-1114.

Fase G1 bergantung pada tipe sel, umumnya berlangsung 8-10 jam. Selama fase G1, ditentukan kapan sel membelah lagi. Pada fase G1, sel menunggu signal yang memicu masuknya kembali ke siklus sel. Masa ini dikenal sebagai fase G0 (G zero). Sel yang keluar dari siklus sel mengalami diferensiasi terminal, berarti sel tidak membelah lagi; seperti sel saraf, dengan daya diferensiasi rendah. Ada sel yang terhenti membelah pada G2. Namun, waktu G2 lebih pendek daripada G1 dan lebih seragam, biasanya berlangsung 4-6 jam.

Selain penggunaan mikroskop elektron untuk mengetahui proliferasi siklus ada media kultur. Sintesis DNA dapat dipelajari menggunakan analog timidin, sebagai pengganti timidin radioaktif. Sel diinkubasi selama fase S dengan 5-bromodeoxyuridine (BrdU) atau 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU), yang masuk ke dalam DNA. Dengan mikroskop *fluorescence* dan pewarnaan *immunostaining* (jika menggunakan BrdU) atau reaksi kimia jika menggunakan EdU, dapat ditentukan sintesis DNA dalam siklus sel.<sup>1</sup>

Sebagai implikasi adalah pemahaman proses regenerasi pada sel. Misalnya, dengan menggunakan kultur sel kardiomyosit (sel otot jantung) di dalam media kultur secara *in vitro*, dan ditambahkan sejenis protein parakrin, C3orf58, suatu hypoxia and Akt induced stem cell factor (HASF) yang baru dihasilkan *mesenchymal stem cell*, Beigi et al., mengubah siklus sel kardiomyosit yang bersifat *dormant* sesudah lahir menjadi sel yang mampu masuk ke dalam siklus sel dengan sintesis DNA meningkat sebesar 60%, diukur menggunakan bromodeoxyuridine (BrdU) (Gambar 6).<sup>3</sup>

Dari hasil pemeriksaan kardiomyosit neonatal secara *in vitro*, peneliti melanjutkan penelitian pada hewan coba mencit secara *in vivo* menggunakan overekspresi HASF. Mencit wild type (WT) (sham operated) sebagai kontrol atau mencit transgenic (Tg) overekspresi HASF yang telah dilakukan infark miokard atau injuri pada kardiomyosit, disuntikan EdU or BrdU secara intraperitoneal untuk mengukur sintesis DNA dua hari setelah pembedahan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sintesis DNA meningkat secara signifikan pada kardiomyosit dewasa pada mencit overekspresi HASF dibandingkan dengan mencit wild type (infark miokard sebesar 54%) dengan nilai  $p < 0.05$  (Gambar 7).<sup>3</sup>

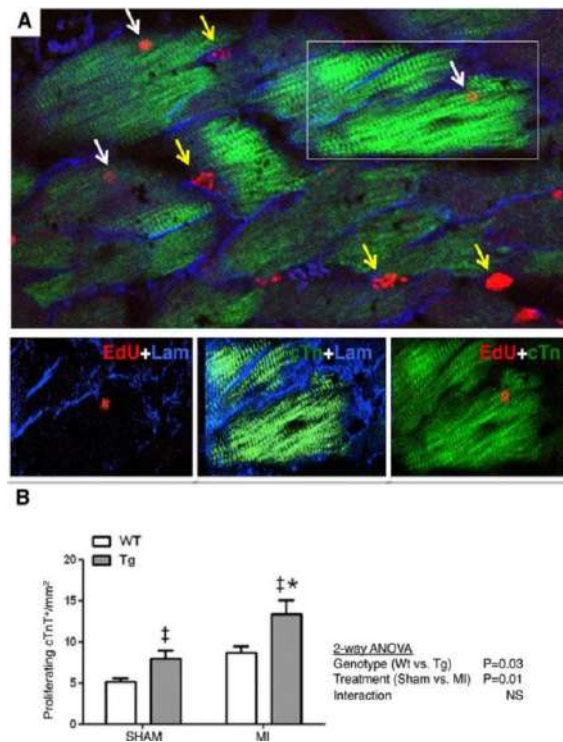


**Gambar 6.** HASF meningkatkan sintesis DNA pada kardiomyosit neonatal secara *in vitro*. A, Ambilan BrdU oleh kardiomyosit neonatal diukur dengan ELISA. FGF1 (5,8 nmol/L) sebagai kontrol positif. B, Image representatif kardiomyosit BrdU+ dengan atau tanpa pengobatan hypoxia and Akt induced stem cell factor (HASF) dilihat di bawah mikroskop konfokal. Pembesaran dapat dilihat pada gambar inset di sebelah kanan. C, perhitungan kardiomyosit neonatal BrdU + cTnT + 7 hari setelah pengobatan dengan HASF. Cardiac troponin T (cTnT; merah), BrdU (hijau), dan nuclear 4',6-diamidino-2-phenylindole (biru). \*P<0.05 versus tidak diberi pengobatan.

Dikutip dari Beigi F, Schmeckpeper J, Pow-anpongkul P, Payne JA, Zhang L, Zhang Z, Huang J, Mirotsoiu M, Dzau VJ. *C3orf58, a novel paracrine protein, stimulates cardiomyocyte cell-cycle progression through the PI3K-AKT-CDK7 pathway. Circ Res. 2013;113:372-380.*

Selain itu, siklus sel juga dapat dipelajari dengan alat flow cytometry. Flow cytometry adalah suatu teknik pengukuran (*metry*) terhadap sifat sel (*cyto*) ketika sel bergerak di dalam aliran cairan (*flow*).<sup>4</sup>

Pemeriksaan ini juga memungkinkan analisis kimia pada satu sel.<sup>1</sup> Proses pemisahan sel dengan menggunakan pewarna *fluorescence* atau antibody dengan flow cytometry dikenal sebagai *fluorescence-activated cell sorting* (FACS). Dengan menggunakan FACS Calibur, saya dapat mempelajari marker stem cell endotel yaitu CD34+ sebagai antigen. Dengan menggunakan *monoclonal antibody*, memungkinkan pemeriksaan stem cell CD34+ seseorang, sehingga saya dapat mengetahui kapasitas regeneratif stem sel.



**Gambar 7.** Hypoxia and Akt induced stem cell factor (HASF) menginduksi sintesis DNA pada kardiomyosit dewasa secara *in vivo*. A, Image representatif jaringan jantung dewasa pada area peri-infarct 2 minggu pasca infarct miokard (MI) dilihat di bawah mikroskop konfokal (Å~40), menunjukkan proliferasi kardiomyosit cTnT+ (panah putih) dan proliferasi cTnTneg nonkardiomyosit (panah kuning). Contoh kardiomyosit proliferasi (kotak) dapat dilihat pada inset yang diperbesar di bawah. 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) (merah), cardiac troponin T (cTnT; hijau) dan lamini (Lam; biru). B, perhitungan jumlah total EdU+ atau BrdU + dari kardiomyosit cTnT+ yang berproliferasi. †P<0.05 for ‡Tg versus WT untuk efek pengobatan for dan \*P<0.05 untuk Tg-MI versus WT-MI.

Dikutip dari Beigi F, Schmeckpeper J, Pow-anpongkul P, Payne JA, Zhang L, Zhang Z, Huang J, Mirotsoiu M, Dzau VJ. *C3orf58, a novel paracrine protein, stimulates cardiomyocyte cell-cycle progression through the PI3K-AKT-CDK7 pathway. Circ Res. 2013;113:372-380.*

## STEM CELL

Sel membentuk berbagai jaringan tubuh dapat menjalankan berbagai fungsi berbeda. Misalnya, sel saraf mengirimkan sinyal elektrik, sel retina berespon terhadap cahaya. Sel tulang sebagai penyangga tubuh dan mengatur kadar kalsium, sel darah merah mengangkut oksigen, dan sel otot berfungsi untuk pergerakan.

Apa yang membedakan stem cell dari sel. Apa yang membuat sel dalam berbagai jaringan memiliki fungsi yang berbeda dengan proses siklus sel yang sama? Mengapa hal ini bisa terjadi?

Semua jenis sel didalam tubuh berasal dari stem cell selama proses perkembangan fetus. Terdapat tiga sifat yang membedakan stem cell dengan sel :

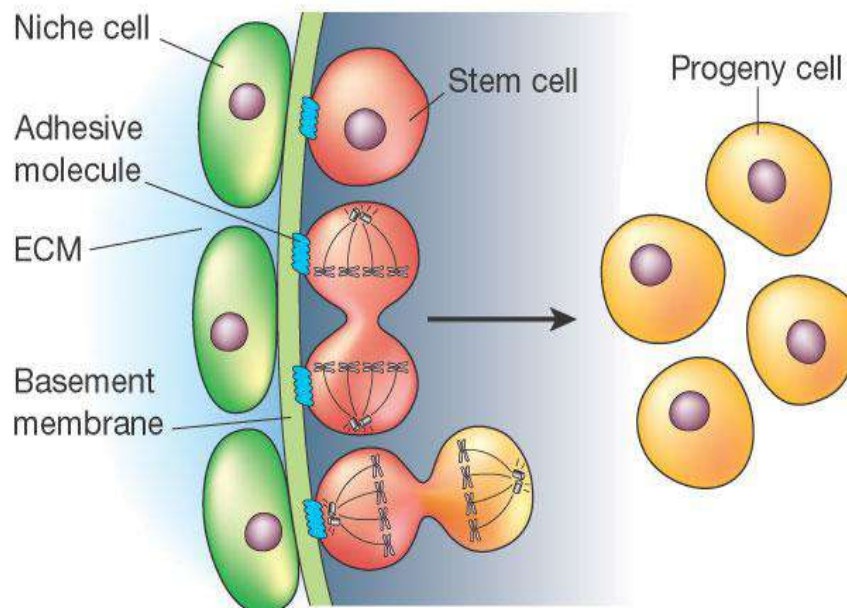
1. Mampu memperbanyak diri (self renewal) dan berdiferensiasi menghasilkan sel anak.
2. Dalam kondisi tidak berdiferensiasi (unspecialized).
3. Dapat berdiferensiasi menjadi jenis sel lain dalam kondisi sesuai.<sup>5</sup>

Dengan sifat ini, stem cell merupakan sumber pengganti sel dengan potensi mengobati berbagai penyakit pada manusia. Misalnya, terdapat dua juta

stem cell di dalam sumsum tulang membelah setiap detik untuk mempertahankan jumlah sel darah merah yang memadai di dalam tubuh. 1 Stem cell berada di dalam "niche" atau lingkungan mikro jaringan seperti di sumsum tulang dalam kondisi "diam" atau "dormant", namun dapat diaktivasi masuk ke dalam siklus sel atau setelah mengalami injuri.<sup>6,7</sup>

Meskipun penggunaan stem cell baru berkembang dalam satu atau lebih dekade ini, stem cell sebenarnya telah dikenal lebih dari satu abad yang lalu oleh Alexander A. Moximow.<sup>8</sup> Dalam 2 dekade ini, embryonic human stem cell dapat dikultur di luar tubuh sehingga dapat dipelajari perilaku stem cell, dilakukan rekayasa genetik atau diubah menjadi tipe sel lain dengan faktor kimia, sehingga dapat digunakan sebagai awal perkembangan terapi stem cell.<sup>9</sup>

Telah diketahui bahwa stem cell bersifat *self renewal*, berproliferasi untuk memperbanyak diri dan berdiferensiasi, karena stem cell sendiri dalam kondisi *undifferentiated*. Hanya saja, perlu diketahui bahwa stem cell pada tahap perkembangan yang berbeda memiliki kapasitas *self renewal* dan diferensiasi berbeda. Karena itu, jenis stem cell mana terbaik digunakan dalam aplikasi klinis masih menimbulkan perdebatan.



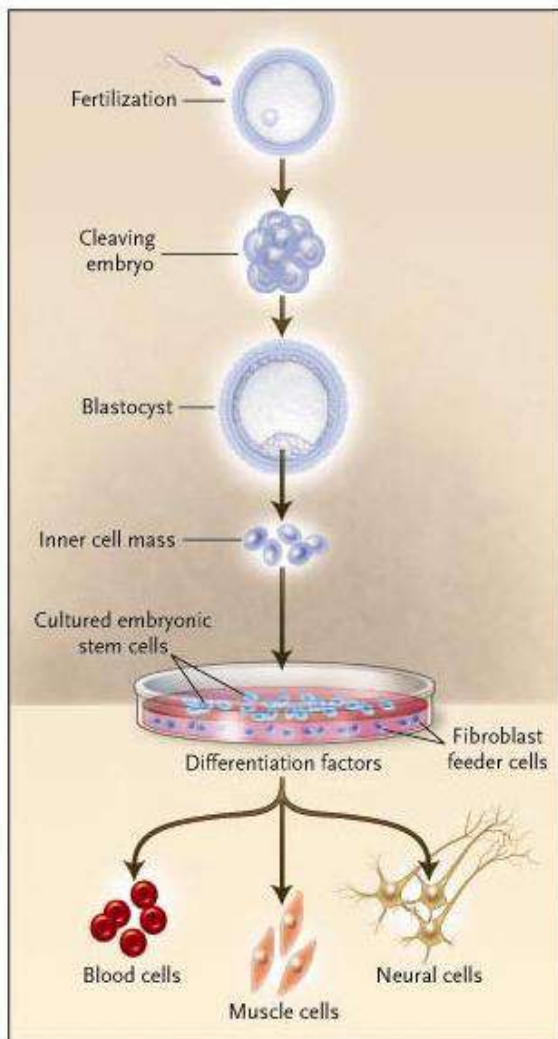
**Gambar 8.** Sel niche (hijau) terdapat di *basement membrane* memberi signal ke stem cell (merah) untuk memblokir diferensiasi dan mengatur pembelahan. Jika mekanisme *lineage* dominan (sel mitotik rendah), stem cell membelah dengan satu sel anak berhubungan dengan *niche*, sedangkan sel lain (kuning) mengadakan diferensiasi. Ketika mekanisme populasi dominan (sel mitotik tinggi), pembelahan stem cell dapat berlangsung simetrik atau asimetrik (tidak ditunjukkan), bergantung pada faktor lokal. ECM, extracellular matrix.

Dikutip dari Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. *Stem cells find their niche. Nature 2001; 414: 98-104.*



**JENIS STEM CELL**

Tiga jenis stem cell yang telah digunakan dalam penelitian : stem cell dewasa (adult stem cell), stem cell embrio (embryonic stem cell, ESC) dan induced pluripotent stem cell. Embryonic stem cell biasanya berasal dari hasil invitro fertilization (IVF), atau hasil fertilisasi secara *in vitro* dikenal sebagai bayi tabung, yang disumbangkan untuk penelitian dengan *informed consent* dari donor. ESC berasal dari *inner cell mass* blastocyst yang mempunyai sifat pluripoten, artinya dapat membentuk ketiga lapisan sel germinal, baik endoderm, mesoderm dan ectoderm (Gambar 9).<sup>10</sup>



**Gambar 9.** Embryonic stem cell berasal dari *inner cell mass* blastocyst; sel yang menyusun *inner cell mass* diisolasikan dan dikultur pada media kultur, dengan selapis feeder cells.

Dikutip dari Gearhart J. *New human embryonic stem-cell lines - more is better.* *N Engl J Med* 2004; 350: 1275-1276.

**EMBRYONIC STEM CELL**

Embryonic stem cell (ESC) pertama kali diisolasikan dari mencit tahun 1981 oleh Martin Evans, dan Kaufman yang diperoleh dari blastocyst.<sup>11</sup> ES lines yang dikultur di media membuka lembaran baru untuk mendapatkan stem cell pluripoten yang dapat menghasilkan semua jenis tubuh.<sup>12</sup> Meskipun diferensiasi ESC ini dapat membentuk tumor teratoma pada tempat ektopik, namun lebih mudah dikontrol daripada sel embryonic carcinoma.<sup>13</sup> Tahun 1998, James Thomson melaporkan pertama kali penemuan embryonic stem cell manusia dan sejak itu, terapi stem cell mendapat perhatian dari para ilmuwan dan publik.<sup>9</sup> Satu tim peneliti dari *Advanced Cell Technology* melaporkan bahwa transplantasi menggunakan embryonic stem cell pluripoten yaitu sel retinal pigment epithelial (RPE) pada pasien dengan degenerasi makula mendapatkan perbaikan tajam penglihatan 4 bulan tanpa pembentukan tumor atau rejeksi imun. (Gambar 10).<sup>14</sup> Hasil penelitian yang juga dilaporkan kelompok peneliti yang sama mendapatkan keamanan penggunaan hESC jangka panjang pada pasien dengan degenerasi makula dan distrofi makula Stargardt.<sup>15</sup>

Karena itu, embryonic stem cell dapat digunakan dalam kedokteran regeneratif sebagai sumber sel baru untuk berbagai penyakit yang memerlukan perbaikan dan pergantian jaringan akibat hilangnya atau disfungsi jaringan oleh berbagai penyakit kronik<sup>14,14</sup>

Optimisasi kultur human embryonic stem cell (hESCs) lines atau embryonic stem cell manusia secara *in vitro* telah mengalami perkembangan dalam satu dekade ini. hESC semula dikultur menggunakan media pertumbuhan mengandung *fetal calf serum* atau derivat hewan lainnya, bersama dengan selapis fibroblast sebagai “feeder” cell untuk menopang faktor pertumbuhan (Gambar 9).<sup>10</sup> Penggunaan produk hewan menghalangi penggunaan dalam terapi, karena dikhawatirkan adanya patogen hewan atau terkontaminasi prion selama kultur. Karena itu, dikembangkan serum bukan produk hewan (xeno-free) malah media tanpa serum (serum-free) yang digunakan sekarang agar dapat digunakan dalam klinis.<sup>16</sup>

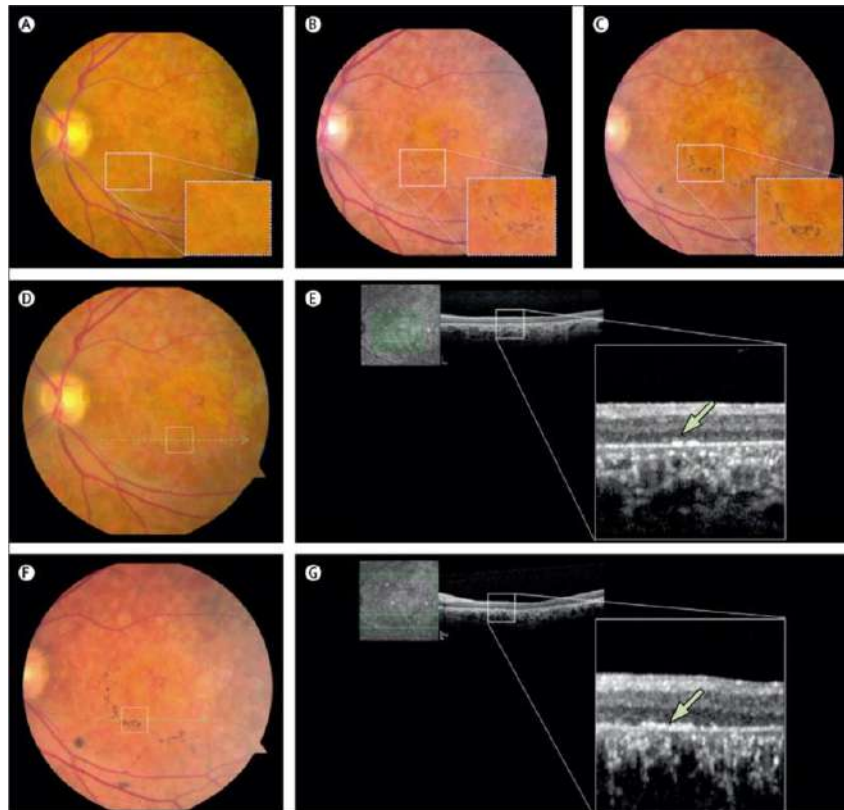
Kardiomyosit yang diperoleh dari hESC, diisolasi dari *embryoid bodies* melalui metode diseksi mekanik atau enzimatik,<sup>17</sup> memperlihatkan



morfologi kardiomyosit dewasa dengan struktur sarkomerik dan ekspresi faktor transkriptor seperti NK2 homeobox 5 (Nkx2.5), GATA binding protein (GATA-4), *myocyte-specific enhancer factor 2C* (MEF2C).<sup>18</sup> Sel ini juga memperlihatkan aktivitas denyutan spontan dengan potensial aksi atrium, ventrikel dan nodal.<sup>19,20</sup> Dalam studi Manard et al., menggunakan ESC jantung mencit, ditransplantasikan ke miokard domba dengan infark mengalami diferensiasi menjadi kardiomyosit dan meningkatkan fungsi jantung.<sup>21</sup> Penelitian Cai et al., melaporkan bahwa terjadi pembentukan graft kardiomyosit dengan penggunaan kardiomyosit diperoleh dari ESC pada mencit, menyebabkan perbaikan fungsi jantung dan pengurangan remodeling, namun terjadi pembentukan teratoma,

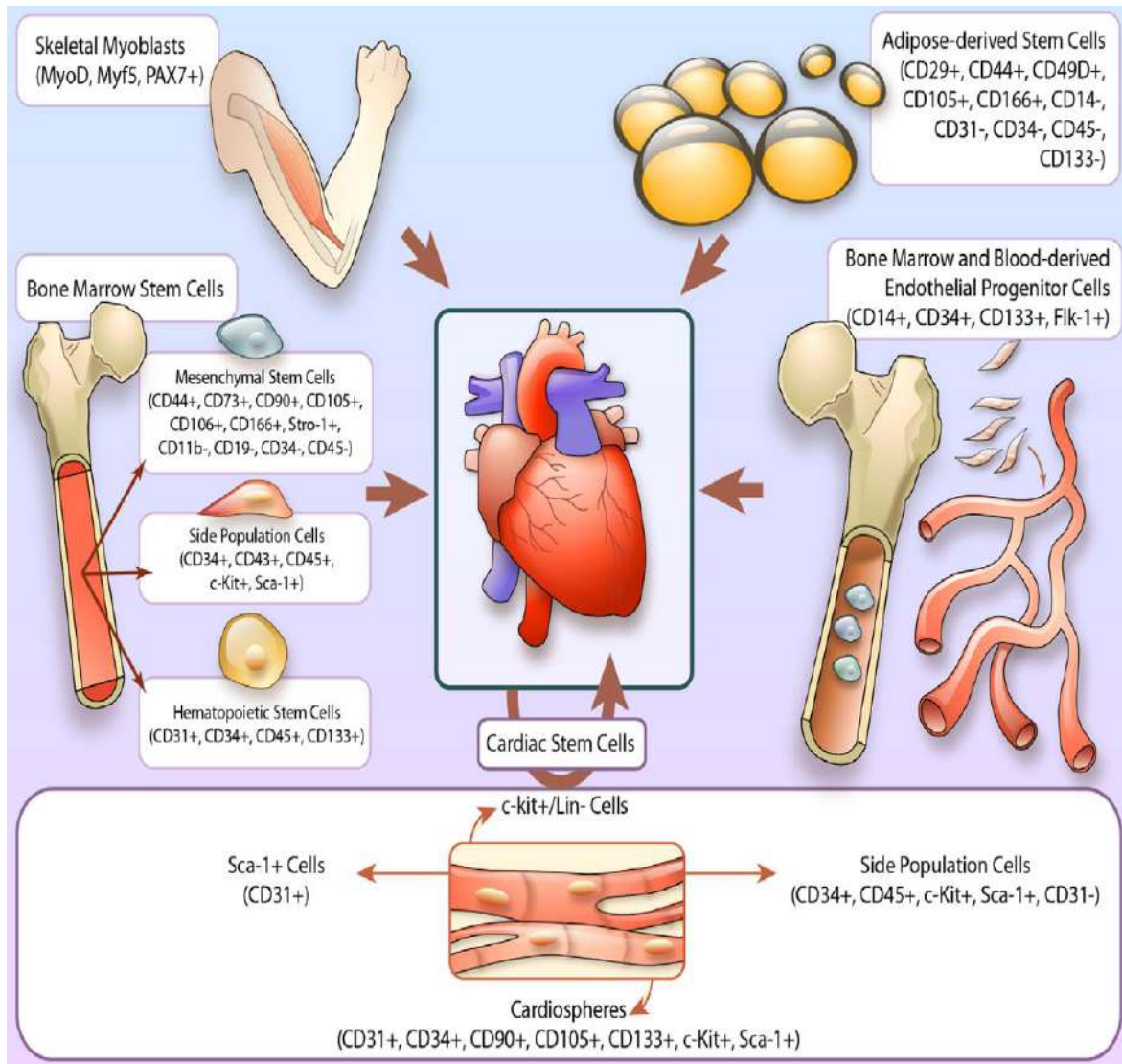
tumor pada jantung.<sup>22</sup>

Meskipun kapasitas ESC dapat berdiferensiasi menjadi jantung, masalah etika dan kekhawatiran biologik seperti pembentukan teratoma, dan rejeksi graft,<sup>23</sup> menghalangi penggunaan terapi embryonic stem cell pada pasien.<sup>24</sup> Pembentukan teratoma mencegah penggunaan ESC dalam uji klinis, meskipun dilakukan manipulasi ESC.<sup>25,26</sup> Belum ada satu uji klinis yang menggunakan ESC pada penyakit kardiovaskuler sampai saat ini. Namun dalam kurun waktu 2 dekade belakangan ini, penggunaan adult stem cell telah dilakukan pada beribu-ribu pasien dengan hasil aman digunakan, sehingga memungkinkan uji klinis fase II dan fase III.<sup>24</sup>



**Gambar 10.** Tempat transplantasi hESC-RPE (human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium) pada pasien distrofi makula Stargardt. Foto fundus berwarna pada makula kiri sebelum dan sesudah operasi (A-C). Regio di dalam kotak adalah batas transplantasi yang dilakukan sesuai dengan tempat atrofi makula. (A) image makula dengan RPE dan atrofi makula neurosensori sebelum operasi (baseline). Tampak berkurangnya pigmentasi, menunjukkan regio atrofi RPE *baseline*. Pigmentasi ini meningkat pada minggu ke 6 sesudah operasi (C). (D-G) foto fundus berwarna dan image SD-OCT pada *baseline* (D) dan bulan ke 3 setelah transplantasi (F). Image berwarna menunjukkan peningkatan pigmentasi pada level RPE dari *baseline* ke bulan ke 3. Image SD-OCT (E,G) menunjukkan peningkatan pigmentasi pada level RPE dengan *engraftment* RPE satu lapis normal, dan survival pada bulan ke 3 (panah) dekat regio membrane Bruch tanpa RPE. hESC=human embryonic stem cells. RPE=retinal pigment epithelium. SD-OCT=spectral domain ocular coherence tomography.

Dikutip dari Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G, Franco-Cardenas V, Pan CK, Ostrick RM, Mickunas E, Gay R, Klimanskaya I, Lanza R. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet* 2012; 379: 713–20.



**Gambar 11.** Sumber stem cell digunakan untuk perbaikan fungsi jantung. Yang termasuk bone marrow-derived stem cell mencakup *hematopoietic stem cell*, *endothelial progenitor cell* dan *nonhematopoietic stem cell* (*mesenchymal stem cello*, dan *unfractionized mononuclear cell*).

Dikutip dari Sanganalmath SK, Bolli R. *Cell therapy for heart failure. A comprehensive overview of experimental and clinical studies. Current challenges, and future directions. Circ Res. 2013;113:810-834.*

**ADULT STEM CELL**

**BONE MARROW-DERIVED STEM CELL**

Sumsum tulang mengandung adult stem cell; hematopoietic stem cell dan nonhematopoietic stem cell, yang berpotensi berdiferensiasi menjadi fenotipe stem cell (Gambar 11).<sup>24</sup> Stem cell di dalam sumsum mudah diperoleh baik dengan cara sentrifugasi gradient atau mobilisasi, sehingga banyak digunakan dalam penelitian preklinis dan klinis.<sup>24</sup>

Yang termasuk kelompok Bone Marrow-Derived Stem Cell adalah :

**HEMATOPOIETIC STEM CELL**

*Hematopoietic stem cell* (HSC) adalah satu-satunya sel di dalam sistem hematopoietik yang mempunyai sifat multipotensi dan self renewal. Multipotensi berarti kemampuan berdiferensiasi menjadi seluruh sel darah, sedangkan *self-renewal* adalah kemampuan untuk menghasilkan sel yang identik

dengan HSC tanpa diferensiasi.<sup>27</sup> Konsep *hematopoietic stem cell* pertama kali disampaikan oleh James Till dan Ernest McCulloch dari hasil penelitian terhadap sistem regenerasi di dalam darah mencit.<sup>27</sup>

Darah merupakan komponen sel yang mempunyai daya regenerasi amat tinggi. Setiap hari sebanyak 1 trilion sel darah ( $10^{12}$ ) dihasilkan oleh sumsum tulang. Namun para ahli anatomi memperhatikan adanya morfologi sel dan tingkat diferensiasi yang berbeda di dalam sel sumsum tulang. Dr. Alexander Maximow, pertama sekali mengemukakan bahwa keberagaman sel di dalam sumsum tulang berasal dari proses hematopoiesis yang tersusun di dalam satu sel prekursor dikenal sebagai hematopoietic stem cell (HSC). Maka lahirlah istilah stem cell tahun 1909, yang disampaikan ilmuwan Rusia ini.<sup>28</sup>

Kejadian jatuhnya bom atom di Hiroshima dan Nagasaki tahun 1945 mengakibatkan ratusan ribu korban. Penelitian retrospektif menunjukkan bahwa para korban meninggal dengan dosis radiasi terkecil akibat gagal hematopoetik. Namun, banyak di antara yang selamat menderita leukemia akibat radiasi. Pengamatan dengan mikroskop menunjukkan bahwa sumsum tulang normal bersifat radiosensitif.<sup>29</sup> Ray Owen tahun 1945 mengamati bahwa sapi kembar jantan yang memiliki satu plasenta dapat saling membagi sel darah.<sup>30</sup> Pengamatan ini mendasari penelitian Medawar dan Bellingham tahun 1953 yang mendapatkan graft kulit pada kembar heterozigot dan homozigot (identik) hampir dapat ditoleransi dalam sel hematopoetik. Penemuan Medawar ini menghantarkan beliau mendapat hadiah Nobel bidang kedokteran tahun 1960.<sup>30</sup>

Penelitian pada mencit tahun 1950 mendapatkan bahwa sindroma radiasi dapat dicegah dengan melindungi limpa dengan tembaga,<sup>31</sup> atau **menyuntikan** sel limpa atau sumsum tulang.<sup>32,33</sup> Hasil penelitian membuka jalan perkembangan transplantasi sel hematopoetik.<sup>30</sup> Pengamatan Till dan McCulloch tahun 1961 dari penelitian menggunakan mencit yang diberi sel sumsum dari mencit lain (alogenik) mendapatkan bahwa di dalam limpa mencit resipien terbentuk koloni sel pada hari ke 10.<sup>34</sup> Koloni sel dinamakan colony-forming cell spleen (CFU-S) yang terdiri dari berbagai sel diferensiasi. Till dan McCulloch mengusulkan bahwa koloni sel ini adalah *hematopoietic stem cell*, karena sel ini bersifat *self-renewal* dan mampu menghasilkan semua jenis darah.<sup>30</sup> Penelitian berikutnya membuktikan bahwa CFU-S adalah sel

klonogenik tunggal, yang mampu menghasilkan lebih banyak *myeloerythroid colony-forming cells* pada mencit yang diradiasi dengan dosis subletal.<sup>35</sup> Penelitian secara *in vivo* dilanjutkan oleh Pluznik dan Sachs, yang meneliti karakteristik HSC dan mengidentifikasi growth factor yaitu G-CSF untuk sel hematopoetik. Dalam perkembangan selanjutnya, dapat diidentifikasi CD34 sebagai marker HSC dan progenitor cells.<sup>36</sup>

Weissman dan kolega menggunakan monoclonal antibody mengisolasi repopulating cells jangka panjang pada mencit,<sup>37</sup> dan mendapatkan bahwa stem cell terdapat di dalam satu populasi dengan marker : c-Kit+, Thy-1.1, lineage marker<sup>neg</sup>, dan Sca+ (KTLS). Populasi HSC ini bersifat *multilineage* pada mencit karena mampu melakukan rekonstitusi jangka panjang (3 bulan) pada seluruh sistem hematopoiesis pada mencit yang diberikan penyinaran dosis mematikan meskipun jumlahnya hanya 0.05% dari sel sumsum tulang.<sup>30</sup> Osawa et al., melakukan isolasi HSC mencit dengan efisiensi cloning 90% secara *in vitro* dan memberikan kepada mencit yang telah mendapat penyinaran dosis letal, juga mampu menginduksi hematopoiesis.<sup>38</sup>

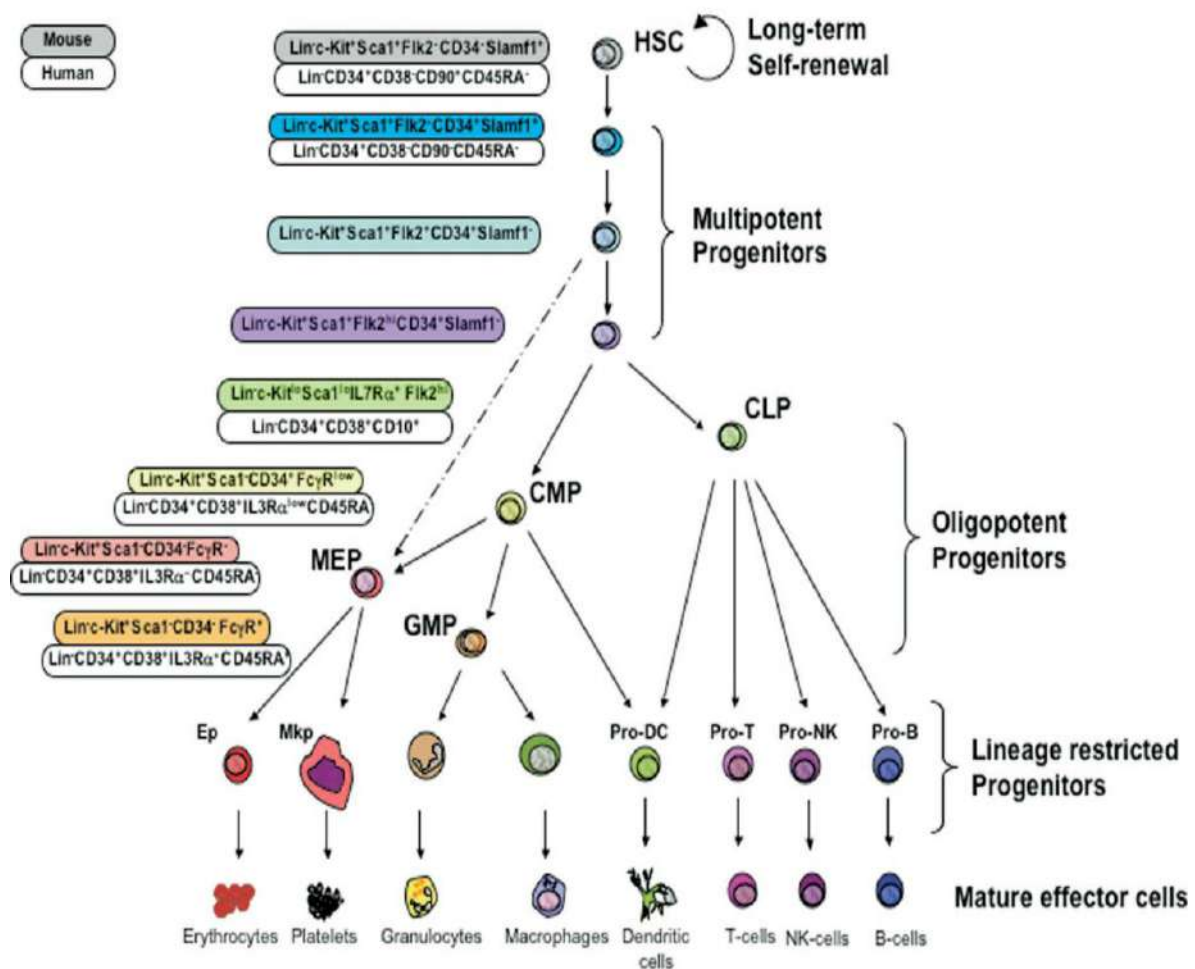
Hal yang sama terjadi pada manusia. Dengan pemurnian HSC yang menunjukkan marker CD34+, Thy+, Lin-, CD38- dan CD34RA-, diberikan kepada mencit dengan gangguan imun berat (*severe combined immunodeficiency*, SCID), mampu menimbulkan hematopoiesis.<sup>27</sup> Hal ini menunjukkan bahwa populasi sel HSC manusia mempunyai kemampuan daya regenerasi meskipun sulit menentukan efek jangka panjang. Struktur hierarki perkembangan hematopoetik sebagai multipotensi secara progresif mengalami keterbatasan (**Gambar 12**).<sup>30</sup> Pada awalnya, HSC menghasilkan MPP (multipotent progenitors) yang tidak memiliki sifat *self-renewal*, namun berdiferensiasi dalam skala penuh, yaitu berdiferensiasi menjadi CLP (*common lymphoid progenitor*) dan CMP (*common myeloid progenitor*). Progenitor oligopotensi ini menghasilkan sel efektor *megakaryocyte/erythrocyte progenitors* (MEPs) and *granulocyte/macrophage progenitors* (GMPs), sedangkan CLL menghasilkan progenitor limfosit T dan B matang, natural killer (NK) cells. Sedangkan CLL dan CMP sama-sama menghasilkan sel dendritik (**Gambar 12**).<sup>30</sup>

Marker sel permukaan pertama sekali diperoleh pada HSC manusia adalah CD34, suatu ligand L-selectin yang hanya berjumlah 0.5-5% dari sel darah di dalam hati fetus manusia, darah plasenta dan sumsum tulang dewasa.<sup>39,40,41</sup> Semua sel CD34+

bersifat multipotensi<sup>27</sup> artinya dapat menghasilkan semua jenis sel darah juga sel endotel vaskuler, terutama pada ujung pembuluh darah, tempat proliferasi paling aktif terjadi.<sup>42</sup> Sel endotel memiliki plastisitas tinggi untuk memberikan respon terhadap signal angiogenik.<sup>43</sup> Angiogenesis adalah proses pertumbuhan pembuluh darah melalui tumbuhnya percabangan daripembuluh darah yang sudah ada.<sup>43</sup> Sel endotel menjadi motil, aktif membentuk filopodia akibat respon terhadap signal angiogenik, seperti vascular endothelial growth factor (VEGF), yang

dihasilkan CD34+ stem cell. Melalui pembentuk ujung sel, terbentuk lumen dan berproliferasi untuk menopang pemanjangan lumen (Gambar 13B).<sup>43</sup> Ujung sel beranastomosis dengan pertumbuhan sel lain membentuk loop pembuluh darah. Dengan masuknya aliran darah, pembentukan *basement membrane*, **rekrutmen** sel mural untuk menstabilkan hubungan, maka diakhiri dengan berhentiknya signal angiogenik, maka kondisi ini kembali menjadi tidak aktif (*quiescence*) setelah terbentuk pembuluh darah baru. (Gambar 13 C) (Gambar 14).<sup>43</sup>

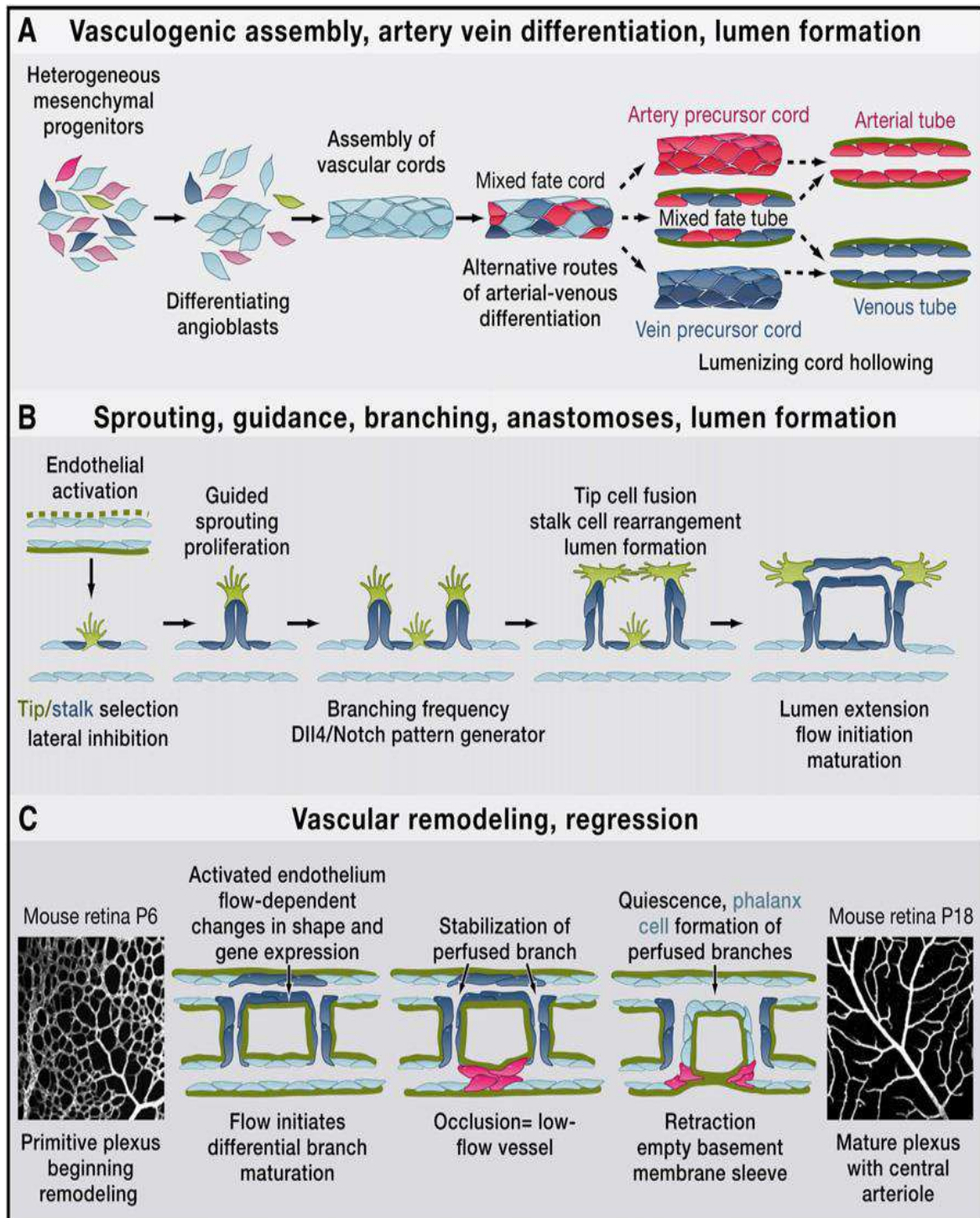
## Hematopoietic Hierarchy



**Gambar 12.** Perkembangan hematopoietik menunjukkan hierarki diferensiasi hematopoietik. Pertanda permukaan isolasi pada manusia (atas) dan mencit (bawah) menunjukkan stem dan progenitor cell. HSC menunjukkan rekonstitusi jangka panjang, self renewing; MPP, multipotent progenitor cell dengan self renewal terbatas ; CMP, common myeloid progenitor; CLP, common lymphoid progenitor; BLP, B lymphocyte progenitor; ProT, T-cell progenitor; GMP, granulocyte/macrophage progenitor; MEP, megakaryocyte/erythroid progenitor; Mkp, megakaryocyte progenitor; EP, erythroid progenitor.

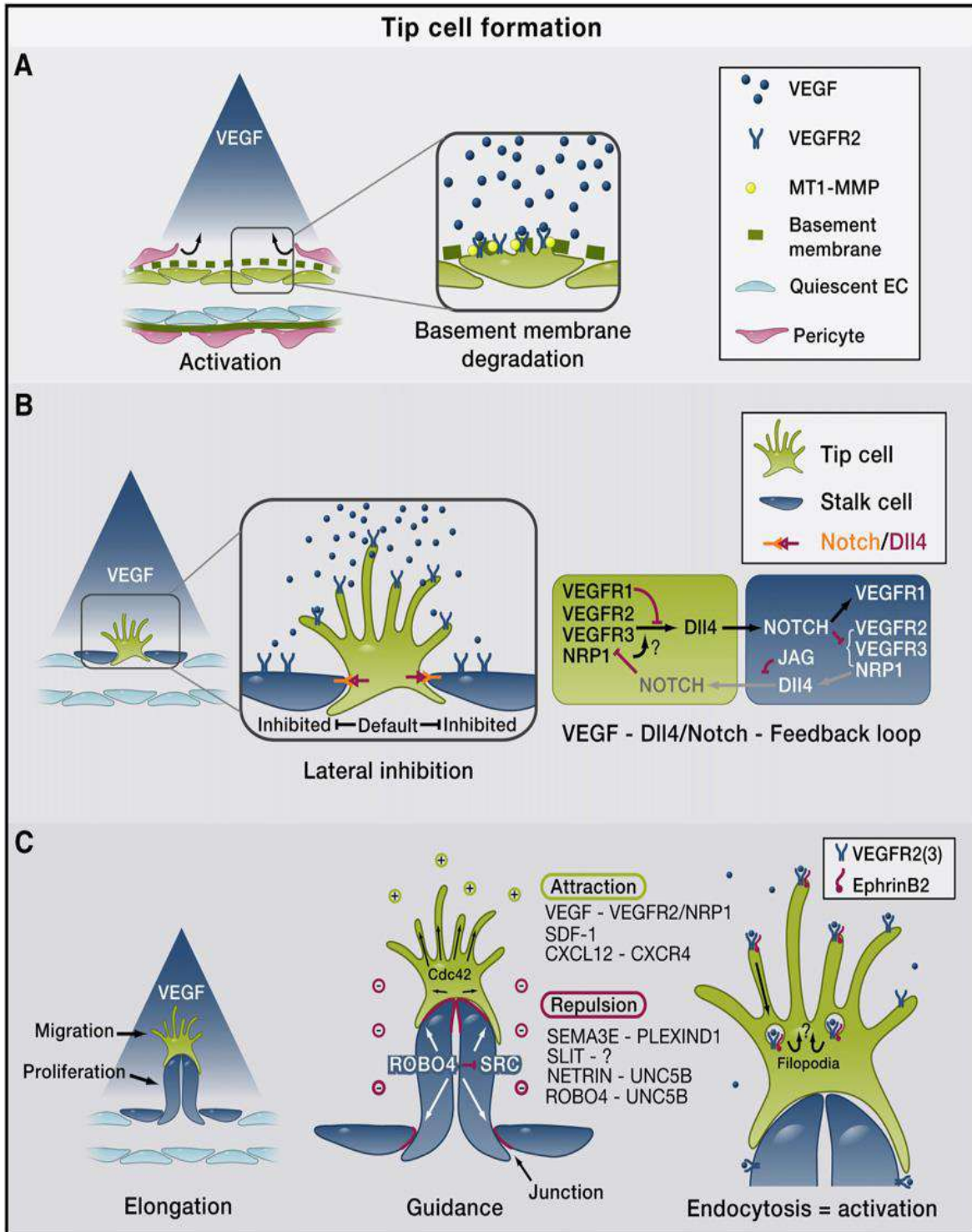
Dikutip dari Weissman IL, Shizuru JA. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood*. 2008;112:3543-3553.





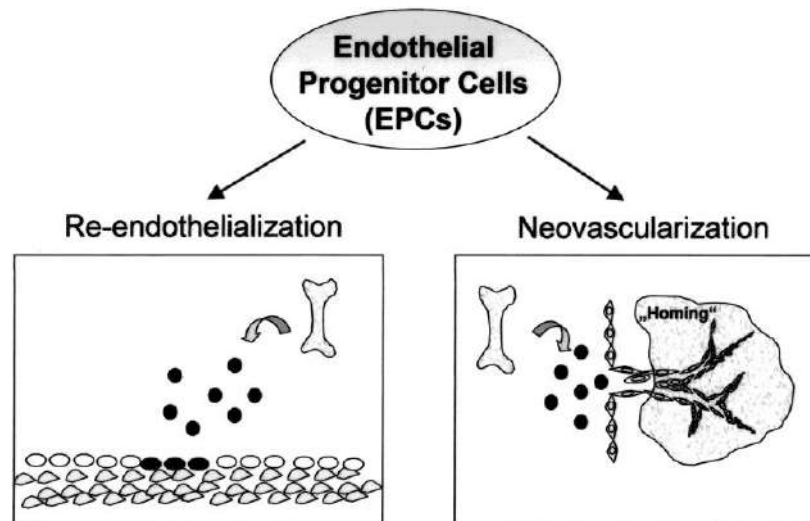
**Gambar 13.** Pembentukan pembuluh darah (A) Angioblast berdifereiasi menjadi sel endotel, membentuk cetakan pembuluh darah, **lumen** dan sebagai awal fenotipe arteri dan vena (B) Langkah pertumbuhan pembuluh darah : !1) seleksi ujung/batang sel; (2) navigasi ujung sel dan proliferasi batang sel; (3) koordinasi percabangan; (4) elongasi batang sel, fusi ujung sel dan pembentukan lumen ; dan (5) perfusi dan maturasi pembuluh darah. (C) Langkah sekuensi remodeling **vaskuler** dari primitif (kotak kiri) menjadi pleksus pembuluh darah yang matur (kotak kanan) termasuk **fenotipe** falang endotel, deposisi *basement membrane*, penutupan dengan perisit dan regresi percabangan.

Dikutip dari Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. *Basic and therapeutic aspects of angiogenesis*. Cell 2011;146:873-887.



**Gambar 14.** Pembentukan ujung sel. (A) Sebagai respon terhadap rangsangan vascular endothelial growth factor (VEGF) sel endotel (EC) terlepas dari *basement membrane* dan perisit terlepas, memungkinkan sel endotel bermigrasi (B) VSGF/Notch signaling **menyeleksi** ujung dan batang sel (C) Filopodia mengarahkan ujung sel dengan melalui respon terhadap rangsangan. Pembentukan filopodia diatur oleh CDC42 dan endositosis reseptor EphrinB2/VEGFR2. Signaling ROBO4/UNC5B diperlukan untuk menstabilkan lapisan endotel dengan menghmbat SRC.

Dikutip dari Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. *Basic and therapeutic aspects of angiogenesis.* Cell 2011;146:873-887.



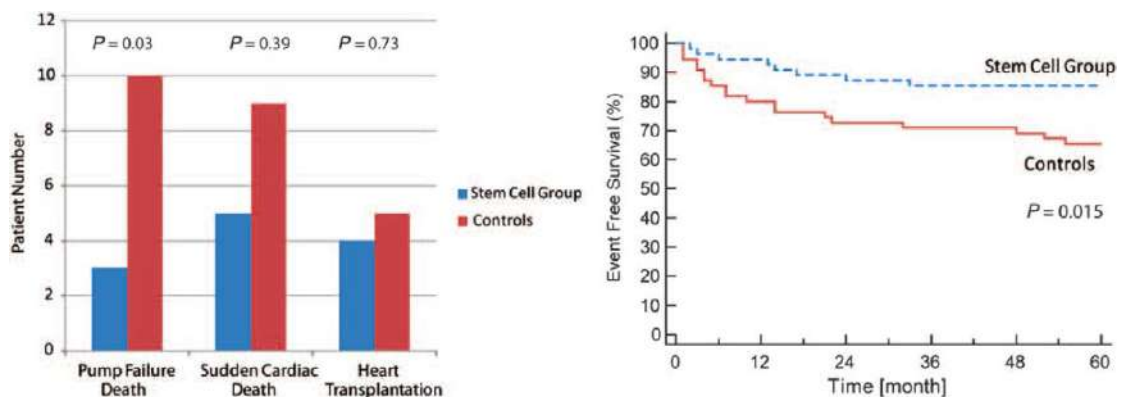
**Gambar 15.** Peran *endothelial progenitor cell* (EPC) terhadap biologi vaskuler. Penyuntikan EPC menyebabkan reendotelialisasi dan neovaskularisasi pembuluh darah setelah injuri.

Dikutip dari Urbich C, Dimmeler S. *Endothelial progenitor cells. characterization and role in vascular biology. Circ Res. 2004;95:343-353.*

Karena itu, CD34+ stem cell sebagai bagian dari *endothelial progenitor cell* dapat meregenerasikan sel endotel pada pembuluh darah yang mengalami iskemia melalui proses neovaskularisasi dan re-endothelialisasi (Gambar 15).<sup>44,45</sup>

Transplantasi CD34+ secara autologous telah dilakukan pada pasien dengan kardiomiopati iskemik<sup>46</sup> dan noniskemik.<sup>47,48</sup> Penyuntikan CD34+ stem cell ke area periinfark ketika dilakukan *coronary* bypass secara off-pump meningkatkan fungsi kontraksi dibandingkan hanya dengan *coronary bypass*.<sup>46</sup> Penelitian menggunakan CD34+

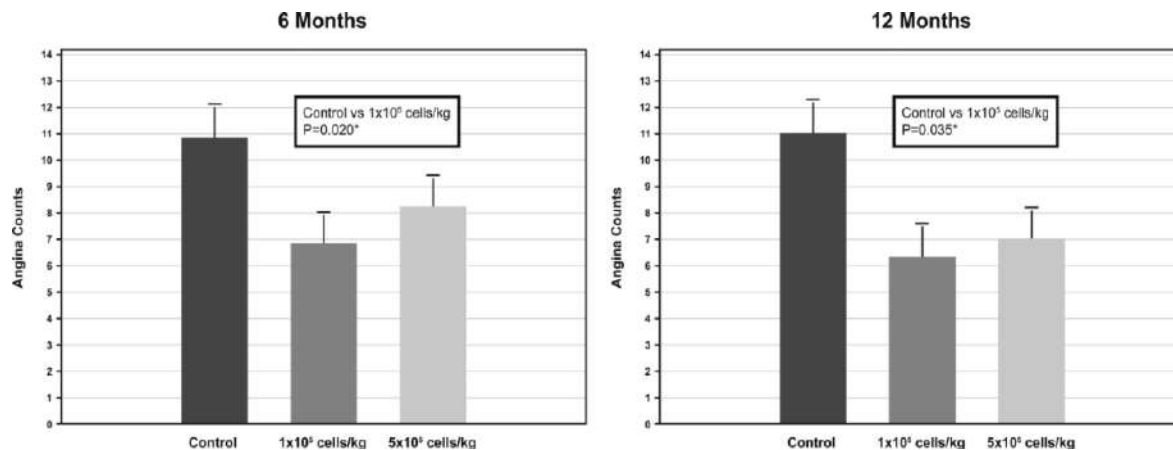
atau CD133-, CD34+ secara intrakoronaria pada pasien dengan infark miokard anterior juga **mendapatkan** perbaikan perfusi regional dan remodeling ventrikel kiri.<sup>49</sup> Vrtovec et al., dalam penelitian terhadap pasien kardiomiopati noniskemik dengan **menyuntikan** CD34+ cell secara intrakoronaria juga mendapatkan peningkatan fraksi ejeksi ventrikel kiri dan jarak jalan 6 menit serta penurunan kadar N-terminal probrain natriuretic peptide.<sup>47</sup> Penelitian lebih lanjut oleh kelompok peneliti yang sama mendapatkan bahwa efek ini bertahan dalam jangka waktu 5 tahun dengan menurunnya angka kematian (Gambar 16).<sup>48</sup>



**Gambar 16.** Survival dan penyebab kematian pada pasien diberikan stem cell CD34+ dan kontrol. Survival 5 tahun dievaluasi dengan analisis Kaplan-Meier mendapatkan 2,3 kali lebih tinggi pada kelompok stem cell dibandingkan dengan kelompok kontrol (kanan), terutama karena mortalitas akibat gagal pompa (kiri).

Dikutip dari Vrtovec B, Poglajen G, Lezaic L, Sever M, Domanovic D, Cernelc P, Socan A, Schrepfer S, Torre Amione G, Haddad F, Wu JC. *Effects of intracoronary CD34+ stem cell transplantation in nonischemic dilated cardiomyopathy patients: 5-year follow-up. Circ Res. 2013;112:165-173.*





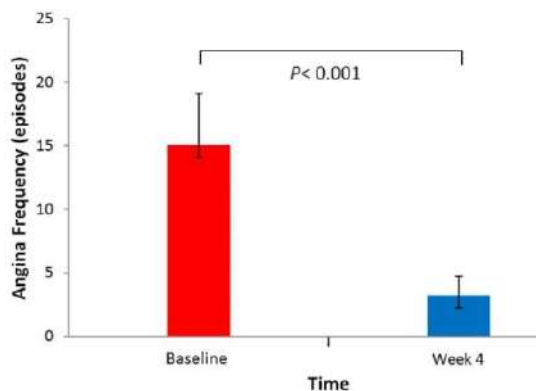
**Gambar 17.** Insiden angina per minggu pada bulan 6 dan bulan 12.

Dikutip dari Losordo DW, Henry TD, Davidson C, Lee JS, Costa MA, Bass T, Mendelsohn F, Fortuin FD, Pepine CJ, Traverse JH, Amrani D, Ewenstein BM, Riedel N, Story K, Barker K, Povsic TJ, Harrington RA, Schatz RA, the ACT34-CMI Investigators. Intramyocardial, autologous CD34+ cell therapy for refractory angina. *Circ Res.*2011;109: 428-436.

Penelitian Losordo et al., pada pasien angina refrakter menggunakan **penyuntikan** CD34+ intramiokard secara autologus dengan dua dosis; 1x10<sup>5</sup> atau 5x 10<sup>5</sup> cells/kg, terhadap 167 pasien mendapatkan penurunan frekuensi angina selama 6 bulan (6.8±1.1 versus 10.9±1.2, P< 0.020) dan 12 bulan (6.3±1.2 versus 11.0± 1.2, P< 0.035), dan durasi *exercise treadmill test* meningkat selama 6 bulan (139±151 versus 69±122 detik, P<0.014; 12 bulan : 140±171 versus 58 ±146 detik, P< 0.017) (Gambar 17).

Penelitian kami mendapatkan bahwa pasien dengan angina refrakter yang tidak bisa dilakukan balonisasi dengan tindakan angiografi koroner atau coronary *bypass* dapat dilakukan **penyuntikan** molekul untuk meningkatkan jumlah CD34+ stem cell dalam tubuh. Kemudian dilakukan tindakan apheresis untuk memisahkan jumlah stem cell di dalam satu kantong, lalu dilakukan transplantasi secara intravena. Hasil penelitian ini mendapatkan bahwa pasien yang diberikan stem cell mendapatkan penurunan angina secara signifikan pada minggu keempat (dari 15.07±4.03 vs 3.27±1.49, p<0.001) (Gambar 18), juga perbaikan toleransi olahraga dari 5.90±2.53 menit menjadi 8.41 ± 2.49 menit, p< 0.001) (Gambar 19).<sup>51</sup> Hasil penelitian ini telah dipresentasikan pada seminar Basic Cardiovascular Sciences (BCVS), American Heart Association (AHA) tertanggal 18-21 Juli 2016 di Phoenix, Arizona, Amerika Serikat. Metode penelitian yang bersifat non-invasif ini merupakan pertama dilakukan di dunia dengan mendapatkan hasil yang menggembirakan. Sehingga hasil penelitian ini

terpilih sebagai salah satu yang terbaik oleh AHA, dan diundang untuk memberikan presentasi pada pertemuan *Scientific Sessions*, American Heart Association, bulan November 2016.

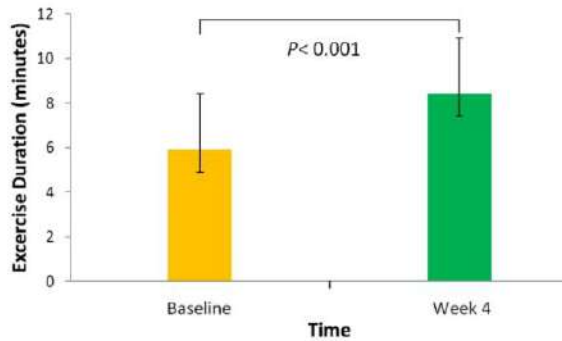


**Gambar 18.** Frekuensi angina pada *baseline* dan minggu ke 4 pada pasien dengan angina refrakter setelah dilakukan transplantasi CD34+ stem cell (15.07±4.03 versus 3.27±1.49, p<0.001).

Dikutip dari Lim H, Lindarto D, Zein U, Hariaji I. Intravenous mobilized autologous peripheral blood CD34+ stem cell transplantation for angina.

Dari berbagai penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa transplantasi CD34+ stem cell, baik yang berasal dari darah perifer maupun *bone marrow-derived stem cell* dapat digunakan pada berbagai kondisi penyakit jantung; infark miokard, gagal jantung iskemik dan noniskemik dan angina refrakter serta memberikan hasil yang baik untuk jangka pendek dan panjang.





**Gambar 19.** Exercise treadmill test menunjukkan perubahan signifikan pada durasi olahraga antara *baseline* dengan minggu ke 4 setelah dilakukan *transplantasi* stem cell ( $5.90 \pm 2.53$  versus  $8.41 \pm 2.49$ ,  $p < 0.001$ ).

Dikutip dari Lim H, Lindarto D, Zein U, Hariaji I. *Intravenous mobilized autologous peripheral blood CD34+ stem cell transplantation for angina.*

## NONHEMATOPOIETIC STEM CELL

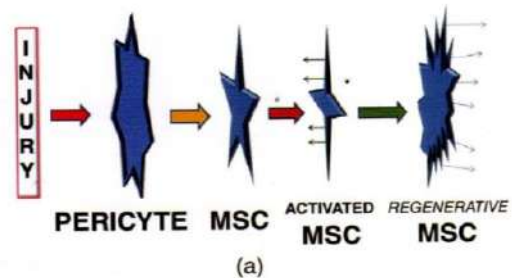
### MESENCHYMAL STEM CELL (MSC)

MSC, juga dikenal sebagai bone marrow stromal cells, adalah nonhematopoietic stem cell bersifat multipoten dan melekat pada kultur. MSC berdiferensiasi menjadi kondrosit, **adiposit**, osteoblast dan sel otot skeletal dan dilaporkan berdiferensiasi menjadi kardiomyosit<sup>52</sup> dan sel endotel,<sup>53,54</sup> namun potensi kardiogenik ini masih kontroversial.<sup>55</sup> Ekspresi MSC secara khusus adalah CD105, CD73, CD90 dan STRO-1, tidak memiliki marker *hematopoietic* seperti CD45, CD34, dan CD14/11b).<sup>56,57</sup> Selain terdapat di sumsum tulang, MSC juga dapat diisolasi dari darah perifer,<sup>58,59</sup> darah tali pusat,<sup>60</sup> jaringan adiposa,<sup>61</sup> jaringan sinovia,<sup>62</sup> dan jaringan paru,<sup>63</sup> bersifat heterogen karena potensi pertumbuhan berbeda namun marker permukaan dan potensi diferensiasi sama.<sup>64</sup>

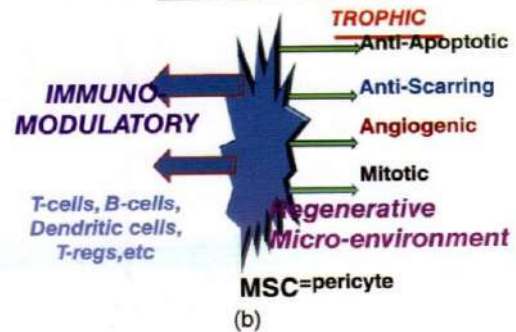
Semua jaringan pembentuk MSC memiliki suplai pembuluh darah yang baik. Ketika sel perivaskuler diisolasi, dikultur dan diperiksa menggunakan fluorescence activated cell sorting (FACS), maka tampak marker khas perisit dan MSC.<sup>65</sup> Karena itu, Caplan mengusulkan bahwa semua MSC adalah perisit.<sup>66</sup> Namun pericyte dengan diferensiasi tinggi bukan MSC. Dengan MSC sebagai **perisit**, maka MSC memiliki respon terhadap sel endotel. Perisit yang keluar dari pembuluh darah atau akibat inflamasi menjadi MSC. MSC aktif mensekresi dua jenis molekul bioaktif; **imunomodulasi** dan faktor trofik (Gambar 20).<sup>67</sup> Aktivitas **imunomodulasi**

menghambat limfosit sehingga mencegah kerusakan jaringan, yang berpotensi menimbulkan reaksi autoimun. Molekul trofik menghambat apoptosis akibat iskemia, pembentukan jaringan parut (scar) dan meningkatkan angiogenesis dengan mensekresi vascular endothelial growth factor (VEGF), yang menarik sel endotel (Gambar 14).<sup>43</sup>

### 2012 PROPOSED SEQUENCE OF CHANGE DUE TO INJURY:



### 2012 natural INJURY RESPONSE



**Gambar 20.** Injuri menginduksi pelepasan **perisit** yang menyebabkan MSC teraktivasi (A). MSC teraktivasi mensekresi sejumlah molekul bioaktif berperan sebagai (B) imunomodulasi dan trofik.

Dikutip dari Caplan AI. *MSCs: the new medicine.* In: Vertes AA eds. *Stem cells in regenerative medicine: science, regulation and business strategies.* Ed 1, John Wiley & Sons, Ltd, 2015, p. 415-421.

Dengan fungsi ganda MSC tersebut, maka MSC merupakan 'pabrik obat' yang bersifat spesifik terhadap tempat injuri, berfungsi memperbaiki kerusakan jaringan di tempat yang dituju. Karena itu, kunci efikasi pengobatan MSC adalah membawa sedikit MSC ke tempat tujuan dengan mempertimbangkan tempat dan waktu yang tepat. Dengan demikian, MSC berfungsi sebagai pengantar sekresi beragam obat. Karena itu, Caplan menamakan MSC sebagai medicinal signaling cells (MSCs).<sup>68</sup> Pemahaman ini akan memberikan arah yang jelas terhadap penggunaan MSC untuk tujuan

terapeutik.<sup>67</sup>

Berbagai penelitian preklinis dan klinis menunjukkan bahwa transplantasi MSC pada zona perbatasan infark miokard menunjukkan reduksi miosit yang mengalami apoptotik dan meningkatkan jumlah vaskularisasi,<sup>69,70</sup> reduksi jaringan parut dan kardioproteksi. Amado *et al.*, menunjukkan bahwa dengan pencitraan *computed tomography* tampak restorasi kontraksi jaringan miokard pada penelitian menggunakan model babi.<sup>71,72</sup> Gnechi *et al.* mendapatkan bahwa penggunaan MSC dikultur di media hipoksik mengurangi apoptosis dan nekrosis pada kardiomyosit tikus yang dipapar dengan oksigen rendah.<sup>73</sup> MSC yang direkayasa dengan ekspresi Akt akan meningkatkan kardioproteksi.<sup>73</sup> Kardioproteksi MSC secara *in vivo* mengurangi jumlah sel apoptotik pada tempat penyuntikan MSC.<sup>74</sup> Hal ini menunjukkan bahwa MSC dapat memproteksi atau mengurangi stimulasi yang menyebabkan kerusakan miosit (Gambar 21).<sup>75</sup>

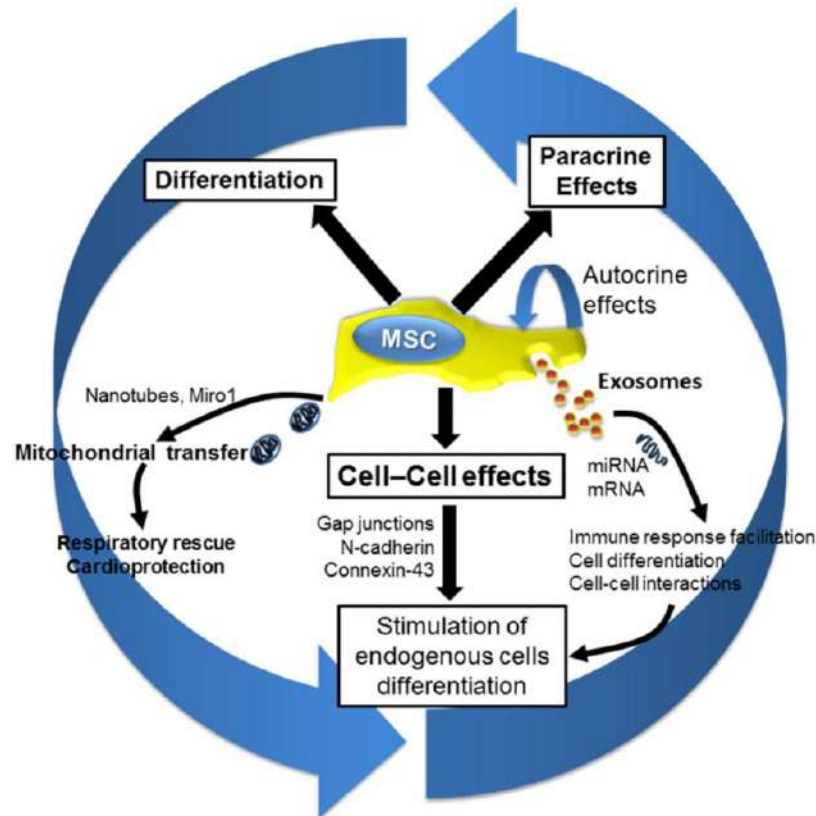
Mekanisme kerja MSC terhadap penyakit kardiovaskular : reduksi fibrosis,<sup>76</sup> stimulasi angiogenesis,<sup>77</sup> dan restorasi fungsi kontraksi jantung melalui proses *engraftment*,<sup>53</sup> diferensiasi dan stimulasi *cardiac stem cell* secara endogen untuk proliferasi dan diferensiasi (Gambar 21).<sup>75</sup> Efek ini terjadi secara serentak dalam memperbaiki jaringan parut atau disfungsi miokard dengan jaringan kontraksi sehingga dapat memperbaiki perfusi jaringan. Sebagian besar studi mendapatkan bahwa *engraftment* terapi stem cell memperlihatkan retensi sel yang rendah. Toma *et al.*, mendapatkan bahwa setelah 4 hari, jumlah MSC yang ditransplantasi yang masih tertinggal didalam miokardium berkisar 0.44%.<sup>53</sup> Pada model kardiomiopati iskemik kronik dengan model babi, yang memiliki anatomi dan fisiologi seperti manusia,<sup>78</sup> Quevedo *et al.*, melaporkan bahwa MSC alogenik dapat mengadakan *engraftment* dan berdiferensiasi menjadi kardiomyosit, sel otot polos dan endothelium.<sup>80</sup> MSC sumsum tulang babi jantan yang disuntikan ke babi betina mendapatkan kolokalisasi dengan kromosom Y dengan pemeriksaan *fluorescence in-situ hybridization (FISH)*. Diferensiasi kardiomyosit didapati sebanyak 14% dengan kromosom Y positive pada MSC yang diidentifikasi dengan *costaining* untuk protein struktur jantung  $\alpha$ -sarcomeric actinin dan tropomyosin, faktor transkripsi GATA-4 dan Nkx2.5.<sup>79</sup> Meskipun *engraftment* dan diferensiasi MSC rendah dibandingkan dengan pemulihan fungsional jantung

setelah transplantasi sel, maka timbul pertanyaan apakah *engraftment* dan diferensiasi merupakan faktor dominan ?<sup>80</sup>

MSC dapat menghasilkan sejumlah *soluble paracrine factors* yang berkontribusi terhadap kardiomiogenesis dan angiogenesis.<sup>73,81,82,83,84,85</sup> MSC juga mensekresi sejumlah sitokin dan *growth factor* yang menekan sistem imun, inhibisi fibrosis dan apoptosis, meningkatkan angiogenesis dan merangsang diferensiasi stem cell yang spesifik terhadap jaringan.<sup>86,87</sup> Pemberian MSC intramiokard pada model babi dengan infark miokard dapat mengurangi besarnya infark dengan merekrut *cardiac stem cell* c-kit endogen, sedangkan pemberian media kultur MSC tidak memberikan efek.<sup>88</sup> Hal ini menunjukkan bahwa efek parakrin MSC merupakan mekanisme kerja utama yang mendasari perbaikan fungsi dan regenerasi jaringan miokard (Gambar 21).<sup>75</sup>

Sejak 2011, MSC dan preparat sel kultur telah diuji untuk gagal jantung kronik dengan jumlah sampel kecil. Uji klinis ini secara konsisten menunjukkan bahwa sel terapi dapat mengurangi ukuran jaringan parut infark miokard, memulihkan remodeling ventrikel, meningkatkan jarak jalan 6 menit dan meningkatkan kualitas hidup diukur dengan kuesioner (Tabel 1).<sup>89,90,91,92,93,94</sup>

Saat ini tercatat pada *clinicaltrials.gov* sebanyak 34 uji klinis menggunakan MSC untuk berbagai gangguan jantung pada dewasa (infark miokard akut, gagal jantung iskemik, dan noniskemik). Kebanyakan studi masih dalam fase I dan II (Gambar 22A),<sup>94</sup> dan ada beberapa studi fase yang sedang berlangsung atau *ongoing* dan sudah selesai. Terdapat beragam uji klinis MSC. Ada 7 uji klinis bersifat *multicentered* dan 1 double-centered. Kebanyakan (27) adalah uji klini skala kecil, dengan jumlah pasien < 100 per uji (Gambar 22 B dan C) dan hanya beberapa bersifat *placebo-controlled*. Rute MSC (intravena, intrakoronaria, intramiokard, transendokard; Gambar 22 D), dosis dan asal sel (fetal-umbilical vs dewasa, autologus vs alogenik, dan sumsum tulang vs adiposa). Hal ini mendasari beragam rancang studi, asal sel, dosis dan cara pemberian. Tahun 2009, uji klinis dengan MSC alogenik diberikan secara intravena menunjukkan pengurangan kejadian aritmia dan nyeri dada.<sup>95</sup> Uji ini merupakan awal penggunaan MSC alogenik pada penyakit jantung. Saat ini product MSC digunakan untuk uji klinis skala besar melibatkan ribuan pasien dan jika berhasil produk ini disetujui FDA.<sup>95</sup>



**Gambar 21.** Mekanisme kerja *mesenchymal stem cell* (MSC). Mekanisme kerja MSC adalah membentuk efek parakrin, autokrin dan langsung yang menginduksi regenerasi vaskuler, proteksi miokard, regenerasi kardiomyosit yang menyebabkan perbaikan jantung. Miro 1: mitochondria Rho-GTP ase.

Dikutip dari Karantalis V, Hare JM. Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease. *Circ Res.* 2015;116:1413-1430.

**Tabel 1.** Terapi Stem Cell pada Gagal Jantung Kronik

Nama uji klinis (Jumlah Pasien)	$\Delta$ 6MWT	$\Delta$ MLHFQ	$\Delta$ MI SIZE	$\Delta$ EF
Williams et al <sup>6</sup> (n=8)	...	...	-18.3 $\pm$ 8.3%	...
SCPIO <sup>20</sup> (n=21)	...	-19.8	-9.8 $\pm$ 3.5 g (-30%)	+8-12.3%
MESOBlast <sup>23</sup> (n=60)	+52.5 m*	...	...	+5.2 $\pm$ 9.3%*§
CADUCEUS <sup>18</sup> (n=25)	+33.0 m	-10.8†	-12.9 g (-42%)	†
POSEIDON <sup>16</sup> (n=30)	+43.5 m	-7.6	-33.21%	+2.0%*†
C-CURE <sup>19</sup> (n=33)	+62.0 m	$\pm$ 10*†	...	+7.0%
TAC-HFT <sup>17</sup> (n=59)	+32.6 m†	-6.3	-12.6 g (-32.9%)	†
MSC-HF‡ (n=59)	...	...	-4.4 $\pm$ 5.1 g	+5.5 $\pm$ 3.8%

6MWT : 6-minute walk test; C-CURE, Cardiopoietic stem Cell therapy in heart failure; CADUCEUS, CARDiosphere-Derived aUtologous Stem Cells to Reverse ventricUlar dySfunction; EF, ejection fraction; MESOBlast, A Phase II Dose-escalation Study to Assess the Feasibility and Safety of Transendocardial Delivery of Three Different Doses of Allogeneic Mesenchymal Precursor Cells (MPCs) in Subjects With Heart Failure; MI SIZE, myocardial infarction size/scar size; MLHFQ, Minnesota Living With Heart Failure Questionnaire MSC-HF, Mesenchymal Stromal Cells in chronic ischemic Heart Failure; POSEIDON, The Percutaneous Stem Cell Injection Delivery Effects on Neomyogenesis Pilot Study; SCPIO, Cardiac Stem Cell Infusion in Patients With Ischemic Cardiomyopathy; and TAC-HFT, The Transendocardial Autologous Cells (hMSC or hBMC) in Ischemic Heart Failure Trial.

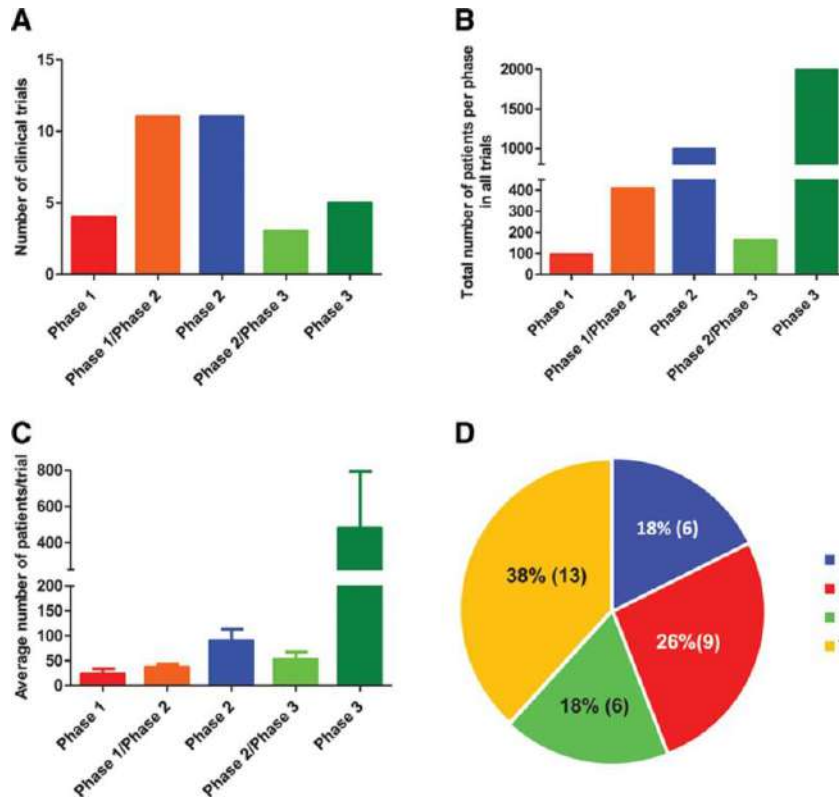
\*Tidak signifikan vs kontrol

†Tidak signifikan dalam kelompok.

‡Data tidak dipublikasi.

§25 juta kelompok sel precursor mesenchymal.

Dikutip dari Sanina C, Hare JM. Mesenchymal stem cells as a biological drug for heart disease. Where are we with cardiac cell-based therapy? *Circ Res.* 2015;117:229-233.



**Gambar 22.** Jumlah uji klinis MSC (Mesenchymal Stem Cell) (n=34) didapati pada clinicaltrials.gov penyakit jantung. Grafik bar menunjukkan jumlah uji klinis sesuai dengan fase klinis (A). Jumlah total pasien yang terdaftar sesuai dengan fase uji klinis (B). Jumlah rata-rata pasien yang terdaftar per uji (C). Diagram menunjukkan persentase rute pemberian sel dalam 34 uji klinis (intravena (IV), introkoronari (IC), intramiokard (IM), dan transendokardial (TE), D).  
 Dikutip dari Sanina C, Hare JM. Mesenchymal stem cells as a biological drug for heart disease. Where are we with cardiac cell-based therapy? *Circ Res.* 2015;117:229-233.

**MSC JARINGAN ADIPOSA**

Jaringan adiposa mengandung sejumlah stem cell multipoten dikenal sebagai MSC jaringan adiposa, mampu bereplikasi menjadi sel tidak terdiferensiasi, adiposit dan berdiferensiasi menjadi sel lain sepanjang turunan mesenchymal. MSC jaringan adiposa dilaporkan dapat berdiferensiasi menjadi kardiomyosit<sup>96</sup> dan sel endotel,<sup>97</sup> memotivasi studi model gagal jantung pada hewan coba. Miyahara et al., mendapatkan bahwa transplantasi MSC lapisan tunggal ke dalam infark miokard dengan jaringan parut dapat memperbaiki dinding jaringan parut menipis dan memperbaiki fungsi jantung.<sup>98</sup> Studi lain membandingkan MSC jaringan adiposa dengan BMMNC (bone marrow mononuclear cell) pada model tikus dengan infark miokard kronik.<sup>99</sup> Satu bulan setelah transplantasi, MSC adiposa dapat menginduksi perbaikan fraksi ejeksi ventrikel kiri, meningkatkan angiogenesis dan mengurangi fibrosis secara signifikan dibandingkan dengan sel

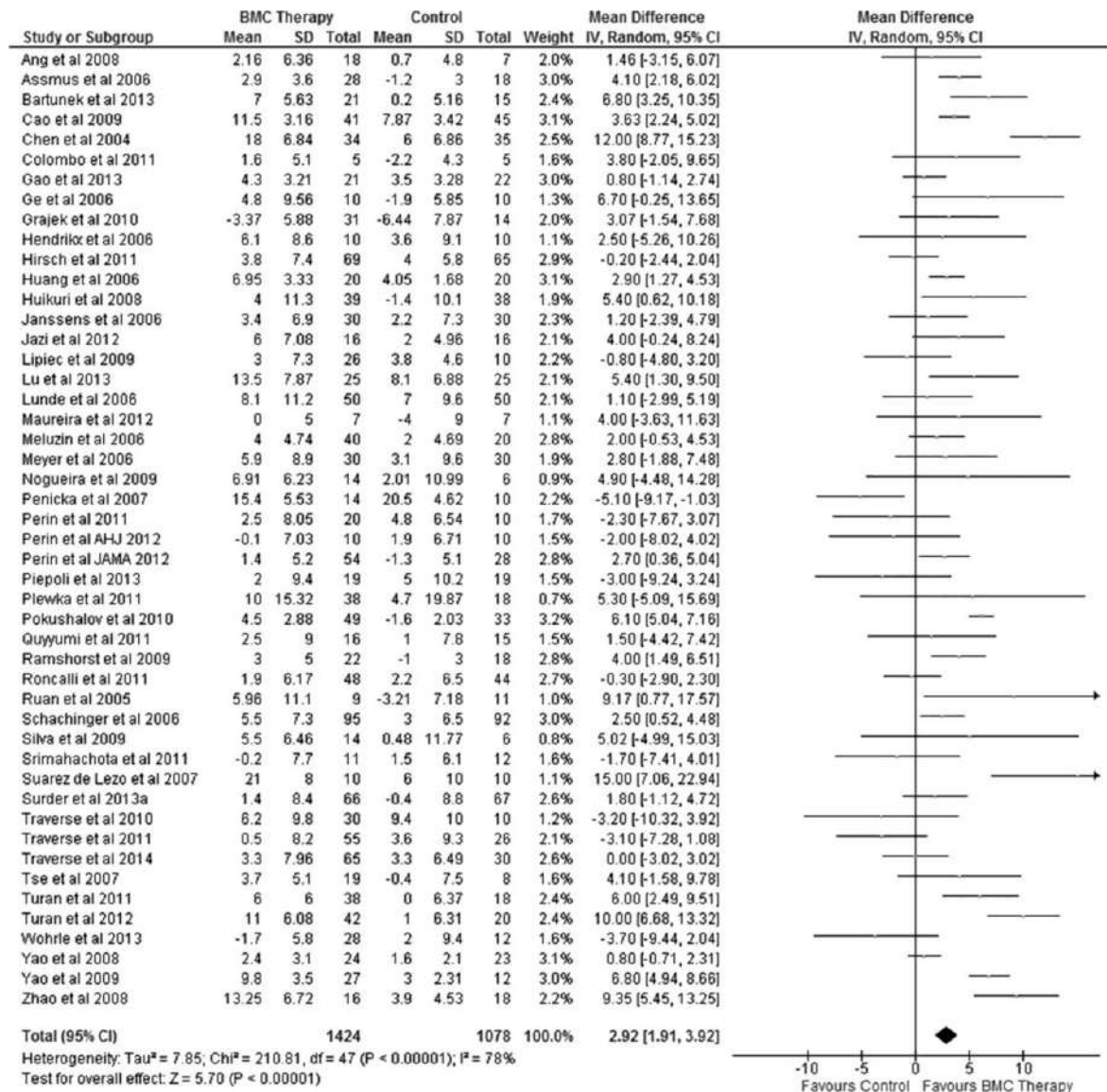
kardiomiogenik adiposa atau BMMNC. Studi A Randomized Clinical Trial of Adipose-derived Stem Cells in Treatment of Non Revascularizable Ischemic Myocardium (PRECISE) oleh Perin et al., merekrut 27 pasien mendapatkan bahwa penggunaan sel adiposa dapat menstabilkan besarnya infark dan meningkatkan konsumsi oksigen maksimal.<sup>100</sup>

**UNFRACTIONIZED BONE MARROW-DERIVED STEM CELL**

Hasil meta-analisis yang dilakukan Afzal et al., dimuat di *Circulation Research*, jurnal ranking No 1 di dunia dalam penelitian kardiovaskuler, melibatkan 48 studi acak tersamar mendapatkan bahwa transplantasi sel sumsum tulang (bone marrow cell) pada pasien penyakit jantung iskemik meningkatkan fraksi ejeksi ventrikel kiri (left ventricular ejection fraction, LVEF) sebesar 2.92% (95% confidence interval, 1.91–3.92; p <0.00001)

(Gambar 23)<sup>101</sup>, mengurangi besarnya infark (infarct size) sebesar  $-2.25\%$  (95% confidence interval,  $-3.55$  s/d  $-0.95$ ;  $p=0.0007$ ), mengurangi volume sistolik akhir (left ventricular end-systolic volume, LVESV) sebesar  $-6.37$  mL (95% confidence interval,  $-8.95$  s/d  $-3.80$ ;  $p<0.00001$ ), dan cenderung mengurangi volume diastolik akhir ventrikel kiri (left ventricular end-diastolic volume, LVEDV) sebesar  $-2.26$  mL (95% confidence interval,  $-4.59$  s/d  $0.07$ ;  $p=0.06$ ) (Tabel 2).<sup>101</sup> Terapi sel sumsum tulang aman dilakukan dan meningkatkan outcome klinis, termasuk menurunkan

angka mortalitas, infark miokard rekuren, aritmia ventrikel dan kejadian serebrovaskuler selama follow-up. Efek ini dianalisis menggunakan *magnetic resonance imaging* (MRI), merupakan pencitraan canggih dalam menganalisis perbaikan struktur dan fungsi jantung. Kesimpulan meta-analisis ini memberikan petunjuk bahwa terapi stem cell merupakan modalitas pengobatan dalam meningkatkan fungsi jantung melalui proses regenerasi jaringan jantung dan efek parakrin yang merangsang *cardiac stem cell* dan faktor parakrin yang menyebabkan perbaikan fungsi jantung.



**Gambar 23.** Efek transplantasi BMC terhadap LVEF (left ventricular ejection fraction). Transplantasi BMC memberikan peningkatan LVEF sebesar 2,92% (95% CI, 1,91–3,92;  $P<0.00001$ ) dibandingkan kontrol. IN inverse variance.

Dikutip dari Afzal MR, Samanta A, Shah ZI, Jeevanantham V, Abdel-Latif A, Zuba-Surma EK, Dawn B. Adult bone marrow cell therapy for ischemic heart disease. Evidence and insights from randomized controlled trials. *Circ Res.* 2015;117:558-575.

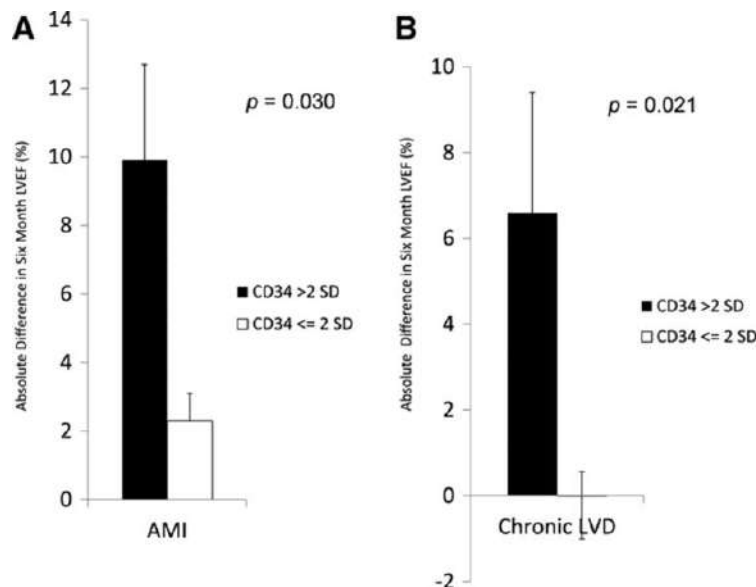


**Tabel 2.** Perbedaan hasil akhir terapi sel sumsum tulang (BMC) dengan kontrol selama follow up pada pasien penyakit jantung iskemik

Durasi Follow-Up	BMC Therapy (n)	Control (n)	Perbedaan rerata (95% CI)	Nilai P
<b>LVEF</b>				
0-3 bln	499	385	3.53 (2.05 to 5.00)	<0.00001
4-6 bln	1196	958	2.92 (1.88 to 3.96)	<0.00001
7-12 bln	591	446	4.43 (0.48 to 3.89)	<0.00001
>12 bln	330	298	2.19 (0.48 to 3.89)	0.01
<b>Infarct size</b>				
0-3 bln	123	88	-6.02 (-11.37 to -0.67)	<0.03
4-6 bln	443	373	-2.25 (-3.77 to -0.72)	<0.004
7-12 bln	167	93	-4.39 (-7.20 to -1.57)	0.002
>12 bln	99	87	-2.25 (-3.14 to -1.36)	<0.00001
<b>LVESV</b>				
0-3 bln	322	244	-7.26 (-11.11 to -3.41)	0.0002
4-6 bln	907	751	-5.50 (-7.78 to -3.22)	<0.00001
7-12 bln	424	353	-10.58 (-14.90 to -6.27)	<0.00001
>12 bln	285	271	-4.76 (-7.46 to -2.06)	0.0006
<b>LVEDV</b>				
0-3 bln	322	244	-2.34 (-7.03 to 2.34)	0.33
4-6 bln	877	725	-2.57 (-4.98 to -0.16)	<0.04
7-12 bln	432	358	-5.84 (-11.03 to -0.64)	<0.00001
>12 bln	262	266	-2.08 (-4.98 to 0.82)	0.16

BMC, bone marrow cell; CI, confidence interval; LVEDV, left ventricular end-diastolic volume; LVEF, left ventricular ejection fraction; LVESV, left ventricular end-systolic volume; and n, jumlah poin pada setiap kelompok.

Dikutip dari Afzal MR, Samanta A, Shah ZI, Jeevanantham V, Abdel-Latif A, Zuba-Surma EK, Dawn B. Adult bone marrow cell therapy for ischemic heart disease. Evidence and insights from randomized controlled trials. *Circ Res.* 2015;117:558-575.



**Gambar 24.** Persentase sel CD34+ dan perubahan LVEF pada 6 bulan. Aspirasi sumsum dilakukan pasien dengan infark miokard akut dan disfungsi ventrikel kiri. Persentase CD34+ diukur sesuai dengan kriteria ISHAGE dan LVEF diukur pada baseline dan bulan ke 6. A. Pasien dengan infark miokard akut (Acute Mioacardial Infarction, AMI). A, Pasien dengan persentase CD34+ dalam sumsum tulang tinggi (> 2 SD dari dengan rerata) menunjukkan peningkatan LVEF secara signifikan pada 6 bulan follow up. B. Pasien dengan disfungsi ventrikel kiri, (left ventricular dysfunction, LVD) dan CD34+ sumsum tulang tinggi (> 2 SD dari rerata) menunjukkan peningkatan LVEF lebih tinggi pada 6 bulan follow up.

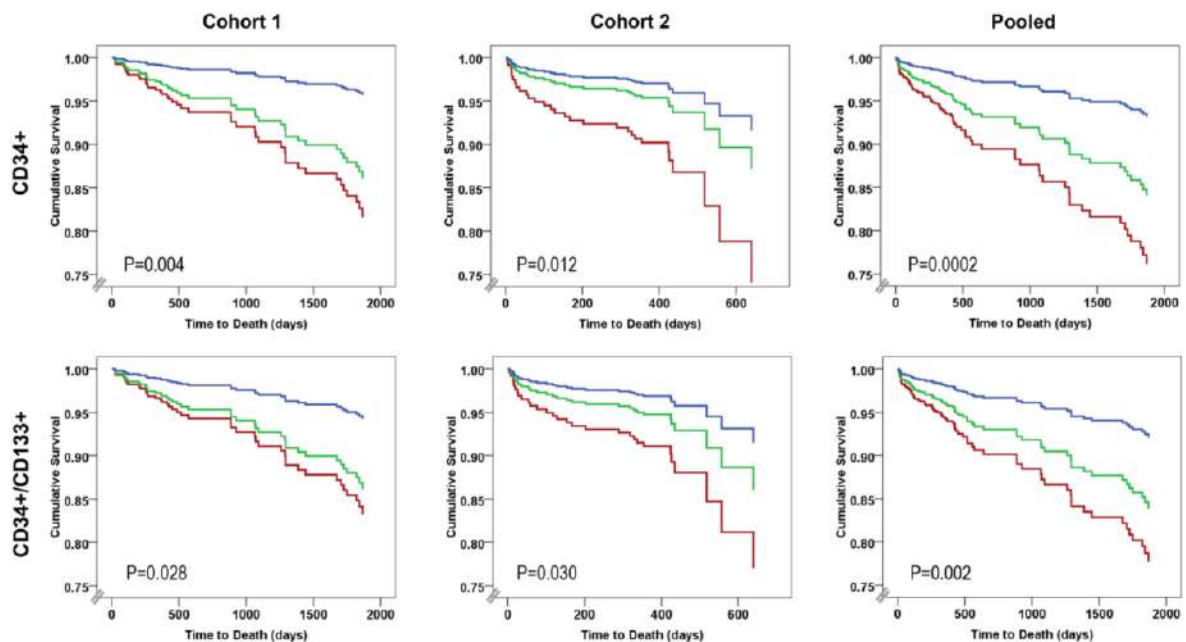
Dikutip dari Cogle CR, Wise E, Meacham AM, Zierold C, Traverse JH, Henry TD, Perin EC, Willerson JT, Ellis SG, Carlson M, Zhao DXM, Bolli R, Cooke JP, Anwaruddin S, Bhatnagar A, Cabreira-Hansen MDG, Grant MB, Lai D, Moy L, Ebert RF, Olson RE, Sayre SL, Schulman IH, Bosse RC, Scott EW, Simari RD, Pepine CJ, Taylor DA; for the Cardiovascular Cell Therapy Research Network (CCTR) Detailed analysis of bone marrow from patients with heart disease and left ventricular dysfunction BM CD34, CD11b, and clonogenic capacity as biomarkers for clinical outcomes. *Circ Res.* 2014;115:867-874

Timbul pertanyaan : Apa yang mendasari perbaikan fungsi dan struktur jantung menggunakan terapi sel sumsum tulang ? Mengapa kenaikan fraksi ejeksi hanya sebesar 2.92%, dapat menyebabkan penurunan angka mortalitas ? Hasil analisis secara detail dilakukan peneliti Cogle et al., yang mendapatkan bahwa *CD34+ stem cell yang berada di dalam sumsum tulang berhubungan dengan perbaikan LVEF (+9.9% versus +2.3%;  $p = 0.03$ ) pada pasien dengan infark miokard akut (acute myocardial infarction, AMI) dan +6.6% versus -0.02%;  $p = 0.021$  pada pasien dengan penyakit jantung iskemik konik (Gambar 24).*<sup>102</sup> Hasil analisis ini diperoleh dari stem cell sumsum tulang dan darah perifer pasien yang direkrut dalam studi Cardiovascular Cell Therapy Research Network (CCTRN) meliputi 3 studi utama yaitu uji klinis acak tersamar Transplantation in Myocardial Infarction Evaluation (TIME), LateTIME, and First Mononuclear Cells injected in the United States (FOCUS) yang dilaksanakan oleh CCTRN dengan jumlah sampel sebanyak 291 dari total 299 pasien yang direkrut dalam ke 3 studi.

Dalam penelitian terhadap 2 studi kohort penelitian melibatkan masing-masing  $n=502$  dan  $n=403$  pada

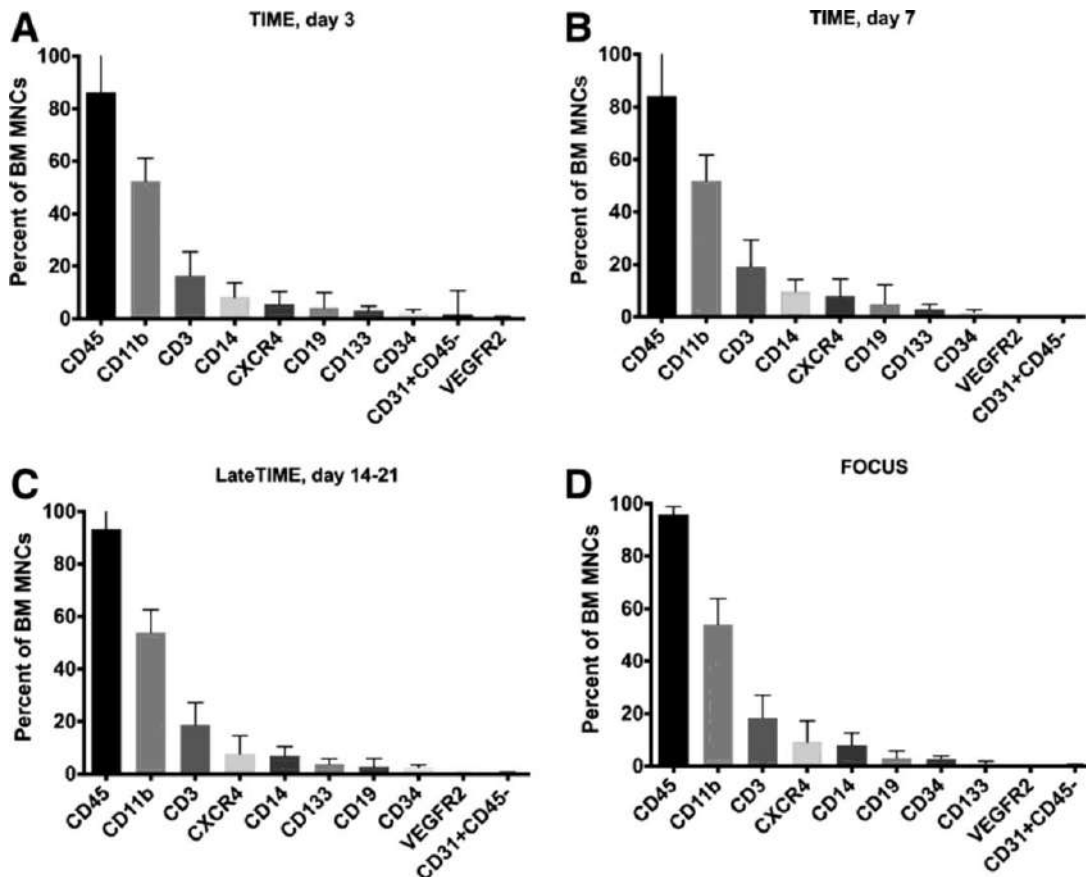
pasien dengan penyakit jantung koroner, Patel et al., mendapatkan bahwa pasien dengan jumlah  $CD34+$  stem cell dan  $CD34+/CD133+$  yang rendah masing-masing mendapatkan risiko kematian sebesar 3,54 (1.67–7.50) dan 2.46 (1.18–5.13) daripada orang normal (Gambar 25).<sup>103</sup> Hal ini terjadi karena gangguan kapasitas regenerasi endogen akibat berkurangnya stem cell  $CD34+$ .

Dari hasil penelitian Cogle et al., and Patel et al., dapat ditarik suatu kesimpulan bahwa reaksi sumsum tulang terhadap kondisi penyakit jantung koroner dalam hal hematopoietic stem cell yang bisa diperiksa dengan marker  $CD34+$  stem cell berbeda-beda. Meskipun kadar  $CD34+$  mencapai kadar terendah pada hari ke 7 setelah infark miokard (Gambar 26),<sup>102</sup> pasien yang mempunyai kadar  $CD34+$  yang tinggi dalam 6 bulan setelah infark akan mempunyai LVEF yang lebih tinggi daripada pasien dengan LVEF yang rendah (Gambar 24).<sup>102</sup> Hal ini berimplikasi bahwa pemberian terapi stem cell dapat meningkatkan fungsi jantung pasien ketika  $CD34+$  mencapai titik terendah, karena hanya  $CD34+$  di dalam sumsum tulang yang mengalami perubahan ketika terjadi infark miokard.<sup>102</sup>



**Gambar 25.** Survival disesuaikan dengan usia dan jenis kelamin dengan end point primer jumlah  $CD34+$  (atas) dan  $CD34+/133+$  (bawah). Hasil ditunjukkan dari kohort 1 dan 2 dan kombinasi. Garis berwarna menunjukkan tertile jumlah progenitor cell (biru = tertile atas; hijau = tertile tengah; merah = tertile bawah). Nilai P adalah perkiraan efek dalam model regresi Cox.

Dikutip dari Patel RS, Li Q, a Ghasemzadeh N, Eapen DJ, Moss LD, Janjua AM, Manocha P, Kassem HA, Veledar E, Samady H, Taylor WR, A. Maziar Zafari AM, Sperling L, Vaccarino V, Waller EK, Quyyumi AA. Circulating  $CD34+$  progenitor cells and risk of mortality in a population with coronary artery disease. *Circ Res.* 2015;116:289-297

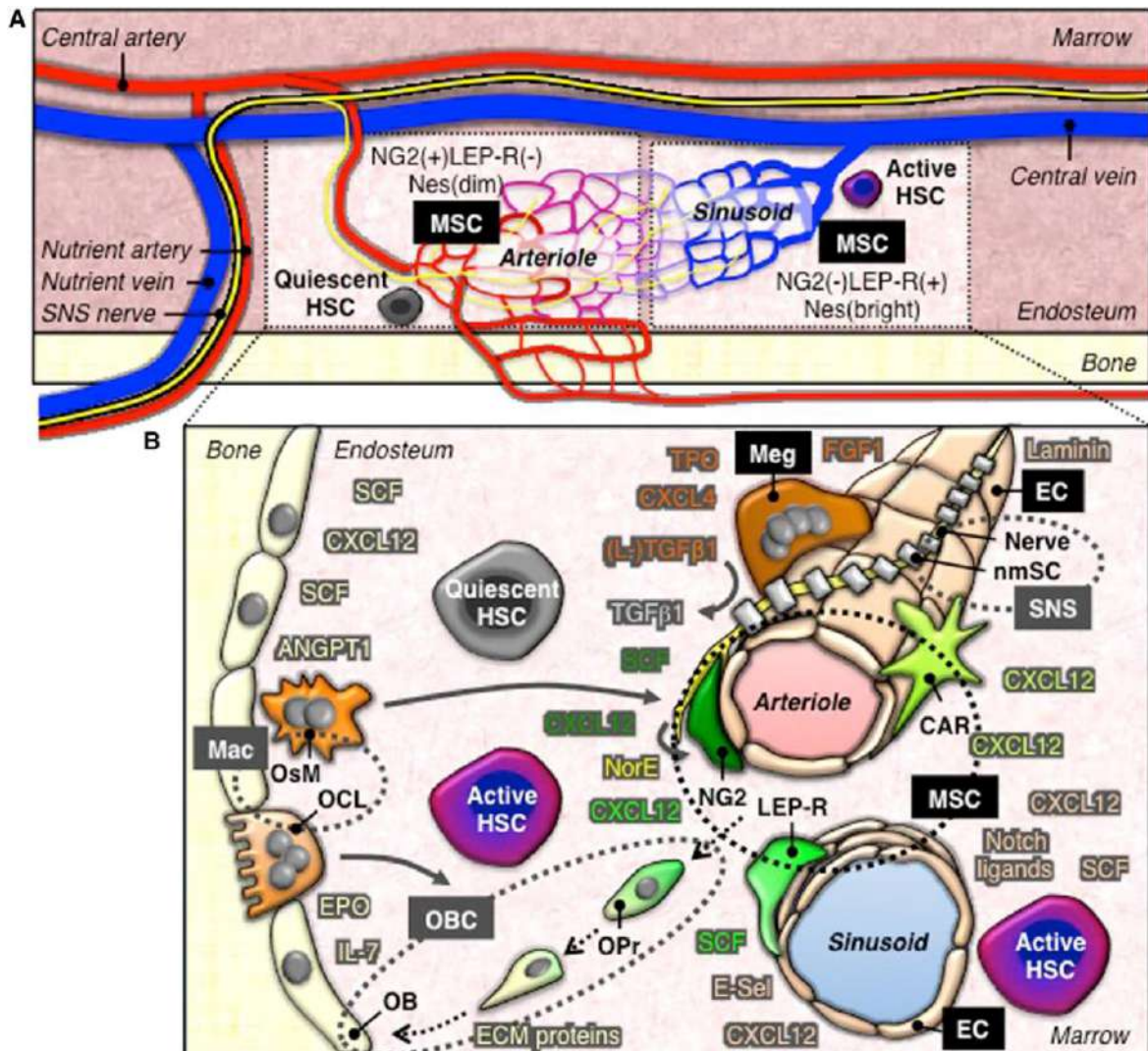


**Gambar 26.** Subset sel di dalam sumsum tulang pada pasien Cardiovascular Cell Therapy Research Network (CCTRN). BMMNCs (bone marrow mononuclear cells) dari subjek dilakukan imunostaining dan dihitung dengan flow cytometry. Dalam uji TIME, pasien dilakukan secara acak 1:1 dengan aspirasi sumsum tulang (A) 3 hari atau (B) 7 hari setelah infark miokard akut (AMI, acute myocardial infarction). C. pada uji LateTime, semua subjek mengalami aspirasi sumsum tulang 2-3 minggu setelah AMI. D. dalam uji FOCUS, aspirasi sumsum tulang dilakukan pada pasien dengan iskemia miokard kronik dan disfungsi ventrikel kiri > 30 hari setelah AMI. VEGFR2 : vascular endothelial growth factor receptor 2. Dikutip dari Cogle CR, Wise E, Meacham AM, Zierold C, Traverse JH, Henry TD, Perin EC, Willerson JT, Ellis SG, Carlson M, Zhao DXM, Bolli R, Cooke JP, Anwaruddin S, Bhatnagar A, Cabreira-Hansen MDG, Grant MB, Lai D, Moy L, Ebert RF, Olson RE, Sayre SL, Schulman IH, Bosse RC, Scott EW, Simari RD, Pepine CJ, Taylor DA; for the Cardiovascular Cell Therapy Research Network (CCTRN) Detailed analysis of bone marrow from patients with heart disease and left ventricular dysfunction BM CD34, CD11b, and clonogenic capacity as biomarkers for clinical outcomes. *Circ Res.* 2014;115:867-874

Apa yang terjadi di dalam sumsum tulang pasien ketika timbul penyakit jantung iskemik berupa infark miokard? Di dalam sumsum tulang didapati adanya *niche* (microenvironment) yang mengatur hematopoietic stem cell (HSC). Ketika tidak ada injuri atau infark, HSC berada dalam kondisi *quiescent* berarti sel dalam keadaan *dormant* (G0). Sebaliknya jika ada injuri, HSC keluar dari kondisi *dormant* dan menjadi aktif berproliferasi.<sup>104</sup> Menurut Kunisaki et al., HSC dalam kondisi *quiescent* karena dipertahankan oleh *endosteal niche*, yaitu rongga dinding osteoblast, sedangkan HSC dalam kondisi aktif untuk daya regenerasi akibat *vascular sinusoidal niche*.<sup>105</sup>

Komponen sel di dalam *niche* sumsum tulang ada 2 jenis: sel endotel (endothelial cell), mesenchymal stromal cell yaitu nonhematopoietic stem cell, dan megakaryocyte yang memberikan signal ke HSC. 105 Arteriolar stromal niche cells yang mempertahankan HSC dalam keadaan *quiescent* adalah Nestin-GFP<sup>bright</sup>, NG2<sup>+</sup>, LepR<sup>-</sup> pericytes, sedangkan sinusoidal stromal niche cells yang mengatur HSC dalam keadaan aktif adalah as Nestin-GFP<sup>dim</sup>, NG2<sup>-</sup> (Gambar 27)<sup>106</sup> HSC yang *quiescent* memberi suplai 1 triliun sel setiap hari, sedangkan sel yang aktif sebagai “backup” akan menggantikan stem cell yang hilang dalam kondisi homeostasis dan terutama sebagai respon terhadap injuri atau perubahan patologik.<sup>105</sup>





**Gambar 27.** Susunan HSC Niche. (A) Anatomi rongga sumsum tulang menggambarkan invasi simpatis dan pembuluh darah dan hubungan antara arteriole dan pembuluh darah sinusoid. Setiap regio (kotak titik-titik) adalah bagian perivascular MSC, yang mengatur berbagai kondisi HSC. HSC dalam keadaan *quiescent* adalah sel dormant G0. HSC aktif adalah sel yang keluar dari *quiescent* atau dalam kondisi aktif cycling atau migrasi. (B) HSC niche essential (hitam dan asesoris (abu) mengatur fungsi HSC. Kelompok sel dalam Lingkaran titik-titik baik dengan sumber yang sama (yaitu perivascular MSC dan diferensiasi osteoclast) atau fungsi sama (komponen makrofag dan susunan saraf pusat). Panah hitam menggambarkan progeni MSC berdiferensiasi menjadi osteoblast dan membentuk kompartemen osteoclast. Panah abu-abu menunjukkan efek HSC niche cell. CAR, CXCL12<sup>bright</sup> MSCs; E-Sel, E-selectin; LEP-R, NG2+LEP-R+Nesbright MSCs; NG2, NG2+LEP-R\_Nesdim MSCs; nmSC, non-myelinating Schwann cells; NorE, norepinephrine; OCL, osteoclasts; OPr, osteoprogenitors; OsM, osteomacs.

Dikutip dari Schepers K, Campbell TB, Passegue E. Normal and leukemic stem cell niches: insights and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell* 2015;16:254-267.

## CARDIAC STEM CELL

Leri et al., mengungkapkan adanya satu populasi stem cell di dalam jantung atau resident stem cell yang mempunyai kemampuan berdiferensiasi menjadi kardiomyosit, sel otot polos dan sel endotel,

yang disebut *cardiac stem cell*.<sup>107</sup> Penemuan ini tidak hanya memutarbalikan doktrin bahwa jantung adalah organ pascamitotik melainkan bersifat *self-renewal*, sekaligus membuka peluang terapeutik (Gambar 11).<sup>24</sup> Apa yang disampaikan dalam tinjauan pustaka Leri et al., adalah berdasarkan hasil

studi dari kelompok mereka yaitu Beltrami et al., yang melaporkan adanya satu populasi sel diisolasi dari jantung tikus yang mengekspresi tyrosine kinase receptor c-kit (marker stemness) yang kurang mengekspresikan hematopoietik.<sup>108</sup> Penyuntikan CSC manusia ke dalam miokardium rodent dengan infark miokard dapat memperbaiki struktur dan fungsi ventrikel kiri dan terbentuk kimer jantung berisikan miokardium manusia yang tersusun atas miosit dan pembuluh darah koroner.<sup>109</sup>

Bukti bahwa kardiomiopati iskemik berhubungan dengan hilangnya fungsi CSC,<sup>110</sup> memotivasi penelitian CSC pada gagal jantung kronik. Suntikan c-kit+ CSC secara intramiokard ke zona batas infark 20 hari setelah oklusi koronaria permanen pada tikus menunjukkan daya regenerasi pada jaringan parut (scar) sebesar kurang lebih 42% dengan pertumbuhan miokard baru, berkurangnya dilatasi ventrikel kiri dan perbaikan fungsi jantung.<sup>111</sup>

Penelitian oleh Tang et al.,<sup>112</sup> mendapatkan bahwa CSC yang disuntikkan secara intrakoronaria dapat meregenerasikan jaringan jantung dan mengurangi remodeling ventrikel kiri pascainfark pada infark miokard lama setelah satu bulan pada tikus, menghantarkan Bolli et al., melakukan verifikasi hasil penelitian.<sup>113</sup> Dengan menggunakan hewan coba babi, kelompok peneliti ini melakukan oklusi arteri koronaria dan reperfusi. Setelah oklusi dilakukan, dilakukan isolasi dan kultur memperbanyak c-kit+ CSC pada atrium kanan. Dengan menggunakan kateter, hasil kultur sebanyak 1 juta CSC disuntikkan secara intrakoronaria, dan mendapatkan peningkatan LVEF (*left ventricular ejection fraction*), dan peningkatan penebalan sistolik dinding ventrikel di tempat infark, penurunan tekanan diastolik akhir, dan peningkatan dP/dtmax ventrikel.<sup>112</sup> Hasil yang meyakinkan ini meletakkan dasar bagi penelitian SCIPIO (Cardiac Stem cell Infusion in Patients with Ischemic Cardiomyopathy), uji klinis pertama menggunakan CSC.<sup>24</sup>

SCIPIO adalah suatu studi acak tersamar menggunakan CSC autologus untuk pengobatan gagal jantung iskemik kronik, dengan target populasi LVEF  $\leq 40\%$  yang telah menjalani *coronary bypass*. Kurang lebih 4 bulan setelah bypass, CSC yang diperoleh sebanyak 1 juta yang diperoleh dari hasil ekspansi kultur, disuntikkan secara intrakoronaria, dengan kelompok kontrol tidak diberi CSC. Hasil sementara sangat menjanjikan.<sup>114,115</sup> Pada kelompok

terapi CSC, LVEF yang diukur dengan eko 3 dimensi mengalami peningkatan dari  $29.0 \pm 1.7\%$  menjadi  $36 \pm 2.5\%$  setelah 4 bulan. Pada kelompok kontrol sebanyak 13 orang tidak mengalami perubahan. Efek CSC meningkat pada penilaian 1 tahun (LVEF +8.1% versus baseline; n=17) dan 2 tahun (LVEF : +12.9%; n=8). Dengan pemeriksaan MRI, besar infark berkurang pada 4 bulan dari  $34.9 \pm 2.3$  menjadi  $21.6 \pm 2.7$  gr (reduksi 38.1%) dan pada 1 tahun dari  $33.9 \pm 3.0$  menjadi  $18.7 \pm 3.6$  gr (reduksi 44.8%). Efek ini menyebabkan perbaikan kelas fungsional NYHA dan kualitas hidup.<sup>114</sup>

## CARDIOSPHERE DAN CARDIOSPHERE-DERIVED CELL

Messina et al., pertama kali melakukan isolasi satu populasi sel yang melekat secara kluster pada piring petri dari hasil biopsi atrium and ventrikel manusia dan mencit.<sup>116</sup> Populasi sel ini mampu berdiferensiasi menjadi kardiomiosit, sel endotel dan sel otot polos maka kelompok studi ini menamakan *cardiosphere*.<sup>116</sup> Smith et al., mendapatkan *cardiosphere* yang diperoleh dari spesimen hasil biopsi endomiokardium dan ditanamkan dalam kultur sehingga memperoleh *cardiosphere-derived cells* (CDC). CDC dilaporkan juga mampu berdiferensiasi menjadi kardiomiosit stabil berdenyut secara *in vitro* dan menyebabkan regenerasi kardiomiosit, meningkatkan fungsi jantung ketika disuntikkan pada model mencit dengan infark miokard.<sup>117</sup> Penelitian eksperimental dilakukan Johnston et al., tahun 2009 dengan menyuntikkan CDC manusia secara intrakoronaria ke babi dengan infark miokard lama mengakibatkan regenerasi jantung, reduksi besarnya infark, dan mengurangi proses remodeling ventrikel kiri serta memperbaiki fungsi jantung.<sup>118</sup> Secara fenotipe, CDC adalah campuran berbagai tipe sel, termasuk sel yang mengekspresi endotel (kinase inserta domain receptor (KDR) atau CD31, stem cell (CD34+, c-kit, Sca-1) dan marker antigen mesenkimal (CD105, CD90) (Gambar 11).<sup>24</sup>

Studi klinis fase I secara acak tersamar (CADUCEUS) oleh Makkar et al., pada pasien dengan infark miokard akut dan gangguan fungsi ventrikel LVEF  $\leq 45\%$  mendapatkan bahwa dari 17 pasien yang disuntikkan CDC dosis 12.5, 17,3 atau 25 juta sel secara autologous dari hasil biopsi endomiokard, setelah 1,5-3 bulan dengan infark, dengan 8 pasien sebagai kontrol, mendapatkan

bahwa CDC dapat mereduksi besaran infark sebesar 42% (dari 24% menjadi 12% pada ventrikel kiri) pada 12 bulan follow-up, dan peningkatan jaringan yang hidup dan penebalan dinding sistolik regional pada regio infark,<sup>119</sup> namun terapi CDC tidak dapat meningkatkan LVEF, mengurangi volume LV dan meningkatkan kelas fungsional NYHA atau kualitas hidup diukur dengan Minnesota Living with Heart Failure Questionnaire.<sup>119</sup>

## INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL

Takahashi dan Yamanaka menggunakan 4 faktor transkripsi (octamer-binding transcription factor 3/4 (OCT3/4), sex determining region Y-box2 (Sox-2), c-Myc, Kruppel-like factor 4 (Klf-4), dikenal sebagai faktor Yamanaka, pada fibroblast mencit dewasa dan mengubahnya menjadi satu populasi *induced pluripotent stem cells* (iPSC).<sup>120</sup> Sel ini dapat mengekspresi marker permukaan *embryonic stem cell* (ESC), dan memiliki morfologi dan pertumbuhan seperti pada ESC. Potensi iPSC terhadap kardiogenik sangat menyerupai potensi dari ESC, dengan kardiomyosit yang dihasilkan berupa denyutan spontan, kontraktilitas dan ekspresi ion kanal.<sup>121</sup> Namun, sampai saat ini, belum ada studi yang spesifik menilai potensi iPSC pada model hewan dengan gagal jantung.

Faktor transkripsi yang digunakan memiliki sifat onkogenik seperti c-Myc dan Kruppel-like factor-4 sehingga berpotensi menghasilkan teratoma. Metode lebih baru tidak lagi menggunakan faktor ini sehingga dapat menyingkirkan kemungkinan pembentukan teratoma,<sup>122,123</sup> tetapi sifat alamiah yang terkandung di dalam sel ini dapat menyebabkan tumorigenesis.<sup>124</sup> Efisiensi yang rendah dari iPSC dan variasi antar *cell line* juga menimbulkan masalah terhadap *reprogramming*.<sup>125</sup> Namun, dengan perkembangan teknologi yang pesat, teknik ini akan dapat diatasi.

Dengan sifat yang dimiliki menyerupai *embryonic stem cell* (ESC) sehingga memungkinkan tumorigenesis, maka timbul pertanyaan apa yang membuat iPSC dapat menyerupai ESC? Para ahli mengungkapkan bahwa di dalam iPS cell terdapat "epigenetic memory", suatu pola *chemical mark* (*penanda kimia*) pada metilasi DNA yang menggambarkan asal tipe sel,<sup>126</sup> dengan sekelompok gen spesifik yang resisten terhadap proses *reprogramming*.<sup>127</sup> Karena itu, retensi *epigenetic memory* mempunyai pengaruh lebih

signifikan terhadap karakteristik sel.<sup>127</sup> Dengan melakukan *reprogramming* berulang atau subkultur iPSC secara kontinu atau obat *demethylating agent* dapat dilakukan perubahan ulang untuk mencapai pluripotensi yang paling mendasar.<sup>128</sup>

## EPIGENETIK

Kata epi- dalam bahasa Yunani berarti di atas, dekat, pada, sebelum atau sesudah. Namun konotasi sebelum atau sesudah mungkin lebih sering digunakan. Epigenetik dapat diartikan sebagai perubahan dalam regulasi ekspresi gen yang dapat diturunkan kepada sel progeni tanpa perubahan pada urutan nukleotida gen.<sup>129</sup> Definisi epigenetic pertama kali dikemukakan oleh Conrad Waddington sebagai perubahan ekspresi gen yang diturunkan dan fenotipe sel yang tidak bergantung pada perubahan sekuensi DNA.<sup>130</sup> Hal ini berarti bahwa melalui perubahan pada ekspresi gen yang diturunkan, epigenetik dapat mengubah proses pada DNA melalui serangkaian proses seperti metilasi DNA, modifikasi kromatin dan non-coding RNA.<sup>131</sup>

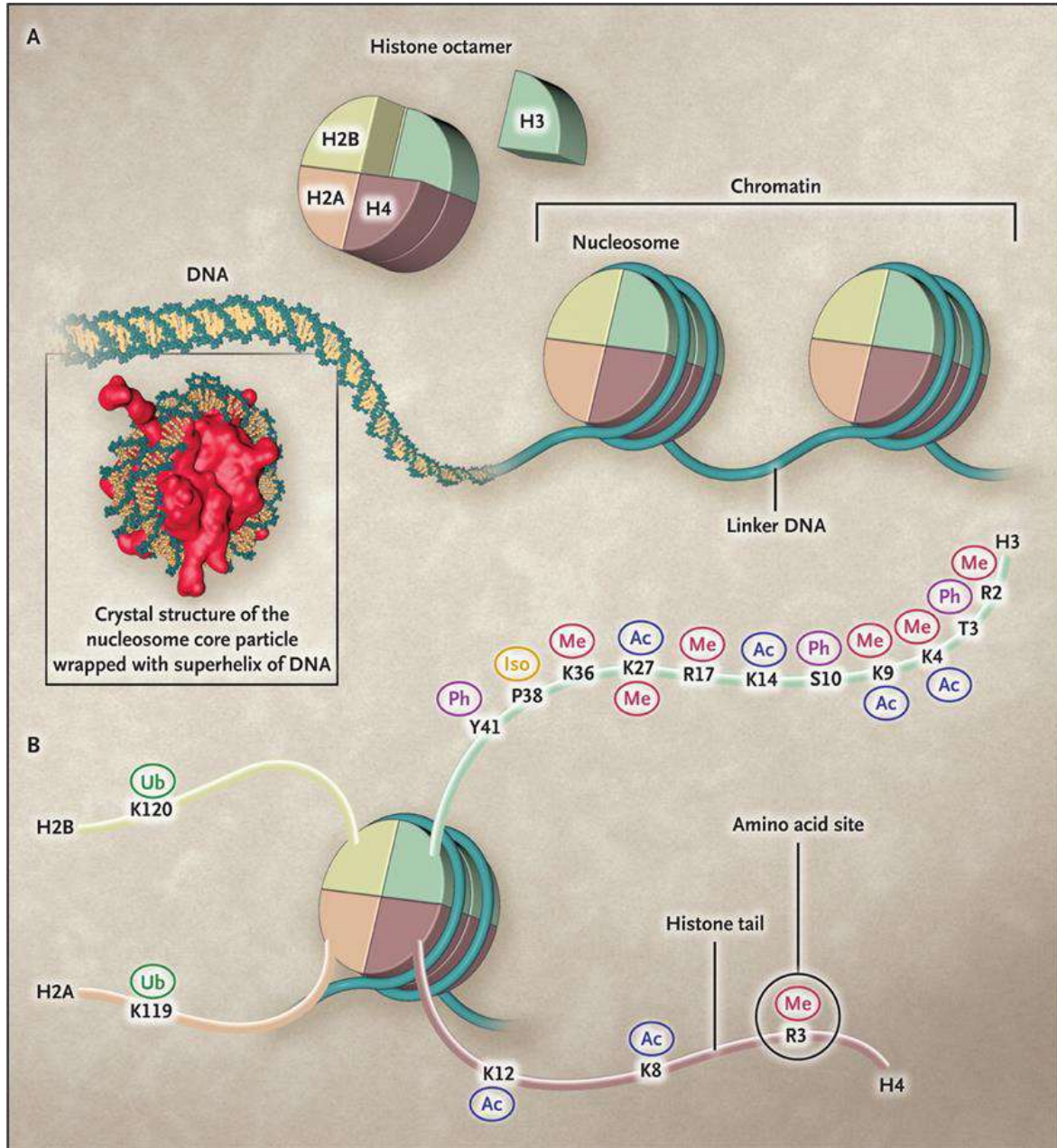
Kromatin adalah makromolekul DNA dan protein histon, yang menyokong seluruh genom yang mengandung materi genetik di dalam sel eukariot. Unit dasar kromatin adalah nukleosom, terdiri dari oktamer berisikan dua histon H2A, H2B, H3 dan H4, tempat terbungkusnya 147 bp DNA (Gambar 28).<sup>132</sup> Nukleosom dipisahkan oleh DNA linker dengan panjang 20-50 bp.<sup>133</sup> DNA nukleosom yang terbungkus lebih sulit dipengaruhi daripada DNA linker (Gambar 29).<sup>134</sup> Karena itu, posisi genom dan perubahan nukleosom dapat mempengaruhi kemampuan protein berikatan dengan sekuensi target di dalam DNA. Kromatin dapat dibagi atas: heterokromatin, dengan kromatin yang terbungkus ketat, terutama mengandung gen tidak aktif, sedangkan eukromatin mengandung konformasi yang lebih relaks yang memungkinkan terjadinya transkripsi aktif. Berbagai kondisi dapat berpengaruh terhadap proses ini yaitu modifikasi pada DNA atau histon (Gambar 28 B).<sup>132</sup>

Perubahan epigenetik dan susunan kromatin dalam aktivasi dan represi gen penting dalam mempertahankan pluripotensi stem cell, seperti pada *embryonic stem cell* dan sel germinal primordial.<sup>135</sup> Kedua jenis sel dapat menghasilkan semua jenis sel dari suatu organisme, sedangkan multipoten dan unipoten stem cell mempunyai keterbatasan



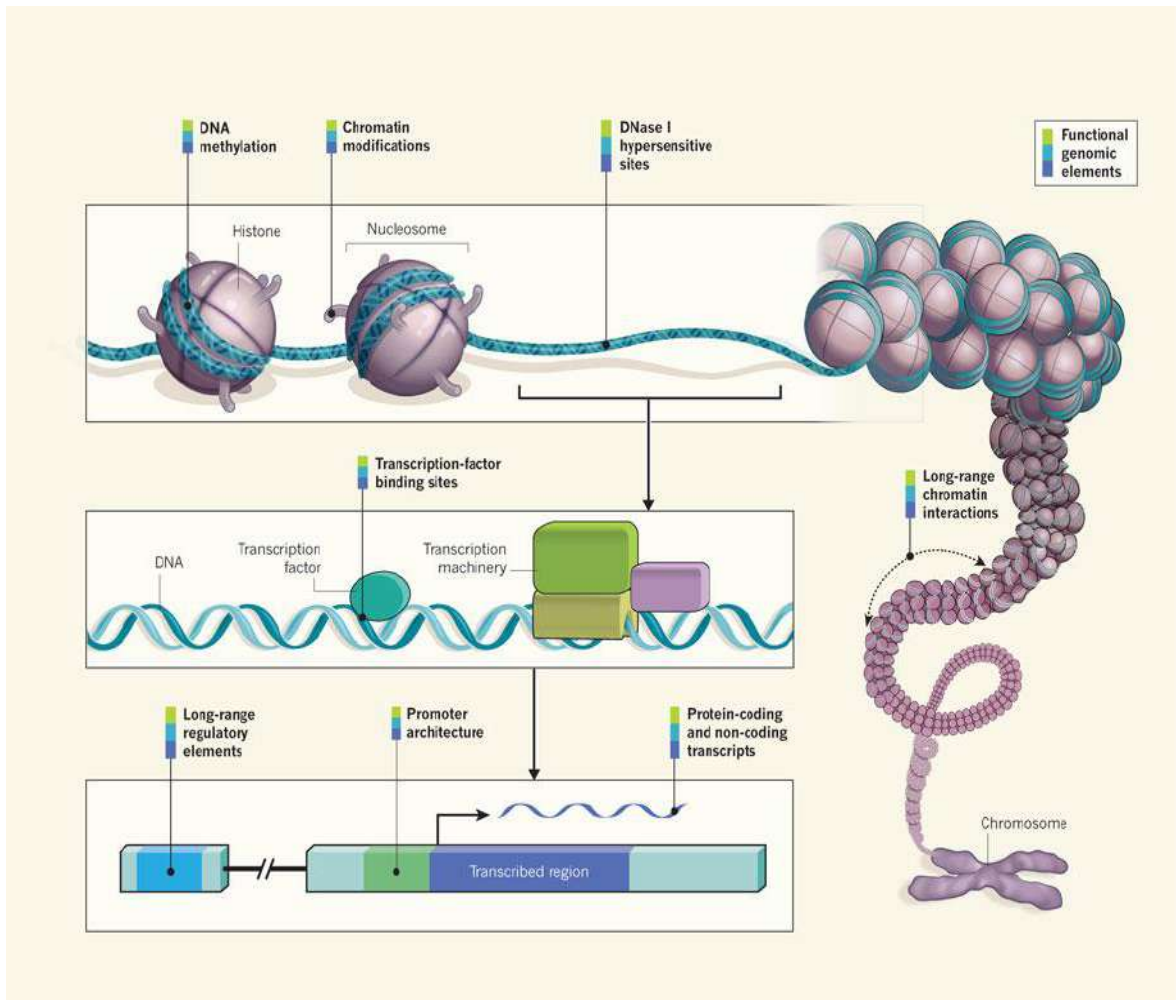
kapasitas diferensiasi dalam menghasilkan sel progeni. Progresivitas dalam kondisi stem menjadi sel yang lebih terdiferensiasi memerlukan perubahan fungsi sel, pola ekspresi gen dan morfologi.<sup>135</sup>

Karena itu, sifat khusus sel tidak hanya ditentukan oleh sekuensi DNA, tetapi juga kombinasi gen aktif dan *silent* dalam suatu waktu ketika mengalami proses perkembangan.



**Gambar 28.** Nukleosom. Unit dasar fungsional kromatin adalah nukleosom (Panel A), tersusun atas okramer histon dikelilingi DNA. Oktamer dipisahkan oleh DNA linker. Oktamer histon dibentuk oleh histon tetramer H3:H4 dan dua dimer H2A: H2B. Ekor histon terdiri dari empat histon inti yang dipengaruhi oleh modifikasi post-translasi (Panel B). Hal ini meliputi metilasi (Me), asetilasi (Ac), fosforilasi (Ph), ubiquilasi (Ub) dan isomerisasi prolin (Iso), yang terjadi pada tempat asam amino yang spesifik, seperti K4 dan K9 pada ekor histon H3. Asam amino histon yang sama juga mengalami modifikasi post translasi yang berbeda.

Dikutip dari Dawson MA, Tony Kouzarides T, Huntly BJP. Targeting epigenetic readers in cancer. *N Engl J Med* 2012;367:647-57.



**Gambar 29.** Metilasi DNA dan modifikasi kimia terhadap histon dapat mempengaruhi kecepatan transkripsi DNA menjadi molekul RNA (histon adalah protein tempat lilitan DNA membentuk kromatin). Aktivitas faktor transkripsi dan struktur elemen DNA (lokasi dan sekuensi) dari elemen DNA pengaturan gen termasuk promotor, yang berada *upstream* dari tempat dimulainya transkripsi RNA.

Dikutip dari Ecker JR. *Serving up a genome feast. Nature* 2012; 489: 52-53.

Meskipun semua sel di dalam tubuh mempunyai sekuensi DNA yang identik, namun setiap sel mempunyai fenotipe dan pola ekspresi gen berbeda. Misalnya, perubahan kromatin di otak dapat mempengaruhi ekspresi gen yang berupa 'epigenetik' dan menetap walaupun terjadi pembelahan sel. Teori "kode epigenetik" menjelaskan bahwa dua kondisi kromatin diperlukan dalam memodifikasi kompleks kromatin. Regio dengan aktivitas transkripsi diperankan oleh asetilasi lisin oleh enzim histone acetyltransferase (HATs) dengan merelaksasikan struktur kromatin dengan melemahkan interaksi muatan positif pada ekor histon dengan muatan negatif fosfat yang menopang

DNA, sehingga memungkinkan aktivator transkripsi masuk dan menginduksi gen.<sup>136</sup> Sedangkan histone deacetylase (HDACs) memperantarai deasetilasi lisin dengan merubah sifat elektrostatik kromatin yang menyebabkan represi gen.<sup>135,136</sup> Karena itu, histone acetyltransferases (HATs) dan HDACs bekerja saling berlawanan dalam mengatur kondisi asetilasi protein.

Untuk mendapat gambaran secara umum tentang peran epigenetik terhadap ekspresi gen, maka di sini akan dipaparkan salah satu contoh pengaruh histone deacetylase terhadap ekspresi pada penyakit jantung dan ginjal dan upaya intervensi

terhadap peran kromatin dengan melakukan modifikasi kromatin.

#### *Ada spasi*

Sebagian besar studi HDAC terfokus pada peranan dalam pengaturan hipertrofi jantung. Hipertrofi jantung terjadi sebagai respon patologik dalam upaya untuk menormalkan regangan dinding jantung untuk meningkatkan performan jantung. Untuk jangka panjang, respon ini bersifat maladaptif,<sup>137</sup> sehingga supresi terhadap hipertrofi jantung akan menurunkan angka morbiditas dan mortalitas pada pasien dengan hipertensi. Jika hipertensi tidak ditanggulangi dengan baik, dapat menyebabkan gagal jantung dengan preservasi fraksi ejsi (HFpEF).<sup>136</sup> Hal yang sama dapat terjadi pada ginjal jika pengontrolan hipertensi tidak diatasi dengan baik. Upaya menurunkan tekanan darah menggunakan angiotensin converting enzyme inhibitor atau obat  $\beta$ -bocker, melalui modulasi terhadap sistem renin angiotensin, hanya mempertahankan pengontrolan tekanan darah dan sedikit memperlambat proses injuri glomerulus dan mekanisme fibrotik sehingga berakhir pada HPPeF dan penyakit ginjal tahap akhir.<sup>136</sup> Histone deacetylases (HDACs) memegang peranan penting dalam petogenesis penyakit ini, sehingga inhibitor HDAC berpotensi terhadap pengobatan pada sumbu kardiorenal ini.<sup>136</sup>

Studi Zhang et al, mendapatkan bahwa HDAC kelas IIa berfungsi sebagai represor terhadap signal hipertrofi jantung. Ketika terjadi signal stres, HDAC kelas IIa keluar dari nukleus kardiomyosit sehingga tidak mampu merepresi gen yang meningkatkan pertumbuhan miosit.<sup>138</sup> Hal ini berarti HDAC bersifat represi terhadap gen. Penelitian menggunakan mencit transgenik dengan overekspresi HDAC2 dependent yang menyebabkan hipertrofi dapat dihambat oleh HDAC inhibitor TSA (trichostatin A) atau *valproic acid* selama 2 minggu.<sup>139</sup>

Bagaimana mekanisme HDAC inhibitor dalam memberikan efek terapeutik terhadap penyakit jantung, dalam hal hipertrofi dan gagal jantung ? Tentu salah satu penjelasan adalah efek protektif terhadap ekspresi gen jantung dengan melepaskan represi, misalnya peningkatan ekspresi gen Kruppel-like factor (Klf)4 *transcription factor*, karena gen ini dapat menekan ekspresi gen yang berhubungan dengan hipertrofi jantung.

Studi Gardner et al., mendapatkan bahwa ekspresi BNP (brain natriuretic peptide) yang memperantarai

regangan ventrikel jantung, dan meningkat pada gagal jantung pada waktu hipertrofi jantung, bergantung pada HDAC2 dengan faktor transkripsi yin-yang (YY1) terhadap promotor gen BNP.<sup>140</sup> YY1 mengalami asetilasi pada miosit jantung sehingga deasetilasi terhadap faktor transkripsi ini oleh HDAC akan menyebabkan stimulus terhadap transkripsi gen BNP. Dengan menggunakan TSA, dapat menghambat kompleks YY1: HDAC2 dan menekan ekspresi BNP yang diinduksi endotelin.<sup>140</sup>

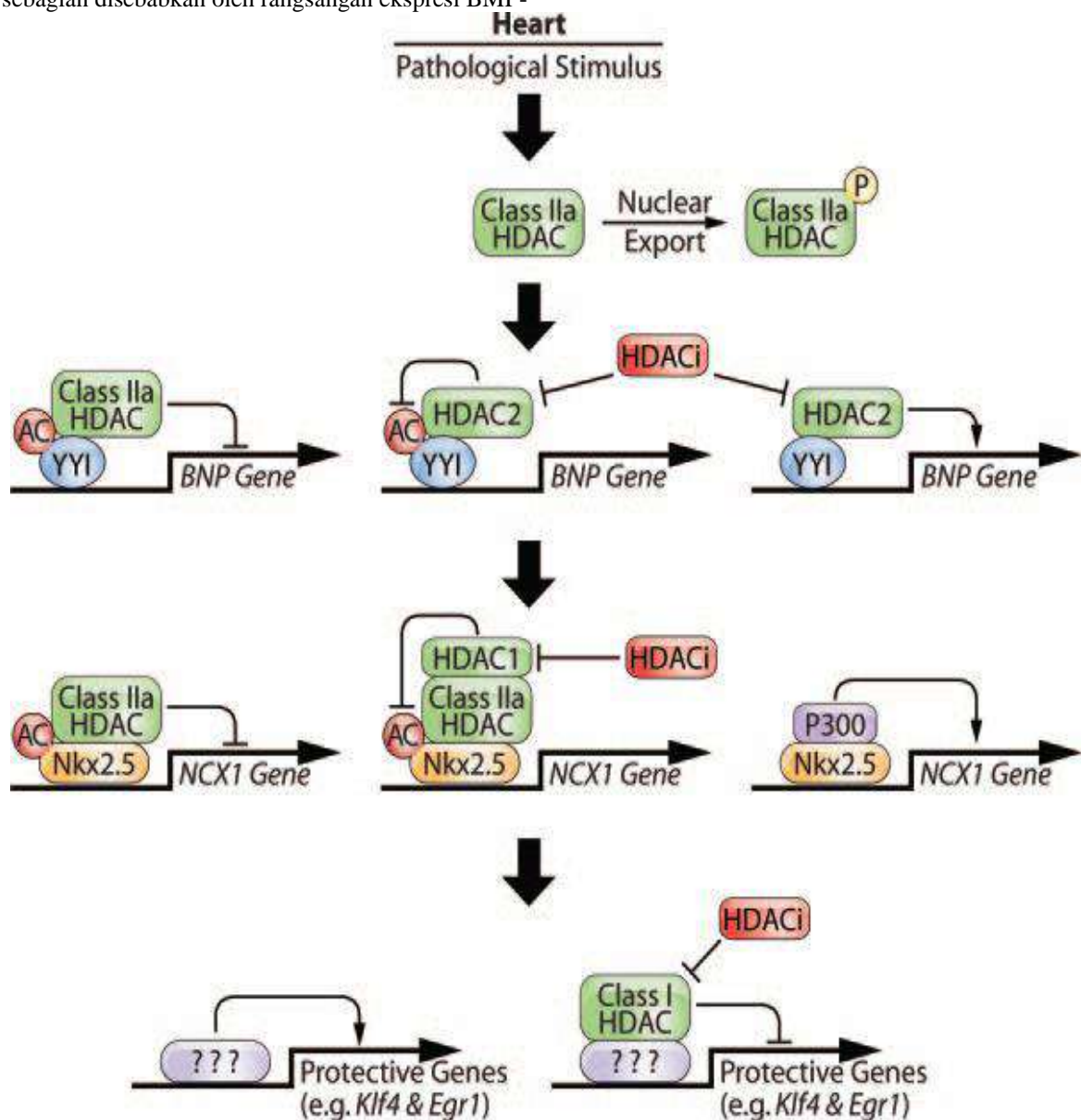
Penelitian Menick et al., menunjukkan bahwa aktivitas HDAC1 merangsang ekspresi gen sodium/calcium exchanger (NCX1) selama terjadi hipertrofi jantung.<sup>141</sup> Setelah asetilasi, Nkx2.5 tidak mampu berasosiasi dengan p300 HAT sehingga tidak mampu merangsang ekspresi NCX1. Deasetilasi gen Nkx2.5 oleh HDAC1 meningkatkan hubungan dengan p300 dan menyebabkan ekspresi NCX1, dan proses ini dapat dihambat oleh TSA. Dengan demikian, dapat dikemukakan bahwa studi gen BNP dan NCX1 menjelaskan mekanisme HDAC menekan ekspresi gen dengan merubah kondisi asetilasi pada protein nonhiston (Gambar 30).<sup>136</sup>

Penyakit ginjal kronik (CKD, chronic kidney disease) dapat disebabkan hipertensi dan diabetes. Penyakit ini sebagai respon terhadap stres dan injuri kronik, menyebabkan pelepasan sitokin dan inflamasi.<sup>136</sup> Peningkatan kadar transformisng growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) mengaktivasi sel mesangial dan fibroblast mengakibatkan produksi protein extracellular matrix (ECM) sehingga menyebabkan fibrosis organ baik terhadap ginjal dan jantung.<sup>142</sup> TGF- $\beta$  juga meningkatkan dediferensiasi sel epitel ginjal menjadi sel mesenkimal yang memproduksi matrix melalui proses *epithelial-to-mesenchymal transition* (EMT).<sup>143</sup>

Studi Yoshikawa et al., menunjukkan bahwa TSA dapat memblok TGF- $\beta$  yang memperantarai EMT, mengurangi ekspresi profibrotik ECM dan mempertahankan ekspresi E-cadherin, marker fungsional epitel.<sup>144</sup> TSA juga meningkatkan ekspresi faktor renoprotektif, bone morphogenetic protein (BMP)-7, suatu inhibitor TGF- $\beta$  signaling yang dikenal menekan EMT dan mengembalikan fibrosis ginjal.<sup>145,146</sup> Pada model nefritis nefrotoksik pada mencit dengan injuri renal autoimun selama 3 minggu, pemberian TSA dapat mengurangi fibrosis dan mengembalikan fungsi ginjal secara signifikan.<sup>147</sup> Pemberian pan-HDAC dapat mengembalikan fungsi ginjal pada model ini.



Mekanisme yang mendasari efikasi HDAC inhibitor oleh stem cell di dalam ginjal. <sup>136</sup> sebagian disebabkan oleh rangsangan ekspresi BMP-

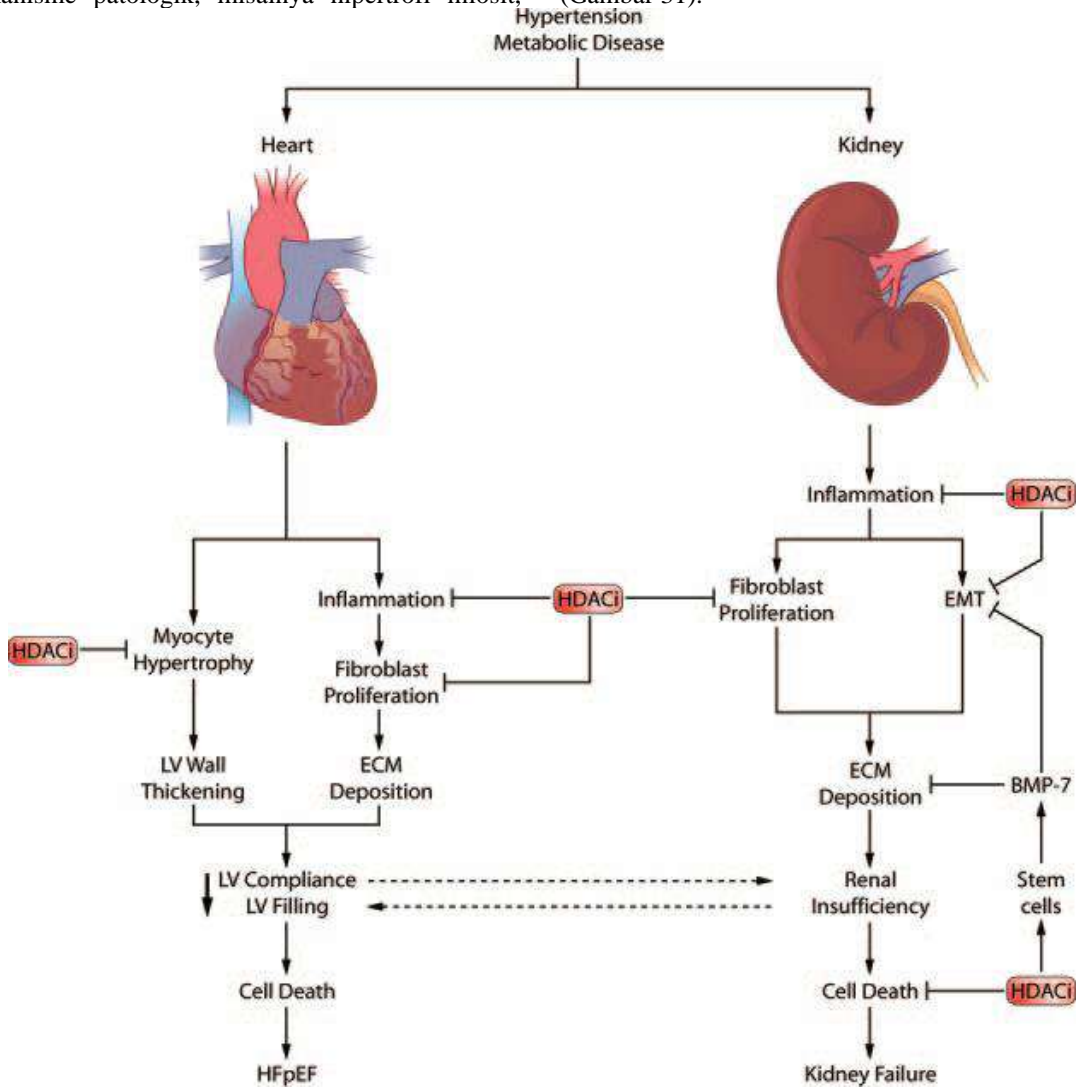


**Gambar 30.** Regulasi gen jantung oleh HDAC inhibitor. Stimuli stres memicu pengeluaran antihipertrofi HDAC class IIa melalui nukleus. HDAC kelas IIa memiliki aktivitas intrinsik katalitik minimal sehingga resisten terhadap HDAC inhibitor. Pada kondisi patologik, faktor transkripsi YY1 terikat pada HDAC kelas I, HDAC 2 mendeasetilasi YY1, meningkatkan ekspresi gen BNP. HDAC kelas I mendeasetilasi faktor transkripsi Nkx2.5, sehingga meningkatkan hubungan terhadap p300 HAT dan merangsang ekspresi gen NCX1. Karena itu, penggunaan inhibitor HDAC dapat menghambat ekspresi gen tersebut. Inhibitor HDAC merangsang gen Klf4 dan Egr1 di dalam jantung, sehingga dapat menghambat hipertrofi (Klf4) dan meningkatkan gen kontraktilitas (Egr1).  
Dikutip dari Bush EW, McKinsey TA. Protein acetylation in the cardiorenal axis. The promise of histone deacetylase inhibitors. *Circ Res.* 2010;106:272-284.

Restorasi asetilasi protein oleh HDAC inhibitor menjanjikan pada penyakit kardiorrenal. Kemampuan HDAC inhibitor dapat disebabkan kemampuan

senyawa ini mempengaruhi berbagai tipe sel seperti miosit, fibroblast, sel epitel, sel inflamatori dan mekanisme patologik, misalnya hipertrofi miosit,

produksi sitokin inflamatori, EMT, deposisi ECM, dan apoptosis yang menyebabkan gagal organ (Gambar 31).<sup>136</sup>



**Gambar 31.** Target HDAC inhibitor terhadap mekanisme patologik pada penyakit jantung dan ginjal kronik. Stres kronik hipertensi dan diabetes menyebabkan hipertrofi kardiomyosit dan inflamasi yang menyebabkan fibrosis kardiorenal, mengurangi fungsi organ, kematian sel dan akhirnya menyebabkan gagal organ. HDAC inhibitor dapat menargetkan berbagai tipe sel dalam progresivitas penyakit. HDAC inhibitor bersifat kardioprotektif dan renoprotektif, memblokir hipertrofi jantung dan mencegah kematian sel ginjal pada model gagal jantung dan gagal ginjal.

Dikutip dari Bush EW, McKinsey TA. Protein acetylation in the cardiorenal axis. The promise of histone deacetylase inhibitors. *Circ Res.* 2010;106:272-284.

**DAFTAR PUSTAKA**

1. Hardin J and Bertoni G. Becker’s world of the cell. The cell cycle and mitosis. 9 ed. Pearson Education, Inc. , USA 2016; p. 714-745.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 5 ed Garland Science, USA, 2008; p.

- 1053-1114.
3. Beigi F, Schmeckpeper J, Pow-anpongkul P, Payne JA, Zhang L, Zhang Z, Huang J, Mirotso M, Dzau VJ. C3orf58, a novel paracrine protein, stimulates cardiomyocyte cell-cycle progression through the PI3K–AKT–CDK7 pathway. *Circ Res.* 2013;113:372-380.
4. McCoy, Jr JP. Basic principles in clinical flow



- cytometry. In : Carey JL, McCoy Jr. JP, Keren DF. Eds. Flow cytometry in clinical diagnosis. 4 th ed. ASCP. Singapore 2007, p. 15-34.
5. Watt FM, Hogan BLM. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 2000; 287: 1427-1430.
  6. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 2014; 505: 327-334.
  7. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature* 2001; 414: 98-104.
  8. Konstantinov IE. In search of Alexander A. Maximow: The man behind the unitarian theory of hematopoiesis. *Perspect Biol Med* 2000; 43: 269-276.
  9. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282:1145-147.
  10. Gearhart J. New human embryonic stem-cell lines -more is better. *N Engl J Med* 2004; 350: 1275-1276.
  11. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154-156.
  12. Bubak AN, Elsworth JD, Sladek JR. Animal models in regenerative medicine. In : Vertes AA, Qureshi N, Caplan AI, Babiss LE eds. Stem cells in regenerative medicine : science, regulation and business strategies. Ed 1, John Wiley & Sons, Ltd, 2015, p. 303- 316.
  13. Rossant J. Embryonic stem cells in perspective. In : Lanza R & Atala A eds. Essential of stem cell biology. 3<sup>rd</sup> ed. Academic Press. 2014, p. 35-38.
  14. Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G, Franco-Cardenas V, Pan CK, Ostrick RM, Mickunas E, Gay R, Klimanskaya I, Lanza R. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet* 2012; 379: 713-20.
  15. Schwartz SD, Regillo CD, Lam BL, Elliott D, Rosenfeld PJ, Gregori NZ, Hubschman JP, Davis JL, Heilwell G, Spirm M, Maguire J, Gay R, Bateman J, Ostrick RM, Morris D, Vincent M, Anglade E, Del Priore LV, Lanza R. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet* 2015; 385: 509-16.
  16. Genbacev O, Krtolica A, Zdravkovic T et al. Serum free derivation of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeder. *Fertility and Sterility* 2005; 83: 1517-1529.
  17. Mummery CL, Zhang J, Ng ES, Elliott DA, Elefanty AG, Kamp TJ. Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview. *Circ Res.* 2012;111:344–358.
  18. Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res.* 2002;91:501–508.
  19. He JQ, Ma Y, Lee Y, Thomson JA, Kamp TJ. Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. *Circ Res.* 2003;93:32–39.
  20. Sartiani L, Bettiol E, Stillitano F, Mugelli A, Cerbai E, Jaconi ME. Developmental changes in cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells: a molecular and electrophysiological approach. *Stem Cells.* 2007;25:1136-1144.
  21. Menard C, Haggge AA, Agbulut O, Barro M, Morichetti MC, Brasselet C, Bel A, Messas E, Bissery A, Bruneval P, Desnos M, Puc.at M, Menasch. P. Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic stem cells to infarcted sheep myocardium: a preclinical study. *Lancet.* 2005;366:1005–1012.
  22. Cai J, Yi FF, Yang XC, Lin GS, Jiang H, Wang T, Xia Z. Transplantation of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves cardiac function in infarcted rat hearts. *Cytotherapy.* 2007;9:283–291.
  23. Nussbaum J, Minami E, Laflamme MA, Virag JA, Ware CB, Masino A, Muskheli V, Pabon L, Reinecke H, Murry CE. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB J.* 2007;21:1345–1357.
  24. Sanganalmath SK, Bolli R. Cell therapy for heart failure. A comprehensive overview of experimental and clinical studies. Current challenges, and future directions. *Circ Res.* 2013;113:810-834.
  25. Schuldiner M, Itskovitz-Eldor J, Benvenisty N. Selective ablation of human embryonic stem cells expressing a “suicide” gene. *Stem Cells.* 2003;21:257–265.
  26. Cao F, Lin S, Xie X, Ray P, Patel M, Zhang X, Drukker M, Dylla SJ, Connolly AJ, Chen X, Weissman IL, Gambhir SS, Wu JC. In vivo

- visualization of embryonic stem cell survival, proliferation, and migration after cardiac delivery. *Circulation*. 2006;113:1005–1014.
27. Seita J, Weissman IL. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2010; 2: 640-653.
  28. Maximow, A. Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere. *Folia Haematol. (Frankf.)* 1909; 8: 125-134.
  29. Eaves CJ. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood* 2015; 125 :2605-2613.
  30. Weissman IL, Shizuru JA. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood*. 2008;112:3543-3553.
  31. Jacobson LO, Simmons EL, Marks EK, Robson MJ, Bethard WF, Gaston EO. The role of the spleen in radiation injury and recovery. *J Lab Clin Med*. 1950;35:746-770.
  32. Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst* 1951;12:197-201.
  33. Jacobson LO, Simmons EL, Marks E, Eldredge JH. Recovery from radiation injury. *Science*. 1951;113:510-511.
  34. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*. 1961;14:213-222.
  35. Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 1963;197:452-454.
  36. Wolpe SD, Koh L. Hematopoietic stem cell. In : Vertes AA eds. *Stem cells in regenerative medicine. : science, regulation and business strategies*. Ed 1, John Wiley & Sons, Ltd, 2015, p. 397-413.
  37. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. 1988; 241:58-62.
  38. Osawa M, et al. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*. 1996; 273:242-245.
  39. Civin CI, et al. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol*. 1984; 133: 157-165.
  40. DiGiusto D, et al. Human fetal bone marrow early progenitors for T, B, and myeloid cells are found exclusively in the population expressing high levels of CD34. *Blood*. 1994; 84 :421-432.
  41. Krause DS, et al. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*. 1996; 87:1-13.
  42. Goodell MA. CD341 or CD342: Does it Really Matter? *Blood* 1999; 8: 2545-2547.
  43. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* 2011;146:873-887.
  44. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells. characterization and role in vascular biology. *Circ Res*. 2004;95:343-353.
  45. Prof. Hadyanto Lim. *Stem cell kardiovaskuler*. Ed 2. Vol 1. PT Sofmedia 2012, p.127-144.
  46. Patel AN, Geffner L, Vina RF, Saslavsky J, Urschel HC Jr, Kormos R, Benetti F. Surgical treatment for congestive heart failure with autologous adult stem cell transplantation: a prospective randomized study. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005;130:1631-1638.
  47. Vrtovec B, Poglajen G, Sever M, Lezaic L, Domanovic D, Cernelc P, Haddad F, Torre-Amione G. Effects of intracoronary stem cell transplantation in patients with dilated cardiomyopathy. *J Card Fail*. 2011;17:272-281.
  48. Vrtovec B, Poglajen G, Lezaic L, Sever M, Domanovic D, Cernelc P, Socan A, Schrepfer S, Torre-Amione G, Haddad F, Wu JC. Effects of intracoronary CD34+ stem cell transplantation in nonischemic dilated cardiomyopathy patients: 5-year follow-up. *Circ Res*. 2013;112:165-173.
  49. Manginas A, Goussetis E, Koutelou M, Karatasakis G, Peristeri I, Theodorakos A, Leontiadis E, Plessas N, Theodosaki M, Graphakos S, Cokkinos DV. Pilot study to evaluate the safety and feasibility of intracoronary CD133(+) and CD133(-) CD34(+) cell therapy in patients with nonviable anterior myocardial infarction. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2007;69:773-781.
  50. Losordo DW, Henry TD, Davidson C, Lee JS, Costa MA, Bass T, Mendelsohn F, Fortuin FD, Pepine CJ, Traverse JH, Amrani D, Ewenstein BM, Riedel N, Story K, Barker K, Povsic TJ, Harrington RA, Schatz RA, the ACT34-CMI Investigators. Intramyocardial, autologous

- CD34+ cell therapy for refractory angina. *Circ Res.* 2011;109: 428-436.
51. Lim H, Lindarto D, Zein U, Hariaji I. Intravenous mobilized autologous peripheral blood CD34+ stem cell transplantation for angina (in press).
  52. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284:143–147.
  53. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation.* 2002;105:93–98.
  54. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest.* 2002;109:337–346.
  55. Reinecke H, Minami E, Zhu WZ, Laflamme MA. Cardiogenic differentiation and transdifferentiation of progenitor cells. *Circ Res.* 2008;103:1058–1071.
  56. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36:568–584.
  57. Prof. Hadyanto Lim. *Stem Cell Kardiovaskuler ed 2, vol 2.* PT Sofmedia, 2015, p. 174-192.
  58. Wang Z, Shuch G, Williams K, Soker S. In Lanza R eds. *Essentials of stem cell biology.* 3<sup>rd</sup> ed Elsevier 2014. p. 227-244.
  59. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, Maini RN. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 2000;2:477–488.
  60. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol.* 2000;109:235–242.
  61. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7:211–228.
  62. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 2001;44:1928–1942.
  63. Sabatini F, Petecchia L, Taviani M, Jodon de Villeroche V, Rossi GA, Brouty-Boye D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Lab Invest.* 2005;85:962–971.
  64. Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells.* 2007;25:1384–1392.
  65. Crisan M, Yao S, Castejolla L et al., A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 2008; 3: 301-313.
  66. Caplan AI. All MSCs are pericytes ? *Cell Stem Cell* 2008; 3: 229-230.
  67. Caplan AI. MSCs: the new medicine. In : Vertes AA eds. *Stem cells in regenerative medicine. : science, regulation and business strategies.* Ed 1, John Wiley & Sons, Ltd, 2015, p. 415-421.
  68. Caplan AI. What's in a name ? *Tissue Engineering Part A* 2010; 16: 2415-2417.
  69. Schuleri KH, Feigenbaum GS, Centola M, Weiss ES, Zimmet JM, Turney J, Kellner J, Zviman MM, Hatzistergos KE, Detrick B, Conte JV, McNiece I, Steenbergen C, Lardo AC, Hare JM. Autologous mesenchymal stem cells produce reverse remodelling in chronic ischaemic cardiomyopathy. *Eur Heart J.* 2009;30:2722–2732.
  70. Silva GV, Litovsky S, Assad JA, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation.* 2005;111:150–156.
  71. Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, St John M, Xie JS, Cattaneo S, Durand DJ, Fitton T, Kuang JQ, Stewart G, Lehrke S, Baumgartner WW, Martin BJ, Heldman AW, Hare JM. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:11474–11479.
  72. Amado LC, Schuleri KH, Saliaris AP, Boyle AJ, Helm R, Oskoueï B, Centola M, Eneboe V, Young R, Lima JA, Lardo AC, Heldman AW, Hare JM. Multimodality noninvasive imaging demonstrates in vivo cardiac regeneration after mesenchymal stem cell therapy. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:2116–2124.
  73. Gneocchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, Noiseux N, Zhang L, Pratt RE, Ingwall JS, Dzau VJ. Paracrine action

- accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med.* 2005;11:367–368
74. Li W, Ma N, Ong LL, Nesselmann C, Klopsch C, Ladilov Y, Furlani D, Piechaczek C, Moebius JM, Lützwow K, Lendlein A, Stamm C, Li RK, Steinhoff G. Bcl-2 engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function. *Stem Cells.* 2007;25:2118–2127.
  75. Karantalis V, Hare JM. Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease. *Circ Res.* 2015;116:1413–1430.
  76. Molina EJ, Palma J, Gupta D, Torres D, Gaughan JP, Houser S, Macha M. Reverse remodeling is associated with changes in extracellular matrix proteases and tissue inhibitors after mesenchymal stem cell (MSC) treatment of pressure overload hypertrophy. *J Tissue Eng Regen Med.* 2009;3:85–91.
  77. Psaltis PJ, Zannettino AC, Worthley SG, Gronthos S. Concise review: mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair. *Stem Cells.* 2008;26:2201–2210.
  78. McCall FC, Telukuntla KS, Karantalis V, Suncion VY, Heldman AW, Mushtaq M, Williams AR, Hare JM. Myocardial infarction and intramyocardial injection models in swine. *Nat Protoc.* 2012;7:1479–1496.
  79. Quevedo HC, Hatzistergos KE, Oskouei BN, Feigenbaum GS, Rodriguez JE, Valdes D, Pattany PM, Zambrano JP, Hu Q, McNiece I, Heldman AW, Hare JM. Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106: 14022–14027.
  80. Williams AR, Hare JM. Stem cells biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res.* 2011;109:923–940.
  81. Gneocchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res.* 2008;103:1204–1219.
  82. Gneocchi M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, Mu H, Melo LG, Pratt RE, Ingwall JS, Dzau VJ. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J.* 2006;20:661–669.
  83. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation.* 2004; 109:1543–1549.
  84. Mirotsov M, Zhang Z, Deb A, Zhang L, Gneocchi M, Noiseux N, Mu H, Pachori A, Dzau V. Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104: 1643–1648.
  85. Li H, Zuo S, He Z, Yang Y, Pasha Z, Wang Y, Xu M. Paracrine factors released by GATA-4 overexpressed mesenchymal stem cells increase angiogenesis and cell survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010; 299:H1772–H1781.
  86. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem.* 2006;98:1076–1084.
  87. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol.* 1996;166:585–592.
  88. Hatzistergos KE, Quevedo H, Oskouei BN, Hu Q, Feigenbaum GS, Margitich IS, Mazhari R, Boyle AJ, Zambrano JP, Rodriguez JE, Dulce R, Pattany PM, Valdes D, Revilla C, Heldman AW, McNiece I, Hare JM. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ Res.* 2010;107:913–922.
  89. Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, et al. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA.* 2012;308:2369–2379.
  90. Heldman AW, DiFede DL, Fishman JE, et al. Transendocardial mesenchymal stem cells and mononuclear bone marrow cells for ischemic cardiomyopathy: the TAC-HFT randomized trial. *JAMA.* 2014;311:62–73.
  91. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, Czer LS, Marbán L, Mendizabal A, Johnston PV, Russell SD, Schuleri KH, Lardo AC, Gerstenblith G, Marbán E. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet.* 2012;379:895–904.
  92. Bartunek J, Behfar A, Dolatabadi D, et al. Cardiopoietic stem cell therapy in heart failure:

- the C-CURE (Cardiopietic stem Cell therapy in heart failURE) multicenter randomized trial with lineage-specified biologics. *J Am Coll Cardiol.* 2013;61:2329–2338.
93. Chugh AR, Beache GM, Loughran JH, Mewton N, Elmore JB, Kajstura J, Pappas P, Tatooles A, Stoddard MF, Lima JA, Slaughter MS, Anversa P, Bolli R. Administration of cardiac stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy: the SCIPIO trial: surgical aspects and interim analysis of myocardial function and viability by magnetic resonance. *Circulation.* 2012;126:S54–S64.
  94. Sanina C, Hare JM. Mesenchymal stem cells as a biological drug for heart disease. Where are we with cardiac cell-based therapy? *Circ Res.* 2015;117:229–233.
  95. Hare JM, Traverse JH, Henry TD, Dib N, Strumpf RK, Schulman SP, Gerstenblith G, DeMaria AN, Denktas AE, Gammon RS, Hermiller JB Jr, Reisman MA, Schaer GL, Sherman W. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54:2277–2286.
  96. Planat-B.nard V, Menard C, Andr. M, Puceat M, Perez A, Garcia- Verdugo JM, P.nicaud L, Casteilla L. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res.* 2004;94:223–229.
  97. Miranville A, Heeschen C, Sengen.s C, Curat CA, Busse R, Bouloumi. A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue- derived stem cells. *Circulation.* 2004;110:349–355.
  98. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, Ishino K, Ishida H, Shimizu T, Kangawa K, Sano S, Okano T, Kitamura S, Mori H. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med.* 2006;12:459–465.
  99. Mazo M, Planat-B.nard V, Abizanda G, et al. Transplantation of adipose derived stromal cells is associated with functional improvement in a rat model of chronic myocardial infarction. *Eur J Heart Fail.* 2008;10:454–462.
  100. Perin EC, Sanchez PL, Ruiz RS et al. First in man transendocardial injection of autologous adipose-derived stem cells in patients with non revascularizable ischemic myocardium (precise). *Circulation.* 2010;122:A17966.
  101. Afzal MR, Samanta A, Shah ZI, Jeevanantham V, Abdel-Latif A, Zuba-Surma EK, Dawn B. Adult bone marrow cell therapy for ischemic heart disease. Evidence and insights from randomized controlled trials. *Circ Res.* 2015;117:558–575.
  102. Cogle CR, Wise E, Meacham AM, Zierold C, Traverse JH, Henry TD, Perin EC, Willerson JT, Ellis SG, Carlson M, Zhao DXM, Bolli R, Cooke JP, Anwaruddin S, Bhatnagar A, Cabreira-Hansen MDG, Grant MB, Lai D, Moy L, Ebert RF, Olson RE, Sayre SL., Schulman IH, Bosse RC, Scott EW, Simari RD, Pepine CJ, Taylor DA; for the Cardiovascular Cell Therapy Research Network (CCTRN) Detailed nalysis of bone marrow from patients with heart disease and left ventricular dysfunction BM CD34, CD11b, and clonogenic capacity as biomarkers for clinical outcomes. *Circ Res.* 2014;115:867–874.
  103. Patel RS, Li Q, a Ghasemzadeh N, Eapen DJ, Moss LD, Janjua AM, Manocha P, Kassem HA, Veledar E, Samady H, Taylor WR, A. Maziar Zafari AM, Sperling L, Vaccarino V, Waller EK, Quyyumi AA. Circulating CD34+ progenitor cells and risk of mortality in a population with coronary artery disease. *Circ Res.* 2015;116:289–297
  104. Li L, Clevers H. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science* 327, 542–545
  105. Kunisaki Y, Bruns I, Scheiermann C, Ahmed J, Pinho S, Zhang D, Mizoguchi T, Wei Q, Lucas D, Ito K, Mar JC, Bergman A, Frenette PS. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature* 2013; 502: 737–643.
  106. Schepers K, Campbell TB, Passegue E. Normal and leukemic stem cell niches: Insights and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell* 2015;16:254–267.
  107. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Role of cardiac stem cells in cardiac pathophysiology:a paradigm shift in human myocardial biology. *Circ Res.* 2011;109:941–961.
  108. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal- Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell.* 2003;114:763–776.
  109. Bearzi C, Rota M, Hosoda T, et al. Human

- cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:14068–14073.
110. Urbanek K, Torella D, Sheikh F, De Angelis A, Nurzynska D, Silvestri F, Beltrami CA, Bussani R, Beltrami AP, Quaini F, Bolli R, Leri A, Kajstura J, Anversa P. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:8692–8697.
  111. Rota M, Padin-Iruegas ME, Misao Y, et al. Local activation or implantation of cardiac progenitor cells rescues scarred infarcted myocardium improving cardiac function. *Circ Res*. 2008;103:107–116.
  112. Tang XL, Rokosh G, Sanganalmath SK, et al. Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction. *Circulation*. 2010;121:293–305.
  113. Bolli R, Tang XL, Sanganalmath SK, Rimoldi O, Mosna F, Abdel-Latif A, Jneid H, Rota M, Leri A, Kajstura J. Intracoronary delivery of autologous cardiac stem cells improves cardiac function in a porcine model of chronic ischemic cardiomyopathy. *Circulation*. 2013;128:122–131.
  114. Bolli R, Chugh AR, D’Amaro D, et al. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet*. 2011;378:1847–1857.
  115. Chugh AR, Beache GM, Loughran JH, Mewton N, Elmore JB, Kajstura J, Pappas P, Tatooles A, Stoddard MF, Lima JA, Slaughter MS, Anversa P, Bolli R. Administration of cardiac stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy: the SCIPIO trial: surgical aspects and interim analysis of myocardial function and viability by magnetic resonance. *Circulation*. 2012;126:S54–S64.
  116. Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, Salio M, Battaglia M, Latronico MV, Coletta M, Vivarelli E, Frati L, Cossu G, Giacomello A. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res*. 2004;95:911–921.
  117. Smith RR, Barile L, Cho HC, Leppo MK, Hare JM, Messina E, Giacomello A, Abraham MR, Marbán E. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation*. 2007;115:896–908.
  118. Johnston PV, Sasano T, Mills K, Evers R, Lee ST, Smith RR, Lardo AC, Lai S, Steenbergen C, Gerstenblith G, Lange R, Marbán E. Engraftment, differentiation, and functional benefits of autologous cardiosphere-derived cells in porcine ischemic cardiomyopathy. *Circulation*. 2009;120:1075–1083.
  119. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, Czer LS, Marban L, Mendizabal A, Johnston PV, Russell SD, Schuleri KH, Lardo AC, Gerstenblith G, Marbán E. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet*. 2012;379:895–904.
  120. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126:663–676.
  121. Pfannkuche K, Liang H, Hannes T, Xi J, Fatima A, Nguemo F, Matzkies M, Wernig M, Jaenisch R, Pillekamp F, Halbach M, Schunkert H, Sarić T, Hescheler J, Reppel M. Cardiac myocytes derived from murine reprogrammed fibroblasts: intact hormonal regulation, cardiac ion channel expression and development of contractility. *Cell Physiol Biochem*. 2009;24:73–86.
  122. Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, Hargus G, Blak A, Cooper O, Mitalipova M, Isacson O, Jaenisch R. Parkinson’s disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*. 2009;136:964–977.
  123. Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K. Virus free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*. 2009;458:771–775.
  124. Riggs JW, Barrilleaux BL, Varlakhanova N, Bush KM, Chan V, Knoepfler PS. Induced pluripotency and oncogenic transformation are related processes. *Stem Cells Dev*. 2013;22:37–50.
  125. Ma T, Xie M, Laurent T, Ding S. Progress in the reprogramming of somatic cells. *CRes*. 2013;112:562–574.
  126. Scudellari M. A decade of iPS cells. *Nature* 2016; 310: 310–312.
  127. Zwaka TP. Stem cells : troublesome memory. *Nature* 2010; 467: 280–281.
  128. Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan

- P, Kim J, Aryee MJ, Ji M, Ehrlich LIR, Yabuuchi A, Takeuchi A, Cunniff1 KC, Hongguang H, Mckinney-Freeman S, Naveiras O, Yoon TJ, Irizarry RA, Jung N, Seita J, Hanna J, Murakami P, Jaenisch R, Weissleder R, Orkin SH, Weissman IL, Feinberg AP, Daley GQ. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 2010; 467 285-292.
129. Editorial. Beyond the genome. *Nature* 2015; 518: 273.
130. Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev.* 2009;23:781–783.
131. Tellefsbol TO. Epigenetics of human disease. In : Tellefsbol ed. *Epigenetic in human disease*. Elsevier Inc 2012; p. 106.
132. Dawson MA, Tony Kouzarides T, Huntly BJP. Targeting epigenetic readers in cancer. *N Engl J Med* 2012;367:647-57.
133. Segal E, Widom J. What controls nucleosome positions? *Trends Genet* 2009; 25:335-43.
134. Ecker JR. Serving up a genome feast. *Nature* 2012; 489: 52-53.
135. Shafa M, Rancourt DE. Stem cell epigenetics and human disease. In : *Epigenetics of human disease*. In : Tellefsbol ed. *Epigenetic in human disease*. Elsevier Inc 2012; p. 481-501.
136. Bush EW, McKinsey TA. Protein acetylation in the cardiorenal axis. The promise of histone deacetylase inhibitors. *Circ Res.* 2010;106:272-284.
137. Gardin JM, Lauer MS. Left ventricular hypertrophy: the next treatable, silent killer? *JAMA.* 2004;292:2396–2398.
138. Zhang CL, McKinsey TA, Chang S, Antos CL, Hill JA, Olson EN. Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell.* 2002;110:479–488.
139. Kook H, Lepore JJ, Gitler AD, Lu MM, Wing-Man YW, Mackay J, Zhou R, Ferrari V, Gruber P, Epstein JA. Cardiac hypertrophy and histone deacetylase-dependent transcriptional repression mediated by the atypical homeodomain protein Hop. *J Clin Invest.* 2003;112: 863–871.
140. Glenn DJ, Wang F, Chen S, Nishimoto M, Gardner DG. Endothelin stimulated human B-type natriuretic peptide gene expression is mediated by Yin Yang 1 in association with histone deacetylase 2. *Hypertension.* 2009;53:549–555.
141. Chandrasekaran S, Peterson RE, Mani SK, Addy B, Buchholz AL, Xu L, Thiyagarajan T, Kasiganesan H, Kern CB, Menick DR. Histone deacetylases facilitate sodium/calcium exchanger up-regulation in adult cardiomyocytes. *FASEB J.* 2009;23:3851–3864.
142. Lim H, Zhu YZ. Role of transforming growth factor- $\beta$  in the progression of heart failure. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 2584-2596.
143. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009;119:1420–1428.
144. Yoshikawa M, Hishikawa K, Marumo T, Fujita T. Inhibition of histone deacetylase activity suppresses epithelial-to-mesenchymal transition induced by TGF-beta1 in human renal epithelial cells. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18:58–65.
145. Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, Kalluri R. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med.* 2003;9:964–968.
146. Zeisberg M, Kalluri R. Reversal of experimental renal fibrosis by BMP7 provides insights into novel therapeutic strategies for chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 2008;23:1395–1398.
147. Imai N, Hishikawa K, Marumo T, Hirahashi J, Inowa T, Matsuzaki Y, Okano H, Kitamura T, Salant D, Fujita T. Inhibition of histone deacetylase activates side population cells in kidney and partially reverses chronic renal injury. *Stem Cells.* 2007;25:2469–2475.

## 2

# Epigenetik : Ilmu Baru Genetik

<b>PENDAHULUAN</b>	42	<b>METODE PEMERIKSAAN EPIGENETIK</b>	54
<b>METILASI DNA</b>	45	<b>PEMERIKSAAN METILASI DNA</b>	54
<b>MODIFIKASI KROMATIN</b>	46	<b>PRINSIP PEMERIKSAAN METILASI DNA</b>	54
Asetilasi dan deasetilasi	46	<b>TEKNIK PEMERIKSAAN</b>	55
Fosforilasi	47	Southern-blot hybridization	55
Metilasi	48	COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis)	57
Ubiquitilasi dan Sumoilasi	48	MSP (Methylation-specific PCR)	57
<b>NONCODING RNA</b>	48	Real time MSP dan MethyLight	57
Short ncRNA dan miRNA	48	Pyrosequencing	57
<b>MEKANISME EPIGENETIK</b>		MassARRAY	57
<b>DALAM PENGATURAN</b>		<b>PEMERIKSAAN MODIFIKASI KROMATIN</b>	57
<b>EKSPRESI GEN PADA</b>		<b>CHROMATIN IMMUNOPRECIPITATION</b>	57
<b>RISIKO KARDIOVASKULER</b>	49	(ChIP)	57
<b>METILASI DNA DAN</b>		<b>METILASI DNA PADA RISIKO DAN</b>	
<b>MODIFIKASI KROMATIN</b>	49	<b>PENYAKIT KARDIOVASKULER</b>	60
<b>MICRORNA</b>	52	<b>INTERVENSI EPIGENETIK DALAM</b>	
		<b>MENCEGAH PENYAKIT KARDIOVASKULER</b>	61

*“Great things are done by a series of small things brought together”*

*-Vincent van Gogh-*

## PENDAHULUAN

Pada manusia, informasi genetik (DNA) tersusun di dalam 23 pasang kromosom berjumlah kurang lebih 25.000 gen. Kromosom ini diibaratkan sebagai sebuah pustaka dengan berbagai jenis buku berbeda di dalamnya, yang memberikan instruksi terbentuk seorang manusia; tersusun oleh jaringan tubuh yang dibentuk oleh protein. Sekuens DNA di dalam genom terdiri atas  $3 \times 10^9$  (3 miliar) basa, disingkat dengan 4 huruf; A,C,G, dan T di dalam urutan basa, sehingga memberikan suatu rangkaian kata (gen), kalimat, bab dan buku. Namun, bagaimana kejadian sel dikordinasi selama perkembangan normal dan abnormal merupakan suatu tantangan dalam mengungkapkannya.<sup>1</sup>

Jika molekul DNA dari sel eukariot dibentangkan, maka panjang sekitar 2 meter harus dikondensasikan secara maksimal menjadi 10.000 lipatan untuk diisikan di dalam sebuah nukleus, ruang yang menyimpan materi genetik. DNA yang mengelilingi suatu “bantalan benang” protein, yang dikenal sebagai protein histon, adalah polimer DNA yang disebut kromatin. Ketika tumpukan DNA berada di dalam ruangan terbatas, maka timbul masalah sulit mendapatkan buku pilihan, karena itu diperlukan sistem indeks. Kromatin sebagai platform penyusun genom memberikan indeks. Kromatin bersifat fleksibel, karena dapat mengalami kondensasi (dikenal heterokromatin) atau kurang kondensasi (eukromatin). Hal ini terjadi karena adanya variasi kromatin yang

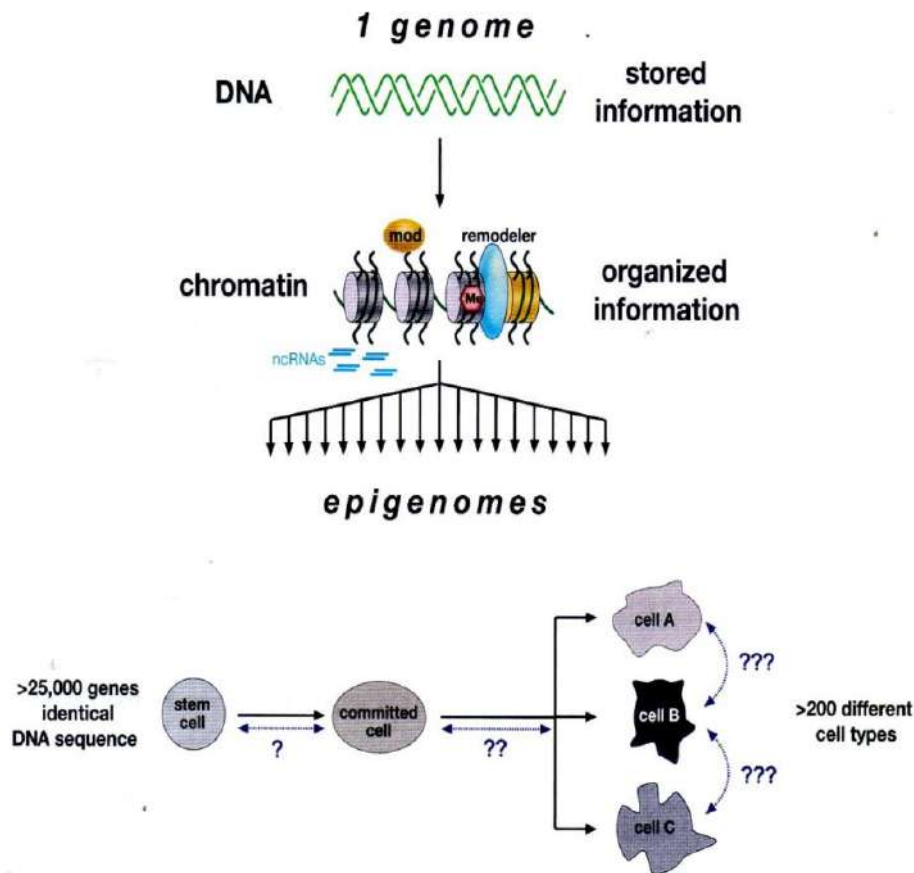


dikenal sebagai protein histon yang tidak lazim (histon varian), perubahan struktur kromatin (remodeling kromatin), dan penambahan unsur kimia ke dalam protein histon (modifikasi kovalen). Penambahan satu gugus metil ke dalam satu basa cytosine (c) dalam cetakan DNA (dikenal metilasi DNA) dan histon kovalen dapat mengubah kondisi kromatin. Noncoding RNA dapat “menuntun” regio khusus di dalam genom menjadi kromatin yang lebih kondensasi. Karena itu, kromatin bersifat dinamik dalam menentukan indeks genom dan signal protein dari pengaruh lingkungan, sehingga menentukan apakah gen akan diekspresikan atau tidak.<sup>1</sup>

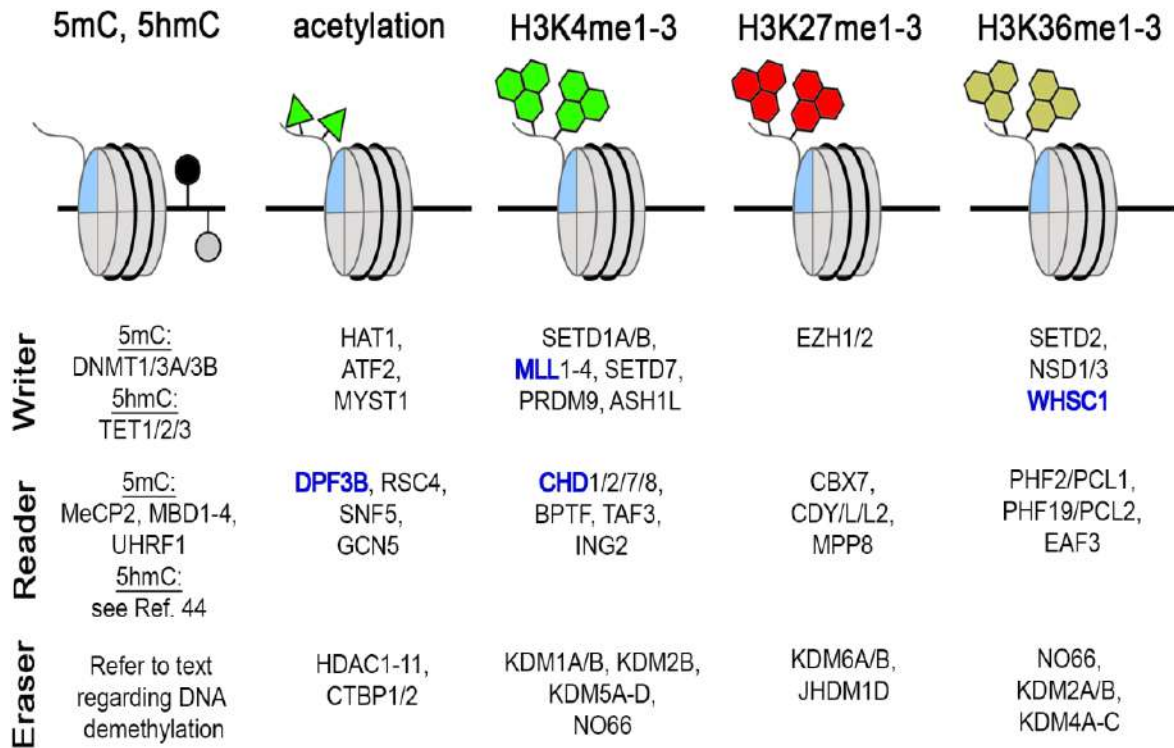
Pengaturan kromatin di dalam genom dikenal sebagai “epigenetik”. Jadi, epigenetik memberikan pola indeks yang diturunkan pada pembelahan sel, memberikan

“memori” seluler, yang merupakan ekstensi informasi diturunkan dari kode genetik (DNA). Karena itu, epigenetik dapat didefinisikan sebagai perubahan dalam transkripsi gen melalui perubahan kromatin, tanpa proses perubahan sekuensi DNA. Proses epigenetik yang menyebabkan perubahan ekspresi gen umumnya melalui proses metilasi DNA, modifikasi kromatin dan non-coding RNA.<sup>2</sup>

Proses perkembangan pada sebuah sel telur yang dibuahi dapat berlanjut dari satu genom tunggal menghasilkan sejumlah “epigenom” berbeda pada lebih dari 200 jenis sel (Gambar 1)<sup>1</sup>. Variasi program ini dikenal sebagai “kode epigenetik” yaitu mekanisme kovalen dan non kovalen yang berpengaruh terhadap kondisi kromatin melalui pembelahan dan perkembangan sel.



**Gambar 1.** Sekuensi DNA (untaian ganda berwarna hijau). Komposisi kromatin pada seluruh genom bergantung pada tipe sel, dan respon terhadap signal internal dan ekstena. (Panel bawah) Divertifikasi genom pada organisme multiseluler selama perkembangan dan diferensiasi dari satu stem cell (embrio yang telah dibuahi) menjadi sel terdiferensiasi. Pengembalian diferensiasi (de-deferensiasi) atau transdiferensiasi (garis biru) memerlukan *reprogramming* epigenom sel. Dikutip dari Allis CD, Jenuwen T, Reinberg D. Overview and concepts. In : Allis CD eds., *Epigenetics* Cold Spring Harbour Laboratory Press 2007, p. 23-61.



**Gambar 2.** Protein yang terlibat dalam regulasi modifikasi epigenetik. Writer menunjukkan enzim mengkatalisis modifikasi. Reader adalah protein atau kompleks multiprotein yang mengenal dan berikatan dengan modifikasi, dan eraser adalah kelompok enzim yang mengkatalisis *epigenetic* mark. Koordinasi pengaturan ketiga kelompok tidak hanya mempertahankan epigenetik yang dapat diturunkan tetapi juga menentukan regulasi epigenetik selama perkembangan. Daftar modifikasi histon writer, reader, dan eraser amat panjang. Karena itu, hanya dimuat contoh masing-masing modifikasi. Protein dalam cetakan huruf biru menunjukkan defek jantung ketika terjadi mutasi. DPF3B–Tetralogy of Fallot, MLL2–Kabuki Syndrome, CHD7–CHARGE Syndrome, WHSC1–Wolf-Hirschhorn Syndrome. 5mC menunjukkan 5-methylcytosine; 5hmC, 5-hydroxymethylcytosine; ASH1L, (absent, small or homeotic)-like; ATF, activating transcription factor 4; BPTF, bromodomain PHD finger transcription factor; CBX, chromobox; CDYL, chromodomain Y-like; CHD, chromodomain; CTBP, C-terminal binding protein; DNMTs, DNA methyltransferases; DPF3B, D4 Zinc and double PHD Fingers, family 3; EAF (Eleven nineteen lysine-rich leukemia gene)-associated factor; EZH, enhancer of zeste; GCN5, general control of amino-acid synthesis 5; H3K27me3, histone 3 lysine 27 trimethylation; HAT, histone acetyltransferase; HDAC, histone deacetylase; ING2, inhibitor of growth family member 2; JHDM1D, jumonji C domain-containing histone demethylase 1; KDM, lysine demethylase; MeCP2, methyl- CpG binding protein 2; MLL, mixed-lineage leukemia; MPP8, M-phase phosphoprotein 8; MYST1, MOZ YBF2 SAS2 TIP60 family member 1; NO66, nucleolar oxygenase 66; NSD1, nuclear receptor binding SET domain protein 1; PCL, polycystin-like; PHF2, PHD finger protein 2; RSC4, remodel the structure of chromatin complex subunit 4; SETD, su(var)3-9 and enhancer of zeste domain; SNF5, switch/sucrose nonfermentable (SWI/SNF) homolog 5; PRDM, PR domain-containing; TAF3, TATA box binding protein associating factor 3; TET, ten eleven translocation; UHRF1, ubiquitin-like PHD and Ring finger domain-containing protein 1; and WHSC1, Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1  
Dikutip dari Boland MJ, Nazor KL, Loring JF. *Epigenetic regulation of pluripotency and differentiation. Circ Res.* 2014;115:311-324.

Perubahan fenotipe yang terjadi dari sel ke sel selama perkembangan organisme multiseluler diungkapkan oleh Waddington sebagai “epigenetic landscape”. Namun, spektrum sel, dari stem cell ke sel yang mengalami diferensiasi memiliki sekuensi DNA yang sama, tetapi sangat berbeda dalam profil gen yang diekspresikan.<sup>2</sup>

Regulasi epigenetik terhadap stem cell meliputi modifikasi DNA, seperti 5-methylcytosine (5mC) dan 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), modifikasi ekor histon post-translasi, remodeling nukleosom *energy-dependent*, dan long noncoding RNA.<sup>3</sup> Modifikasi DNA oleh residu deoxycytidine memberikan efek terhadap ekspresi gen yang kuat.<sup>4,5,6</sup> Pemahaman terkini mengenai modifikasi histon

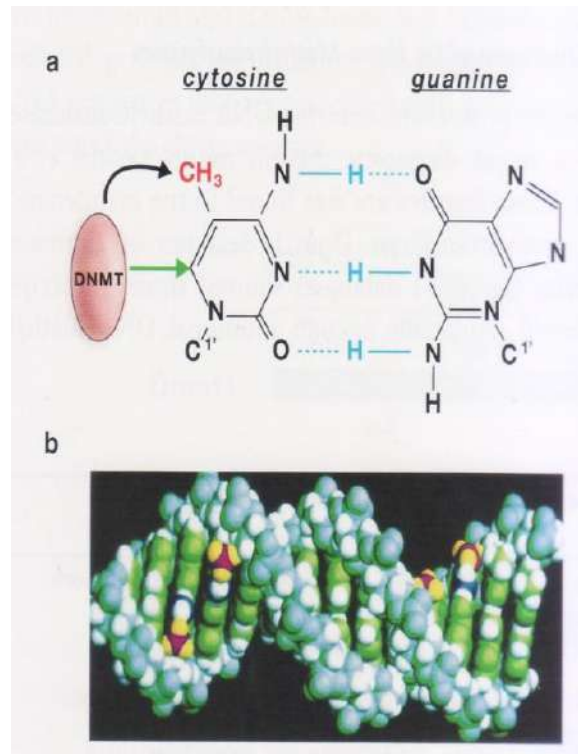
pada remodeling kromatin (kode histon) telah mengungkapkan berbagai hubungan epigenetik yang kompleks. Modifikasi DNA atau histon yang meliputi enzim yang mengkatalisis modifikasi (writer), protein yang mengenal dan berikatan dengan modifikasi (reader), dan enzim yang menghilangkan modifikasi (eraser). Misalnya histone 3 lysine 27 trimetilasi (H3K27 me3) dikatalisis oleh histone methyltransferase (HMTase) enhancer dari zeste homolog 2 (EZH2), dibaca oleh chromobox homolog 7 (CBX7), dan dihapus oleh lysine-specific demethylase UTX (Gambar 2).<sup>3</sup> Reader memiliki pengenalan terhadap motif yang khas seperti methyl-CpG binding domain untuk 5mC dan bromodomain untuk lysine atau arginine dalam modifikasi yang spesifik, termasuk chromodomain dan tudor, WD40 repeat, dan plant homeodomain (PHD) finger domain.<sup>7</sup>

Untuk mendapat gambaran yang lebih jelas dari pengaruh epigenetik terhadap stem cell di atas, maka dibahas cara pengaturan epigenetik terhadap sel mamalia. Proses epigenetik yang menyebabkan perubahan ekspresi gen umumnya melalui proses metilasi DNA, modifikasi kromatin dan non-coding RNA.<sup>8</sup> Berikut ini akan dipaparkan metilasi DNA, modifikasi histon, noncoding RNA yang berpengaruh terhadap elemen pengaturan spesifik yaitu promotor dan enhancer.

### METILASI DNA

Metilasi DNA bersifat diturunkan dan reversibel, merupakan modifikasi epigenetik yang memegang peranan penting dalam represi transkripsi, supresi transposisi retroelemen, *genomic imprinting*, XCI (X-chromosome inactivation), dan susunan kromatin.<sup>3</sup> Metilasi DNA melakukan pemindahan gugus metil dari S-adenosylmethionine (SAM) ke karbon 5 dari cincin cytosine untuk menghasilkan 5 mC dalam CpG dinucleotide (cytosine-guanine dinucleotide yang dipisahkan oleh satu phosphate).<sup>3,9</sup> Sekuens CpG cenderung dikelompokkan bersama dikenal sebagai *CpG island* mengelilingi gen promotor. Gen ini dapat diidentifikasi sebagai high (HCP) atau low (LCP) density promoter.<sup>10</sup> Reaksi pemindahan ini dikatalisis oleh DNA methyltransferase (DNMTs). Dikenal tiga enzim DNMT yaitu DNMT1, DNMT3A, DNMT3B dan kofaktor DNMT3L.<sup>3,9</sup> Ketika proses katalisis terjadi, gugus metil yang telah menempati tempat promotor dapat mencegah ikatan oleh faktor transkripsi dan juga ekspresi gen (Gambar 3).<sup>10, 11</sup>

Pada mamalia, metilasi DNA terjadi selama perkembangan embrio dan dipertahankan ketika terjadi pembelahan sel. Karena itu, pola metilasi DNA memungkinkan marking epigenetik genom tetap stabil melalui pembelahan sel mutipel sehingga membentuk memori sel.



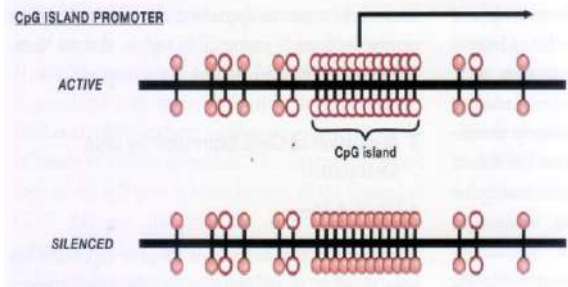
**Gambar 3.** Metilasi cytosine pada DNA.

(a) Penambahan satu gugus metil (merah) pada posisi 5 cincin pirimidin cytosine (tanda panah hitam) tidak mengganggu pasangan basa GC (garis biru). DNA methyltransferase berhubungan dengan karbon posisi 6 secara kovalen (tanda panah hijau) selama transfer gugus metil. (b) Model DNA dimetilasi panel b pada cytosine pada dua sekuensi yang saling komplementer. Gugus metil berpasangan (warna merah hati dan kuning) terletak pada sulkus mayor dari untaian ganda.

Dikutip dari Li En, Bird A. *DNA methylation n mamals*. In : *Allis CD eds. Epigenetics*. Cold Spring Harbour Laboratory press 2007, p. 341-355.

Penelitian molekuler dan genetik menunjukkan bahwa metilasi cytosine DNA berhubungan dengan *gene silencing* (Gambar 4).<sup>11</sup> Gugus metil dari residu metil cytosine berada di sulkus mayor DNA helix, tempat protein berikatan DNA dan memberikan efek menarik atau mengeluarkan protein yang berikatan dengan DNA. Sejumlah protein dapat berikatan dengan DNA yang mengandung CpG dinucleotide yang dimetilasi,

dikenal dengan *methyl CpG binding protein*, yang dapat merekrut kompleks represor terhadap regio promoter yang dimetilasi sehingga menyebabkan *transcriptional silencing*. Metilasi CpG mencegah ikatan protein dan berpengaruh terhadap transkripsi. Faktor transkripsi hanya dapat berikatan dengan sekuensi DNA yang mengandung CpG ketika tidak dimetilasi.<sup>11</sup>



**Gambar 4.** CpG islands.

CpG islands adalah regio dengan kepadatan CpG tinggi tetapi metilasi CpG berkurang pada promoter gen manusia. Silencing gen jangka panjang terjadi jika metilasi didapati pada CpG island. Misalnya, gen pada kromosom X inaktif dan *imprinted genes* yang mengalami silencing di tempat ini. Pada sel kanker terdapat gen tertentu yang mengalami silencing oleh metilasi pada CpG island.

Dikutip dari Li En, Bird A. DNA methylation n mamals. In : Allis CD eds. Epigenetics. Cold Spring Harbour Laboratory press 2007, p. 341-355.

## MODIFIKASI KROMATIN

Histon adalah unsur pembentuk nukleosom, dengan struktur berbentuk oktamer yang membungkus DNA pada sel eukariot. Struktur yang terbentuk dikenal sebagai kromatin.<sup>12</sup> Histon mudah mengalami modifikasi melalui proses dikenal sebagai posttranslational modification (PTM). Modifikasi yang berpengaruh terhadap struktur kromatin ini dilakukan oleh 2 kelompok : 1. Molekul kimia kecil termasuk asetilasi, fosforilasi dan metilasi. 2 Peptida yang lebih besar; ubikuitilasi dan sumoilasi (Tabel 1).<sup>12</sup>

Mekanisme *histone posttranslational modification* (HPTM) yang berpengaruh terhadap kromatin dapat berupa transkripsi gen atau represi melalui tiga model (Gambar 5).<sup>12</sup> Model 1 adalah histon yang telah mengalami modifikasi berpengaruh terhadap struktur kromatin. Model 2 HPTM dapat menghambat ikatan suatu faktor terhadap kromatin. Model 3 HPTM menciptakan suatu tempat ikatan

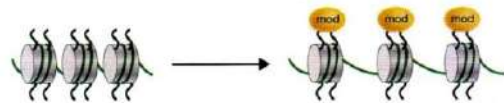
untuk protein tertentu.

**Tabel 1.** Tipe histone posttranslational modification kovalen

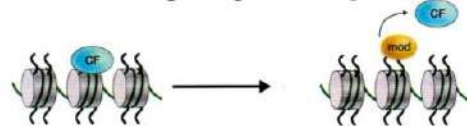
	Peran dalam transkripsi	Tempat modifikasi histon
<b>Kelompok 1</b>		
Asetilasi	aktivasi	H3 (K9, K14, K18, K56) H4 (K5, K8K12, K16) H2A H2B (K6, K7, K16, K17)
Fosforilasi	aktivasi	H3 (S10)
Metilasi	aktivasi represi	H3 (K4, K36, K79) H3 (K9, K27) H4 (K20)
<b>Kelompok 2</b>		
Ubikuitilasi	aktivasi represi	H2B (K123) H2A (K119)
Sumoilasi	represi	H3 ? H4 (K5, K8, K12, K16) H2A (K126) H2B (K6, K7, K16, K17)

Dikutip dari Kouzarides T, Berger SL. Chromatin modifications and their mechanism of action. In : Allis CD eds. Epigeetics. Cold Spring Harbour Laboratory press 2007, p. 191-209.

### Model 1: Chromatin structural change



### Model 2: Inhibit binding of negative-acting factor



### Model 3: Recruit positive-acting factor



**Gambar 5.** Model menunjukkan bagaimana *histone posttranslational modification* berpengaruh terhadap kromatin.

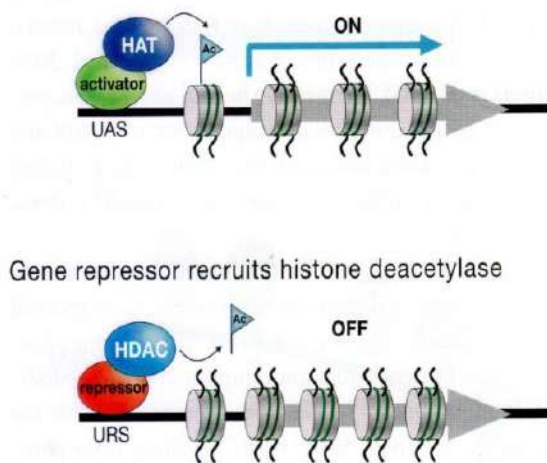
Dikutip dari Kouzarides T, Berger SL. Chromatin modifications and their mechanism of action. In : Allis CD eds. Epigenetics. Cold Spring Harbour Laboratory press 2007, p. 191-209.

## Asetilasi dan Deasetilasi

Penelitian eksperimental menunjukkan bahwa asetilasi (versus tanpa asetilasi) berhubungan dengan



proses transkripsi. Regio dengan transkripsi aktif, atau akan menjadi aktif, cenderung menyebabkan konfigurasi kromatin “terbuka” sehingga mudah diakses DNase dan MNase, jika ditambahkan pada nuklei, dapat memotong DNA. Dengan menggunakan *chromatin immunoprecipitation* (ChIP), dapat dianalisis protein yang berikatan dengan sekuensi DNA tertentu secara *in vivo*. Pada pertengahan tahun 1990 an, enzim asetilasi histon dan deasetilasi pertama kali diidentifikasi dan berperan dalam pengaturan gen. Aktivator yang berikatan dengan DNA merekrut *histone acetyltransferase* (HAT) melakukan asetilasi terhadap histon nukleosom, sedangkan represor merekrut enzim HDAC (*histone deacetylase*) melaksanakan deasetilasi histon. Hal ini menyebabkan perubahan nukleosom dalam mengatur gen *on* atau *off* (Gambar 6).<sup>12</sup> Aktivitas enzim HAT dan HDAC penting untuk mengatur aktivasi dan represi gen.

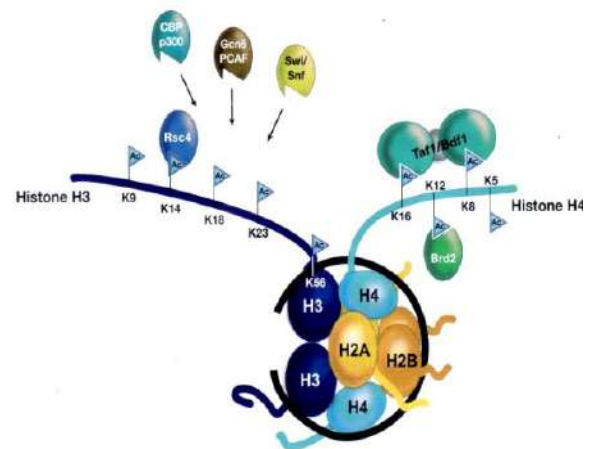


**Gambar 6.** Enzim pengubah histon direkrut ke arah promotor oleh faktor transkripsi yang mengikat DNA. *Histone acetyltransferase* (HAT) direkrut oleh aktivator yang berikatan dengan *upstream activating sequences* (UAS). Enzim ini mengkatalisis asetilasi pada histon, dan berkontribusi terhadap aktivasi transkripsi. *Histone deacetylases* (HDAC) direkrut oleh represor transkripsi yang berikatan dengan *upstream repressive sequences* (URS) dan menyebabkan deasetilasi histon sehingga terjadi represi transkripsi.

Dikutip dari Kouzarides T, Berger SL. *Chromatin modifications and their mechanism of action*. In : Allis CD eds. *Epigenetics*. Cold Spring Harbour Laboratory press 2007, p. 191-209.

Protein HAT dapat mengadakan asetilasi residu lisin pada ke empat inti histon, tetapi enzim yang berbeda memiliki spesifisitas dalam pemilihan substrat (Gambar 7).<sup>12</sup> Misalnya, famili HAT – GNAT (*acetyltransferase* yang berhubungan dengan GNAT)

dengan target pada histon H2 (?) sebagai substrat utama. Famili HAT kedua adalah MYST, dengan target pada H4. Famili ketiga adalah terbesar yaitu CBP/p300 dengan target pada kedua H3 dan H4. Domain protein khusus yaitu bromodomain, berikatan khusus dengan lisin yang mengalami asetilasi. Protein yang mengandung bromodomain lain adalah Taf1 dan Bdf1 di dalam kompleks TFIID.



Gambar 7. Tempat-tempat asetilasi histon. Histon mengalami asetilasi terutama pada residu lisin yang terletak pada amino terminal H3 dan H4, kecuali H3K56 pada globular domain. Tampak protein dengan ikatan khusus pada histon asetilasi.

Dikutip dari Kouzarides T, Berger SL. *Chromatin modifications and their mechanism of action*. In : Allis CD eds. *Epigenetics*. Cold Spring Harbour Laboratory press 2007, p. 191-209.

Terdapat berbagai enzim HDAC yang mengeluarkan gugus asetil, dikenal tipe I, tipe II, dan tipe III atau enzim yang berhubungan dengan Sir2. Tipe I dan tipe II tidak melibatkan kofaktor sedangkan tipe III memerlukan kofaktor NAD sebagai bagian mekanisme katalitik. HDAC bersama dengan kompleks multisubunit sebagai komponen dengan target enzim terhadap gen menyebabkan represi transkripsi (Gambar 6).<sup>12</sup>

### Fosforilasi

Histon merupakan salah satu protein pertama yang mengalami fosforilasi, ketika sel dirangsang untuk proliferasi, dengan gen diinduksikan menjadi aktif dan berfungsi merangsang siklus sel. Peningkatan ekspresi gen berhubungan dengan fosforilasi histon H3. Fosforilasi juga dikenal sebagai modifikasi posttranslasi dalam proses *signal transduction* dari permukaan sel melalui sitoplasma ke dalam nukleus sehingga menimbulkan ekspresi gen.<sup>12</sup>



## Metilasi

Metilasi adalah modifikasi histon kovalen yang lebih kompleks karena dapat terjadi pada lisin atau arginin. Modifikasi metilasi dapat menimbulkan ekspresi transkripsi positif atau negatif bergantung pada posisi residu di dalam histon (Tabel 1).<sup>12</sup> Keadaan metilasi dapat juga terjadi secara multipel pada masing-masing residu. Lisin dapat mengalami mono (me-1), di (me-2) atau tri (me-3) metilasi, sedangkan arginin dapat mono (me1) atau di-me(2) metilasi. Kombinasi metilasi di dalam nukleosom amat besar karena paling tidak terdapat 24 tempat metilasi lisin dan arginin pada H3, H4, H2A, H2B. Hal ini disebabkan proses regulasi yang bersifat dinamik memerlukan sekuensi dan waktu transkripsi yang tepat.

Dari sejumlah tempat metilasi yang dikenal, terdapat enam yang telah diketahui. Lima terdapat pada H3 (K4, K9, K27, K36, K79) dan satu pada H4 (K20). Secara umum, metilasi berkaitan dengan aktivasi transkripsi dan juga represi (Tabel 1).<sup>12</sup> Ada dua tempat yang berkaitan dengan DNA repair yaitu H3K79me dan H4K20me.<sup>12</sup>

## Ubikuitilasi dan Sumoilasi

Ubikuitilasi (Ub) dan Sumoilasi (SUMO) adalah polipeptida besar, yang meningkatkan ukuran histon kurang lebih dua pertiga kali lipat, sedangkan PTM sebelumnya; asetilasi, fosforilasi dan metilasi adalah molekul kimia kecil. Ub and SUMO identik sebesar 18%, memiliki 3 dimensi dengan permukaan muatan berbeda.

Ubikuitilasi dapat bersifat represif atau aktivasi (Tabel 1),<sup>12</sup> bergantung pada tempat khusus. H2A dan H2B adalah tempat monoubikuitilasi, dengan H2B monoubikuitilasi mengaktifasi transkripsi, sedangkan H2K119ub1, bersifat represif terhadap transkripsi pada mamalia dan dikatalisis oleh grup protein Polycomb Bmi2/Ring1A (*tulisan Gambar 8 dihapus*).<sup>12</sup>

Sumoilasi bersifat represif pada jamur dan mamalia. Peran SUMO bersifat negatif dengan mencegah aktivasi HPTM. Inhibisi terhadap HPTM melalui dua mekanisme : SUMO-histon secara langsung menghambat tempat substrat lisin pada asetilasi dan sumoilasi secara bergantian seperti terlihat pada Gambar 5 model 2. Kedua, histon sumoilasi dapat

merekut HDAC ke arah kromatin (Model 3) dan via grup SUMO yang terjadi pada represor yang mengikat DNA.

## NONCODING RNA

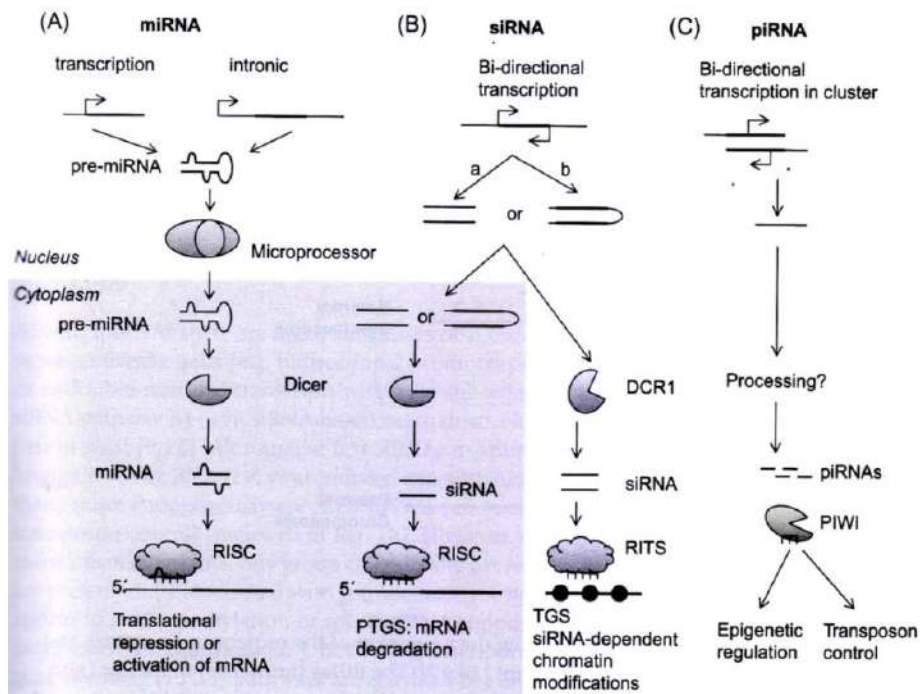
Noncoding RNA (ncRNA) dapat dibagi atas dua kelompok yang berhubungan dengan *epigenetic* yaitu : long ncRNA, dan short ncRNA termasuk di dalamnya miRNA, siRNA dan Piwi-interacting RNA (piRNA). Dalam pembahasan pada bab ini, difokuskan pada short ncRNA dan miRNA.<sup>13</sup>

## Short ncRNA dan miRNA

RNAi (RNA interference) adalah mekanisme dsRNA (double stranded RNA) pendek yang digunakan untuk pengaturan ekspresi gen pada sekuensi khusus, dengan pengikatan beberapa nukleotida ncRNA terhadap regio coding atau promoter mRNA.<sup>13</sup> Pengikatan ini mengakibatkan *silencing* terhadap ekspresi mRNA. Meskipun ada 3 kelas utama ncRNA; miRNA, short interfering RNA (siRNA) dan Piwi-interacting RNA (piRNA) (*Gambar 8*),<sup>13</sup> miRNA paling dikenal di antara ketiga kelas pengatur ncRNA. Studi menunjukkan bahwa tidak hanya satu gen miRNA yang menargetkan pada beberapa ratus gen target dalam mengurangi ekspresi,<sup>14</sup> tetapi beberapa miRNA dapat mengurangi ekspresi melalui metode deadenilasi pada polyA tail.<sup>15</sup>

miRNA mempunyai peran penting dalam stem cell terhadap *self-renewal* dan diferensiasi.<sup>16</sup> Pengaturan pada *self renewal* atau *self-replication* pada sel jaringan termasuk *adult stem cell* (sel somatik dan germline-cells) menyebabkan pembelahan asimetrik, dengan satu sel anak mempertahankan sifat stem cell dan sel anak lain mempunyai fungsi diferensiasi. Sifat ini diatur secara interseluler (antar sel melalui *cell signaling*), juga intrasel melalui epigenetik, transkripsi, translasi dan mekanisme posttranslasi. Akhir-akhir ini, miRNA memegang peranan penting dalam mengatur nasib dan sifat stem cell, contoh klaster miR 290-295 adalah kelompok miRNA yang memiliki motif sama dengan 5' proximal AAGUGC.<sup>17</sup> Ekspresi klaster ini akan meningkat selama perkembangan pre-implantasi dan tetap tinggi pada embryonic stem cell (ESC) dalam kondisi *undifferentiated*, tetapi

menurun pada waktu diferensiasi ESC.<sup>17</sup>



**Gambar 8.** Jalur pengaturan ncRNA. (A) miRNA pada awalnya adalah single-stranded RNA (ssRNA) dihasilkan melalui transkripsi atau *splicing*, yang melipat menjadi stem-loop membentuk double-stranded RNA yang tidak sempurna (dsRNA). Kemudian diproses oleh endoribonuclease RNase III (Dicer) sebelum mengalami denaturasi. Salah satu untai RNA (biasanya yang kurang stabil) berikatan dengan RNA-induced silencing complex (RISC), kemudian berikatan dengan mRNA yang berisikan sekuensi komplementer terhadap miRNA, untuk menginduksi pemecahan atau degradasi, atau memblokir translasi. (B) siRNA dihasilkan oleh dsRNA dan dapat masuk melalui jalur *post-transcriptional gene silencing* (PTGS), menyebabkan degradasi mRNA di dalam sitoplasma, atau *transcriptional gene silencing* (TGS) yang melibatkan modifikasi kromatin. (C) piRNA adalah ssRNA yang dihasilkan dalam bentuk kluster dan dipecahkan menjadi unit individual melalui mekanisme yang belum diketahui. Kemudian akan berikatan dengan protein PIWI untuk menginduksi pengaturan epigenetik dan transposon.

Dikutip dari Collins LJ, Schonfeld B, Chen XS. *The epigenetics of non-coding RNA* : In : In : Tollefsbol TO ed. *Handbook of Epigenetics*. Academic Press 2011, p.49-61.

## MEKANISME EPIGENETIK DALAM PENGATURAN EKSPRESI GEN PADA RISIKO KARDIOVASKULER

### METILASI DNA DAN MODIFIKASI KROMATIN

Gambaran keterlibatan pengaturan ekspresi gen oleh mekanisme epigenetik dapat dilihat dari hasil studi besar *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) 3 dekade yang lain. Studi acak tersamar yang melibatkan 1441 pasien yang didiagnosis diabetes tipe 1 menggunakan terapi suntikan insulin 1 atau 2 kali dibandingkan terapi kombinasi regimen suntikan insulin multipel dengan monitoring glukosa secara ketat.<sup>18</sup> Hasil studi ini mendapatkan penurunan kadar HbA1c 7% dan 9% pada masing-masing pasien yang mendapat terapi insulin intensif dan standar. Manfaat klinis yang diperoleh dari

pengontrolan glukosa secara intensif membuat DCCT diterminasi lebih dini yaitu reduksi insiden dan progresivitas komplikasi mikrovaskuler; nefropati, neuropati dan retinopati secara signifikan pada terapi insulin intensif.<sup>19</sup> Sebagai lanjutan terhadap studi ini, dilakukan studi observasional *the Epidemiology of Diabetic Interventions and Complications (EDIC)*.<sup>20</sup> EDIC meneliti insiden kejadian makrovaskuler yang tidak dilakukan DCCT sebelumnya karena jangka studi yang relatif singkat. Hasil studi EDIC mendapatkan outcome vaskuler yang lebih melebar antara kedua kelompok, menunjukkan bahwa adanya pengaruh terapi insulin sebelumnya.<sup>20</sup>

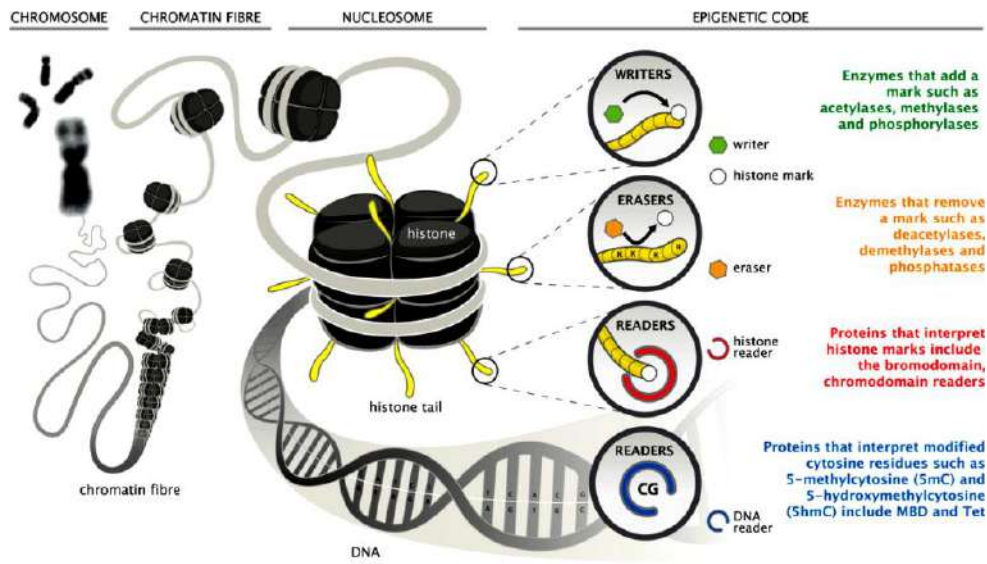
Manfaat terapi insulin secara intensif pada awal pengobatan terhadap progresivitas komplikasi vaskuler diabetika tetap lebih baik ketika uji klinis DCCT/EDIC telah memasuki dekade ke 4. Hal ini yang sama terjadi pada uji klinis *United Kingdom*

*Prospective Diabetes Study* (UKPDS) terhadap pasien diabetes melitus tipe 2, meskipun dengan level HbA1c yang hampir sama pada kedua kelompok setelah di *follow-up* selama 10 tahun, menunjukkan bahwa reduksi komplikasi vaskuler secara persisten terjadi pada kelompok kontrol intensif pada awal pengobatan dibandingkan dengan terapi konvensional. Studi *Veteral Affairs Diabetes Trial* selama *follow-up* 10 tahun menunjukkan manfaat klinis pada kelompok dengan pengontrolan glukosa intensif, meskipun tidak diperoleh perbedaan outcome kardiovaskuler pada awal pengobatan. Konsistensi hasil akhir studi ini dengan studi lain menunjukkan bahwa outcome kardiovaskuler tetap negatif meskipun telah dilakukan uji coba sejumlah obat hipoglikemik yang baru. Hal ini menunjukkan adanya pengaruh hiperglikemia terdahulu sebagai faktor patogenik yang mendasarinya yang disebabkan oleh mekanisme pada tingkat molekuler yaitu perubahan ekspresi gen pada vasculopati akibat pemaparan glukosa sebelumnya. Adanya memori biologik terhadap hiperglikemia inilah sebagai pemicu terhadap outcome penyakit vaskuler diabetik. Pemicu ekspresi gen ini adalah perubahan epigenetik

sebagai penyebab memori biologik yang mendasari komplikasi kardiometabolik.<sup>18</sup>

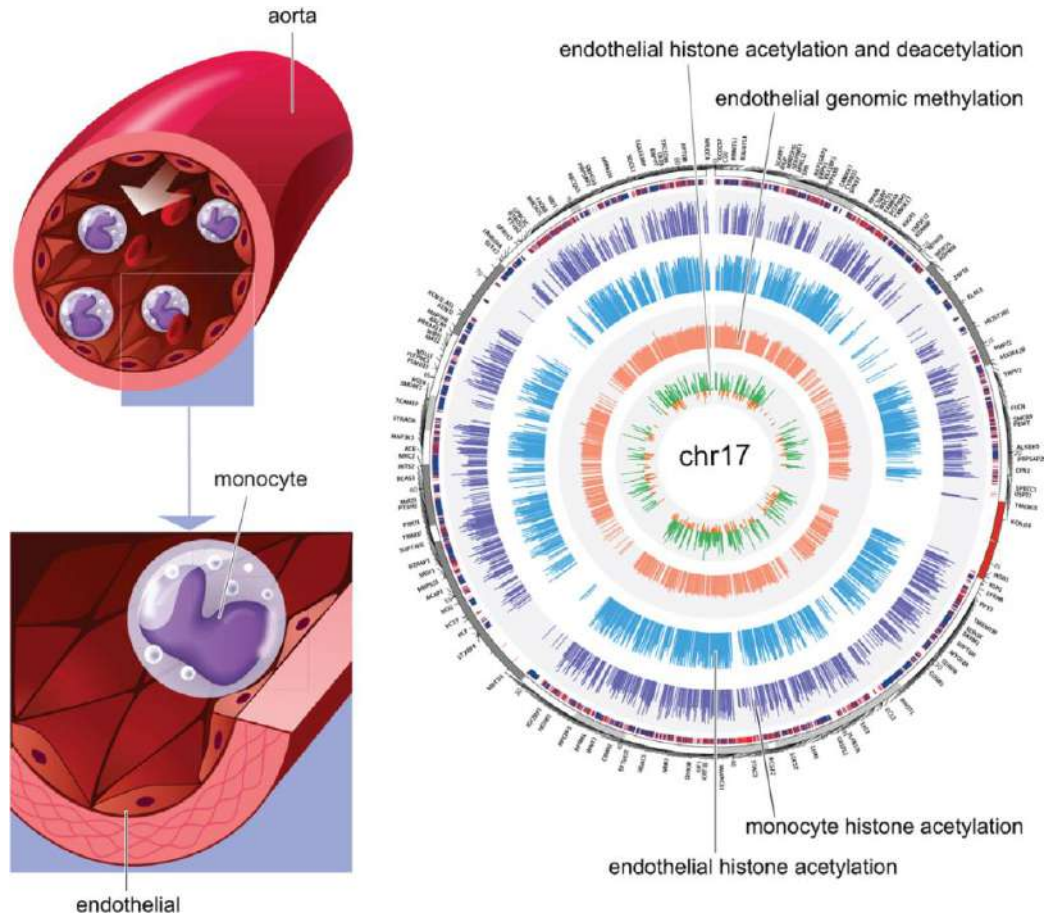
Unit kromatin dengan nukleosom oktamerik tersusun adalah 2 *copy* pada masing-masing protein histon H2A, H2B, H3 dan H4 mengelilingi 147 bp DNA (**Gambar 9**).<sup>19</sup> Kemampuan kromatin mengalami perubahan adaptasi struktur dan remodeling dari transisi tertutup (heterokromatin) menjadi terbuka (eukromatin) terhadap sel adalah kemampuan mengelola respon terhadap berbagai stimuli dengan mengatur asesibilitas sehingga terjadi perubahan ekspresi gen.<sup>21</sup>

Bersama dengan aktivitas microRNA dan long noncoding RNA, komponen kromatin marks menentukan regio struktur dan fungsi genom.<sup>22</sup> Modifikasi epigenetik melibatkan kromatin marks berupa *writer*, *eraser* dan *reader*. *Writer* membutuhkan enzim khusus yang memodifikasi pada ekor histon, sedangkan *eraser* mengeluarkan marks. Akhirnya, kelompok protein ketiga adalah *reader* yang mengenal *histone marks* dan memungkinkan ekspresi gen berlangsung.



**Gambar 9.** Kromatin dan residu modifikasi. Kromatin mengatur struktur dan fungsi gen. DNA dibungkus menjadi satu makrostruktur 30 nm terdiri dari serabut kromatin. Bersama dengan residu *posttranlation modifications* (PTM), kromatin mengatur fungsi meliputi transkripsi, *repair*, replikasi dan kondensasi. Nukleosom sebesar 11 nm terdiri dari 147 bp DNA dengan satu oktamer tersusun atas 2 *copy* dari masing-masing protein histon H2A, H2B, H3 dan H4. Ekor histon dapat mengalami perubahan oleh *writing enzyme* dengan menambahkan histone methyltransferase, Set7. Ekor histon juga cenderung terhadap perubahan oleh *erasing enzyme* yang mengeluarkan modifikasi dan diinterpretasi oleh protein *reader* yang mengidentifikasi modifikasi ekor histon. Residu cytosine dari dupleks DNA cenderung mengalami modifikasi oleh enzim 5-methylcytosine (5mc) dan 5 hydroxymethylcytosine (5hmC) oleh methyl-CpG binding domain (MBD) dan ten-eleven translocation (TET). Supresi gen melalui metilasi melibatkan rekrutmen MBD sedangkan protein TET mengalami demetilasi DNA aktif dan regulasi ekspresi gen.

Dikutip dari Keating ST, Plutzky J, El-Osta A. *Epigenetic changes in diabetes and cardiovascular risk. Circ Res. 2016;118:1706-1722.*



**Gambar 10.** Profiling epigenom pada sel monosit dan endotel manusia. Membedakan profil epigenom dari populasi sel yang berbeda di dalam pembuluh darah. Misalnya, modifikasi histon dan sekuensi metilasi DNA genom yang diperoleh dari sel monosit dan endotel menggunakan metode profiling epigenomik digabung dengan analisis dan integrasi komputasi. Data asetilasi histon dari monosit CD14 dinilai oleh portal Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE). Data asetilasi histon dan metilasi DNA dari sel endotel aorta manusia diperoleh dari GEO (Gene Expression Omnibus; ID: GSE37378). Plot ini menunjukkan bahwa pola asetilasi histon dan metilasi DNA di dalam kromosom 17. Dengan *peaks* yang dihasilkan secara seragam menggunakan MACS (Model-based Analysis of ChIP-Seq) membandingkan sampel dengan input sekuensi pada dua jenis sel. Panjang *peak* berbanding lurus dengan kekuatan *peak* (dikalkulasi dengan nilai P). Asetilasi monosit ditunjukkan dengan warna ungu. Asetilasi sel endotel dengan warna biru, sedangkan regio metilasi dengan warna merah. Trek terdalam menunjukkan promoter gen dari HAECs dengan asetilasi histon (hijau) dan deasetilasi (orange) diinduksi oleh *histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid*. Semua gen pada kromosom 15 berada pada bagian terluar (biru dengan garis luar merah). Nama-nama gen berhubungan dengan asetilasi histon pada promoter.

Dikutip dari Keating ST, Plutzky J, El-Osta A. Epigenetic changes in diabetes and cardiovascular risk. *Circ Res.* 2016;118:1706-1722.

Bukti saat ini menunjukkan bahwa mekanisme epigenetik yang mendasari semua proses aterosklerosis yang didahului oleh disfungsi endotel. Diabetes meningkatkan proses aterosclerosis melalui proses peningkatan ekspresi adhesi dan faktor kemotaktik pada sel endotel pada milieu diabetik,<sup>23</sup> hiperglikemia yang menginduksi migrasi dan proliferasi *vascular smooth muscle cells*,<sup>24</sup> dan peningkatan akumulasi makrofag.<sup>25</sup> Meskipun predisposisi genetik berkontribusi signifikan terhadap aterosklerosis, namun studi *genome-wide*

*association* menunjukkan bahwa komponen yang diwariskan ini hanya memberikan fraksi kecil terhadap penyakit kardiovaskuler.<sup>26</sup> Karena itu, perubahan epigenetik yang berimplikasi terhadap kejadian molekuler mendasari perubahan aterosgenik.<sup>19</sup>

Dibandingkan dengan sampel aorta orang sehat dengan aorta orang yang mengalami aterosklerotik menunjukkan bahwa *epigenetic signature* pada aterosklerosis ditandai dengan hipermetilasi CpG



pada pembuluh darah yang mengalami aterosklerosis, dengan perubahan spesifik terhadap fungsi gen yang berhubungan dengan homeostasis vaskuler.<sup>27</sup> *Follow-up* akhir-akhir ini menunjukkan bahwa loki CpG pada plak aterosklerotik terjadi peningkatan metilasi dengan progresivitas lesi.<sup>28</sup> Akumulasi *deep-sequencing dataset* yang dilakukan proyek Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) memungkinkan *genome-wide map* yang menunjukkan pentingnya *chromatin signature* yang berdasarkan tipe sel (**Gambar 10**).<sup>19,29</sup> Berdasarkan pemahaman ini terhadap epigenom yang mendasari lesi aterosklerotik akan membuka tabir terhadap perkembangan dan progresivitas penyakit sehingga dapat ditranslasikan ke dalam pengobatan baru.

Pertanyaan sekarang adalah bagaimana menjelaskan memori biologik yang ditimbulkan oleh respon epigenetik terhadap hiperglikemia sebelumnya pada pasien diabetes mellitus tipe 2, meskipun telah diobati dengan berbagai obat hipoglikemik, namun tidak menurunkan komplikasi makrovaskuler secara signifikan ?

Produksi *reactive oxygen species* (ROS) oleh mitokondria akibat hiperglikemia mendasari berkembangnya injuri vaskuler pada diabetes yang mengaktivasi 4 jalur utama dalam patogenesis komplikasi kardiovaskuler termasuk aktivasi protein kinase C, produksi *advanced glycation end product* (AGE), polyol pathway flux, dan jalur heksamin.<sup>30</sup> ROS yang dimediasi hiperglikemia merupakan pemicu *memori glikemik* pada pembuluh darah. Protein disandi gen yang mencegah akumulasi ROS, baik *uncoupling protein-1* atau *manganese superoxide dismutase* secara efektif dapat menghilangkan aktivasi transkripsi dari marker hiperglikemik pada sel endotel vaskuler, termasuk RELA. Aktivasi persisten yang menghasilkan ROS menyebabkan memori proinflamasi dari hiperglikemia, misalnya peningkatan enzim protein kinase C (PKC)- $\beta$  dan NAD (P) H oxidase subunit-47 pfox meskipun glukosa telah normal di dalam sel endotel manusia.<sup>31</sup> Penelitian akhir-akhir ini menunjukkan sekuele modifikasi epigenetik yang memodulasi ekspresi gen pro-oksidan dan proinflamasi yang mendasari stres vaskuler persisten.<sup>32</sup>

Dalam studi Paneni et al., terhadap sel endotel aorta manusia,<sup>33</sup> dan mencit diabetes, menunjukkan bahwa aktivasi protein mitokondria dan mediator stres oksidatif p66Shc oleh elevasi PKC  $\beta$ II meskipun telah terjadi normoglikemia. Dengan *silencing*

pp66shc yang dimediasi siRNA pada saat normalisasi glukosa mengurangi produksi ROS mitokondria, mengembalikan ekspresi PKC  $\beta$ II ke arah basal, mengurangi inhibisi eNOS dan ketersediaan *nitric oxide* dipulihkan, sekaligus menekan peningkatan metilglioksil persisten. Perubahan epigenetik secara konsisten mendasari memori hiperglikemia. *Histone deacetylase inhibitor* kelas III secara signifikan meningkatkan p66Shc mRNA dan ekspresi protein pada sel endotel vena umbilikasi manusia.<sup>34</sup> Hal ini berimplikasi bahwa perubahan pada asetilasi histon, dengan peningkatan transkripsi p66Shc selama hiperglikemia diperburuk oleh *histone deacetylase* kelas III SIRT 1 dan dengan overekspresi enzim yang sama dapat mengembalikan fungsi.

Penemuan ini berdampak pada implikasi komplikasi kardiovaskuler pada diabetes. Hiperglikemia menginisiasi peningkatan regulasi epigenetik ekspresi pp66Shc dan produksi ROS yang mengaktivasi PKC  $\beta$ II, selanjutnya mempertahankan level pp66Shc, yang dipicu oleh peningkatan asetilasi histon H3 yang dimediasi GCN5, sehingga meningkatkan ROS yang bergantung pada perubahan epigenetik oleh enzim seperti set7. Selain sebagai penghasil utama ROS, p66Shc juga mengurangi antioksidan manganese superoxide dismutase, sehingga terjadi akumulasi ROS di dalam endothelium vaskuler.<sup>32,34</sup> Hal ini menunjukkan bahwa *legacy hiperglikemia spike* pada diabetes dapat menimbulkan konsekuensi patologik yang lama. Mengatasi aktivitas ekspresi terhadap pp66Shc dengan SIRT1, GCN5 dan Set7 berpotensi terhadap pengurangan komplikasi kardiovaskuler diabetika.<sup>19</sup> Dalam studi Zhoe et al., mendapatkan bahwa SIRT1 menghambat ekspresi p66shc, melindungi terhadap disfungsi endotel yang ditimbulkan oleh hiperglikemia.<sup>34</sup>

## MICRORNA

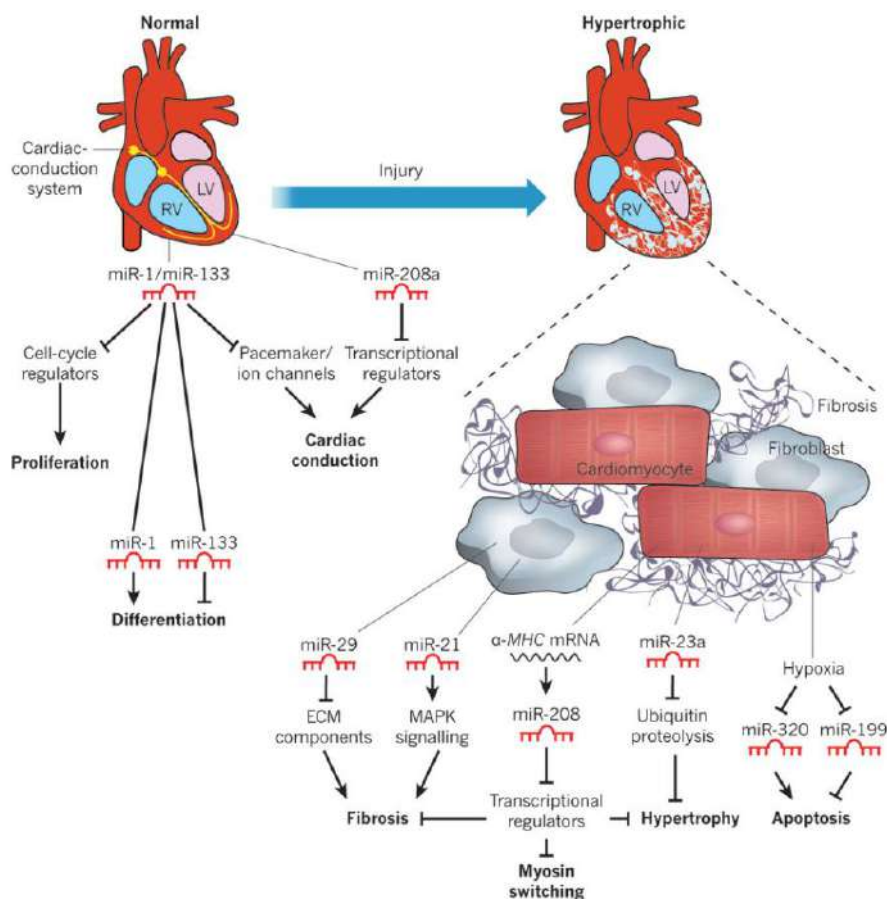
Noncoding RNA terutama microRNA mempunyai peranan penting dalam perkembangan dan penyakit kardiovaskuler.<sup>35,36,37,38,39</sup> Hal ini disebabkan karena sistem kardiovaskuler memiliki kerentanan terhadap perubahan ekspresi gen yang ditimbulkan oleh microRNA, sehingga jika terjadi gangguan, dapat berakibat kelainan berat dan fatal.<sup>40</sup> Small noncoding RNA atau dikenal microRNA adalah untai tunggal RNA berjumlah kurang lebih 22 nukleotida yang berfungsi menghambat ekspresi pada target mRNA melalui komplementer terhadap



pasangan Watson-Crick antara *seed region* miRNA dengan sekuensi yang terletak pada 3'*untranslated regions* (UTR).<sup>40</sup> Jadi, microRNA adalah regulator penting terhadap ekspresi gen posttranskripsi.<sup>41,42,43</sup>

Penelitian eksperimental menunjukkan bahwa setiap microRNA berperan penting dalam berbagai penyakit jantung (Gambar 11),<sup>40</sup> misalnya miR-1,<sup>44</sup> miR-133,<sup>45</sup> dan miR-208a<sup>46</sup> berimplikasi terhadap aritmia, miR-21,<sup>47</sup> dan miR-29<sup>48</sup> terhadap fibrosis, miR-208<sup>46,49</sup> dan miR-133<sup>50</sup> terhadap remodeling diinduksi *pressure overload* dan gangguan metabolik.<sup>51</sup>

Bagaimana peran masing-masing microRNA terhadap penyakit jantung? Famili miR-29 mengalami *downregulated* setelah infark miokard yang berarti fungsinya menurun, sehingga menghambat ekspresi protein matriks ekstraseluler dan kolagen, dan berkontribusi pada pembentukan jaringan parut dan fibrosis.<sup>52</sup> miR-21 berperan penting dalam meningkatkan hipertrofi dan fibrosis jantung dalam respon terhadap *pressure overload*. Dengan melakukan *knockdown* terhadap miR-21 dengan antagomir, dapat mengurangi remodeling jantung setelah kontriksi aorta torakalis.<sup>47</sup>



**Gambar 11.** Fungsi miRNA pada kondisi normal dan penyakit jantung. Semua tanda panah menunjukkan kerja normal dari masing-masing komponen atau proses. MiR-1 dan miR-133 terlihat dalam perkembangan jantung normal (kiri) dengan mengatur proliferasi, diferensiasi dan konduksi jantung. Misalnya, proliferasi ditingkatkan oleh regulator siklus sel, tetapi miR-1 dan miR-133 menghambat regulator tersebut. miR-208a mengatur sistem konduksi. miRNA berkontribusi terhadap perubahan remodeling setelah terjadi injuri jantung (kanan). miR-29 dan miR-21 masing-masing memblokir dan meningkatkan fibrosis jantung. miR-29 memblokir fibrosis dengan menghambat ekspresi komponen ECM, sedangkan miR-21 meningkatkan fibrosis dengan merangsang signaling *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). miR-209 mengatur *myosin isoform switching* hipertrofi dan fibrosis jantung. miR-23a meningkatkan hipertrofi jantung dengan menghambat proteolysis ubiquitin, yang menghambat hipertrofi. Hipoksia mengakibatkan represi miR-320 dan miR-199, yang masing-masing meningkatkan dan menghambat apoptosis. ECM, extracellular matrix; LV, left ventricle; MHC, myosin heavy chain; RV, right ventricle.

Dikutip dari Small EM, Olson EN. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature* 2011; 469: 336-342.

Kemampuan masing-masing miRNA dalam memodulasi jalur penyakit yang kompleks melalui targeting terhadap beberapa komponen, membuat miRNA dapat memodulasi respon jaringan terhadap stres. Hal ini tentu berbeda dengan kerja obat klasik. Target miRNA multipel ini memungkinkan miRNA dapat menempuh mekanisme pintas sehingga membuat sel atau jaringan tidak sensitif terhadap satu jenis obat, melalui mutasi terhadap target obat atau desensitisasi terhadap reseptor permukaan sel. Mekanisme ini tidak mengurangi sensitivitas inhibitor miRNA, yang dapat menargetkan pada beberapa jalur penyakit.<sup>40</sup>

Setiap teknik memiliki ciri tersendiri termasuk jumlah DNA diperlukan, fleksibilitas dalam memilih tempat CpG untuk dianalisis, kuantitas teknik, kompleksitas teknik dan harga. Umumnya jumlah DNA yang diperlukan kecil, kecuali teknik Southern-blot hybridization. Yang mudah dilakukan adalah teknik COBRA, MSP. Real time MSP, MethyLight, dan MassARRAY, sedangkan yang lain tergolong *intermediate*. Teknik Southern dapat mendeteksi metilasi/tidak metilasi pada tempat CpG yang spesifik, sedangkan bisulfite sequencing menganalisis pola metilasi pada masing-masing molekul DNA.

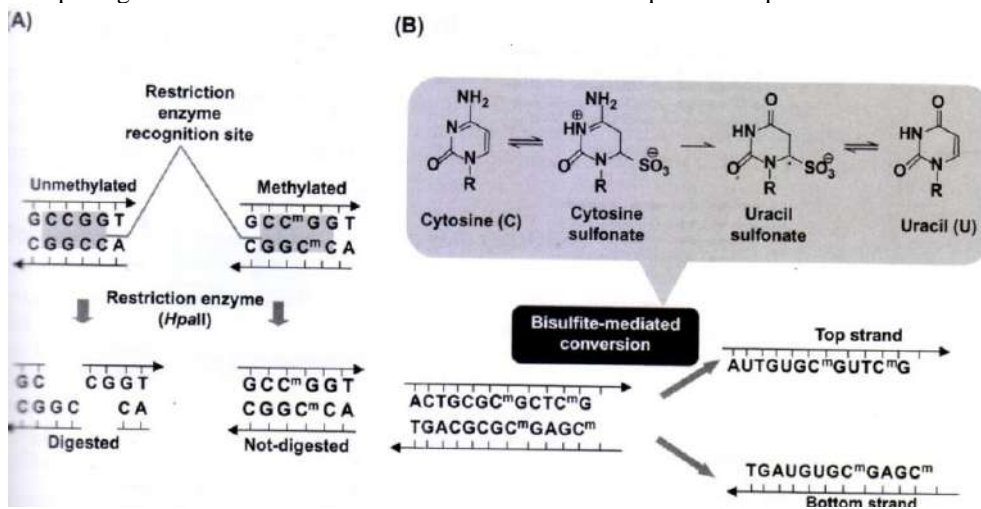
**METODE PEMERIKSAAN EPIGENETIK**

**PRINSIP PEMERIKSAAN METILASI DNA**

**PEMERIKSAAN METILASI DNA**

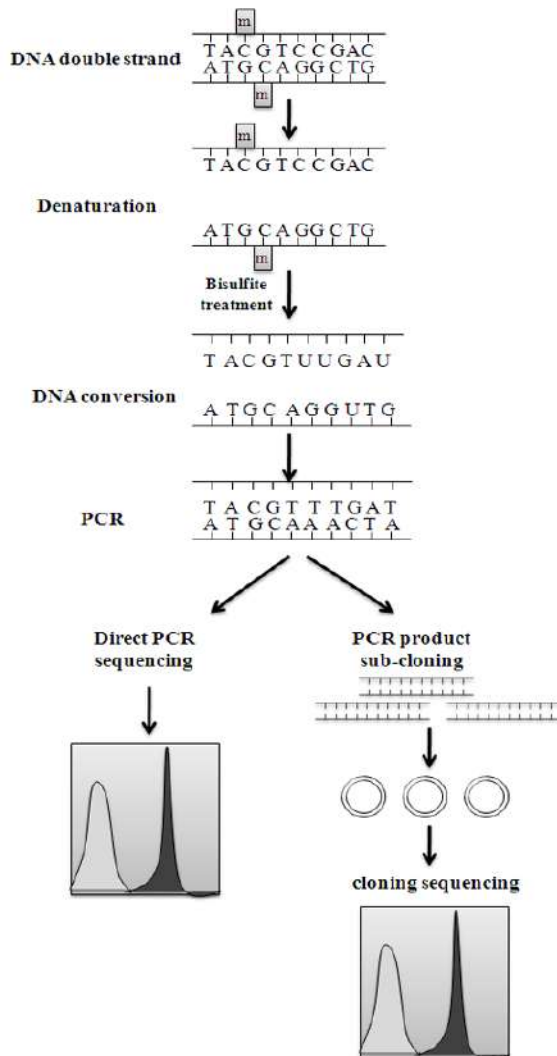
Berbagai jenis pemeriksaan tersedia dalam melakukan pemeriksaan metilasi DNA, termasuk : Southern blot hybridization, bisulfite sequencing, COBRA (combined bisulfite restriction analysis), MSP (methylation-specific PCR), Real-time MSP, MethyLight, Pyrosequencing, dan MassARRAY.<sup>53</sup> Jika ingin dianalisis metilasi DNA sebagai penyebab *gene silencing*, perlu dianalisis regio spesifik yang mengatur ekspresi gen.<sup>54</sup>

Analisis metilasi DNA dilakukan berdasarkan identifikasi 5-methylcytosine (Cm) dari cytosine dengan menggunakan enzim restriksi yang sensitif terhadap metilasi. Aktivitas enzim ini dipengaruhi oleh adanya gugus metil pada tempat CpG di dalam tempat restriksi (**Gambar 12**).<sup>53</sup> Enzim restriksi metilasi, seperti *HpaII* dan *SmaI*, bersifat tidak aktif pada tempat CpG, dan *McrBC*, tidak aktif pada tempat unmethylated CpG. Dengan menggunakan teknik Southern-blot Hybridization dapat mendeteksi perbedaan pemecahan.



**Gambar 12.** Metode deteksi metilasi DNA. Deteksi menggunakan enzim restriksi sensitif terhadap metilasi. Genom DNA dicernakan enzim restriksi (*HpaII* dalam gambar) ketika tempat restriksi (CCGG) dalam kondisi tidak metilasi, tapi tidak dicernakan ketika tempat ini dimetilasi. Apakah genom DNA dicernakan atau tidak tergantung kondisi status metilasi berada dalam DNA original. Cm singkatan dari metilasi cytosine. (B) Deteksi oleh konversi DNA dimediasi bisulfite. Unmethylated cytosine dikonversi dengan cepat menjadi uracil dengan deaminasi sedangkan methylated cytosine dikonversi dengan amat lambat. Karena itu, perbedaan status metilasi pada tempat CpG dapat dikonversi menjadi perbedaan sekuensi, UpG atau CpG. Setelah konversi DNA dimediasi bisulfite, untai ganda atas dan bawah tidak lagi komplementer.

Dikutip dari Hattori N, Ushijima T. Analysis of gene-specific DNA methylation : In : Tollefsbol TO ed. Handbook of Epifegentics. Academic Press 2011, p. 125-134.



**Gambar 13.** Prinsip analisis metilasi menggunakan sekuensi bisulfite. Setelah diperlakukan dengan sodium bisulfite, residu cytosine tidak metilasi dikonversi menjadi urasil sedangkan methylcytosine (5mC) tetap dipengaruhi. Setelah amplifikasi PCR, residu urasil dikonversi menjadi thymine. Status metilasi DNA ditentukan menggunakan sekuensi PCR atau sekuensi kloning.

Dikutip dari Li Y, Tollefsbol TO. DNA methylation detection: Bisulfite genomic sequencing analysis. *Methods Mol Biol.* 2011; 791:11–21.

Prinsip kedua bergantung pada konversi DNA dimediasi bisulfite. Perlakuan ini dengan cepat mengubah unmethylated C menjadi urasil, sedangkan perubahan ke methylated C amat lambat<sup>55</sup>. Status metilasi pada tempat CpG dapat dikonversi menjadi sekuensi, UpG atau CpG, dan ketika konversi telah berubah menjadi sekuensi DNA yang berbeda, maka dapat dideteksi menggunakan teknik bisulfite sequencing, MSP, real

time MSP, COBRA, pyrosequencing, dan MassARRAY (Gambar 12).<sup>53</sup>

Status metilasi ditentukan melalui sekuensi produk PCR (deteksi status metilasi merata) atau sekuensi sub klon (deteksi distribusi molekul tunggal dalam pola metilasi) (Gambar 13).<sup>55</sup> Analisis sekuensi bisulfite tidak hanya mengidentifikasi metilasi DNA di sepanjang untai tunggal DNA, tetapi juga mendeteksi pola metilasi DNA dari untai ganda karena untai DNA yang telah dikonversi tidak komplementer dan produk amplifikasi dapat diukur. Karena itu, sekuensi genomik bisulfite dianggap sebagai teknik gold standard dalam mendeteksi metilasi DNA karena dapat mengidentifikasi 5-methylcytosine secara kualitatif, kuantitatif pada pasangan basa tunggal.<sup>55</sup>

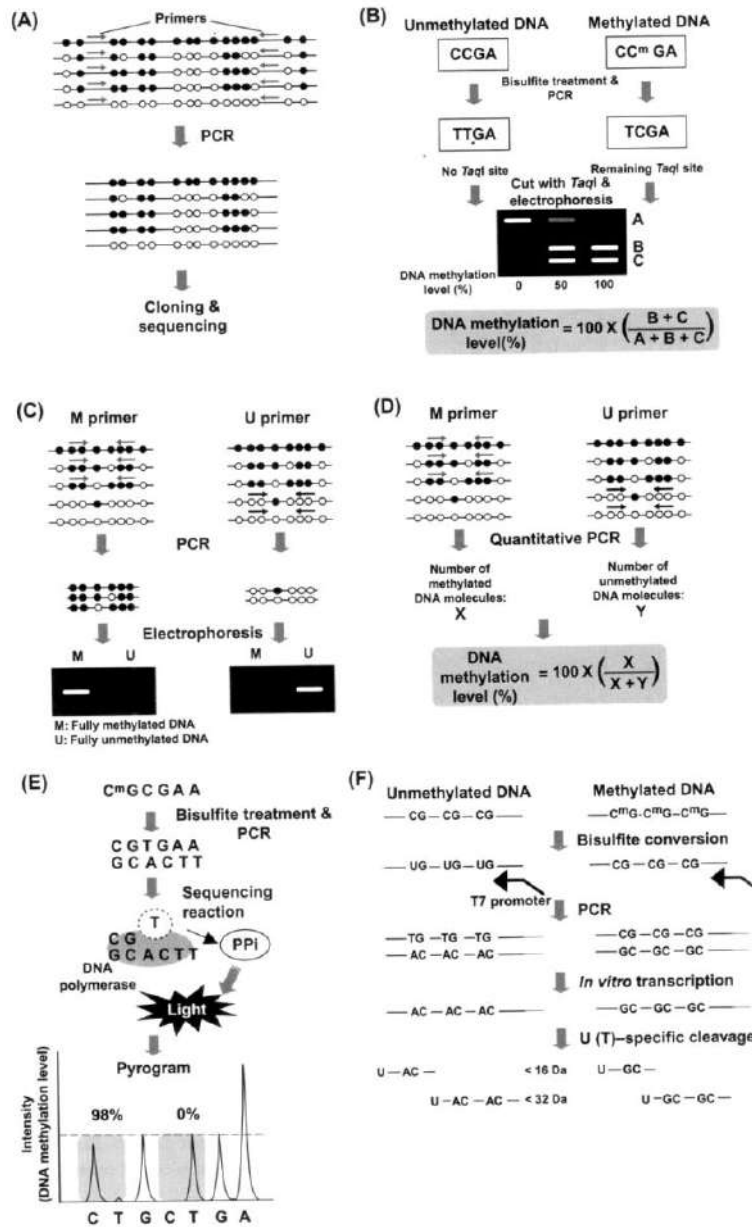
## TEKNIK PEMERIKSAAN

### Southern-blot Hybridization

Status metilasi pada tempat yang telah dikenal enzim restriksi dapat dimonitor dengan melihat band fragmen DNA yang diapit tempat restriksi. Keuntungan teknik adalah kuantitasnya dapat menggambarkan jumlah molekul DNA yang dicernakan atau tidak. Teknik ini terutama digunakan untuk menganalisis sekuensi ulangan karena mampu mendeteksi sekuensi multipel di dalam genom. Kekurangan adalah analisis tempat CpG terbatas dan memerlukan jumlah DNA yang banyak. Saat ini, teknik ini jarang digunakan, telah diganti teknik bisulfite.

### Bisulfite Sequencing

DNA yang telah dikonversi bisulfite diamplifikasi PCR menggunakan primer yang terdapat pada regio yang kurang memiliki tempat CpG. Produk PCR disekuensi, biasanya setelah kloning produk PCR, dan tempat CpG diamplifikasi (Gambar 14A).<sup>53</sup> Basa cytosine (C) dan thymine (T) pada tempat CpG pada DNA yang dikonversi menunjukkan masing-masing methylated and unmethylated C. Teknik ini memungkinkan investigasi status metilasi pada setiap tempat CpG antara primers dan bagaimana tempat CpG di dalam molekul DNA tunggal dimetilasi. Dengan metode ini, dapat dianalisis hampir setiap metilasi DNA. Kekurangan teknik ini adalah pekerjaan intensif memerlukan sekurang-kurangnya 10 klon per satu sampel yang disekuensi.



**Gambar 14.** Prinsip teknik analisis metilasi DNA. Tempat CpG methylated and unmethylated ditunjukkan masing-masing dalam lingkaran tertutup dan terbuka. (A) Bisulfite sequencing. DNA yang dikonversi bisulfite diamplifikasi oleh PCR dengan primer tidak terdapat pada tempat CpG. Produk PCR diklon, dan masing-masing klon disekuensi. Teknik ini memberikan pola metilasi pada molekul DNA pada tempat CPG. (B) COBRA, DNA yang dikonversi bisulfite diamplifikasi oleh PCR dengan primer tidak terdapat pada tempat CpG, dan produk PCR dicernakan oleh enzim restriksi (Taq) dalam gambar ini. Pada assay COBRA, jika cytosine pada tempat CpG dimetilasi, tempat restriksi tetap. Sebaliknya, jika tempat tidak dimetilasi, restriksi akan hilang. Analisis kuantitatif dilakukan dengan gel elektroforesis. (C) MSP, status metilasi pada beberapa CpG di dalam sekuensi primer dilakukan dengan PCR dengan primer pada template metilasi dan tidak metilasi dan monitoring ada atau tidaknya PCR produk. Kondisi PCR dioptimalisasi menggunakan DNA metilasi atau tidak metilasi. (D) Real time MSP. Jumlah molekul DNA metilasi dan tidak metilasi dihitung dengan real-time MSP. (E) Pyrosequencing. Polimorfisme C/T pada produk PCR diteliti dengan mengukur pirofosfat yang dilepaskan. Jumlah pirofosfat dikonversi menjadi signal seperti ditunjukkan dalam program. (F) MassARRAY. Produk PCR diamplifikasi dari DNA yang dikonversi bisulfite ditranskripsi secara *in vitro*, dan dipecahkan RNase A. Perbedaan dalam massa pada produk C dan T (16 Da) dideteksi dengan *mass spectrometry*.

Dikutip dari Hattori N, Ushijima T. *Analysis of gene-specific DNA methylation* : In : Tollefsbol TO ed. *Handbook of Epifgenetics*. Academic Press 2011, p. 125-134.



### COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis)

Teknik ini didasarkan pada munculnya atau hilangnya tempat pengenalan enzim restriksi setelah konversi bisulfit (**Gambar 14 B**).<sup>53</sup> Jumlah rasio molekul DNA yang dimetilasi atau tidak dapat dihitung. Teknik ini dapat mendeteksi jumlah metilasi pada tempat CpG dan kemudahan prosedur. Kekurangannya adalah tempat CpG yang dianalisis terbatas.

### MSP (Methylation-specific PCR)

Teknik ini dapat mencari status metilasi di dalam beberapa tempat CpG dengan melakukan PCR pada tempat yang spesifik untuk sekuensi metilasi dan tanpa metilasi dan mengamati ada atau tidak adanya produk PCR (**Gambar 14 C**).<sup>53</sup> Molekul DNA dengan pola mosaik tidak diamplifikasi. Teknik ini mudah dilakukan dan memiliki fleksibilitas tinggi dalam menseleksi regio genomik untuk dianalisis karena primer dapat dirancang pada posisi sembarangan, meskipun regio yang dianalisis kaya CpG. Kekurangan adalah mudah mendapatkan hasil positif dan negatif palsu.

### Real Time MSP dan MethyLight

Teknik ini dilakukan dengan deteksi *real time* dari produk MSP. Dengan membandingkan amplifikasi uji sampel dengan sampel standar yang berisikan jumlah molekul DNA yang telah diketahui, maka jumlah molekul DNA yang dimetilasi dan tidak dimetilasi dapat dihitung (**Gambar 14 D**).<sup>53</sup> Produk PCR dapat dideteksi dengan pewarnaan seperti SYBR Green I (real time MSP) atau Tag-Man probe (MethyLight).<sup>56</sup> Teknik ini memiliki fleksibilitas tinggi selama **menyeleksi** regio genom yang dianalisis seperti MSP, dan perhitungan jumlah metilasi DNA akurat dan sensitif. Karena itu, cocok digunakan untuk analisis jumlah sampel besar dalam klinis.

### Pyrosequencing

Pyrosequencing dapat mendeteksi tingkat metilasi pada setiap tempat CpG dalam produk PCR yang diperoleh dari primer untuk sekuensi metilasi dan tanpa metilasi setelah konversi bisulfit. Jumlah C dan T pada masing-masing tempat dikonversi

menjadi sejumlah pirofosfat yang dilepaskan dari metode ekstensi primer. Jumlahnya dapat dihitung menggunakan sistem Pyrosequencing (Qiagen) (**Gambar 14 E**).<sup>53</sup> Keuntungan teknik ini adalah akurasi dalam jumlah dan kemudahan prosedur. Kekurangan adalah sulit merancang primer yang sesuai.

### MassARRAY

MassARRAY mendeteksi tingkat metilasi pada masing-masing tempat CpG di dalam produk PCR menggunakan primer untuk sekuensi metilasi dan tanpa metilasi setelah konversi bisulfit. Dengan teknik ini, PCR dilakukan dengan reverse primer bersama dengan T7 promoter tag. Transkrip *in vitro* dapat dipecahkan oleh RNase A, yang mencernakan basa pirimidin (**Gambar 14 F**).<sup>53</sup> MassARRAY amat baik digunakan untuk menghitung jumlah metilasi DNA di dalam tempat CPG dalam jumlah sampel yang banyak, hanya harga **instrumen** yang mahal.

## PEMERIKSAAN MODIFIKASI KROMATIN

### CHROMATIN IMMUNOPRECIPITATION (ChIP)

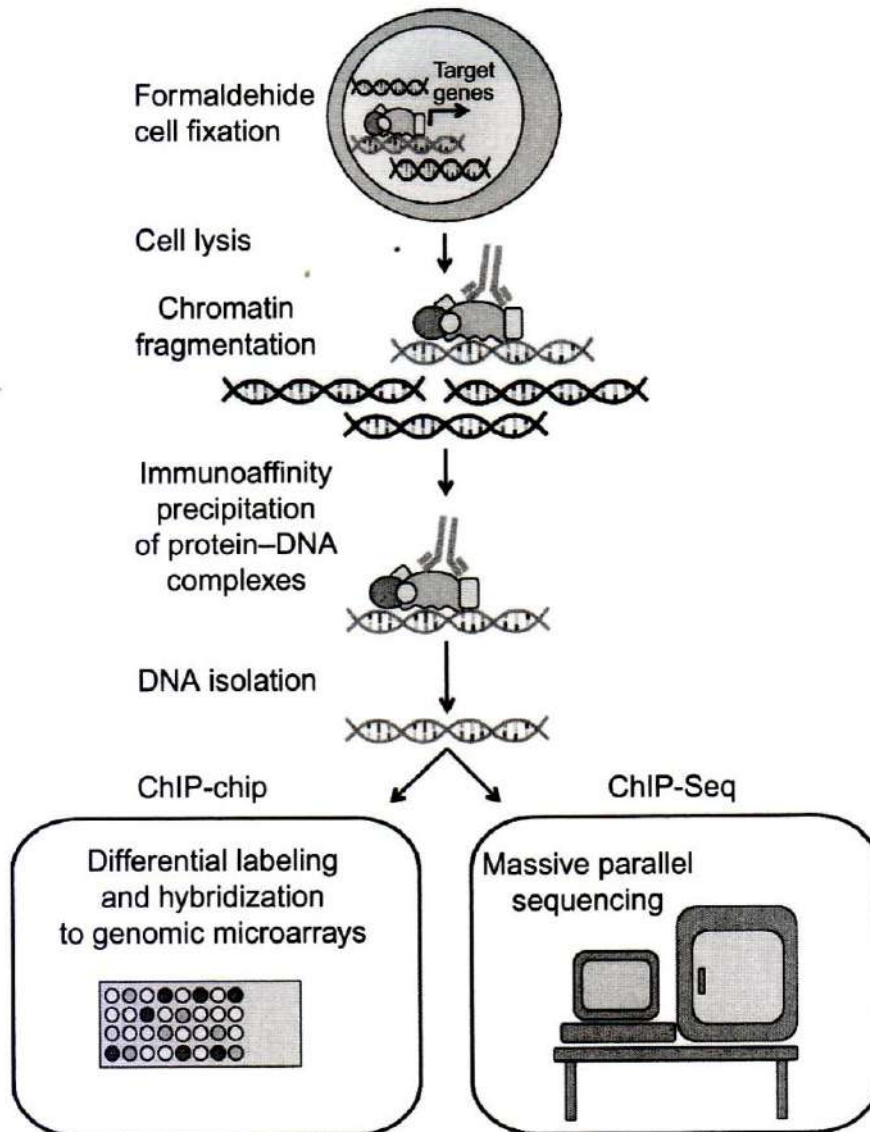
Chromatin immunoprecipitation (ChIP) pertama kali dikembangkan oleh Gilmour dan Lis<sup>57,58</sup> dan Solomon dan Varshavsky<sup>59</sup> melibatkan sel hidup dengan formaldehid untuk memfiksasikan protein ke dalam substrat DNA di dalam sel. (**tulisangambar15,hapus**)<sup>60</sup> Kromosom yang mengalami *crosslink* diekstraksi dan difragmentasi oleh enzim. Kemudian dilakukan isolasi dengan pemurnian immune-afinitas menggunakan antibodi terhadap protein. Fragmen yang dimurnikan dilakukan *assay* dengan sejumlah teknik seperti Southern blot atau polymerase chain reaction (PCR), untuk menentukan hubungan sekuensi DNA dengan protein.<sup>61,62</sup> Metode untuk mendeteksi interaksi protein-DNA pada genom jamur menggunakan DNA microarrays (ChIP-chip) dikemukakan tahun 2000.<sup>63,64</sup> Perkembangan teknologi selanjutnya adalah menggunakan *high throughput sequencing* (ChIP-seq) membuka lembaran baru dalam analisis berbasis ChIP terhadap kontrol gen dan epigenom, memungkinkan surveilen terhadap seluruh genom tanpa bias yang dilakukan chip sebelumnya. Jadi, ChIP adalah suatu alat yang bermanfaat untuk mempelajari interaksi protein-DNA dan perubahan kromatin yang berhubungan dengan ekspresi gen.



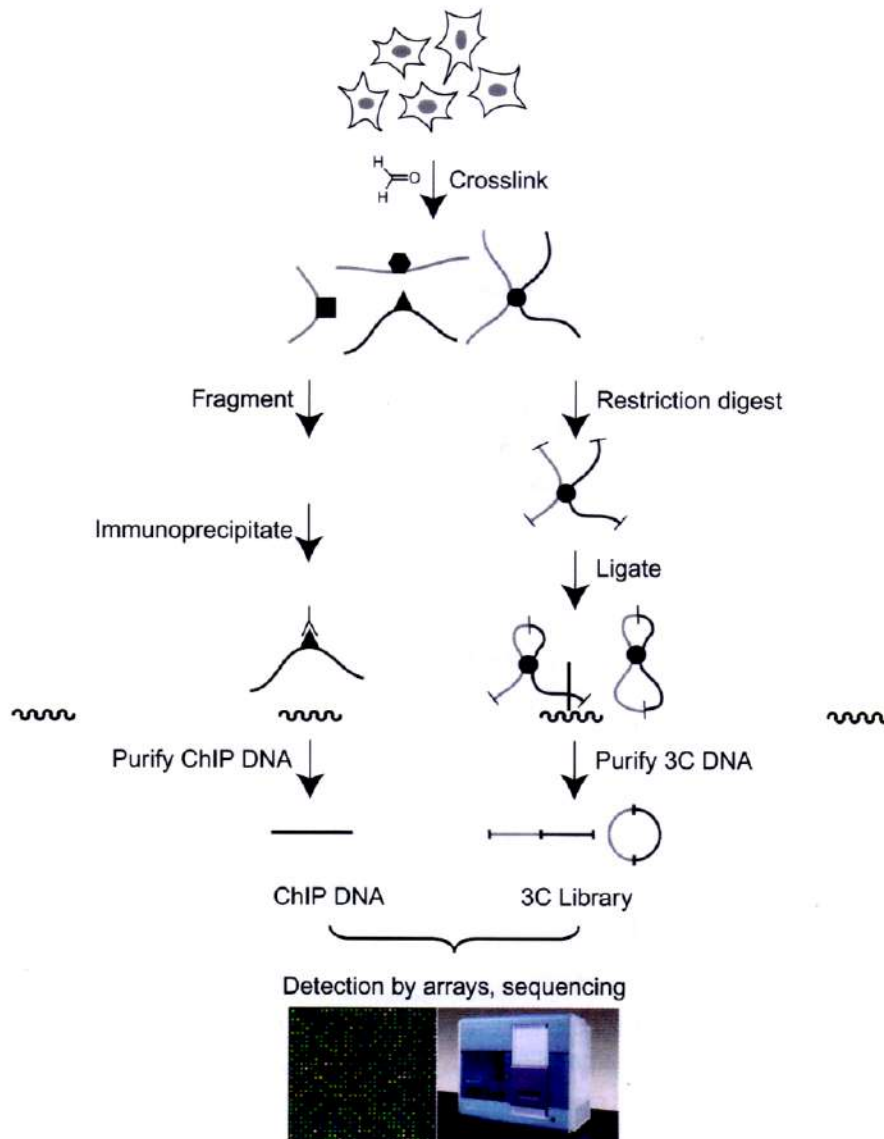
Karena itu, dapat dikumpulkan data epigenetik yang meliputi seluruh genom. Teknik ini memungkinkan penkayaan fragmen DNA yang terikat pada protein spesifik dan identifikasi sekuensi spesifik dari fragmen menggunakan *microarrays*, meliputi sekuensing genom (tiling arrays) atau *next-generation DNA sequencing* (Gambar 15).<sup>65</sup>

*Chromosome confirmation capture* (3C) pertama kali dikembangkan oleh Dekker, yang menentukan interaksi antara setiap pasangan loci dari genom di dalam sel.<sup>66,67</sup> Sama seperti ChIP, 3C menggunakan

formaldehid untuk melakukan *crosslinking* pada sel untuk mempertahankan interaksi genom untuk dilakukan analisis. *Crosslinked chromatin* dicernakan dengan enzim restriksi dan DNA genom yang dicernakan diligasi dalam kondisi untuk mempertahankan ligase intramolekuler dari segmen kromatin. *Crosslink* kemudian dibalikkan dan campuran ligase dimurnikan. 3C akan menghasilkan produk *genome-wide ligation* dengan masing-masing produk ligase berhubungan dengan suatu interaksi spesifik antar kedua loci di dalam nuklei (Gambar 16).<sup>60</sup>



**Gambar 15.**Identifikasi interaksi protein-DNA pada tingkat *genome-wide* menggunakan chromatin imunoprecipitation (ChIP) atau microarrays berbasis (ChIP-on-chip) atau *next generation sequencing technology platform* (ChIP-seq). Dikutip dari Janit K, Janit M. *Assessing epigenetic information*. In : Tollefsbol TO ed. *Handbook of Epifgenetics*. Academic Press 2011, p. 159-171.

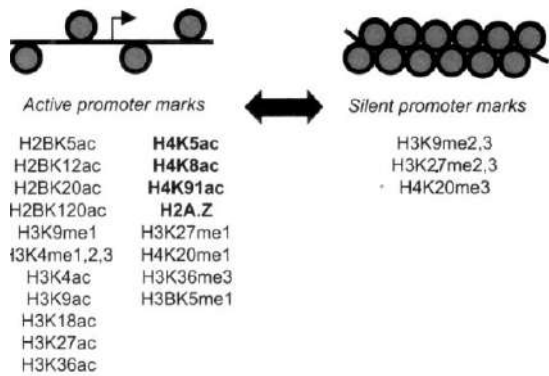


**Gambar 16.** Teknik ChIP dan 3C. Sel yang dikultur atau primer dengan perlakuan formaldehid menjadi *crosslink* DNA berikatan dengan protein di dalam loci *in situ*. Nuklei *crosslink* diproses dengan ChIP seperti pada panel kiri atau 3C pada panel kanan. Nuklei DNA difragmentasi menghasilkan segmen DNA berhubungan dengan protein (kotak, segitiga, lingkaran). Protein yang diteliti (segitiga hitam) diseleksi dengan *immune-affinity precipitation*, dan *crosslink* dibalikkan. Hasil DNA co-presipitasi dianalisis dengan *whole-genome microarray* (ChIP-chip) atau *high-throughput sequencing* (ChIP-seq). Untuk menganalisis lipatan 3 dimensi, 3C menggunakan kromatin *crosslink* yang dicernakan dengan enzim restriksi dan ligasi dibawah kondisi larut menjadi ligase intramolekuler dalam DNA. DNA ligasi dimurnikan dan dianalisis dengan PCR, DNA microarrays, atau *sequencing*.

Dikutip dari Wacker DA, Kim YJ, Kim TH. *Chromatin modifications distinguish genomic features and physical organization of the nucleus*. In : Tollefsbol TO ed. *Handbook of Epigenetics*. Academic Press 2011, p. 159-171.

Dengan metode berbasis ChIP dapat diketahui struktur dan fungsi dinamika epigenom. Misalnya, dengan metode ini dapat diketahui histon marks pada sel T CD4+ yang dilakukan oleh dua studi yang saling berkaitan (Gambar 17).<sup>60</sup> Studi ini dapat menjelaskan fungsi modifikasi histon. Kalau H3K27

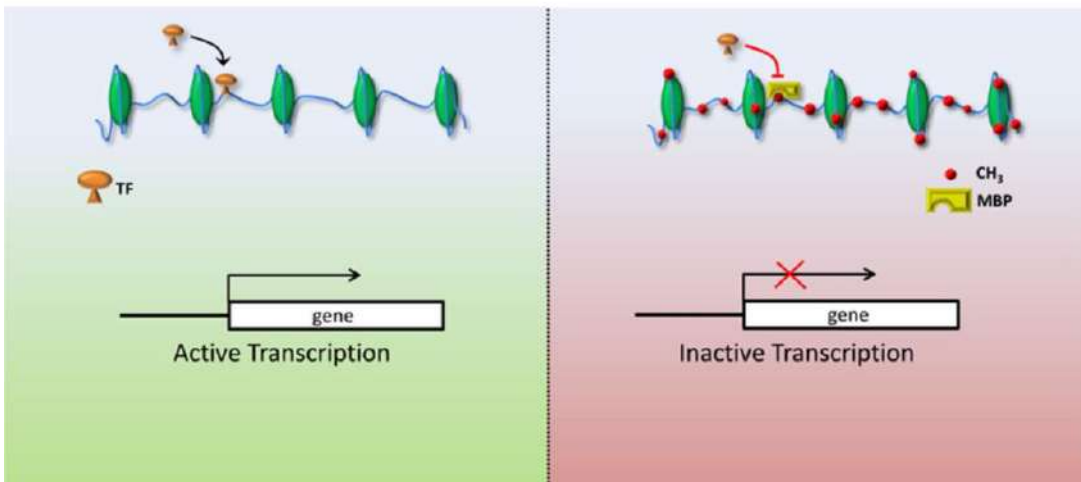
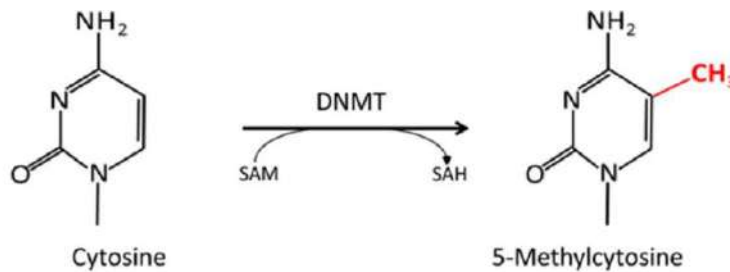
dan K9 di- dan trimetilasi (H3K27 me2 dan me3 dan H3K9-me2 dan me-3) dikonfirmasi sebagai *repressive marks*, maka monometilasi dari residu ini berhubungan dengan promoter aktif. H2BK5 monometilasi berhubungan dengan *downstream transcription start sites*.



**Gambar 17.** Promoter aktif dan *silent* pada *histone marks*. Distribusi *histone marks* aktif (kiri) versus *silent* (kanan). Backbone 17 dari *active chromatin marks* ditunjukkan dengan huruf tebal. Me-1, me2, me3, mono-di- tri- methyl masing-masing. Ac= acetyl.  
 Dikutip dari Wacker DA, Kim YJ, Kim TH. *Chromatin modifications distinguish genomic features and physical organization of the nucleus*. In : : Tollefsbol TO ed. *Handbook of Epigenetics*. Academic Press 2011, p. 159-171.

### METILASI DNA PADA RISIKO DAN PENYAKIT KARDIOVASKULER

Kondisi metilasi DNA berperan penting terhadap regulasi proses biologik yang mendasari penyakit kardiovaskuler (PKV), seperti aterosklerosis, hipertensi dan inflamasi.<sup>68,69,70</sup> Misalnya, mencit dengan genom hipometilasi mempunyai peningkatan ekspresi marker inflamasi,<sup>71</sup> dan hipometilasi DNA merupakan awal pembentukan garis lemak di dalam aorta.<sup>72</sup> Pada ApoE-null mencit yang cenderung aterosklerosis, perubahan metilasi DNA terjadi pada leukosit darah perifer dan aorta sebelum pembentukan lesi vaskuler.<sup>73</sup> Perubahan ini berperan terhadap peningkatan inflamasi dan aterosklerosis. Jika jaringan jantung orang normal dibandingkan dengan pasien dengan gagal jantung, jaringan yang berpenyakit menunjukkan perubahan metilasi pada gen yang berhubungan dengan angiogenesis juga ekspresi.<sup>74</sup>



**Gambar 18.** Metilasi DNA biasanya berhubungan dengan transkripsi inaktif dan supresi ekspresi gen. Gambar menunjukkan mekanisme molekuler menghubungkan metilasi DNA dengan transkripsi inaktif. Cytosine dimetilasi menjadi 5-methylcytosine oleh DNA methyltransferase (DNMT). Ikatan methyl CpG binding protein terhadap sekuensi metilasi mencegah akses sekuensi oleh faktor transkripsi, sehingga menekan transkripsi. MBP menunjukkan methyl CpG binding protein; SAM, S-adenosylmethionine; dan SAH, S-adenosylhomocysteine.

Dikutip dari Zhong J, Agha G, Baccarelli AA. *The role of DNA methylation in cardiovascular risk and disease. Methodological aspects, study design, and data analysis for epidemiological studies*. *Circ Res*. 2016;118:119-131.

Perubahan metilasi DNA yang berhubungan dengan diet dapat berpengaruh terhadap PKV pada manusia.

Flavonoid, sebagai antioksidan, memberikan proteksi terhadap penyakit jantung, karena dapat mengurangi DNMT<sup>75,76,77</sup> (DNA methyltransferase) yang mengubah DNA metilasi menjadi 5 methylcytosine (**Gambar 18**),<sup>78</sup> sehingga terjadi peningkatan level metilasi DNA. Pada North Texas Health Study, peserta yang mengkonsumsi tinggi sayur-sayuran dan buah-buahan memiliki sekuensi ulangan *LINE-1* (*long-interspersed nucleotide repetitive elements-1*) lebih tinggi dibandingkan dengan orang yang memakan tinggi lemak dan karbohidrat.<sup>75</sup> Penelitian Normative Aging Study dilaksanakan di Boston mendapatkan bahwa subjek dengan prevalensi penyakit jantung iskemik dan stroke yang tinggi mempunyai metilasi *LINE-1* lebih rendah.<sup>79</sup>

Hubungan metilasi DNA dan perokok dewasa terhadap gen *AHRR* dapat dilihat pada fibroblast dan makrofag alveolar.<sup>80</sup> Penelitian kembar monozigot mendapatkan adanya perubahan metilasi antara kembar perokok dan bukan perokok di dalam 8 loki, termasuk loki *AHRR* dan *FeRL3*. Perbedaan metilasi DNA juga diamati pada perokok sekarang versus terdahulu, pemaparan merokok kumulatif (jumlah rokok dihisap seumur hidup), dan waktu berhenti merokok (di antara mantan perokok).<sup>81,82</sup> Perubahan metilasi DNA dalam respon terhadap merokok berhubungan dengan merokok dan PKV<sup>83,84,85,86</sup> menunjukkan bahwa adanya peran metilasi DNA.

Pemaparan terhadap faktor lingkungan seperti polusi udara, logam berat, dan arsenik, dapat menginduksi stres oksidatif dan memicu inflamasi, yang berkontribusi terhadap **aterogenesis** melalui peningkatan sitokin, disfungsi endotel, trombosis dan artimia.<sup>87</sup> Partikel polusi udara berhubungan dengan onset infark miokard dan risiko penyakit jantung dan stroke jangka panjang.<sup>88,89,90,91,92</sup> Studi menunjukkan udara partikel dalam udara lembab,<sup>94,94</sup> logam dan zat racun merubah metilasi DNA pada elemen repetitif, juga gen spesifik.<sup>95,96,97</sup>

## **INTERVENSI EPIGENETIK DALAM MENCEGAH PENYAKIT KARDIOVASKULER**

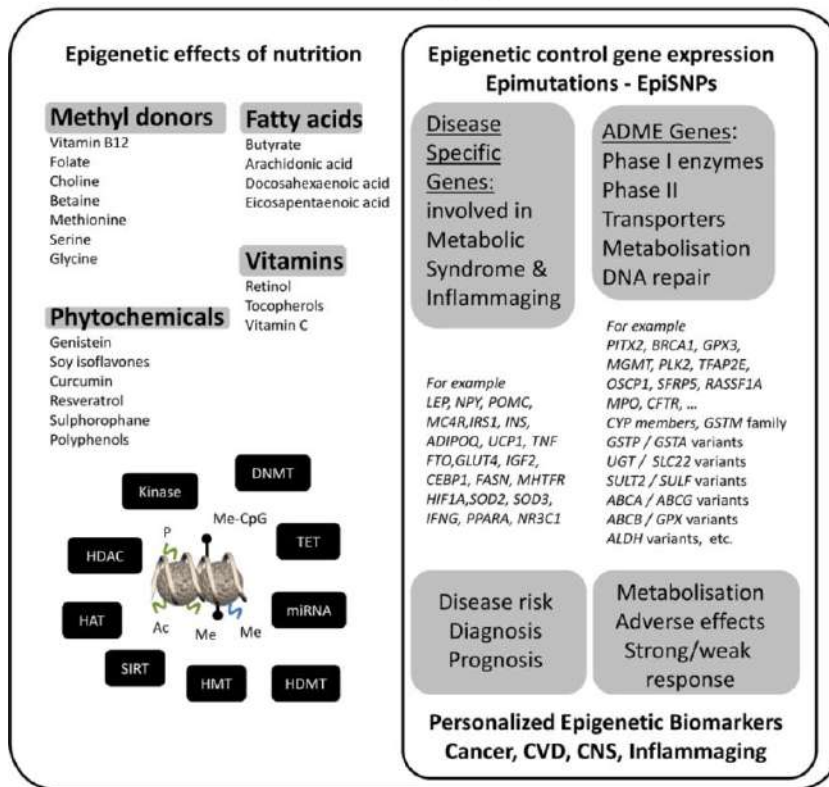
Dengan memahami pengaruh epigenetik terhadap PKV, terutama epigenom yang dapat menjadi target untuk dilakukan intervensi, sehingga dapat

diterjemahkan pengetahuan ini dalam praktek. Misalnya, metilasi DNA bergantung pada siklus biokimia yang memerlukan donor metil, maka intervensi diet dapat dilakukan berupa konsumsi asam folat, vitamin B6, B12, metionin, betaine, dan kolin.<sup>78</sup> Metilasi DNA juga sensitif terhadap zinc,<sup>98</sup> flavonoid,<sup>99</sup> vitamin C,<sup>100</sup> dan niacin.<sup>101</sup> Karena itu, analisis epigenetik *baseline* dapat digunakan untuk mengidentifikasi individu yang mendapat manfaat dari intervensi nutrisi.

Keseimbangan diet fitokimia dan kesehatan merupakan hubungan antara manusia dan alam (**Gambar 19**).<sup>102</sup> Berbagai senyawa polifenol seperti resveratrol, tea catechins, dan flavonoid, dijumpai di dalam sayur-sayuran, buah-buahan dan juice tumbuh-tumbuhan atau minuman memberikan efek kardioprotektif, neuroprotektif, kemopreventif dan anti-inflamasi. Mekanisme manfaat fitokimia adalah : 1. Aktivitas antioksidan atau meningkatkan ekspresi protein antioksidan; 2 mengurangi *stress signaling* endoplasmic retikulum; (3) menghambat sitokin anti-inflamasi; (4) menghambat faktor transkripsi berhubungan dengan penyakit metabolik; (5) menginduksi ekspresi gen metabolik; (6) aktivasi faktor transkripsi yang mengantagonis inflamasi.<sup>103</sup> Makanan ini memiliki aktivitas epigenom dan menentukan respon adaptif terhadap stres, metabolisme energi, homeostasis imun, dan fisiologi tubuh.<sup>104,105,106,107</sup>

Bukti akhir-akhir ini mengemukakan peran hiperhomosisteinemia terhadap penyakit vaskuler dimediasi oleh akumulasi adenosyl-homocystein (Hcy) dan metilasi DNA. Hcy berkompetisi dengan SAM (donor gugus metil) (**Gambar 18**),<sup>78</sup> berikatan dengan DNMT, yang menyebabkan hilangnya metilasi secara pasif dalam replikasi DNA. Kadar Hcy tinggi dalam darah berkorelasi dengan hipometilasi DNA dan aterosklerosis sehingga menyebabkan reduksi metilasi DNA sebesar 35% di dalam limfosit darah perifer.<sup>109,110,111,112</sup> Hal yang sama terjadi pada insulin glukosa, folat atau diet kaya flavanol mengganggu metabolisme donor metil dan pool SAM, menyebabkan perubahan metilasi DNA.<sup>112,113,114,115</sup> Karena itu, makanan kelas spesifik dapat dirancang untuk modulasi epigenetik terapeutik terhadap penyakit gaya hidup seperti PKV, dan diabetes. Studi epidemiologik dan antropologik medis telah menunjukkan bahwa diet kaya flavanol seperti pada coklat berhubungan terbalik dengan risiko kardiovaskuler.<sup>116,117,118,119,120,121,122</sup>

## Nutritional Epigenetics



## Personalized Nutrition

**Gambar 19.** Mekanisme regulasi epigenetik dari senyawa nutrisi. Modulasi berbagai kromatin *writer-eraser* oleh fitokimia (panel kiri). Gen yang menyandi protein absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi (ADME) diregulasi secara epigenetik menentukan respon masing-masing nutrisi. Modifikasi epigenetik terhadap gen yang berhubungan dengan penyakit dapat berkontribusi terhadap diagnosis (biomarker) juga pencegahan atau progresivitas penyakit (panel kanan).

Dikutip dari Szarc vel Szic K, Declerck K, Vidaković M, Vanden Berghe W. From inflammaging to healthy aging by dietary lifestyle choices: is epigenetics the key to personalized nutrition? *Clin Epigenetics*. 2015;7:33.

Berbagai senyawa nutrisi (seperti epigallocatechin gallate, resveratrol, genistein, curcumin, isothiocyanates, withaferin A) (Gambar 19)<sup>102</sup> telah diketahui dapat mengintervensi *writers*, *readers* kromatin, atau *eraser* seperti DNMT, histon kelas I-IV deacetylase (HDACs), histone acetyl transferase (HATs), dan HDAC sirtuin (SIRTs) kelas III yang memodulasi respon inflamasi dan senesen imunologik.<sup>123,124,125,126</sup> HDAC adalah metaprotein zinc yang bergantung pada  $Zn^{2+}$  untuk aktivitasnya dan dibagi atas empat kelas berdasarkan homologinya dengan HDAC jamur. HDAC kelas III disebut sebagai sirtuins, tidak bergantung zinc tetapi *nicotinamide adenine dinucleotide* (NAD+). Inhibitor HDAC kelas I-IV mengandung gugus terdiri dari thiolate, thiol, hydroxamate, karboksilat,

mercaptoamide, epoxide atau keton yang bersifat  $Zn^{2+}$  *chelating*. Flavonoid, adalah activator HDAC kelas III (SIRTs).<sup>102</sup>

### DAFTAR PUSTAKA

- Allis CD, Jenuwen T, Reinberg D. Overview and concepts. In : Allis CD eds., *Epigenetics* Cold Spring Harbour Laboratory Press 2007, p. 23-61.
- Chin MH, Mason MJ, Xie W, Volinia S, Singer M, Peterson C, Ambartsumyan G, Aimuwu O, Richter L, Zhang J, Khvorostov I, Ott V, Grunstein M, Lavon N, Benvenisty N, Croce CM, Clark AT, Baxter T, Pyle AD, Teitell MA,



- Pelegriani M, Plath K, Lowry WE. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell* 2009; 5:111-123.
3. Boland MJ, Nazor KL, Loring JF. Epigenetic regulation of pluripotency and differentiation. *Circ Res.* 2014;115:311-324.
  4. Christman JK, Price P, Pedrinan L, Acs G. Correlation between hypomethylation of DNA and expression of globin genes in Friend erythroleukemia cells. *Eur J Biochem.* 1977;81:53–61.
  5. McGhee JD, Ginder GD. Specific DNA methylation sites in the vicinity of the chicken beta-globin genes. *Nature.* 1979;280:419-420.
  6. Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell.* 1980;20:85-93.
  7. Taverna SD, Li H, Ruthenburg AJ, Allis CD, Patel DJ. How chromatin binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14:1025–1040.
  8. Tellefsbol TO. Epigenetics of human disease. In : Tellefsbol ed. *Epigenetic in human disease.* Elsevier Inc 2012; p. 1-6.
  9. Tollefsbol TO. Epigenetics L the new science of genetics. In : Tollefsbol TO ed. *Handbook of Epigenetics.* Academic Press 2011, p. 1-6.
  10. Heine VM, et al., Understanding epigenetic memory is the key to successful reprogramming : In : *Induced Pluripotent Stem Cells in Brain Diseases,* SpringerBriefs in Neuroscience, p. 27-41.
  11. Li En, Bird A. DNA methylation in mammals. In: Allis CD eds. *Epigenetics.* Cold Spring Harbour Laboratory press 2007, p. 341-355.
  12. Kouzarides T, Berger SL. Chromatin modifications and their mechanism of action. In : Allis CD eds. *Epigenetics.* Cold Spring Harbour Laboratory press 2007, p. 191-209.
  13. Collins LJ, Schonfeld B, Chen XS. The epigenetics of non-coding RNA. In : Tollefsbol TO ed. *Handbook of Epigenetics.* Academic Press 2011, p. 49-61.
  14. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 2005; 433: 769-73.
  15. Eulalio A, Huntzinger E, Nishihara T, Rehwinkel J, Fauser M, Izaurralde E. Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation, *RNA* 2009; 36: 1-6.16.
  16. Gangraju VK, Lin H. microRNAs : key regulators of stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10: 116-25.
  17. Sinkkonen L, Hugenschmidt T, Berninger P, Gaidatzis D, Mohn F, Artus-Revel CG, Zavolan M, Svoboda P, Filipowicz W. MicroRNAs control de novo DNA methylation through regulation of transcriptional repressors in mouse embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol* 2008; 15: 268-79
  18. The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). Design and methodologic considerations for the feasibility phase. The DCCT Research Group. *Diabetes.* 1986;35:530–545.
  19. Keating ST, Plutzky J, El-Osta A. Epigenetic changes in diabetes and cardiovascular risk. *Circ Res.* 2016;118:1706-1722.
  20. Diabetes Control and Complications Trial /Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research, Lachin JM, White NH, Hainsworth DP, Sun W, Cleary PA; Nathan DM. Effect of intensive diabetes therapy on the progression of diabetic retinopathy in patients with type 1 diabetes: 18 years of follow-up in the DCCT/EDIC. *Diabetes.* 2015;64:631–642.
  21. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 2007;128:693-705.
  22. Keating ST, El-Osta A. Epigenetics and metabolism. *Circ Res.* 2015;116:715-736.
  23. Piga R, Naito Y, Kokura S, Handa O, Yoshikawa T. Short-term high glucose exposure induces monocyte-endothelial cells adhesion and transmigration by increasing VCAM-1 and MCP-1 expression in human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis.* 2007;193:328–334.
  24. Suzuki LA, Poot M, Gerrity RG, Bornfeldt KE. Diabetes accelerates smooth muscle accumulation in lesions of atherosclerosis: lack of direct growth-promoting effects of high glucose levels. *Diabetes.* 2001;50:851-860.
  25. Parathath S, Grauer L, Huang LS, Sanson M, Distel E, Goldberg IJ, Fisher EA. Diabetes adversely affects macrophages during atherosclerotic plaque regression in mice. *Diabetes.* 2011;60:1759-1769.
  26. Hammes HP, Klinzing I, Wiegand S, Bretzel RG, Cohen AM, Federlin K. Islet transplantation inhibits diabetic retinopathy in the sucrose-fed diabetic Cohen rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993;34:2092–2096.

27. Zaina S, Heyn H, Carmona FJ, Varol N, Sayols S, Condom E, Ramirez Ruz J, Gomez A, Goncalves I, Moran S, Esteller M. DNA methylation map of human atherosclerosis. *Circ Cardiovasc Genet.* 2014;7:692–700.
28. Valencia-Morales Mdel P, Zaina S, Heyn H, et al. The DNA methylation drift of the atherosclerotic aorta increases with lesion progression. *BMC Med Genomics.* 2015;8:7.
29. ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.* 2012;489:57-74.
30. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001;414:813–820
31. Ilnat MA, Thorpe JE, Kamat CD, Szab C, Green DE, Warnke LA, Lacza Z, Cselenyik A, Ross K, Shakir S, Piconi L, Kaltreider RC, Ceriello A. Reactive oxygen species mediate a cellular ‘memory’ of high glucose stress signalling. *Diabetologia.* 2007;50:1523–1531.
32. Paneni F, Volpe M, Luscher TF, Cosentino F. SIRT1, p66(Shc), and Set7/9 in vascular hyperglycemic memory: bringing all the strands together. *Diabetes.* 2013;62:1800–1807.
33. Paneni F, Mocharla P, Akhmedov A, Costantino S, Osto E, Volpe M, Luscher TF, Cosentino F. Gene silencing of the mitochondrial adaptor p66(Shc) suppresses vascular hyperglycemic memory in diabetes. *Circ Res.* 2012;111:278–289.
34. Zhou S, Chen HZ, Wan YZ, Zhang QJ, Wei YS, Huang S, Liu JJ, Lu YB, Zhang ZQ, Yang RF, Zhang R, Cai H, Liu DP, Liang CC. Repression of P66Shc expression by SIRT1 contributes to the prevention of hyperglycemia-induced endothelial dysfunction. *Circ Res.* 2011;109:639-648.
35. Cordes R, Srivastava D. MicroRNA regulation of cardiovascular development. *Circ. Res.* 2009; 104: 724-732.
36. Latronico MV, Condorelli G. MicroRNAs and cardiac pathology. *Nature Rev. Cardiol.* 2009; 6: 419-429.
37. Small EM, Frost RJ, Olson E N. MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease. *Circulation* 2010; 121: 1022-1032.
38. van Rooij E, Olson E N. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *J. Clin. Invest.* 2007; 117: 2369-2376.
39. Liu N, Olson EN. MicroRNA regulatory networks in cardiovascular development. *Dev. Cell* 2010; 18: 510-525.
40. Small EM, Olson EN. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature* 2011; 469: 336-342.
41. Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet.* 2009;10:94-108.
42. Schraivogel D, Meister G. Import routes and nuclear functions of Argonaute and other small RNA-silencing proteins. *Trends Biochem Sci.* 2014;39:420–431.
43. van Rooij E. The art of microRNA research. *Circ Res.* 2011;108:219-234.
44. Yang B. et al. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nature Med.* 2007; 13:486-491.
45. Luo X. et al. Down-regulation of miR-1/miR-133 contributes to re-expression of pacemaker channel genes HCN2 and HCN4 in hypertrophic heart. *J. Biol. Chem.* 2008; 283: 20045-20052.
46. Callis TE. et al. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J. Clin. Invest.* 2009; 119: 2772–2786.
47. Thum T. et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 2008; 456: 980-984.
48. van Rooij E. et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2008; 105: 13027-13032.
49. van Rooij E. et al. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* 2007; 316: 575-579.
50. Care A et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nature Med.* 2007; 13:613-618.
51. Najafi-Shoushtari, S. H. et al. MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. *Science* 2010; 328: 1566-1569.
52. van Rooij E. et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2008;105: 13027-13032.
53. Hattori N, Ushijima T. Analysis of gene-specific DNA methylation : In : Tollefsbol TO ed. *Handbook of Epifegentics.* Academic Press 2011, p. 125-134.
54. Ushijima T. Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 223-31.
55. Li Y, Tollefsbol TO. DNA methylation

- detection: Bisulfite genomic sequencing analysis. *Methods Mol Biol.* 2011; 791:11–21.
56. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, et al. METHyLight : a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acid Res.* 2000; 28: E32.
  57. Cecchini KR, Raja Banerjee A, Kim TH. Towards a genome-wide reconstruction of cis-regulatory networks in the human genome. *Semin Cell Dev* 2009; 20: 842-8.
  58. Gilmour DS, Lis JT. Detecting protein-DNA interactions in vivo : distribution of RNA polymerase on specific bacterial gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 4275-9.
  59. Solomon MI, Varshavsky A. Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking : a probe for in vivo chromatin structures. *Proc Natl Acad Sci* 1985; 82: 6470-4.
  60. Wacker DA, Kim YJ, Kim TH. Chromatin modifications distinguish genomic features and physical organization of the nucleus. In : : Tollefsbol TO ed. *Handbook of Epigenetics*. Academic Press 2011, p. 159-171.
  61. Orlando V, Paro R, Mapping Polycomb-repressed domains in the bithorax complex using in vivo formaldehyde cross-linked chromatin. *Cell* 1993; 75: 1187-98.
  62. Hech A, Strahl-Bolsinger S., Grunstein M. Spreading of transcriptional repressor SIR3 from telomeric heterochromatin. *Nature* 1996; 383: 92-6.
  63. Ren B, Robert E, Wyrick JJ, Aparicio O, Jennings EG, Simon I et al. Genome-wide location and function of DNA binding protein. *Science* 2000; 290: 2306-9.
  64. Iyer VR, Horak CE, Scafe CS, Cotstein D, Snyder M, Brown PO. Genomic binding sites of the yeast cell-cycle transcription factors SBF and MBF. *Nature* 2001; 409: 533-8.
  65. Janit K, Janit M. Assessing epigenetic information. In : Tollefsbol TO ed. *Handbook of Epigenetics*. Academic Press 2011, p. 159-171.
  66. Dekker J. Gene regulation in the third dimension *Science* 2008; 319: 1793-4.
  67. Dekker J, Rippe K, Dekker M, Klecner N. Capturing chromosome conformation. *Science* 2002; 295: 1306-11.
  68. Baccarelli A, Rienstra M, Benjamin EJ. Cardiovascular epigenetics: basic concepts and results from animal and human studies. *Circ Cardiovasc Genet.* 2010;3:567-573.
  69. Friso S, Pizzolo F, Choi SW, Guarini P, Castagna A, Ravagnani V, Carletto A, Pattini P, Corrocher R, Olivieri O. Epigenetic control of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 gene promoter is related to human hypertension. *Atherosclerosis.* 2008;199:323–327.
  70. Turunen MP, Aavik E, Ylä-Herttuala S. Epigenetics and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1790:886–891.
  71. Makar KW, Wilson CB. DNA methylation is a nonredundant repressor of the Th2 effector program. *J Immunol.* 2004;173:4402-4406.
  72. Chen Z, Karaplis AC, Ackerman SL, et al. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum Mol Genet.* 2001;10:433–443.
  73. Lund G, Andersson L, Lauria M, Lindholm M, Fraga MF, Villar-Garea A, Ballestar E, Esteller M, Zaina S. DNA methylation polymorphisms precede any histological sign of atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein E. *J Biol Chem.* 2004;279:29147–29154.
  74. Movassagh M, Choy MK, Goddard M, Bennett MR, Down TA, Foo RS. Differential DNA methylation correlates with differential expression of angiogenic factors in human heart failure. *PLoS One.* 2010;5:e8564.
  75. Fang MZ, Wang Y, Ai N, Hou Z, Sun Y, Lu H, Welsh W, Yang CS. Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res.* 2003;63:7563–7570.
  76. Lim U, Song MA. Dietary and lifestyle factors of DNA methylation. *Methods Mol Biol.* 2012;863:359–376. doi: 10.1007/978-1-61779-612-8\_23.
  77. Zhang FF, Morabia A, Carroll J, Gonzalez K, Fulda K, Kaur M, Vishwanatha JK, Santella RM, Cardarelli R. Dietary patterns are associated with levels of global genomic DNA methylation in a cancer-free population. *J Nutr.* 2011;141:1165–1171.
  78. Zhong J, Agha G, Baccarelli AA. The role of DNA methylation in cardiovascular risk and disease. Methodological aspects, study design, and data analysis for epidemiological studies. *Circ Res.* 2016;118:119-131.
  79. Baccarelli A, Wright R, Bollati V, Litonjua A, Zanobetti A, Tarantini L, Sparrow D, Vokonas P, Schwartz J. Ischemic heart disease and stroke in relation to blood DNA methylation. *Epidemiology.* 2010;21:819-828.

80. Monick MM, Beach SR, Plume J, Sears R, Gerrard M, Brody GH, Philibert RA. Coordinated changes in AHRH methylation in lymphoblasts and pulmonary macrophages from smokers. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2012;159B:141–151.
81. Allione A, Marcon F, Fiorito G, Guarrera S, Siniscalchi E, Zijno A, Crebelli R, Matullo G. Novel epigenetic changes unveiled by monozygotic twins discordant for smoking habits. *PLoS One.* 2015;10:e0128265.
82. Wan ES, Qiu W, Baccarelli A, Carey VJ, Bacherman H, Rennard SI, Agusti A, Anderson W, Lomas DA, Demeo DL. Cigarette smoking behaviors and time since quitting are associated with differential DNA methylation across the human genome. *Hum Mol Genet.* 2012;21:3073–3082.
83. Zhang Y, Yang R, Burwinkel B, Breitling LP, Brenner H. F2RL3 methylation as a biomarker of current and lifetime smoking exposures. *Environ Health Perspect.* 2014;122:131-137.
84. McElduff P, Dobson A, Beaglehole R, Jackson R. Rapid reduction in coronary risk for those who quit cigarette smoking. *Aust N Z J Public Health.* 1998;22:787–791.
85. Rosenberg L, Palmer JR, Shapiro S. Decline in the risk of myocardial infarction among women who stop smoking. *N Engl J Med.* 1990;322:213-217.
86. Tverdal A, Thelle D, Stensvold I, Leren P, Bjartveit K. Mortality in relation to smoking history: 13 years' follow-up of 68,000 Norwegian men and women 35-49 years. *J Clin Epidemiol.* 1993;46:475–487.
87. Baccarelli A, Ghosh S. Environmental exposures, epigenetics and cardiovascular disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2012;15:323–329.
88. Brook RD, Franklin B, Cascio W, Hong Y, Howard G, Lipsett M, Luepker R, Mittleman M, Samet J, Smith SC Jr, Tager I; Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation.* 2004;109:2655–2671.
89. Brook RD, Rajagopalan S, Pope CA III, Brook JR, Bhatnagar A, Diez-Roux AV, Holguin F, Hong Y, Luepker RV, Mittleman MA, Peters A, Siscovick D, Smith SC Jr, Whitsel L, Kaufman JD; American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention, Council on the Kidney in Cardiovascular Disease, and Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation.* 2010;121:2331–2378.
90. Baccarelli A, Wright RO, Bollati V, Tarantini L, Litonjua AA, Suh HH, Zanobetti A, Sparrow D, Vokonas PS, Schwartz J. Rapid DNA methylation changes after exposure to traffic particles. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179:572–578.
91. Dominici F, Peng RD, Bell ML, et al. Fine particulate air pollution and hospital admission for cardiovascular and respiratory diseases. *JAMA* 2006;295:1127-34.
92. Peters A, Dockery DW, Muller JE, Mittleman MA. Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. *Circulation* 2001;103:2810-5.
93. Wellenius GA, Schwartz J, Mittleman MA. Air pollution and hospital admissions for ischemic and hemorrhagic stroke among Medicare beneficiaries. *Stroke* 2005;36:2549-53.
94. Bind MA, Baccarelli A, Zanobetti A, Tarantini L, Suh H, Vokonas P, Schwartz J. Air pollution and markers of coagulation, inflammation, and endothelial function: associations and epigenetic-environment interactions in an elderly cohort. *Epidemiology.* 2012;23:332–340.
95. Baccarelli A, Bollati V. Epigenetics and environmental chemicals. *Curr Opin Pediatr.* 2009;21:243–251.
96. Bind MA, Lepeule J, Zanobetti A, Gasparini A, Baccarelli A, Coull BA, Tarantini L, Vokonas PS, Koutrakis P, Schwartz J. Air pollution and gene specific methylation in the Normative Aging Study: association, effect modification, and mediation analysis. *Epigenetics.* 2014;9:448–458.
97. Tarantini L, Bonzini M, Apostoli P, Pegoraro V, Bollati V, Marinelli B, Cantone L, Rizzo G, Hou L, Schwartz J, Bertazzi PA, Baccarelli A. Effects of particulate matter on genomic DNA methylation content and iNOS promoter methylation. *Environ Health Perspect.* 2009;117:217–222.
98. Kaplan GA, Keil JE. Socioeconomic factors and cardiovascular disease: a review of the literature. *Circulation.* 1993;88:1973–1998.
99. Dreosti IE. Zinc and the gene. *Mutat Res.* 2001;475:161–167.
100. Halliwell B. Vitamin C and genomic stability. *Mutat Res.* 2001;475:29–35.

101. Hageman GJ, Stierum RH. Niacin, poly(ADP-ribose) polymerase-1 and genomic stability. *Mutat Res.* 2001;475:45-56.
102. Szarc vel Szic K, Declerck K, Vidaković M, Vanden Berghe W. From inflammaging to healthy aging by dietary lifestyle choices: is epigenetics the key to personalized nutrition? *Clin Epigenetics.* 2015;7:33.
103. Joven J, Rull A, Rodriguez-Gallego E, Camps J, Riera-Borrull M, Hernández-Aguilera A, et al. Multifunctional targets of dietary polyphenols in disease: a case for the chemokine network and energy metabolism. *Food Chem Toxicol.* 2013;51:267-79.
104. Einstein FH. Multigenerational effects of maternal undernutrition. *Cell Metab.* 2014;19:893-4.
105. Huang J, Plass C, Gerhauser C. Cancer chemoprevention by targeting the epigenome. *Curr Drug Targets.* 2011;12:1925-56.
106. Vel Szic KS, Ndlovu MN, Haegeman G, Vanden Berghe W. Nature or nurture: let food be your epigenetic medicine in chronic inflammatory disorders. *Biochem Pharmacol.* 2010;80:1816-32.
107. Miceli M, Bontempo P, Nebbioso A, Altucci L. Natural compounds in epigenetics: a current view. *Food Chem Toxicol.* 2014;73:71-83.
108. Remely M, Lovrecic L, de la Garza AL, Migliore L, Peterlin B, Milagro FI, et al. Therapeutic perspectives of epigenetically active nutrients. *Br J Pharmacol.* 2015;172:2756-68.
109. Sharma P, Senthilkumar RD, Brahmachari V, Sundaramoorthy E, Mahajan A, Sharma A, et al. Mining literature for a comprehensive pathway analysis: a case study for retrieval of homocysteine related genes for genetic and epigenetic studies. *Lipids Health Dis.* 2006;5:1.
110. Chen NC, Yang F, Capecci LM, Gu Z, Schafer AI, Durante W, et al. Regulation of homocysteine metabolism and methylation in human and mouse tissues. *FASEB J.* 2010;24:2804-17.
111. Jiang Y, Sun T, Xiong J, Cao J, Li G, Wang S. Hyperhomocysteinemia-mediated DNA hypomethylation and its potential epigenetic role in rats. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2007;39:657-67.
112. Kim JM, Hong K, Lee JH, Lee S, Chang N. Effect of folate deficiency on placental DNA methylation in hyperhomocysteinemic rats. *J Nutr Biochem.* 2009;20(3):172-6.
113. Bistulfi G, Vandette E, Matsui S, Smiraglia DJ. Mild folate deficiency induces genetic and epigenetic instability and phenotype changes in prostate cancer cells. *BMC Biol.* 2010;8:6.
114. Ghoshal K, Li X, Datta J, Bai S, Pogribny I, Pogribny M, et al. A folate- and methyl-deficient diet alters the expression of DNA methyltransferases and methyl CpG binding proteins involved in epigenetic gene silencing in livers of F344 rats. *J Nutr.* 2006;136:1522-7.
115. Ulrich CM, Reed MC, Nijhout HF. Modeling folate, one-carbon metabolism, and DNAmethylation. *Nutr Rev.* 2008;66 Suppl 1:S27-30.
116. Manach C, Mazur A, Scalbert A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Curr Opin Lipidol.* 2005;16:77-84.
117. Fisher ND, Hollenberg NK. Aging and vascular responses to flavanol-rich cocoa. *J Hypertens.* 2006;24(8):1575-80.
118. Sies H, Schewe T, Heiss C, Kelm M. Cocoa polyphenols and inflammatory mediators. *Am J Clin Nutr.* 2005;81(1 Suppl):304S-12.
119. Heiss C, Kleinbongard P, Dejam A, Perre S, Schroeter H, Sies H, et al. Acute consumption of flavanol-rich cocoa and the reversal of endothelial dysfunction in smokers. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:1276-83.
120. Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5:493-506.
121. Bertelli AA, Das DK. Grapes, wines, resveratrol, and heart health. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2009;54:468-76.
122. Chiva-Blanch G, Badimon L, Estruch R. Latest evidence of the effects of the Mediterranean diet in prevention of cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep.* 2014;16:446.
123. Huang J, Plass C, Gerhauser C. Cancer chemoprevention by targeting the epigenome. *Curr Drug Targets.* 2011;12:1925-56.
124. Vel Szic KS, Ndlovu MN, Haegeman G, Vanden Berghe W. Nature or nurture: let food be your epigenetic medicine in chronic inflammatory disorders. *Biochem Pharmacol.* 2010;80:1816-32.
125. Burdge GC, Lillycrop KA. Nutrition, epigenetics, and developmental plasticity: implications for understanding human disease. *Annu Rev Nutr.* 2010;30:315-39.
126. Jackson AA, Burdge GC, Lillycrop KA. Diet, nutrition and modulation of genomic expression in fetal origins of adult disease. *World Rev Nutr Diet.* 2010;101:56-72.



## 3

# Stem Cell Self-Renewal

<b>PENDAHULUAN</b>	<b>68</b>	<b>SIRKIT REGULASI FAKTOR TRANSKRIPSI</b>	
<b>STRATEGI SELF-RENEWAL</b>	<b>69</b>	<b>PADA EMBRYONIC STEM CELL</b>	
		<b>SELF-RENEWAL MANUSIA</b>	<b>77</b>
<b>PENGATURAN STEM CELL SELF-RENEWAL</b>	<b>70</b>	<b>INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL</b>	<b>77</b>
<b>STEM CELL NICHE</b>	<b>70</b>	<b>PLURIPOTENSI SECARA <i>IN VIVO</i></b>	<b>77</b>
<b>EMBRYONIC STEM CELL</b>	<b>71</b>	<b>MEKANISME INDUCED PLURIPOTENT</b>	
		<b>STEM CELL PADA TINGKAT EPIGENETIK</b>	<b>78</b>
<b>EMBRYONIC STEM CELL DENGAN</b>	<b>73</b>	<b>Faktor transkripsi penentu nasib sel</b>	
<b>MENCEGAH DIFERENSIASI</b>		<b>pluripoten</b>	<b>79</b>
<b>EMBRYONIC STEM CELL</b>	<b>75</b>	<b>PERUBAHAN TARGET KROMATIN SELAMA</b>	
<b>SELF RENEWAL MELALUI PROLIFERASI</b>		<b>PROSES PEMBENTUKAN INDUCED</b>	
<b>MEKANISME EPIGENETIK TERHADAP</b>	<b>75</b>	<b>PLURIPOTENT STEM CELL</b>	<b>80</b>
<b>EMBRYONIC STEM CELL SELF-RENEWAL</b>			
<b>SELF-RENEWAL PADA EMBRYONIC STEM</b>	<b>76</b>		
<b>CELL MANUSIA</b>			

*“The art of simplicity is a puzzle of complexity”*

—*Douglas Horton-*

## PENDAHULUAN

Stem cell adalah sel yang mempunyai dua sifat utama : *self-renewal* dan berdiferensiasi.<sup>1,2</sup> Secara eksplisit, stem cell mampu menghasilkan sel anak yang identik dengan sel induk melalui mitosis (*self-renewal*), juga menghasilkan sel anak (progeni) dengan potensi terbatas (sel terdiferensiasi).<sup>3</sup> Dengan kapasitas *self-renewal* berarti mampu menghasilkan kembali satu sel progeni yang memiliki fenokopi yang sama dengan sel induk dan satu progeni berdiferensiasi. Sehingga stem cell dideskripsikan sebagai ‘immortal’, ‘unlimited’ atau ‘kontinu’ dalam kapasitas replikasi sel.<sup>3</sup> Istilah “immortal” ini ditinjau dari “replicative ageing”

kurang tepat, karena sel progeni dapat mengalami proses “penuaan.”<sup>5</sup>

*Self-renewal* pada stem cell bertujuan untuk membuat lebih banyak stem cell melalui pembelahan simetris yaitu menghasilkan dua stem cell, misalnya pada awal perkembangan embrio yang normal, pembelahan stem cell yang bersifat transien ini untuk pertumbuhan tubuh.<sup>4</sup> Sedangkan pembelahan asimetris adalah menghasilkan satu stem cell dan satu sel anak terdiferensiasi dengan kemampuan diferensiasi terbatas.<sup>4</sup> Sifat *self-renewal* menjadikan stem cell dapat memberikan jumlah suplai sel tanpa terbatas, sedangkan potensi diferensiasi memungkinkan stem cell menghasilkan

semua jenis sel. Sifat ini membuat stem cell dapat digunakan dalam kedokteran regeneratif.<sup>5</sup>

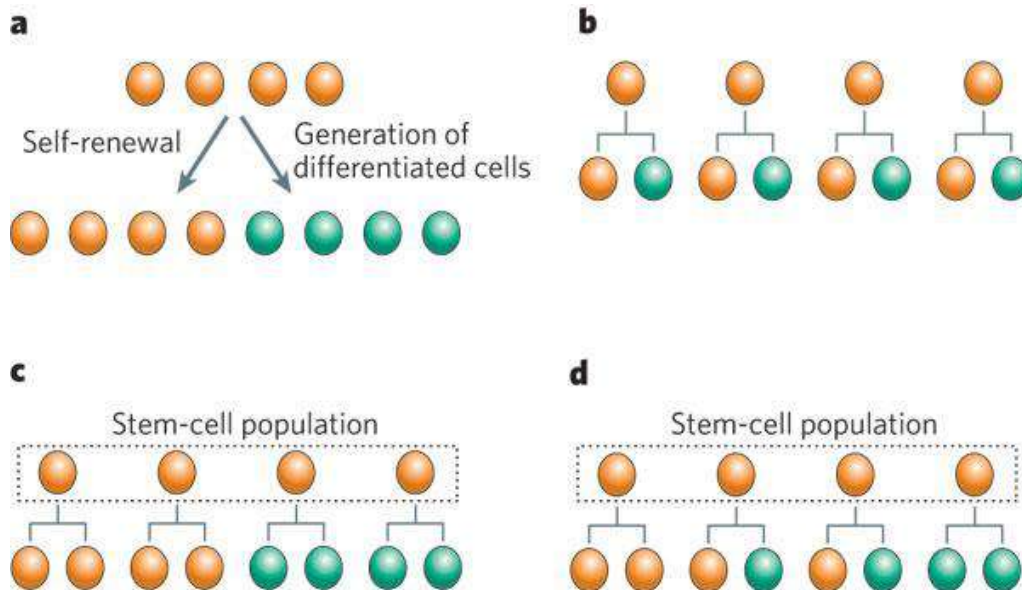
Secara fungsional, stem cell mempunyai sifat potensi karena mampu menghasilkan progeni yang terdiferensiasi. Stem cell yang mampu menghasilkan satu organisme disebut totipoten, misalnya terdapat pada zigot. Stem cell yang mampu berdiferensiasi menghasilkan 3 lapisan sel germinal disebut stem cell pluripoten; lapisan ektoderm, mesoderm dan endoderm.<sup>4</sup> Stem cell pluripoten dapat dijumpai pada embrio pre dan post-implantasi.<sup>3</sup> Multipotent stem cell adalah stem cell yang dapat menghasilkan lebih dari satu jenis sel tetapi dalam jumlah terbatas, misalnya pada adult stem cell. Stem cell ini merupakan progeni dari stem cell pluripoten sehingga sifat plastisitas terbatas. Kapasitas *self-renewal* amat penting bagi kelangsungan fungsi *adult stem cell*, misalnya *hematopoietic stem cell* dan *spermatogonial stem cell* – untuk dapat mengembalikan fungsi jaringan dengan masa turn over yang cepat, misalnya pembentukan darah (hematopoiesis). Karena itu, dalam bab ini akan dipaparkan strategi dan proses pembelahan pada *self-renewal* pada *adult stem cell* dan *embryonic*

*stem cell*, mekanisme yang mendasari, dan pengaturan *self-renewal* pada tingkat epigenetik.

## STRATEGI SELF-RENEWAL

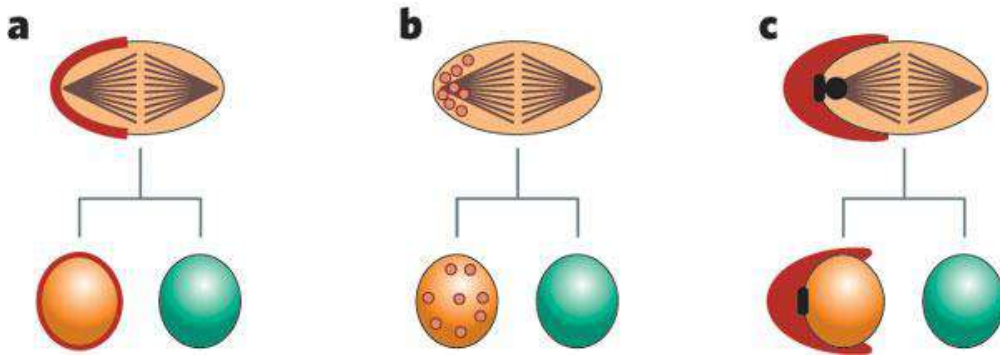
Dengan melakukan pembelahan asimetris, stem cell memiliki strategi untuk melakukan dua tugas dalam sekali pembelahan (Gambar 1 a,b).<sup>6</sup> Dengan strategi ini, stem cell belum mampu memperbanyak jumlahnya yang amat diperlukan ketika pool stem cell diperlukan untuk perkembangan<sup>7,8,9</sup> dan saat terjadi injuri untuk regenerasi<sup>9,10,11,12,13</sup> Karena itu, diperlukan strategi *self-renewal* untuk memenuhi jumlah yang diperlukan.<sup>5</sup>

Stem cell melakukan pembelahan secara simetris untuk *self-renewal* sekaligus menghasilkan sel progeni yang terdiferensiasi. Pembelahan simetris adalah menghasilkan dua sel anak atau sel terdiferensiasi, yang dibutuhkan ketika terjadi injuri atau penyakit yang memerlukan banyak stem cell (Gambar 1 c).<sup>6</sup> Stem cell dapat mengadakan pembelahan secara asimetris atau kombinasi pembelahan simetris dan asimetris (Gambar 1 d).<sup>6</sup>



**Gambar 1.** Strategi stem cell. a, stem cell (orange) melakukan *self-renewal* dan menghasilkan sel terdiferensiasi (hijau). B-d, strategi mempertahankan keseimbangan stem cell dan progeni terdiferensiasi. B, pembelahan sel asimetrik; setiap stem cell menghasilkan satu sel anak dan satu sel anak mengadakan diferensiasi. c, d, strategi populasi. Strategi populasi memberikan kontrol dinamik terhadap keseimbangan stem cell terdiferensiasi - kapasitas untuk memperbaiki setelah injuri atau penyakit. Dalam skema ini, stem cell memiliki "potensi" untuk menghasilkan satu stem cell dan satu sel terdiferensiasi pada setiap pembelahan. c, pembelahan sel simetrik; setiap stem cell dapat membelah secara simetrik menghasilkan dua sel anak atau dua sel terdiferensiasi. d, kombinasi pembelahan sel: masing-masing stem cell dapat membelah baik simetrik maupun asimetrik.

Dikutip dari Morrison SJ, Kimble J. *Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. Nature* 2006; 441: 1068-1074.



**Gambar 2.** Kontrol pembelahan stem cell. a. lokasi asimetik dari regulator polaritas sel (merah) memulai pembelahan asimetrik. Pembelahan asimetrik terdapat pada kompleks PAR-aPKC pada satu ujung pembelahan sel. Stem cell berwarna *orange*, dan sel terdiferensiasi berwarna hijau. b. penentu nasib sel (merah) berkumpul di sitoplasma pada satu sel anak, atau berhubungan dengan membran, sentrosom atau konstituen sel lainnya, yang didistribusikan ke sel anak. c, Orientasi *spindle mitotic* hanya dijumpai pada sel anak dari stem cell *niche* (merah), karena sel anak mempunyai akses terhadap signal ekstrinsik yang diperlukan untuk mempertahankan identitas stem cell. Mekanisme ini mencapai pembelahan asimetrik meskipun pembelahan ini sendiri secara intrinsik adalah simetrik. Pada model yang sama, sel anak ditempatkan jauh dari *niche* dipaparkan terhadap signal yang menginduksikan diferensiasi.

Dikutip dari Morrison SJ, Kimble J. *Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. Nature* 2006; 441: 1068-1074.

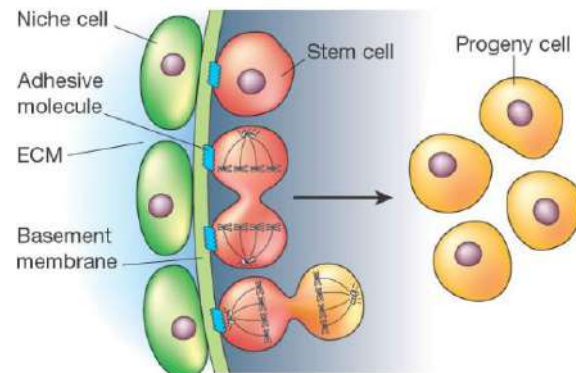
Ada dua mekanisme yang mendasari pembelahan asimetris : mekanisme intrinsik dan mekanisme ekstrinsik. Mekanisme intrinsik meliputi faktor polaritas sel dan segregasi penentu nasib sel (Gambar 2 a,b).<sup>6</sup> Hanya sel progeni yang keluar dari stem cell *niche* karena adanya signal ekstrinsik untuk berdiferensiasi (Gambar 2c).<sup>6</sup> Meskipun secara intrinsik berupa pembelahan simetris, namun terjadi pembelahan asimetris karena adanya pemaparan terhadap signal eksternal. Karena itu, pada pembelahan asimetrik proses benang pembelahan dapat direproduksi karena proses ini diregulasi secara ekstrinsik dan intrinsik.

## PENGATURAN STEM CELL SELF-RENEWAL

### STEM CELL NICHE

Dengan mengetahui pengaturan *self-renewal* stem cell dan bagaimana stem cell diatur, maka dapat diketahui sifat alamiah stem cell. Observasi pada adult stem cell seperti *hematopoietic stem cell* (HSC) menunjukkan bahwa potensi HSC akan kehilangan *self-renewal* jika sel tersebut dikeluarkan dari *microenvironment* (*niche*) dan banyak faktor *signaling* dari *niche* secara langsung mengatur sel progeni mengalami diferensiasi. Jika ruang di dalam *niche* terbatas, satu sel progeni akan digantikan di luar *niche*, dan memulai diferensiasi karena kurangnya faktor

*self-renewal*. Jika ruang *niche* ada, maka kedua sel progeni dari hasil pembelahan stem cell akan menyimpan identitas stem cell (misalnya, *self-renewal*). Karena itu, stem cell *niche* memprediksi bagaimana jumlah stem cell dikontrol oleh keberadaan *niche* yang memberikan signal diperlukan untuk *self-renewal* dan *survival*.



**Gambar 3.** Sel *niche* (hijau) berada di *basement membrane* memberikan signal ke stem cell (merah) untuk memblok diferensiasi dan mengatur pembelahan. Jika mekanisme garis turunan menonjol (pembelahan sel rendah), pembelahan stem cell dengan satu sel anak berhubungan dengan *niche*, yang lain (kuning) terlepas dan memulai diferensiasi. Sebaliknya, jika mekanisme populasi menonjol (pembelahan sel tinggi), pembelahan stem cell dapat menjadi simetrik (terlihat pada gambar) atau asimetrik (tidak ditunjukkan), ditentukan oleh faktor local. ECM, extracellular matrix.

Dikutip dari Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. *Stem cells find their niche. 2001; 414: 98-104.*

Mekanisme interna yang mengatur pola pembelahan sel dan menentukan nasib sel anak adalah melalui ekspresi gen. Berbagai signal dan interaksi interseluler turut menentukan tingkah laku sel yang tidak terdiferensiasi. Schofield mengemukakan bahwa pengatur *hematopoietic stem cell* (HSC) adalah pada satu regio yang dikenal sebagai *niche* (Gambar 3).<sup>14</sup> *Niche* tersusun atas jaringan sel atau substrat ekstraseluler yang menyangga satu atau lebih stem cell dan mengatur *self-renewal* dan produksi sel progeni secara *in vivo*.<sup>14</sup> *Niche* juga menunjang polaritas orientasi sel progeni misalnya satu sel progeni ditempatkan di luar *niche* untuk mengadakan diferensiasi (Gambar 3).<sup>14</sup>

### EMBRYONIC STEM CELL (ESC)

Selama pembentukan embrio, sel mengalami proses dari sifat proliferasif and pluripoten menjadi sel yang terbatas dalam potensi diferensiasi. Martin Evans dan Kaufman menemukan *pluripotent cell lines*, dikenal sebagai embryonic stem (ES) cells yang berasal dari *inner cell mass* di dalam blastocyst mencit, tahun 1981.<sup>15</sup> Atas penemuan ini, Martin Evans bersama Mario Capecchi dan Oliver Smithies dianugrahi hadiah Nobel. Kultur ES cell diperoleh dari satu sel tunggal dapat berdiferensiasi menjadi sejumlah tipe sel, atau membentuk teratokarsinoma jika disuntikkan ke dalam mencit.<sup>16</sup>

Dengan adanya *leukemia inhibitory factor* (LIF), suatu faktor pertumbuhan, di dalam kultur (secara *in vitro*) yang mencegah diferensiasi dan meningkatkan proliferasi, ES cell mencit dapat mempertahankan *self-renewal*, atau kondisi proliferasi dan *undifferentiated* terus-menerus selama bertahun-tahun,<sup>17</sup> serta dijumpai pada sel epiblast berusia 4.5 hari (E.4.5), dan jika disuntikkan ke dalam blastocyst, maka menyebabkan pertumbuhan embrio, menghasilkan seluruh sel embrio dan germline.<sup>18</sup> Kemampuan ES cell dalam mempertahankan perkembangan embrio ini dikenal sebagai *naive pluripotency* atau *ground pluripotent state*.<sup>19,20</sup> Jadi, ES cell adalah stem cell yang berasal dari epiblast preimplantasi yang mempertahankan *naïve pluripotency* melalui *self-renewal*.<sup>20</sup> Sebaliknya, epiblast stem cell (EpiSC) berasal dari epiblast atau ectoderm primitif embrio pascaimplantasi. EpiSC mencit mempertahankan *self-renewal* karena adanya fibroblast growth factor (Fgf2) dan Activin dan jarang berkontribusi terhadap embrio kimera setelah disuntikkan ke dalam blastocyst, dan dikenal sebagai *primed*

*pluripotency*.<sup>4</sup>

Secara *in vivo*, keadaan pluripotensi selama perkembangan zigot totipoten menjadi blastocyst. Pada tingkat proses ini terbagi atas dua garis turunan : *inner cell mass* (ICM), sebagai pembentuk pluripotensi, dan *trophectoderm* (TE), yang membentuk lapisan epitel ekstraembrionik yang melapisi dan menyokong ICM (Gambar 4).<sup>19</sup> Pada blastocyst tingkat akhir (E-4.0). ICM berkonsolidasi membentuk garis turunan yang mengekspresikan Nanog dan lapisan ekstraembrionik dengan endoderm primitif yang mengekspresikan Gata-6 (dikenal sebagai hipoblast).<sup>21</sup> Epiblast yang terbagi ini masuk ke dalam perkembangan “ground state”, sebagai asal perkembangan seluruh sel embrio (Gambar 4).<sup>19</sup>

Epiblast akan berkembang menjadi ectoderm primitif pada tahap embryogenesis. Ektoderm primitif dapat dibedakan dari ICM, karena tidak menghasilkan trophoctoderm dan endoderm primitif (Gambar 5),<sup>17</sup> juga morfologi epitel yang berbeda dari ICM.<sup>22</sup> Ektoderm primitif adalah satu-satunya sel lineage dengan mempertahankan pluripotensi dan menghasilkan tiga lapis embrio dan sel germinal primordial (Gambar 5).<sup>17</sup> Namun, kurang mampu berdiferensiasi menjadi ekstraembrionik, endoderm primitif dan trophoctoderm. Karena itu, dibandingkan dengan ICM, tingkat pluripotensi ektoderm primitif lebih kecil atau “terbatas”.<sup>17</sup>

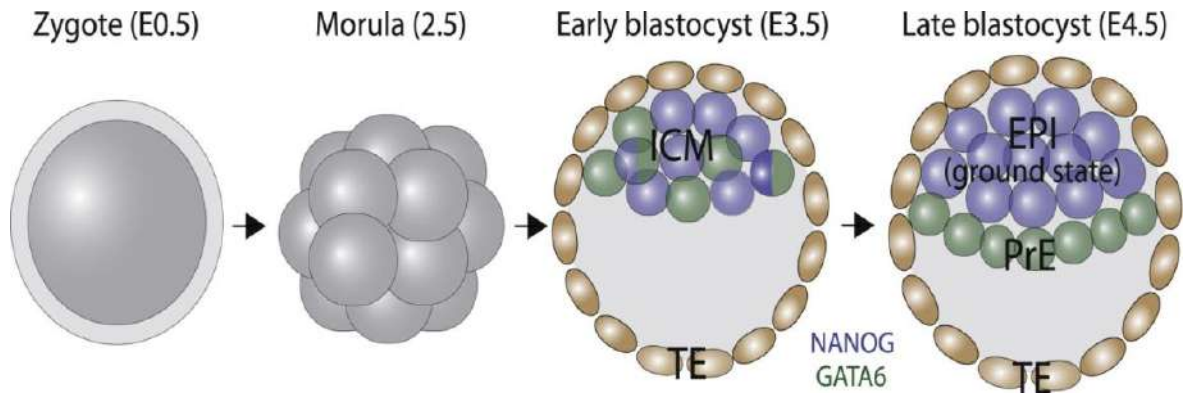
Pluripotensi didefinisikan sebagai kemampuan menghasilkan semua tipe sel dari satu embrio terlepas dari *trophoectoderm* (prekursor pembentuk plasenta), dan menghasilkan seluruh sel embrio dan dewasa.<sup>23,24</sup> Hal ini disebabkan analisis awal pada embrio kimerik mencit, yang dihasilkan dari suntikan sel ICM dan sel ES ke dalam embrio dengan jumlah sel sebanyak 8 atau blastocyst.<sup>25</sup> Namun, ICM masih mampu menghasilkan trophoctoderm lineage, juga ES cell dalam kondisi kultur.<sup>26</sup>

Dalam beberapa tahun terakhir, studi telah mengemukakan peran faktor transkripsi dan proses epigenetik dalam mempertahankan pluripotensi ES cell.<sup>26,27,28,29,30,31</sup> Fungsi faktor transkripsi bergantung pada tahap perkembangan sel pluripoten. Hal ini menunjukkan bahwa faktor-faktor ini berfungsi bersama dengan proses lain.<sup>32</sup> Aktivitas faktor transkripsi juga bergantung pada akses gen target, yang dapat dibuat lebih mudah atau tidak terhadap modifikasi DNA nya, histon, atau struktur kromatin.<sup>33</sup>



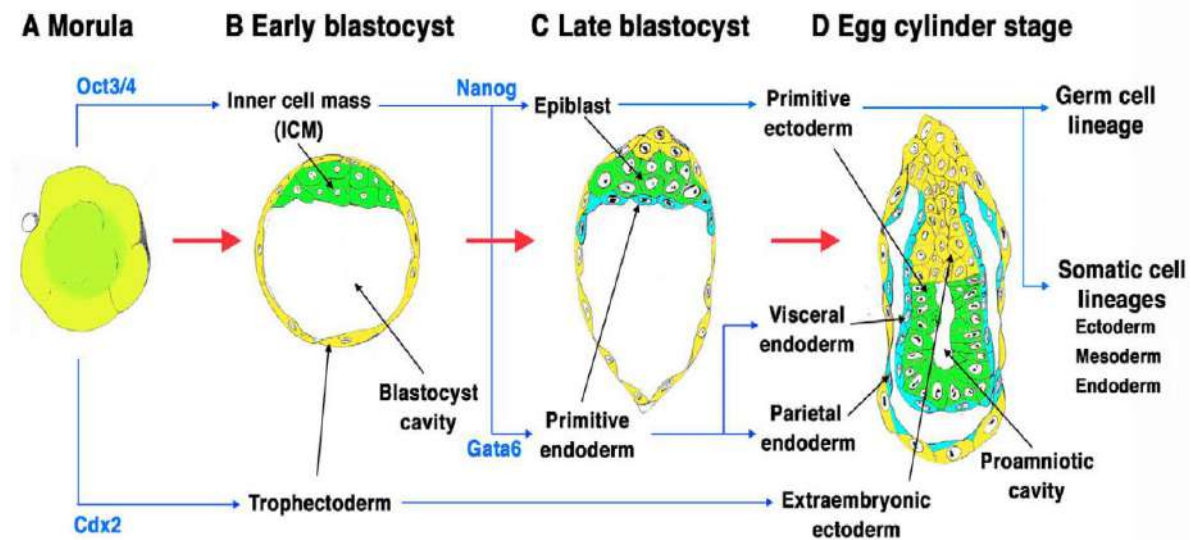
Meskipun ES cell dikatakan bersifat pluripoten, diferensiasi menjadi 3 tipe sel : ectoderm primitif, endoderm primitif dan sel trophoctoderm, analog dengan kemampuan diferensiasi ICM. Diferensiasi ECS cell mencit dapat diinduksi oleh ekspresi ektopik dari faktor transkripsi tertentu, Misalnya ekspresi faktor

transkripsi Gata6 pada ES cell menghasilkan diferensiasi menjadi endoderm primitif.<sup>34</sup> Juga ekspresi caudal-type homeobox transcription factor (Cdx2) menginduksi ES cell berdiferensiasi menjadi *trophoctoderm*.<sup>26</sup> Karena itu, faktor-faktor ini menekan ES cell menjadi *self-renewal*.<sup>17</sup>



**Gambar 4.** Pembentukan pluripotent *ground state* secara in vivo. Perkembangan *zigot* berlanjut melalui pembelahan membentuk morula, yang berkembang menjadi blastocyst terdiri dari trophoctoderm ekstraembrionic (TE) dan inner cell mass pluripotent. ICM mengekspresikan Gata6 (hijau) dan Nanog (biru) tetapi selanjutnya berkembang masing-masing menjadi extraembryonic primitive endoderm (PrE) dan pluripotent naïve epiblast (EPI) secara mutually exclusive. EPI adalah sumber pembentukan seluruh sel embrio, termasuk *germline*, sehingga dikenal sebagai perkembangan “ ground state.”

Dikutip dari Hackett JA, Surani MA. *Regulatory principles of pluripotency: from the ground state up.* Cell Stem Cell 2014;15: 416-430.



**Gambar 5.** Embrio mencit dengan *pluripotent lineage*. Perkembangan preimplantasi dalam bentuk skema. (A) Stem cell pluripoten (hijau) pada perkembangan morula menjadi inner cells (B) membentuk inner cell mass (ICM) blastocyst. (C) Setelah menjadi endoderm primitive pada permukaan ICM, stem cell pluripoten membentuk epiblast dan memulai proliferasi secara cepat setelah implantasi. (D) Membentuk ectoderm primitif, epitelium berlapis tunggal yang membatasi pluripotensi dan menghasilkan *germ cell lineage* dan membentuk *somatic lineage* embrio. Faktor transkripsi tertentu (biru) diperlukan untuk diferensiasi berbagai embryonic lineages (garis turunan embrio).

Dikutip dari Niwa, H. *How is pluripotency determined and maintained?* Development 2007; 134, 635-646.



## EMBRYONIC STEM SELF-RENEWAL DENGAN MENCEGAH DIFERENSIASI

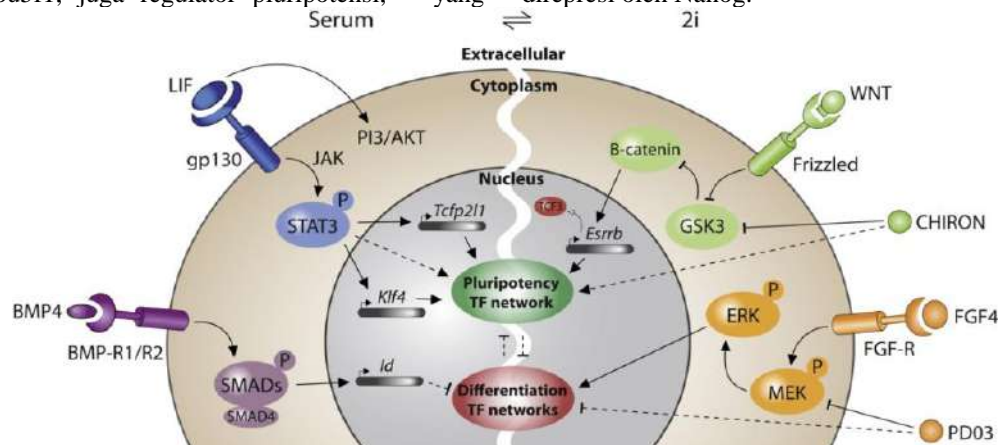
*Self-renewal* dari ES cell dapat dipertahankan dengan mencegah diferensiasi dan meningkatkan pluripotensi. Untuk penelitian *in vitro* pada mencit, sangat dibutuhkan satu faktor kunci yaitu *leukemic inhibitory factor* (Lif) untuk mencegah diferensiasi. Sebenarnya, kondisi kultur optimal untuk *self-renewal* yang kuat pada *ground state* (*naive pluripotent*) pada ES cell mencit terdiri dari 3 adiktif 2i yaitu suplemen LIF (CHIRON, PD03, LIF) (Gambar 6),<sup>19</sup> yang terutama berpengaruh terhadap masing-masing jalur WNT, FGF/ERK, dan JAK/STAT.<sup>19</sup> Namun, kombinasi dari dua dari antara tiga sudah cukup mempertahankan *naive self-renewal*, paling tidak untuk menguji genetik.<sup>35,36</sup>

Lif adalah family sitokin interleukin-6 berikatan dengan reseptor heterodimerik terdiri dari Lif receptor- $\beta$  dan gp130. Ikatan ini menyebabkan aktivasi jalur Jak/Stat (Janus kinase signal transducer and activator of transkription).<sup>17</sup> Aktivasi Stat amat penting dan cukup mempertahankan EC cell mencit,<sup>37,38</sup> dan c-Myc adalah target dari Stat3.<sup>39</sup>

Faktor transkripsi famili POU Oct3/4, yang disandi oleh Pou5f1, juga regulator pluripotensi,<sup>40</sup> yang

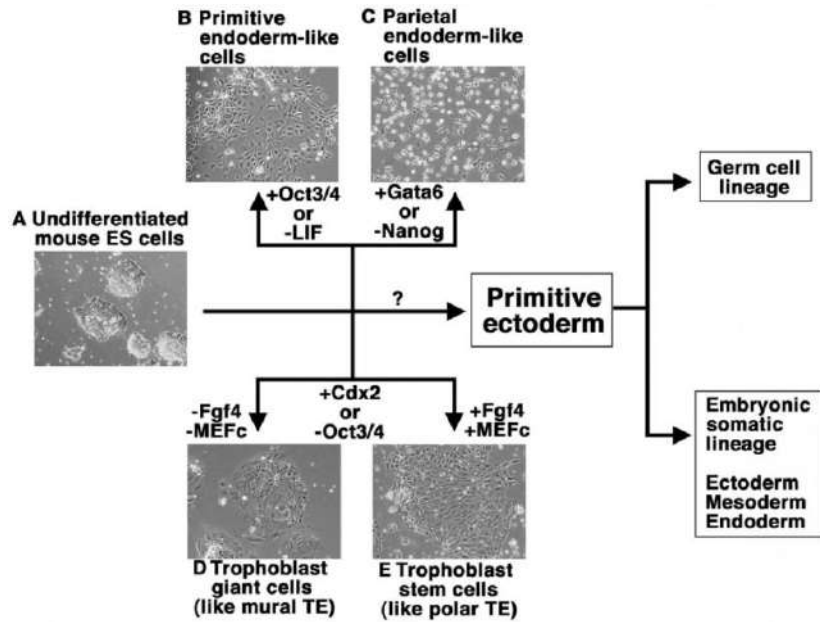
bekerja sebagai pengawal untuk mencegah diferensiasi ES cell. Represi artifisial terhadap Oct 3/4 pada ES cell menginduksi diferensiasi sepanjang *trophoectodermal lineage*, ketika overekspresi ES cell berdiferensiasi menjadi *primitive endoderm-like cell* (Gambar 7B).<sup>17,27</sup> Oct3/4 dilaporkan secara langsung mencegah diferensiasi menjadi *trophoectoderm* yang berinteraksi dengan Cdx2 (faktor pemicu diferensiasi *trophoectoderm* (Gambar 7D,E)).<sup>17</sup>

Gen target yang mencegah ES cell dari diferensiasi menjadi *endoderm primitif* dengan merepresi faktor pencetus adalah Gata6. Nanog adalah NK-2 class *homeobox transcription factor* yang diekspresikan sepanjang sel pluripoten ICM. Overekspresi Nanog pada ES cell dapat mempertahankan keadaan pluripoten tanpa Lif, sehingga dikenal sebagai repressor Gata6.<sup>28,30</sup> Namun, dilaporkan bahwa ekspresi Nanog sebagian diregulasi oleh Oct3/4 dan Sox2, suatu anggota famili Sox (SRY-related HMG box).<sup>41,42</sup> Meskipun overekspresi Nanog pada ES cell yang memblokir diferensiasi ES cell menjadi endoderm primitif (diinduksi oleh penarikan Lif) atau pembentukan embryoid bodies (EB : struktur menyerupai bola yang membentuk ES cell pada suspensi kultur dan menyerupai diferensiasi mesoderm), tidak ada bukti langsung bahwa Gata6 direpresi oleh Nanog.<sup>17</sup>



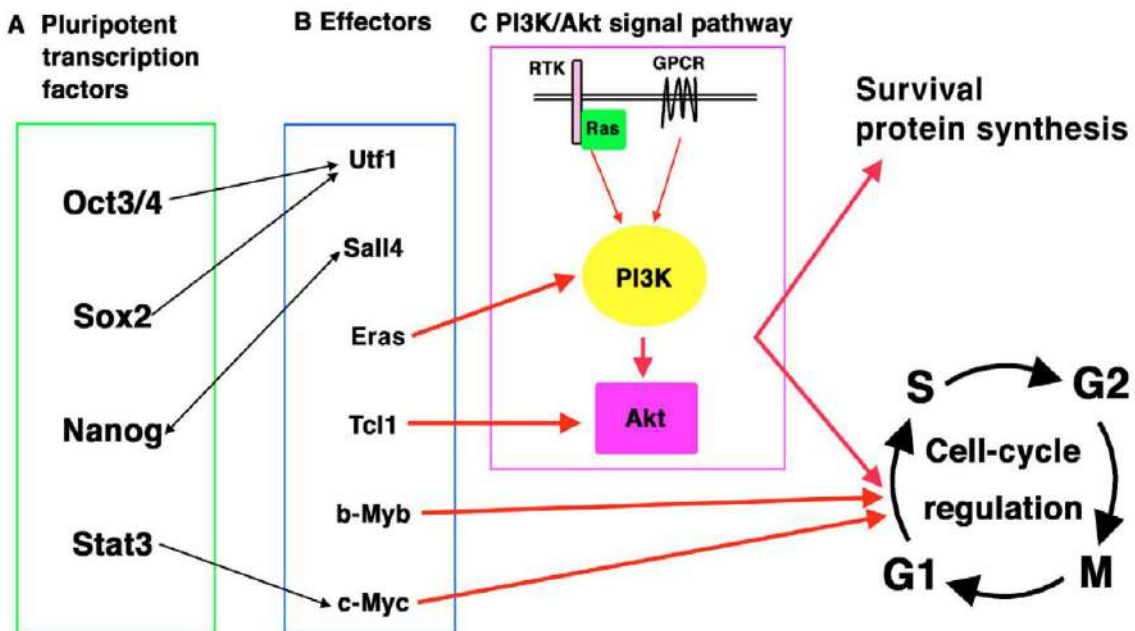
**Gambar 6.** Jalur *signaling* ekstrinsik yang memperkuat dan mengantagonis *naive pluripotency*. Berbagai kaskade *signaling* berpengaruh terhadap *self-renewal*. Tanda panah menunjukkan aktivasi, sedangkan bar menunjukkan inhibisi atau blok terhadap aktivitas target. Garis tebal menunjukkan target downstream dan garis-terputus-putus adalah efek tidak langsung. Sesuai jarum jam : BMP4 terdapat dalam serum dan berfungsi via SMADs mengaktifasi gen Id. *LIF signaling* berpengaruh terhadap banyak jalur tetapi terutama bekerja pada fosforilasi dimediasi JAK pada STAT3, yang mengaktifasi Ecfp211 dan Klf4. *Signaling* WNT kanonikal memblokir aktivasi GSK3 menyebabkan stabilisasi  $\beta$ -catenin, yang sebaliknya menghilangkan represi gen pluripotensi yang dimediasi TCF3, termasuk Esrrb. CHIRON mirip dengan *signaling* WNT dengan menghambat GSK3. *Signaling* FGF mengaktifasi jalur MAPK menyebabkan fosforilasi MEK, yang sebaliknya mengadakan fosforilasi dan mengaktifasi ERK. ERK yang aktif meningkatkan transisi menjadi keadaan “primed”, yang dihambat oleh inhibitor MEK yaitu PD03.

Dikutip dari Hackett JA, Surani, M.A. *Regulatory principles of pluripotency: from the ground state up*. *Cell Stem Cell* 2014;15: 416-430.



**Gambar 7.** Diferensiasi ES cell mencit. (A) ES cell mencit berdiferensiasi menjadi 3 tipe sel –endoderm primitif, trophoectoderm (TE) dan ektoderm primitif –menyerupai potensi diferensiasi pada stem cell pluripoten pada embrio preimplantasi. (B-E) Berbagai kondisi kultur dapat menginduksi ES cell berdiferensiasi menjadi turunan tertentu. (B) tanpa Lif dan adanya kelebihan Oct 3/4, ES cell berdiferensiasi menjadi *primitive endoderm-like cell*, sedangkan (C) tanpa Nanog dan adanya Gata6, akan berdiferensiasi menjadi *parietal endoderm-like cell*. (D,E) Dengan mengeluarkan Oct 3/4 dari dan menambah Cdx2 ke dalam kultur ES cell menginduksi diferensiasi TE-like. MEFc, mouse embryonic fibroblast conditioned medium.

Dikutip dari Niwa, H. *How is pluripotency determined and maintained?* Development 2007; 134, 635-646



**Gambar 8.** Regulasi ES cell pada mencit. Faktor transkripsi pluripoten mengaktivasi ekspresi efektor tertentu (B) yang meningkatkan proliferasi ES cell. Diantaranya, Eras dan Tcl1 merangsang jalur *signaling* fosfoinositol 3-kinase (PI3K)/Akt untuk meningkatkan siklus sel, sedangkan b-Myb dan c-Myc mengaktivasi progresivitas siklus sel secara langsung. Bagaimana Utf1 dan Sall4 mempengaruhi proliferasi EC sel tidak diketahui.

Dikutip dari Niwa, H. *How is pluripotency determined and maintained?* Development 2007; 134, 635-646.

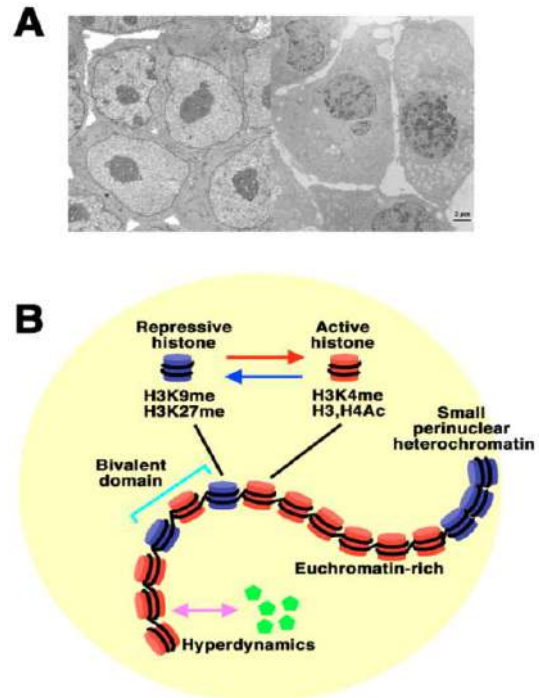
## EMBRYONIC STEM CELL SELF-RENEWAL MELALUI PROLIFERASI

Dengan kondisi kultur optimal, ES cell dapat mengadakan pembelahan simetris setiap 12 jam dengan Lif. Selama *self-renewal*, sebagian besar ES cell berada dalam fase S dari siklus sel, dengan sedikit dalam fase G1.<sup>43</sup> Penemuan akhir-akhir ini mendapatkan bahwa jalur fosfoinositol-3-kinase (PI3K)/Akt *signaling* memegang peranan penting dalam meningkatkan proliferasi, survival dan/atau diferensiasi ES cell mencit (Gambar 8).<sup>17</sup> Delesi Pten, yang menyandi regulator negatif PI3K pada ES cell mencit dilaporkan meningkatkan viabilitas, proliferasi ES cell,<sup>44</sup> dan aktivasi Akt cukup mempertahankan *self-renewal* ES cell tanpa Lif.<sup>45</sup>

Dua modulator jalur PI3K)/Akt yang secara spesifik diekspresikan pada ES cell, Eras dan Tc11 (Gambar 8).<sup>17, 46</sup> Eras menyandi molekul kecil GTPase dari famili Ras yang mengaktivasi PI3K untuk merangsang proliferasi ES cell dan tumorigenitas setelah transplantasi ektopik secara *in vivo*.<sup>47</sup> Produk gen Tc11 meningkatkan aktivasi Akt dengan membentuk kompleks heterodimerik dengan Akt.<sup>48</sup> *Knockdown* Tc11 pada ES cell dapat mengganggu *self-renewal* dengan menginduksi diferensiasi dan/atau represi proliferasi.<sup>49,50</sup> Namun, mekanisme molekuler secara langsung mengekspresikan Eras dan Tc11 pada ES cell belum diketahui.<sup>17</sup>

## MEKANISME EPIGENETIK TERHADAP EMBRYONIC STEM SELF-RENEWAL

Protein grup Polycomb (PcG) berfungsi terutama untuk menstabilkan struktur kromatin represif. Polycom-repressive complex 2 (PRC2) terdiri dari Exh2, Eed dan Suz12 di dalam ES cell, berfungsi sebagai histone methyltransferase pada lysine 27 (K27) dari histone H3, sehingga menghasilkan trimetilasi (H3K27me3), suatu *methylation mark* yang berhubungan dengan gen transkripsi inaktif.<sup>51</sup> Secara umum, distribusi *chromatin mark* represif bersifat *mutually exclusive* dengan H3K4me3, yang berhubungan dengan regio aktif.<sup>52,53</sup> Berstein et al., melaporkan bahwa pada ES cell mencit terdapat *histone mark* yang mempunyai lokasi sama pada tempat khusus dikenal sebagai “bivalent domain.” Domain ini tersusun atas elemen kromatin pendek ditandai oleh H3K4me3, yang berhubungan dengan gen yang diekspresikan pada tingkat rendah (Gambar 9B).<sup>17, 54</sup>



**Gambar 9.** Karakteristik epigenom pluripoten. (A) Nuklei *undifferentiated* (kiri) dan *differentiated* (kanan) dari ES cell. Nukleus mengecil dan area distribusi dengan densitas elektron, terutama heterokromatin, berubah secara dramatis ketika ES cell diinduksi terdiferensiasi menjadi endoderm primitif oleh ekspresi ektopik Gata6 (hasil mikroskop elektron). (B) Gambaran epigenetik sel nukleus pluripoten. Volume nukleus membesar pada sel berdiferensiasi sebagai akibat dari relaksasi struktur kromatin. Terdapat regio kecil heterokromatin tetapi kebanyakan adalah eukromatin, sehingga *histone mark* berhubungand dengan aktivitas transkripsi. Hiperdinamik protein kromatin (hijau) berkontribusi terhadap pemeliharaan eukromatin. *Bivalent domain* juga merupakan gambaran pluripoten epigenom, dengan *histone mark* (misalnya H3K4me) diapit oleh histone mark represif (H3K9me).

*Dikutip dari Niwa, H. How is pluripotency determined and maintained? Development 2007; 134, 635-646.*

Separuh dari *bivalent domain* berisikan tempat target yang umum dari Oct3/4, Sox2, dan Nanog, yang dianalisis dengan CHIP-on-CHIP.<sup>29</sup> Jadi, domain ini menunjukkan gen struktur kromatin dalam kondisi siap untuk berdiferensiasi.<sup>55</sup> Lee et al., melakukan analisis pemeriksaan CHIP-on-CHIP untuk Suz12, Eed dan H3K27me saling tumpang tindih dan mendapatkan H3K27me3 *mark* berada pada regio dengan gen *silent*, termasuk Gata4 dan Cdx2 pada ES cell. Sebanyak 1800 gen yang dideteksi sebagai target Suz12 termasuk target represif oleh Oct3/4, Sox2 dan Nanog.<sup>29</sup> Boyer et al. juga mengidentifikasi 512 target gene PRC2 dan PRC1

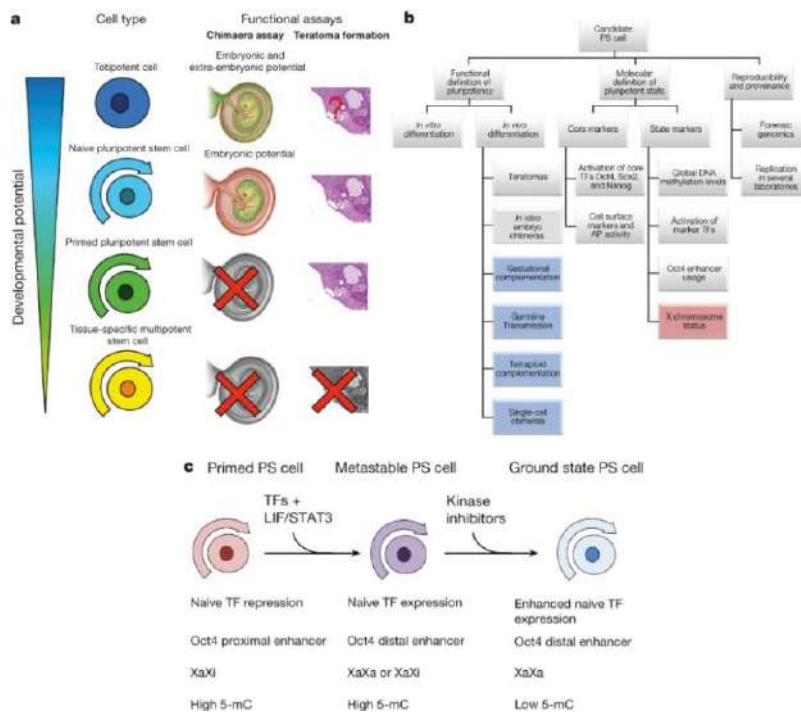
dengan analisis CHIP-on-CHIP dan menemukan bahwa terdapat H3K27 me3 *mark* yang bersifat represif. Penemuan ini menunjukkan bahwa jalur perkembangan represif pada ES cell oleh proses epigenetik diperlukan untuk mempertahankan pluripotensi, tetapi perlu dilakukan studi lanjut.<sup>17</sup>

Eksresi sejumlah gen pada kondisi pluripotensi ES cell adalah sebagai akibat proses genetik dan epigenetik. Pada proses epigenetik, epigenom pluripoten mempertahankan struktur kromatin terbuka, sehingga memungkinkan regulasi genetik dengan cepat (Gambar 9B).<sup>17,54</sup> Banyaknya *chromatin marks* aktif seperti H3K4me3 dan H4c pada ES cell menunjukkan kesesuaian terhadap kondisi ini.<sup>57,58</sup> Kromatin hiperdinamik yang diamati pada ES cell mencit selama *self-renewal* adalah sebagai akibat pertukaran histone H1 dan HP1 $\alpha$ ,<sup>59</sup> sehingga berkontribusi terhadap struktur kromatin terbuka. Hal ini dibuktikan adanya perbedaan distribusi dan frekuensi densitas elektron

tinggi sebagai heterokromatin<sup>60</sup> antara ES dan parietal endoderm cell (Gambar 9B).<sup>17, 54</sup>

**SELF-RENEWAL PADA EMBRYONIC STEM CELL MANUSIA**

Potensi stem cell dibedakan berdasarkan potensi perkembangan atas *embryonic stem cell* dan stem pada jaringan postnatal (Gambar 10).<sup>61</sup> Stem cell pluripoten memiliki sifat berbeda mulai dari embrio preimplantasi dikenal sebagai *embryonic stem cell*, sedangkan yang dihasilkan setelah perkembangan embrio sebagai tahapan *embryonic epiblast*, dikenal sebagai *epiblast stem cell*.<sup>6,63</sup> Kebutuhan kultur ekspresi gen dan gambaran epigenetik membedakan perkembangan pluripotensi di dalam embrio. Istilah *naive* dan *primed* menggambarkan epiblast tahap dini dan lanjut dan merupakan derivat masing-masing dari *embryonic stem cell* dan EpiSC.<sup>64</sup>



**Gambar 10.** Potensi stem cell. a. Dua *assay* utama menilai potensi stem cell pluripoten adalah kimera blastocyst dan pembentukan teratoma. Penilaian *assay* menentukan klasifikasi potensi perkembangan atas totipoten, *naive pluripotent*, *primed pluripotent*, dan multipoten. Totipoten adalah kapasitas **perkembangan** dalam pembentukan suatu organisme, termasuk jaringan ekstraembrio. *Naive pluripotent* mampu membentuk teratoma dan kimera setelah diberikan pada embrio preimplantasi, sedangkan *primed pluripotent* membentuk **teratoma** tanpa membentuk kimera setelah diberikan pada embrio pre implantasi, Stem cell multipoten membentuk tipe sel yang berhubungan dengan asal jaringan, tetapi tidak membentuk **teratoma** atau kimera. *Epiblast* SC menunjukan pluripoten jika diberikan pada embrio postimplantasi. b. Pengujian untuk menilai fungsi dan keadaan sel pluripoten. Penilaian ‘fungsi’ dengan mengukur kapasitas *self-renewal* dan potensi perkembangan dan melakukan validasi “kondisi” pluripotensi dengan mengukur kadar marker faktor transkripsi inti OCT4, SOX2 dan NANOG dan karakteristik marker seperti faktor **transkripsi** dan metilasi DNA. *Dikutip dari: De Los Angeles A, Ferrari F, Xi R, Fujiwara Y, Benvenisty N, Deng H, Hochedlinger K, Jaenisch R, Lee S, Leitch HG, M. Lensch MW, Lujan E, Pei D, Rossant J, Wernig M, Park PJ, Q. Daley GQ. Hallmarks of pluripotency. Nature 2015; 525: 469-478.*



Stem cell pluripoten ditandai oleh mekanisme molekuler yang mempertahankan *self-renewal* dan menekan diferensiasi sekaligus mempertahankan gen kunci diferensiasi dalam keadaan *quiescent* namun "poised" atau siap untuk mengalami potensi perkembangan.<sup>61</sup> Faktor transkripsi yang terlibat dalam bentuk kombinasi yang mengatur pluripotensi : OCT4 (juga dikenal sebagai POU5F1, SOX2 dan NANOG, secara kolektif dikenal sebagai OSN. OCT4 dan NANOG adalah faktor transkripsi inti berdasarkan pola ekspresi khusus di dalam stem cell pluripoten dan embrio dini. dan identifikasi yang berperan penting dalam pluripotensi pada mencit dan manusia.<sup>65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75</sup> Fungsi OCT4 adalah heterodimer dengan SOX2, menempatkan SOX2 di antara regulator inti.<sup>76</sup> Ekspresi ektopik OCT4 dan SOX2 dalam menghasilkan *induced pluripotent stem* (iPS) cell pada mencit and manusia mengkonfirmasi pluripotensi.<sup>65</sup> Meskipun NANOG tidak diperlukan untuk mempertahankan stem cell pluripoten mencit,<sup>73</sup> dan ekspresi rendah atau tidak ada pada *epiblast stem cell* (EpiSC), NANOG menstabilkan stem cell pluripoten, dan diperlukan untuk perkembangan ICM secara *in vivo*,<sup>74</sup> dan diekspresikan pada tempat yang sama dengan OCT4 dan SOX2.<sup>61</sup>

### SIRKIT REGULASI FAKTOR TRANSKRIPSI PADA EMBRYONIC STEM CELL SELF-RENEWAL MANUSIA

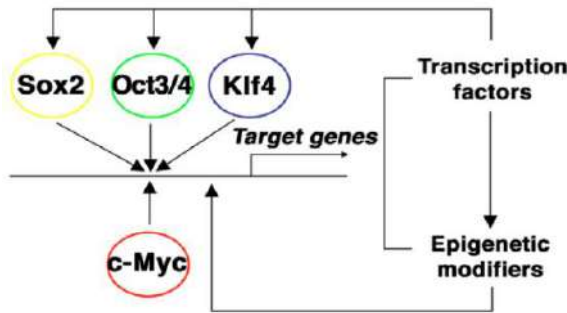
Model awal sirkit regulasi transkripsi dibuat berdasarkan identifikasi gen target dari OCT4, SOX2, dan NANOG yang menyandi faktor transkripsi dan regulator kromatin. Regulator *downstream* pada manusia dan mencit berdasarkan studi ekspresi dan literatur dapat dilihat pada Gambar 11.<sup>61</sup> Model ini meliputi subset gen target yang aktif dan represif berdasarkan karakteristik dari 353 gen. Target aktif meliputi komponen yang menyandi gen dari remodeling kromatin dan kompleks yang memodifikasi histon (misalnya, SMARCD1, MYSTT3 dan SET) yang berperan pada regulasi transkripsi dan faktor transkripsi yang menyandi gen (misalnya, REST, SKIL, HESX1 dan STAT3), yang menyandi gen khusus. REST banyak didapati pada ES cell dan berfungsi menekan gen spesifik neuron.<sup>77</sup> NANOG berfungsi melalui jalur TGF- $\beta$  pada ES cells.<sup>78</sup> OCT4, SOX2, dan NANOG menempati tempat yang sama dengan STA3, suatu regulasi kunci *self-renewal* pada ES cell mencit,<sup>77</sup> menunjukkan bahwa STAT3 berperan penting pada ES cell manusia.

## INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL

### PLURIPOTENSI SECARA *IN VIVO*

Pluripotensi *in vivo* selama perkembangan, baik melalui mekanisme genetik dan epigenetik terlibat dalam kondisi pluripotensi pada ICM melalui *reprogramming* nuklei pada telur yang dibuahi.<sup>17</sup> Aktivitas *reprogramming* terjadi pada sitoplasma telur yang dibuahi, seperti lahirnya embrio yang diklon dari *somatic cell nuclear transfer*.<sup>79,80</sup> Namun, masih belum jelas mekanisme yang berkontribusi terhadap aktivitas epigenetik, juga faktor transkripsi yang ditranslasikan di dalam telur yang dibuahi. Takahashi dan Yamanaka<sup>65</sup> melaporkan bahwa pemberian transgen yang menyandi faktor transkripsi Oct3/4, Sox2, c-Myc dan Klf 4 ke dalam sel somatik, seperti fibroblast embrio dan dewasa pada mencit dan manusia, menghasilkan *induced pluripotent stem cell (iPS) cells*, yang memberikan embrio kimerik setelah disuntikan ke dalam blastocyst mencit. Fungsi Oct3/4, Sox2, dan c-Myc telah disebutkan sebelumnya, Klf4 dikenal sebagai onkogen,<sup>81</sup> tetapi overekspresi Klf4 pada sel embrio mencit dapat mengurangi kemampuan diferensiasi *embryonic bodies* (EB).<sup>82</sup> Klf4 dapat berikatan dengan promoter proksimal gen target Oct3/4, seperti Leftyl, dan membantu mengaktifasi Oct3/4 an Sox2.<sup>83</sup> Keempat faktor dipikirkan sebagai pembentuk pluripotensi pada sel somatik dengan mekanisme seperti pada **Gambar 12**.<sup>86</sup> c-Myc meningkatkan replikasi DNA, dan merelaksasikan struktur kromatin, sehingga memungkinkan Oct3/4 masuk ke dalam gen target. Sox2 dan Klf4 juga bekerja sama dengan Oct3/4 mengaktifasi gen target yang menyandi faktor transkripsi yang meningkatkan anyaman faktor transkripsi pluripoten dan bersama dengan Oct3/4, Sox2, dan Klf4, menghasilkan aktivasi proses epigenetik pada epigenom pluripoten.<sup>17</sup> iPS cell mempunyai profil ekspresi gen yang sama dengan ES cell mencit. Yang menarik adalah bahwa Nanog tidak diperlukan sebagai faktor transkripsi eksogen dalam membentuk iPS cell dan ekspresi endogen tidak selalu diaktivasi untuk membentuk stem cell pluripotensi oleh keempat faktor. Hal ini mendukung hipotesis bahwa Nanog berfungsi untuk mempertahankan pluripotensi dan bergantung pada kondisi.





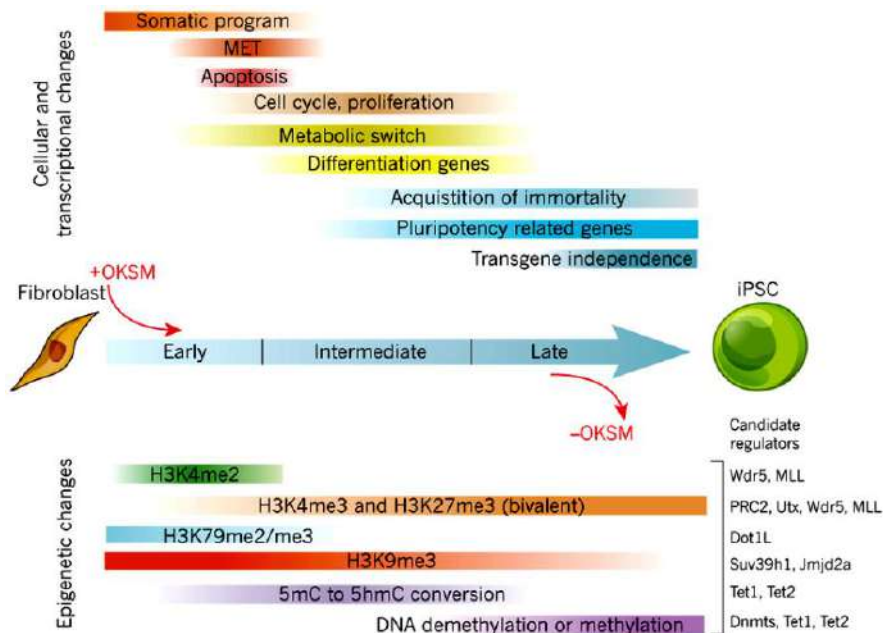
**Gambar 11.** Pembentukan nuklei sel somatik **pluripotensi**. Studi Takahashi dan Yamanaka menggunakan empat faktor Oct3/4, Sox2, Klf 4 dan c-Myc cukup membentuk pluripoten nuklei fibroblast. Oct3/4, Sox2 dan Klf4 mungkin berfungsi bersama untuk mengaktifasi gen target dalam pembentukan anyaman yang stabil dalam faktor transkripsi pluripotensi, juga epigenom pluripoten, sedangkan c-Myc meningkatkan masuknya gen target dengan merangsang replikasi DNA.  
 Dikutip dari Niwa, H. *How is pluripotency determined and maintained?* *Development* 2007; 134, 635-646.

**MEKANISME INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS PADA TINGKAT EPIGENETIK**

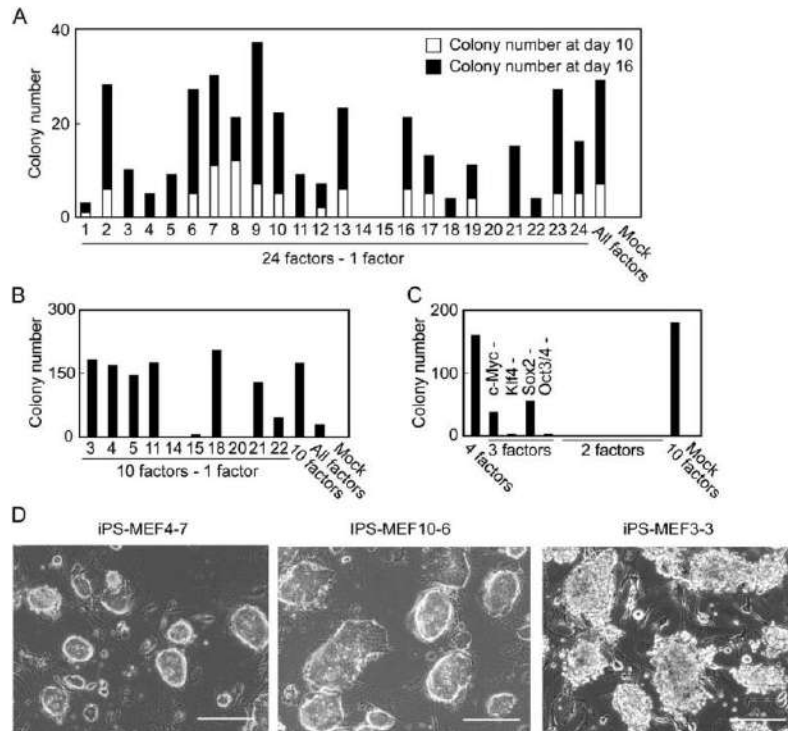
Untuk mendapatkan *induced pluripotency* dari satu sel yang telah terdiferensiasi seperti sel

fibroblast mencit atau manusia, selain proses yang memerlukan waktu sekitar 2 minggu dan tidak efisien (0.1-3%)<sup>65,84</sup> faktor transkripsi yang digunakan harus mengatasi sejumlah rintangan epigenetik terhadap genom selama proses diferensiasi untuk menstabilkan identitas sel dan mencegah perubahan nasib sel.<sup>85</sup> Studi terdahulu menunjukkan bahwa populasi sel yang mengekspresikan OKSM (Oct4, Klf4, Sox2 dan c-Myc) melewati sejumlah kejadian pada tingkat molekuler dan seluler (Gambar 12).<sup>86</sup>

Pada awalnya fibroblast mengurangi marker yang berhubungan dengan keadaan somatik dan selanjutnya mengaktifasi gen yang berhubungan dengan pluripotensi, yang berarti adanya suatu proses yang teratur.<sup>87,88</sup> Ketika iPSC yang baru mengaktifasi gen inti pluripotensi termasuk Oct4, Sox2, dan Nanog, maka sel yang terbentuk telah mendapat keadaan pluripoten dan tidak diperlukan faktor ekspresi dari luar (Gambar 13).<sup>65</sup> Kejadian berikutnya bertepatan dengan aktivasi *silenced X chromosome* pada sel somatik betina, upregulasi telomerase dan pembentukan *immortality* yang merupakan tanda sel pluripoten.<sup>86,87</sup>



**Gambar 12.** Dinamika kejadian molekuler selama proses *reprogramming* seluler. Perubahan pada tingkat sel, transkripsi dan epigenetik (bar berwarna) yang terjadi selama pembentukan *induced pluripotent stem cell (iPSC)* dari fibroblast dan contoh regulator yang berhubungan dengan *chromatin marks* pada *reprogramming* langsung (kanan). Tanda panah merah menunjukkan perjalanan waktu induksi faktor eksogen (+OKSM) dan penarikan (-OKSM). 5hmC, 5-hydroxymethylcytosine; 5mC, 5-methylcytosine; MET, mesenchymal-to-epithelial-transition; OKSM, Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc.  
 Dikutip dari Apostolou E, Hochedlinger K. *Chromatin dynamics during cellular reprogramming.* *Nature* 2013; 502; 462-471.



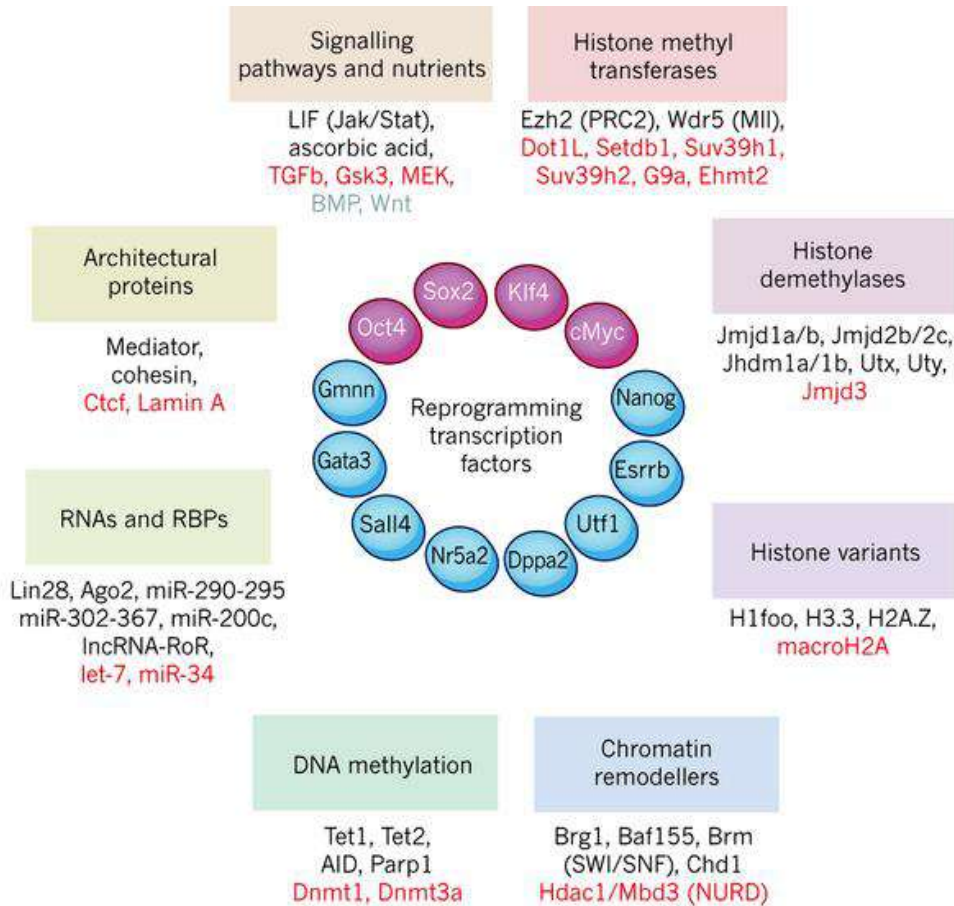
**Gambar 13.** (A) Efek pengeluaran faktor individu dari 24 faktor transkripsi pada pembentukan koloni yang resisten G418. Fbx15<sup>geo</sup>/bgeo MEFs ditransduksi dengan faktor yang dipilih dengan G418 selama 10 hari (kolom putih) atau 16 hari (kolom hitam). (B) Efek pengeluaran faktor individu dari 10 faktor yang dipilih dalam pembentukan koloni yang resisten terhadap G418 setelah transduksi. (C) Efek transduksi pool dari empat, tiga, dan dua faktor terhadap pembentukan koloni resisten terhadap G418 pada 16 hari setelah transduksi. (D) Morfologi iPS-MEF4 (klon 7), iPS MEF 10 (klon 6) dan iPS-MEF 3 (klon 3). Skar bar = 200 mm. MEF : murine embryonic fibroblast.

Dikutip dari Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126, 663-676.

### Faktor Transkripsi Penentu Nasib Sel Pluripotensi

Oct4, Klf4, Sox2 (OKS) adalah satu kombinasi faktor minimal yang dibutuhkan untuk menghasilkan iPSC di bawah kondisi *reprogramming* (dengan adanya serum dan sitokin *leukemic inhibitory factor*, LIF). OKS bekerja menekan *lineage-specific genes* dan mengaktifasi gen yang berhubungan dengan embryonic stem (ES) cell, sehingga membentuk sel yang mempertahankan pluripotensi.<sup>89</sup> Sedangkan ekspresi c-Myc secara signifikan meningkatkan dan mempercepat *reprogramming* tetapi tidak dibutuhkan dalam pembentukan iPSC.<sup>90,91</sup> Ekspresi c-Myc berfungsi pada awal *reprogramming*, dengan merangsang proliferasi dan menginduksi pergeseran metabolik dari keadaan oksidatif menjadi glikolitik yang merupakan ciri sel pluripotensi.<sup>92,93</sup> c-Myc juga berperan dalam *reprogramming* dengan menginduksi promoter RNA polymerase, sehingga meningkatkan gen target.<sup>94,95</sup>

Keempat faktor transkripsi yang dikemukakan Takahashi dan Yamanaka secara fungsional dapat digantikan oleh faktor transkripsi lain, *upstream epigenetic modifier*, microRNA (miRNA) atau molekul kecil untuk mendapatkan iPSC.<sup>84</sup> Penelitian selanjutnya juga mendapatkan bahwa iPSC juga diperoleh dari molekul yang sama sekali tidak mengandung faktor transkripsi,<sup>96,97</sup> menunjukkan bahwa terdapat fleksibilitas di antara faktor *reprogramming* (Gambar 14).<sup>86</sup> Misalnya, studi akhir-akhir ini melaporkan bahwa Oct4 dan Sox2 dapat digantikan oleh *lineage specifier* dini seperti Gata3 dan Geminin.<sup>98</sup> Molekul ini masing-masing berhubungan dengan diferensiasi mesoderm dan ectoderm. Juga menekan program *lineage* lain, sehingga hal ini menunjukkan bahwa jalur diferensiasi dapat memicu induksi iPSC.<sup>86</sup> Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa faktor transkripsi *reprogramming* harus mencapai dua tugas utama, yaitu menghilangkan program somatik dan menginduksi keadaan pluripotensi stabil yang khas untuk ES cells.<sup>86</sup>



**Gambar 14.** Hubungan antara faktor *reprogramming* dengan molekul yang mempengaruhi keadaan kromatin. Faktor transkripsi yang ditunjukkan dapat memicu *induced pluripotency* dengan kombinasi yang lazim digunakan (Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc). Beberapa jenis molekul dapat memfasilitasi (hitam) atau menghambat (merah) *reprogramming*. Bone morphogenic protein (BMP) dan Wnt masing-masing dapat meningkatkan atau menekan pembentukan iPSC bergantung pada tahap pembentukan.

RBPs, RNA binding proteins.

Dikutip dari Apostolou E, Hochdinger K. *Chromatin dynamics during cellular reprogramming*. Nature 2013; 502; 462-471.

**PERUBAHAN TARGET KROMATIN SELAMA PROSES PEMBENTUKAN INDUCED PLURIPOTEN STEM CELL**

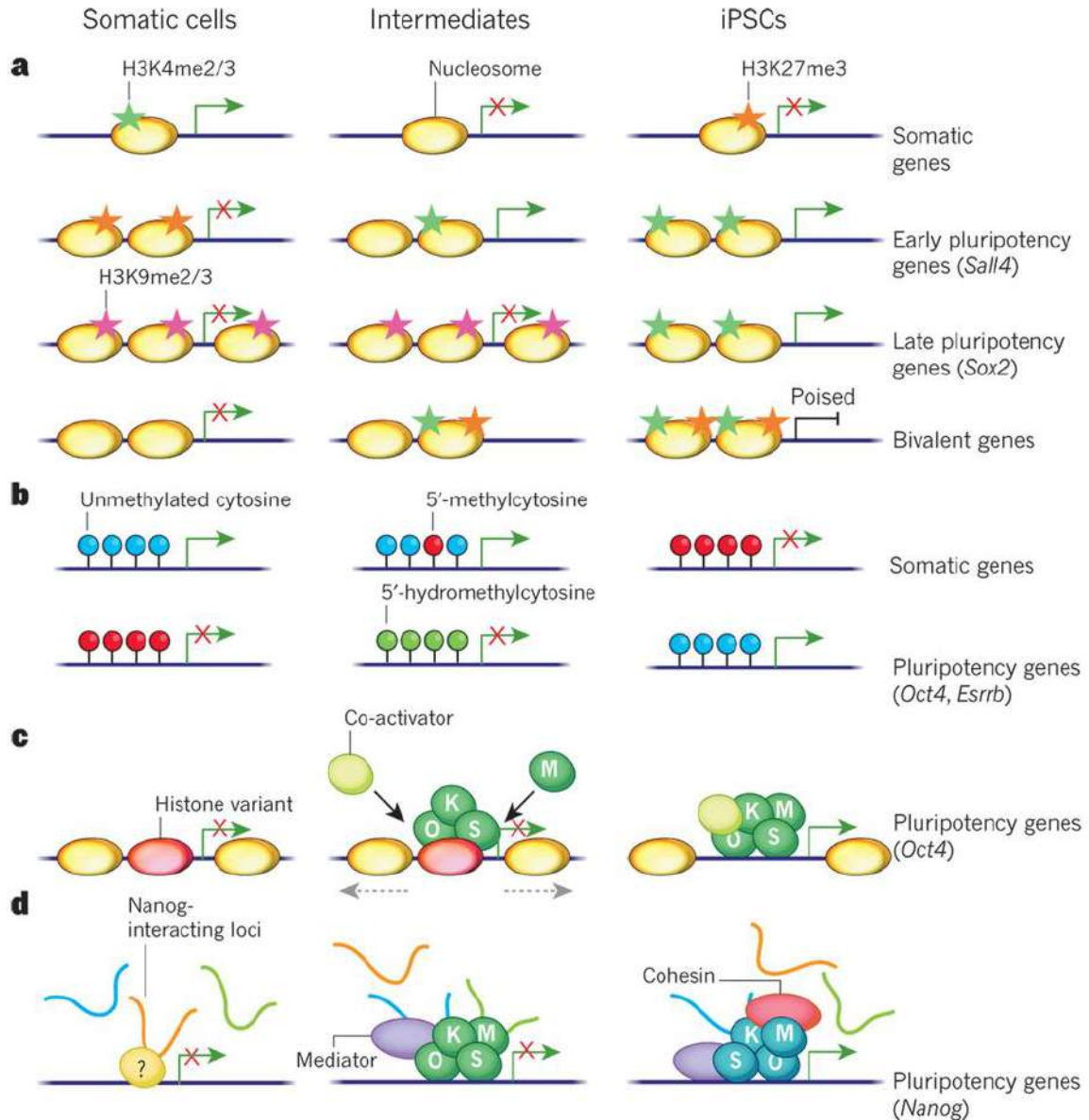
Studi akhir-akhir berhasil mengemukakan proses penempatan OKSM dan *histone marks* pada awal *reprogramming* pada fibroblast mencit dan manusia yang menghasilkan iPSC.<sup>99,100</sup> Terdapat 3 tahapan target OKSM terhadap lokus berdasarkan aksesibilitas kromatin, penambahan remodeling dan kinetik aktivasi transkripsi (Gambar 15 a).<sup>86</sup> Gen dengan keadaan kromatin “terbuka” pada sel somatik terdiri dari kelompok pertama sebagai target, ditandai dengan peningkatan hipersensitivitas DNA ase, histon H3 lysine di dan trimetilasi (H3K4 me2 dan H3K4me3) dan kemampuan berikatan dengan OKSM.

Target OKSM dini yang kedua meliputi *distal regulatory elements*, memerlukan penambahan remodeling kromatin untuk aktivasi transkripsi.<sup>100</sup> *Distal regulatory element* terdiri dari loki yang resisten terhadap DNase-I yang tidak dapat berikatan dengan c-Myc saja.<sup>100</sup> Gen pluripoten dini seperti Sall4 termasuk kelompok ini. Penempatan target ini oleh OKS memfasilitasi ikatan dengan c-Myc. Hal ini mengidentifikasi bahwa OKS adalah “pioneer factors” yang mampu berikatan dengan kromatin somatik tertutup dan memungkinkan remodeling kromatin juga rekrutmen faktor transkripsi dan kofaktor.

Gen bivalen terdiri dari sekelompok target kromatin yang ditandai oleh metilasi H3K4 aktif dan metilasi H3K27 represif pada iPSC dan ES cell.<sup>54</sup> Gen di

dalam kategori ini ditranskripsikan menjadi *silent* pada ES cell dan iPS dan dalam keadaan siap (poised) mengalami aktivasi cepat terhadap komitmen *lineage* (Gambar 15 a).<sup>86</sup> Faktor transkripsi Utf1 terlibat dalam regulasi bivalensi

melalui deposisi H2K27 mark represif dan degradasi transkrip residual.<sup>101</sup> Ekspresi Utf1 dapat menggantikan beberapa faktor *reprogramming* awal, hal ini menunjukkan bahwa pembentukan promoter bivalen penting untuk mendapatkan pluripotensi.<sup>102</sup>



**Gambar 15.** Tingkat regulasi epigenetik selama proses *induced pluripotency*. a, ada 4 kategori gen yang berhubungan dengan modifikasi histon dan respon transkripsi selama *reprogramming*. Misalnya, gen yang ditunjukkan dalam tanda kurung. B, Gain dan loss metilasi DNA terjadi pada akhir *reprogramming*, sedangkan hidroksimetilasi pada gen pluripotensi terjadi pada tahap awal-pertengahan pembentukan iPSC. c, Fungsi Oct (O), Klf4 (K) dan Sox2 (S) sebagai “pioneer factors” yang berikatan dengan regio nukleosom dengan kepadatan tinggi, memungkinkan remodeling kromatin (tanda panah bertitik) dan rekrutmen faktor lain termasuk c-Myc (M). d, Perubahan pada interaksi *long-range chromatin* di sekitar lokus Nanog (somatic-specific, loop berwarna oranye; intermediate-specific, hijau dan pluripotent specific biru) selama pembentukan iPSC. Pembentukan iPSC membentuk kembali hubungan kromatin 3-D, tanda khas ES cell, dan proses ini bergantung pada mediator dan kohesi.

Dikutip dari Apostolou E, Hochedlinger K. *Chromatin dynamics during cellular reprogramming*. *Nature* 2013; 502: 462-471.



Metilasi DNA dianggap sebagai modifikasi epigenetik yang paling stabil, membawa *gene silencing* selama perkembangan dan pada dewasa.<sup>86</sup> Perubahan pada modifikasi kromatin mendahului deposisi metilasi DNA *marks* selama proses diferensiasi.<sup>92</sup> Demikian juga perubahan metilasi DNA hampir selalu terjadi pada akhir proses *reprogramming* dan setelah perubahan kromatin terjadi, menunjukkan bahwa urutan kejadian dalam proses perkembangan normal (Gambar 12).<sup>86</sup> Metilasi DNA terbentuk melalui enzim Dnmt2a dan Dnmt3b methyltransferase *de novo* dan dipertahankan oleh Dnmt1 methyltransferase.<sup>103</sup> Meskipun Dnmt3 *knockdown* meningkatkan pembentukan iPSC pada sel manusia,<sup>104</sup> delesi enzim Dnmt3 dan Dnmt3b tidak memberikan konsekuensi terhadap *reprogramming* sel.<sup>105</sup> Hal ini menunjukkan bahwa *lineage-specific genes* terutama terjadi melalui mekanisme alternatif yaitu deposisi metilasi H3K27 represif, yang konsisten dengan peran penting PRC2 dalam pembentukan iPSC.<sup>106</sup>

Enzim yang berhubungan dengan metilasi DNA mempunyai hubungan langsung dengan pembentukan iPSC (Gambar 12).<sup>86</sup> Protein TET mengkatalisis hidroksilasi 5-methylcytosine (5mc) menjadi 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), yang merupakan substrat untuk *excision repair* dari *unmodified cytosine*.<sup>103</sup> Sesaat setelah overekspresi OKSM, Tet2 menginduksi hidroksimetilasi dari gen kunci seperti Nanog and Esrrb, selanjutnya demetilasi dan aktivasi transkripsi (Gambar 12 dan 15b).<sup>86,107</sup> Analisis proteomik dan genomik menunjukkan bahwa Tet1 dan Tet2 secara langsung berinteraksi dengan Nanog dan menempati target yang sama di dalam ES cell, menunjukkan bahwa Nanog merupakan target Tets.<sup>108</sup> Tet 1 atau Tet2 bersama dengan Nanog secara signifikan meningkatkan pembentukan iPSC dan sebaliknya deplesi Nanog atau Tet2 menghilangkannya.<sup>21,107,108</sup>

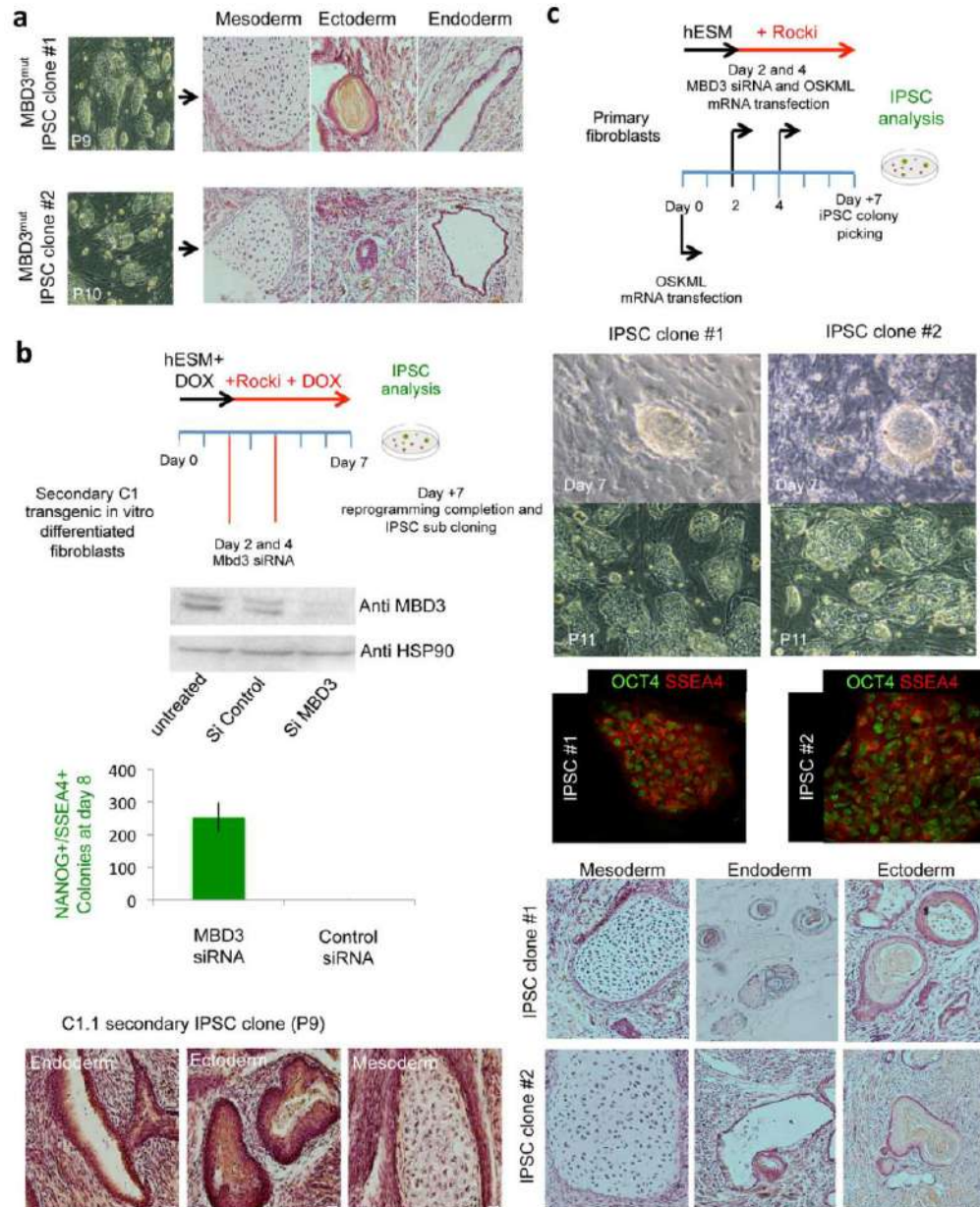
Struktur kromatin setempat dapat berpengaruh terhadap posisi dan densitas nukleosom juga histon varian (Gambar 14 dan 15c).<sup>86</sup> Histon varian biasanya memodifikasi kemampuan nukleosom mengalami remodeling dan mengakomodasi modifikasi histon aktif dan represif. Histon varian macroH2A berhubungan dengan resistensi remodeling kromatin.<sup>109</sup> Struktur kromatin lokal diatur oleh sejumlah kompleks remodeling yang berpengaruh terhadap pembentukan iPSC (Gambar 14).<sup>86</sup> Misalnya, kompleks SWI-SNF, seperti Brg1, Baf155 dan Brm secara langsung merekrut Oct4 untuk merelaksasikan struktur kromatin dan

memfasilitasi ikatan dengan faktor transkripsi lain.<sup>110</sup> Penemuan ini menunjukkan bahwa Oct4 adalah *pioneer factor* yang berpengaruh terhadap perubahan struktur kromatin setempat yang bersifat *silenced target*.<sup>111</sup> Hal yang sama terjadi pada faktor remodeling CHD misalnya Chd1 yang membuka kromatin selama *reprogramming* yang diinduksi faktor transkripsi.<sup>111</sup>

Sebaliknya, kompleks NURD sebagai represif termasuk Hdc1 dan Mbd3, yang penting sebagai heterokromatin, menghambat *reprogramming*. Jika gennya dilakukan *knockdown*, akan meningkatkan efisiensi pembentukan iPSC (Gambar 16).<sup>112,113</sup> Studi Rais et al., mendapatkan bahwa deplesi Mbd3 pada sel somatik memfasilitasi konversi ke pluripotensi dengan efisiensi mendekati 100%,<sup>113</sup> Hal ini membuktikan bahwa Mbd3 adalah faktor yang menentukan *naïve* atau *ground state pluripotency* pada ES cell dan sel somatik mencit dan manusia (Gambar 16).<sup>113</sup> Jadi, Mbd3 dapat menghambat *reprogramming* ketika diberikan sebelum tahap akhir *reprogramming*. Namun sekali pluripotensi terbentuk, Mbd3 tidak mengganggu pemeliharaan pluripotensi.<sup>113</sup> Sebagaimana disampaikan peneliti, bahwa modifikasi pendekatan *reprogramming* ini dapat membentuk pluripotensi dengan fleksibilitas dan resolusi yang menentukan dan sinkron, yang sebelumnya bersifat asinkron dan *stochastic*, karena efisiensi mendapat sel induced stem cell pluripoten hanya berkisar (0.1-3%).<sup>113</sup>

Di samping struktur kromatin setempat, susunan kromatin 3D telah diimplikasikan dalam proses pluripotensi, diferensiasi dan *reprogramming* (Gambar 15 c).<sup>86,114</sup> Diferensiasi ES cells diikuti dengan reposisi gen pluripotensi dari nukleus di tengah ke nukleus di perifer dan disrupsi promoter-enhancer *looping* pada lokus pluripotensi seperti Oct 4<sup>115,116</sup> dan Nanog.<sup>111,112</sup> Studi akhir-akhir ini mengidentifikasi interaksi kompleks *pluripotency specific long-range* pada lokus Nanog, yang disusun kembali selama diferensiasi dan *reprogramming*.<sup>116</sup> Pembentukan dan pemeliharaan *network* ini bergantung pada kompleks mediator dan kohesi (Gambar 15d).<sup>86</sup> Subunit dari kompleks ini secara langsung berinteraksi dengan faktor *reprogramming*,<sup>117,118</sup> dan dengan *knockdown* dapat menghambat pembentukan iPSC.<sup>117</sup> Hal ini menunjukkan bahwa faktor *reprogramming* tidak hanya mengaktivasi atau melakukan *silencing* terhadap gen tetapi juga berfungsi sebagai penyusun kromatin dengan mengatur kembali struktur kromatin dari keadaan somatik menjadi pluripoten.<sup>86</sup>





**Gambar 16.** Melakukan depresi ekspresi Mbd3 memfasilitasi pembentukan iPS manusia. 1. Secara *in vitro* fibroblast terdiferensiasi dari MBD3<sup>wt</sup> dan MBD3<sup>mut</sup> dari iPSC cell membawa transgen OKSM yang diinduksi doxycycline, direprogram. Pluripotensi secara random dari sel yang diklon dengan pembentukan teratoma. b, Fibroblast C1 manusia direprogram membawa transgen OKSM yang diinduksi doxycycline sesuai dengan protokol *reprogramming*. Knockdown Mbd3 pada hari ke 2 dan ke 4, tetapi tidak dengan scrambled control siRNA, meningkatkan efisiensi *reprogramming* secara nyata dievaluasi dengan pembentukan koloni NANOG/SSEA41 dan divalidasi secara *in vivo* dengan pembentukan teratoma. Western blot mengkonfirmasi penurunan ekspresi protein MBD3 setelah transfeksi dengan siRNA MBD3. Error bar menunjukkan s.d dari rata-rata (n 53). c, Perlakuan MBD3 siRNA pada fibroblast primer manusia memungkinkan pembentukan sel IPS cell hanya dengan dua ronde *reprogramming* dengan transfeksi mRNA dengan faktor OSKML dan LIN28 (OSKML). Representatif sel IPS cell manusia dengan waktu dan pasase berbeda (P, jumlah pasase). Pluripotensi dari klon yang diseleksi ditunjukkan dengan pewarnaan OCT4 dan SSEA4 marker pluripotency dan pembentukan teratoma. Hasil ini menunjukkan bahwa inhibisi ekspresi dan/atau fungsi MBD3 meningkatkan pembentukan iPSC cell dengan transien mRNA atau protokol transfeksi transien untuk *reprogramming* iPSC cell.

Dikutip dari Rais Y et al. Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. Nature 2013; 502: 65-70.

**DAFTAR PUSTAKA**

1. Cheng LC, Tavazoie M. Stem Cells: From epigenetics to microRNAs. *Neuron* 2005; 46: 363-367.
2. Till JE, McCulloch EA. 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* 1961; 14: 1419-1430.
3. Melton D. Stemness : Definition, criteria, and standards. In : Lanza R, Atala A. eds *Essentials of stem cell biology*. Elsevier Inc. 2014; p. 7-17.
4. Niwa H. Mechanisms of stem cell self renewal. In : Lanza R, Atala A. eds *Essentials of stem cell biology*. Elsevier Inc. 2014; p. 81-94.
5. Rando TA. Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature* 2006; 441: 1080-86.
6. Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 2006; 441: 1068-1074.
7. Kimble JE, White JG. On the control of germ cell development in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 1981; 81: 208-219.
8. Morrison SJ, Hemmati HD, Wandycz A M, Weissman I L. The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1995; 92:10302-10306.
9. Lechler T, Fuchs E. Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature* 2005; 437: 275-280.
10. Wright D E et al., Cyclophosphamide/granulocyte colony-stimulating factor causes selective mobilization of bone marrow hematopoietic stem cells into the blood after M phase of the cell cycle. *Blood* 2001;97: 2278-2285.
11. Morrison SJ, Wright D, Weissman I L. Cyclophosphamide/granulocyte colony stimulating factor induces hematopoietic stem cells to proliferate prior to mobilization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1997; 94: 1908-1913.
12. Bodine D, Seidel NE, Orlic D. Bone marrow collected 14 days after in viv administration of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor to mice has 10-fold more repopulating ability than untreated bone marrow. *Blood* 1996; 88: 89-97
13. Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 2002; 36: 1021-1034.
14. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. 2001; 414: 98-104.
15. Rossant J. Embryonic stem cell in perspective. In : Lanza R, Atala A. eds *Essentials of stem cell biology*. Elsevier Inc. 2014; p. 35-38.
16. Yu J, Thomson JA. Embryonic stem cell : derivation and properties. In : : Lanza R, Atala A. eds *Essentials of stem cell biology*. Elsevier Inc. 2014; p. 387-398.
17. Niwa, H. How is pluripotency determined and maintained? *Development* 2007; 134, 635-646.
18. Respuela P, Nikolic M, Tan M, Frommolt P, Zhao Y, Wysocka J, Rada-Iglesias A. Foxd3 promotes exit from naive pluripotency through enhancer decommissioning and inhibit germline specification. *Cell Stem Cell* 2016; 18: 118-133.
19. Hackett JA, Surani M.A. Regulatory principles of pluripotency: from the ground state up. *Cell Stem Cell* 2014;15: 416-430.
20. Leitch, H.G., and Smith, A.The mammalian germline as a pluripotency cycle. *Development* 2013; 140: 2495-2501.
21. Silva J, Nichols J, Theunissen TW, Guo G, van Oosten AL, Barrandon O, Wray J, Yamanaka S, Chambers I, Smith A. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell* 2009; 138:722-737.
22. Gardner RL, Rossant J. Investigation of the fate of 4.5 day postcoitum mouse inner cell mass cells by blastocyst injection. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1979; 52: 141-152.
23. Bioani M, Schöler HR.Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006; 6:872-884.
24. Solter D. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. *Nat. Rev. Genet.* 2006; 7: 319-327.
25. Beddington RS, Robertson E J. An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development* 1989; 105, 733-737.
26. Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, Strumpf D, Takahashi K, Yagi R, Rossant J. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell* 2005; 123: 917-929.
27. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct 3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* 2000; 24: 372-376.
28. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M,

- Maeda M, Yamanaka S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 2003; 113: 631-642.
29. Boyer L A, Lee T I, Cole, M F, Johnstone S E, Levine SS, Zucker J P, Guenther M G, Kumar RM, Murray H L, Jenner R G. et al., Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005; 122, 947-956.
  30. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003; 113, 643-655.
  31. Boyer L, Plath K, Zeitlinger J, Brambrink T, Medeiros LA, Lee TI, Levine SS, Wernig M, Tajonar A, Ray M K. et al. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 2006; 441: 349-353.
  32. Sieweke M H, Graf T. A transcription factor party during blood cell differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1998; 8:545-551.
  33. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* 2003; 33:S245-S254.
  34. Fujikura J, Yamato E, Yonemura S, Hosoda K, Masui S, Nakao K, Miyazaki J, Niwa H. Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors. *Genes Dev.* 2002;16, 784-789.
  35. Wray J, Kalkan T, Smith AG. The ground state of pluripotency. *Biochem. Soc. Trans.* 2010; 38:1027-1032.
  36. Dunn SJ, Martello G, Yordanov B, Emmott S, Smith AG. Defining an essential transcription factor program for naïve pluripotency. *Science* 2014; 344:1156-1160.
  37. Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith, A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev.* 1998;12: 2048-2060.
  38. Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, Arai K, Katsuki M, Heike T, Yokota T. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J.* 1999;18: 4261-4269.
  39. Cartwright P, McLean C, Sheppard A, Rivett D, Jones K, Dalton S. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* 2005; 132:885-896.
  40. Nichols, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H, Smith A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 1998; 95:379-391.
  41. Kuroda T, Tada M, Kubota H, Kimura H, Hatano S Y, Suemori H, Nakatsuji N, Tada T. Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 2005; 25:2475-2485.
  42. Rodda D J., Chew J L, Lim LH, Loh YH, Wang B, Ng H H, Robson P. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J. Biol. Chem.* 280, 24731-24737.
  43. Burdon T, Smith A, Savatier P. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol.* 2002; 12: 432-438.
  44. Sun H, Lesche R, Li DM, Liliental J, Zhang H, Gao J, Gavrilova N, Mueller B, Liu X, Wu H. PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 6199- 6204.
  45. Watanabe S, Umehara H, Murayama K, Okabe M, Kimura T, Nakano T. Activation of Akt signaling is sufficient to maintain pluripotency in mouse and primate embryonic stem cells. *Oncogene* 2006; 25: 2697-2707.
  46. Takahashi K, Murakami M, Yamanaka, S. Role of the phosphoinositide 3-kinase pathway in mouse embryonic stem (ES) cells. *Biochem. Soc. Trans.* 2005; 33:1522-1525.
  47. Takahashi K, Mitsui K, Yamanaka S. Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells. *Nature* 2003; 423:541-545.
  48. Teitell MA. The TCL1 family of oncoproteins: co-activators of transformation. *Nat. Rev. Cancer* 2005; 5:640-648.
  49. Ivanova N, Dobrin R, Lu R, Kotenko I, Levorse J, DeCoste C, Schafer X, Lun Y, Lemischka, I. R. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* 2006; 442, 533-538.
  50. Matoba R, Niwa H, Masui S, Ohtsuka S, Carter M G, Sharov A A, Ko MS H. Dissecting Oct3/4-regulated gene networks in embryonic stem cells by expression profiling. *PLoS One* 2006; 1, e26.
  51. Cao R, Zhang, Y. The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2004; 14:155-164.

52. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000; 403: 41-45.
53. Lund AH, van Lohuizen, M. Epigenetics and cancer. *Genes Dev.* 2004; 18, 2315-2335.
54. Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K. et al. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 2006; 125, 315-326.
55. Szutoritz H, Dillon N. The epigenetic basis for embryonic stem cell pluripotency. *BioEssays* 2005; 27:1286-1293.
56. Zipori D. The nature of stem cells: state rather than entity. *Nat. Rev. Genet.* 2004; 5: 873-878.
57. Lee JH, Hart SRL, Skalnik DG. Histone deacetylase activity is required for embryonic stem cell differentiation. *Genesis* 2004; 38:32-38.
58. Azuara V, Perry P, Sauer S, Spivakov M, Jorgensen HF, John RM, Gouti M., Casanova, M, Warnes G, Merkenschlager M. et al. (2006). Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat. Cell Biol.* 8, 532-538.
59. Meshorer E, Yellajoshula D, George E, Scambler P J, Brown DT, Misteli T. Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells. *Dev. Cell* 2006; 10: 105-116.
60. Brown SW. Heterochromatin. *Science* 1966; 151: 417-425.
61. De Los Angeles A, Ferrari F, Xi R, Fujiwara Y, Benvenisty N, Deng H, Hochedlinger K, Jaenisch R, Lee S, Leitch HG, M. Lensch MW, Lujan E, Pei D, Rossant J, Wernig M, Park PJ, Q. Daley GQ. Hallmarks of pluripotency. *Nature* 2015; 525: 469-478.
62. Brons, I. G. et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 2007; 448:19-195.
63. Tesar PJ. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 2007; 448, 196-199.
64. Nichols J, Smith A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 2009; 4: 487-492.
65. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126, 663-676.
66. Boyer, L. A. et al. Core regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005; 22: 947-956
67. Loh, Y.H. et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature Genet.* 2006; 38: 431-440.
68. Nichols, J. et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 1998; 95:379-391.
69. Chambers, I. et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003; 113:643-655.
70. Mitsui, K. et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 2003; 113:631-642.
71. Avilion, A. A. et al. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 2003; 17:126-140.
72. Masui, S. et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nature Cell Biol.* 2007; 9:625-635.
73. Wang Z, Oron E, Nelson B, Razis S, Ivanova N. Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2012; 10:440-454.
74. Chambers, I. et al. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* 2007; 450: 1230-1234.
75. Silva, J. et al. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell* 2009; 138:722-737.
76. Avilion, A. A. et al. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 2003; 17:126-140.
77. Ballas N, Grunseich C, Lu DD, Speh JC, Mandel G. REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis. *Cell* 2005; 121: 645-657.
78. Chambers I. The molecular basis of pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* 2004; 6: 386-391.
79. Gurdon JB. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1962; 10: 622-640
80. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385: 810-813.
81. Rowland B D, Peeper DS. KLF4, p21 and

- context-dependent opposing forces in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2006; 6: 11-23.
82. Li Y, McClintick J., Zhong L, Edenberg H J, Yoder MC, Chan RJ. Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood* 2005; 105:635-637.
  83. Nakatake Y, Fukui N, Iwamatsu Y, Masui S, Takahashi K, Yagi R, Yagi K, Miyazaki JI, Matoba R, Ko MS. et al. Klf4 cooperates with Oct3/4 and Sox2 to activate the Lefty1 core promoter in embryonic stem cells. *Mol. Cell Biol.* 2006; 26: 7772-7782.
  84. Stadtfeld M, Hochedlinger K. Induced pluripotency : history, mechanisms and applications. *Genes Dev* 2010; 24: 2239-2263.
  85. Brambrink, T. et al. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* 2008; 2: 151-159.
  86. Apostolou E, Hochedlinger K. Chromatin dynamics during cellular reprogramming. *Nature* 2013; 502; 462-471.
  87. Stadtfeld M, Maherali N, Breault D, Hochedlinger K. Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell* 2008; 2: 230–240.
  88. Maherali, N. et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 2007; 1 :55-70.
  89. Orkin SH, Hochedlinger K. Chromatin connections to pluripotency and cellular reprogramming. *Cell* 2011; 145: 835-850.
  90. Nakagawa M et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblast. *Nature Biotechnol* 2008; 26: 101-106.
  91. Wernig M, Meissner A, Cassady J, Jaenisch R. c-Myc is dispensable for direct reprogramming reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2008; 2: 10-12.
  92. Polo JM, et al. A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells. *Cell* 2012; 151: 1617-1632.
  93. Sridaran R et al. Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency *Cell* 2009; 136: 364-377.
  94. Lin CY et al. Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc *Cell* 2012; 151: 56-67.
  95. Rahl PB et al. c-Myc regulates transcriptional pause release. *Cell* 2010; 141: 432-445.
  96. Mansour A et al. The H3K27 demethylase Utx regulates somatic and germ cell epigenetic reprogramming. *Nature* 2012; 488: 409-413.
  97. Buganim Y et al. Single –cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierarchic phase. *Cell* 2012; 150: 1209-1222.
  98. Shu J et al., Induction of pluripotency in mouse somatic cells with lineage specifiers. *Cell* 2013; 153: 963-975.
  99. Koche et al. Reprogramming factor expression initiates widespread targeted chromatin remodeling. *Cell Stem Cell* 2011; 8: 96-105.
  100. Soufi A, Donahue G, Zaret K. Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell* 2012; 151: 994-1004.
  101. Jia, J. et al. Regulation of pluripotency and self-renewal of ESCs through epigenetic-threshold modulation and mRNA pruning. *Cell* 2012; 151:576–589.
  102. Mansour AA. The H327 demethylase Utx regulates somatic and germ cell epigenetic reprogramming . *Nature* 2012; 488: 409-413.
  103. Kohli RM, Zhang Y, Tet enzymes TDG and the dynamic of DNA demethylation *Nature* 2013; 502: 472-479.
  104. Onder, T. T. et al. Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming. *Nature* 2012; 483, 598–602.
  105. Pawlak M, Jaenisch R. De novo DNA methylation by Dnmt3a and Dnmt3b is dispensable for nuclear reprogramming of somatic cells to a pluripotent state. *Genes Dev* 2011; 25: 1035-1040.
  106. Fragola, G. et al. Cell reprogramming requires silencing of a core subset of polycomb targets. *PLoS Genet.* 2013; 9: e1003292.
  107. Doege CA et al. Early-stage epigenetic modification during somatic cell reprogramming by Parp1 and Tet2. *Nature* 2012; 488: 652-655.
  108. Costa Y. et al. Nanog-dependent function of TET1 and TET2 in establishment of pluripotency. *Nature* 2013; 495: 370-374.
  109. Skene PJ, Henikoff S. Histone variants in pluripotency and disease. *Development* 2013; 140: 2513-2524.
  110. Singhal, N. et al. Chromatin-remodeling components of the BAF complex facilitate reprogramming. *Cell* 2010; 141: 943–955.
  111. Gaspar-Maia, A. et al. Chd1 regulates open chromatin and pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* 2009; 460:863–868.



112. Luo, M. et al. NuRD Blocks reprogramming of mouse somatic cells into pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2013; 31: 1278-1286.
113. Rais Y et al. Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Nature* 2013; 502: 65-70.
114. de Laat W, Duboule D. Topology of mammalian developmental enhancers and their regulatory landscape. *Nature* 2013; 502: 499-4506.
115. Philips-Cremins JE et al. Architectural protein subclasses shape 3D organization of genomes during lineage commitment. *Cell* 2013; 153: 1281-129.
116. Kagey MH et al., Mediator and cohesion connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* 2010; 467: 430-435.
117. Apotolou E et al. Genome-wide chromatin interactions of the Nanog locus in pluripotency, differentiation, and reprogramming. *Cell Stem Cell* 2013; 12: 699-712.
118. Wei Z et al. Klf 4 organizers long-range chromosomal interactions with the Oct4 locus in reprogramming and pluripotency. *Cell Stem Cell* 2013; 13: 36-47.

## 4

# Stem Cell Diferensiasi

PENDAHULUAN	89
POTENSI DIFERENSIASI HEMATOPOIETIC STEM CELL	89
SUMBER HEMATOPOIETIC STEM CELL	90
REGULASI EPIGENETIK TERHADAP KESIMBANGAN SELF RENEWAL DAN DIFERENSIASI PADA HEMATOPOIETIC STEM CELL	94
REGULASI EPIGENETIK TERHADAP DIFERENSIASI SEL PADA EMBRYONIC STEM CELL	101

*“Perplexity is the beginning of knowledge”*

*-Khalil Gibran-*

## PENDAHULUAN

Berbagai jenis stem cell manusia saat ini bisa diisolasikan dan diperbanyak di luar tubuh atau dikultur secara *in vitro* mulai dari *embryonic stem cell*, *adult stem cell* meliputi *hematopoietic stem cell*, hingga *induced pluripotent stem cell* (iPSCs), sehingga dapat menjadikan suatu model perkembangan manusia di dalam piring petri. <sup>1</sup> Stem cell dapat dikultur dan ditumbuhkan dalam piring petri tanpa batas waktu dan berdiferensiasi menjadi berbagai jenis *lineages* (garis turunan) seperti perkembangan secara *in vivo* dan/atau perbaikan terhadap injuri. <sup>1</sup>

Hematopoietic stem cell (HSC) dengan sifat multipoten mampu berdiferensiasi menjadi seluruh jenis sel darah yang berjumlah lebih dari 10 jenis sel darah yang matur. <sup>2,3</sup> HSC dapat mempertahankan keseimbangan antara *self-renewal* dengan diferensiasi sepanjang hidup seseorang dengan

progeni yang telah berdiferensiasi. Dengan *self-renewal*, berarti HSC dapat memperbanyak dirinya tanpa diferensiasi.

Bab ini akan memfokuskan pada pembahasan mengenai proses diferensiasi pada HSC, dengan fokus pada penjelasan mekanisme epigenetik yang mendasarinya, karena HSC telah berhasil digunakan dalam terapi hemato-onkologik selama beberapa dekade dan juga nonhematologik. Penjelasan dinamika epigenetik pada stem cell pluripoten juga dibahas, seperti pada *embryonic stem cell*.

## POTENSI DIFERENSIASI HEMATOPOIETIC STEM CELL

Satu sistem nomenklatur mengategorikan potensi diferensiasi dari berbagai populasi stem cell seperti tampak pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Potensi Diferensiasi dari Populasi Stem Cell

Penamaan	Potensi Diferensiasi	Contoh Stem/Progenitor Cell
Totipoten	Semua jaringan embrio dan Ekstraembrio	Zigot
Pluripoten	Semua jaringan embrio	ICM, ES cell, iPSC
Multipoten	Semua <i>lineage</i> (garis turunan) dari suatu jaringan/organ	HSC, NSC
Oligopoten	Beberapa tetapi tidak semua <i>Lineage</i> dari suatu jaringan/organ	CMP, CLP
Unipoten	<i>Lineage</i> tunggal dari suatu jaringan	Macrophage progenitor Sperma

ICM: inner cell mass, ES: embryonic stem, iPSC: induced pluripotent stem, HSC: hematopoietic stem cell, NSC: neural stem cell, CMP: common myeloid progenitor, CLP: common lymphoid progenitor.

Dikutip dari Seita J, Weissman IL. *Hematopoietic Stem Cell: Self-renewal versus differentiation*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med. 2010; 26: 640-653.

HSC adalah stem cell somatik yang berada di dalam sumsum tulang, dan jika ditransplasikan ke dalam hewan yang diradiasi dengan dosis subletal, mampu mengembalikan fungsi sistem limfo-hematopoietik.<sup>3</sup> Konsep stem cell yang pertama kali dipelopori oleh Till and McCulloch yang melakukan transplantasi sumsum tulang ke dalam mencit. Sepuluh hari kemudian, timbul koloni di dalam limpa mencit yang memiliki sifat : 1. Kemampuan menghasilkan sel mieloeritroid, and kemampuan bereplikasi sendiri.<sup>4,5,6,7</sup> Berdasarkan pengamatan ini, diperoleh dua kriteria stem cell yaitu multipotensi dan *self-renewal*.<sup>2</sup> Di samping itu, juga dikemukakan bahwa keputusan HSC mengadakan *self-renewal* dan diferensiasi adalah suatu proses *stochastic* atau acak.<sup>8</sup> Ogawa et al., menguji model ini secara *in vitro* dan mendapatkan bahwa produksi koloni sel blast sekunder adalah proses *self-renewal*, sedangkan koloni multilineage adalah diferensiasi,<sup>9,10</sup> karena distribusi kedua jenis koloni amat heterogen seperti dilaporkan oleh Till and McCulloch.

Marker permukaan pertama yang digunakan untuk memperkaya HSC adalah CD34, suatu ligand terhadap L-selectin yang hanya diekspresikan sebesar 0.5-5% di dalam sel darah hati fetus, darah tali pusat dan sumsum tulang dewasa.<sup>11,12,13</sup> Pemeriksaan *assay in vitro* mendapatkan semua sel CD34+ memiliki sifat multipotensi atau oligopotensi, namun populasi masih sangat

heterogen. Isolasi HSC manusia memperlihatkan fenotipe CD34<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>, dengan marker Lin meliputi marker T,B, NK (*Natural Killer*), dan mieloeritroid. Sel ini menghasilkan progeni limfoid dan mieloid secara *in vitro* dan juga pada mencit dengan *severe combined immunodeficiency* (SCID) secara *in vivo*. Sebaliknya populasi yang tersisa dari CD34<sup>+</sup> CD90<sup>-</sup> Lin<sup>-</sup> tidak mampu menghasilkan klon sel yang mengandung tipe sel mieloid dan limfoid. Namun, penkayaan HSC melalui mobilisasi G-CSF ke dalam darah perifer dengan ekspresi CD34 dan CD90 mampu meningkatkan efisiensi transplantasi sumsum tulang dengan memberikan rekonstitusi dimediasi hematopoietic dan *engraftment* jangka panjang sekaligus mengurangi kontaminasi sel kanker atau sel T yang imunoreaktif.<sup>14,15,16</sup> Sebenarnya semua CD34<sup>+</sup> CD9<sup>+</sup> berada di dalam fraksi CD38<sup>-</sup><sup>17</sup>, sehingga dapat disimpulkan bahwa HSC manusia dapat diperkaya di dalam populasi Lin<sup>-</sup> CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>.

## SUMBER HEMATOPOIETIC STEM CELL

Produksi stem cell darah terjadi pada berbagai tempat sel embrionik (Gambar 1).<sup>18</sup> Urutan tempat hematopoiesis pada mamalia meliputi *yolk sac*, area di sekitar aorta dorsalis disebut aorta-gonad mesonephros (AGM), hati fetus, dan sumsum tulang. Plasenta juga dikenal sebagai tempat produksi selama peralihan dari AGM ke hati fetus. Perbedaan

tempat hematopoiesis menggambarkan perbedaan *niche* yang mendukung ekspansi HSC dan diferensiasi pada setiap tahap perkembangan. Misalnya, HSC pada massa hati fetus mengalami siklus sel yang kontinu, sedangkan pada sumsum tulang dewasa HSC umumnya bersifat *quiescent* (*dormant*).

Sistem darah mamalia terdiri lebih dari 10 tipe sel matur termasuk sel darah merah (eritrosit), megakariosit/platelet, sel mieloid (monosit/makrofag dan granulosit), sel mast, limfosit T dan B, natural killer (NK) cells, sel dendritik dengan jumlah yang diproduksi mencapai satu trillion ( $10^{12}$ ) setiap hari pada orang dewasa.<sup>2,19</sup> Sumber tipe sel yang beragam ini berasal dari satu sel progenitor umum, yaitu *hematopoietic stem cell*, yang memiliki potensi diferensiasi yang luar biasa. Perkembangan hematopoietik dengan diferensiasi multipoten yang semakin ke bawah semakin terbatas dalam hierarki struktur seperti terlihat pada Gambar 2.<sup>19</sup> Pada mulanya, HSC menghasilkan MPP (multipotent progenitor), yang tidak lagi memiliki sifat *renewal*, tetapi populasi MPP masih mempunyai potensi diferensiasi untuk pembentukan seluruh sel darah,<sup>20,21</sup> karena sifat heterogen.<sup>21,22,23</sup> MPP dapat berkembang menjadi progenitor oligopoten: CLL (common lymphoid progenitor (CLP)<sup>24,25,26</sup> dan common myeloid progenitor (CMP).<sup>27</sup> Progenitor ini selanjutnya menghasilkan sel efektor sistem hematopoietik, yaitu CMP menjadi megakaryocyte/erythrocyte progenitor (MEP) dan granulocyte/macrophage progenitor (GMP).<sup>28</sup> Hubungan *lineage* antara stem cell, progenitor, dan sel matur membentuk satu 'roadmap' kompleks yang mengarahkan pada penelitian dasar molekuler dari transisi perkembangan.<sup>19</sup>

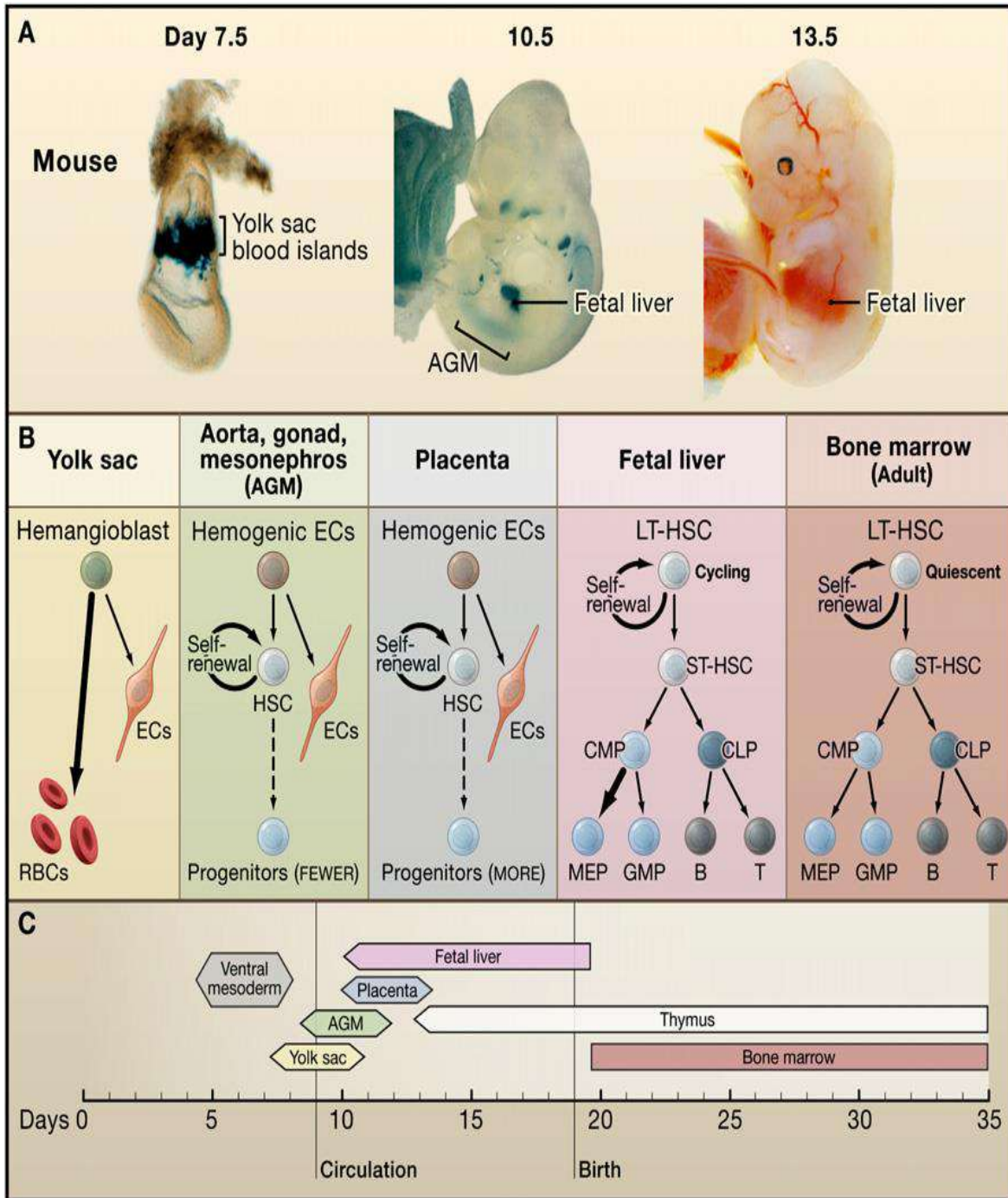
HSC mencit pertama kali diisolasi sebagai populasi (Lin-), c-kit+, Sca-1+ (LSK). menggunakan *multicolored fluorescence-activated cell sorting* dan *monoclonal antibodies* tahun 1988.<sup>29,30</sup> Di dalam subset terdapat CD34- cell yang memiliki kapasitas rekonstitusi multilineage jangka panjang dan *self-renewal*.<sup>22</sup> Dengan melakukan isolasi HSC, dapat dianalisis secara detail status transkripsi dan epigenetik.<sup>31,32,33</sup> Gambaran perkembangan sel hematopoietik mencit dapat dilihat pada Gambar 2A.<sup>19</sup>

Isolasi HSC manusia menunjukkan fenotipe CD34+CD90+Lin- dan marker Lin meliputi limfosit T, B, NK, dan mieloerythroid (Gambar 2B).<sup>19</sup> Sel ini menghasilkan progeni limfoid dan mieloid secara

*in vitro* dan *in vivo* pada mencit *severe combined immunodeficiency* (SCID). Sebaliknya, sel CD34+CD90- Lin- tidak mampu menghasilkan klon sel yang mengandung tipe sel mieloid dan limfoid.<sup>34</sup> Penkayaan HSC lebih lanjut dalam populasi CD34+ menghasilkan marker permukaan CD38. Meskipun 90,9% sel CD34+ mengekspresi CD38, sel ini mampu menghasilkan koloni multilineage mengandung sel limfoid dan mieloid dengan fraksi CD38 rendah hingga negatif dan fraksi CD90+.<sup>35,36,37,38</sup> Ekspresi CD34+ kurang dari 5% dari seluruh komponen sel darah, dan merupakan marker pertama dijumpai di dalam HSC dan progenitor manusia,<sup>11</sup> dan telah terbukti dalam berbagai penelitian transplantasi stem cell hematopoietik selama beberapa dekade, yang menandai keberadaan HSC.<sup>39,40</sup>

Jumlah sel darah matur yang dihasilkan pada manusia adalah 1 juta sel per detik. HSC jarang masuk ke dalam siklus sel atau berada dalam fase G0 dari siklus sel. Bagaimana keseimbangan jumlah HSC dapat dipertahankan selama kehidupan seseorang dengan kebutuhan pergantian sel darah matur, yang sebagian besar hanya hidup dalam waktu singkat? Keseimbangan ini amat penting karena gangguan perkembangan HSC dapat menyebabkan penyakit yang serius, misalnya diferensiasi HSC menjadi *committed progenitor* tidak diikuti hilangnya kapasitas *self-renewal*, atau progenitor derivat HSC gagal mencapai diferensiasi penuh menjadi sel darah matur,<sup>41</sup> atau mengalami progresivitas menjadi preleukemia.<sup>42</sup>

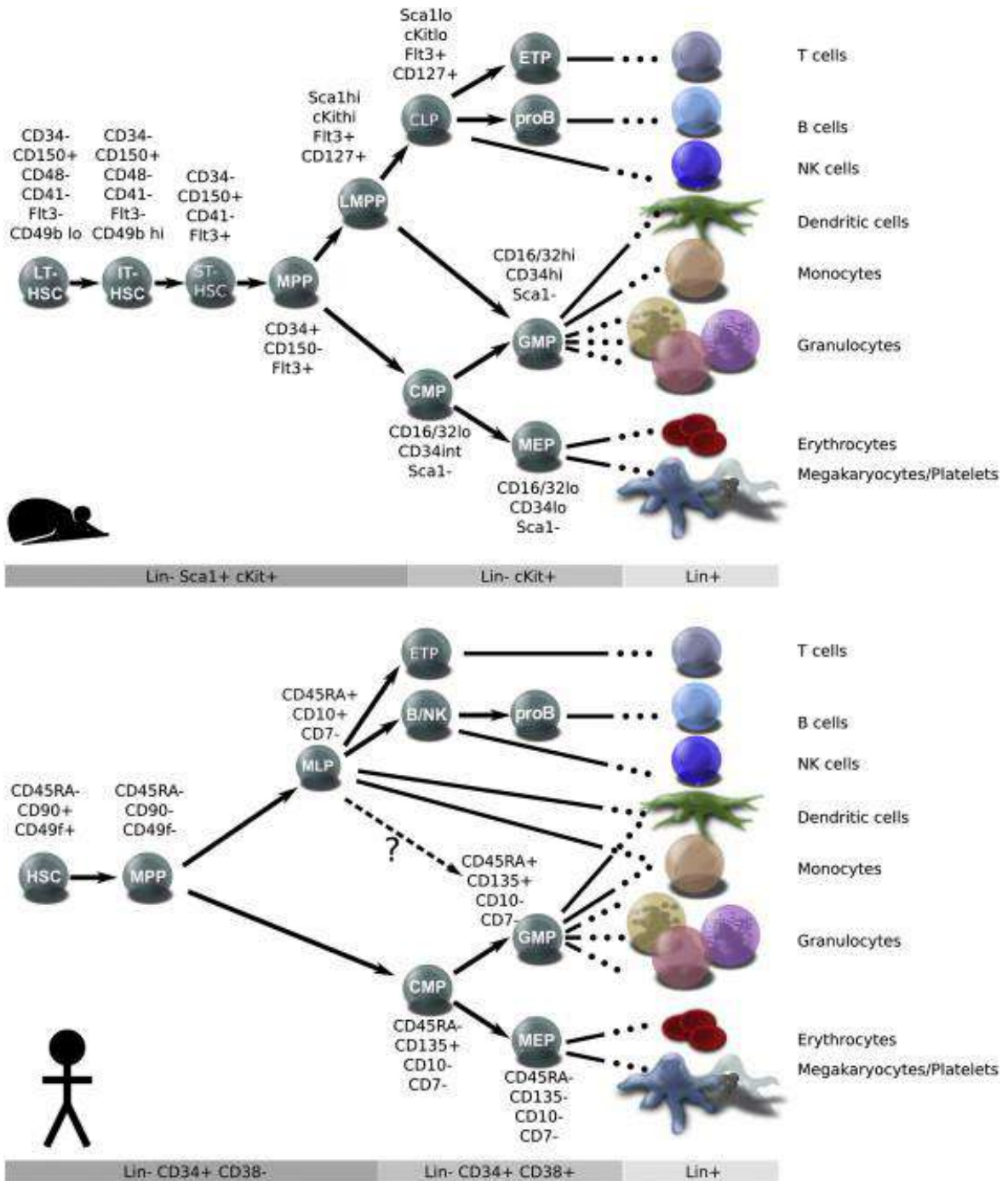
Hematopoietic stem cell dapat berada dalam kondisi *quiescence* karena dipertahankan oleh *signaling* TGF- $\beta$  melalui efek inhibisi terhadap proliferasi tanpa induksi apoptosis dari hasil studi *in vitro*.<sup>43,44,45</sup> Hal ini terbukti dari embrio mencit yang mengalami kematian ketika dilakukan *knockout signaling* Smad dan TGF- $\beta$ . Namun hal ini sulit dibuktikan TGF- $\beta$  secara *in vivo*.<sup>2</sup> Ang-1/Tie2 adalah reseptor tyrosine kinase yang diekspresikan pada sel endotel dan HSC.<sup>46,47,48</sup> Tie dibutuhkan untuk mempertahankan pool HSC di dalam sumsum tulang dewasa.<sup>49</sup> HSC yang mengekspresikan Tie2 berada dalam kondisi *quiescent* dan berdampingan dengan osteoblast sumsum tulang yang mengekspresikan Ang-1. Pengobatan Ang-1 menekan proliferasi HSC dan mempertahankan aktivitas repopulasi jangka panjang secara *in vivo*.<sup>50</sup> Hal ini menunjukkan bahwa Ang-1/Tie2 merupakan target dari modifikasi HSC dalam kondisi *quiescent*.



**Gambar 1.** Regulasi perkembangan hematopoiesis (A). hematopoiesis pertama kali terjadi pada *yolk sac* (YS) kemudian pada regio aorta-gonad mesonephros (AGM), plasenta dan hati fetus (HF) Pulo darah YS dilihat menggunakan pewarnaan LacZ dari embrio *transgenic* dengan ekspresi GATA-1. AGM dan HF diwarnai dengan LacZ pada mencit dengan *knockin* Runx1-Laz. (V) hematopoiesis pada masing-masing tempat mendukung produksi garis turunan darah yang spesifik. ECs, endothelial cells; RBCs, red blood cells; LTHSC, long-term hematopoietic stem cell; ST-HSC, short-term hematopoietic stemcell;CMP,common myeloid progenitor; CLP, common lymphoid progenitor; MEP,megakaryocyte/erythroid progenitor; GMP, granulocyte/macrophage progenitor. (C) Waktu perkembangan dari pergeseran tempat hematopoiesis.

Dikutip dari Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: An evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 2008; 132: 631-644.



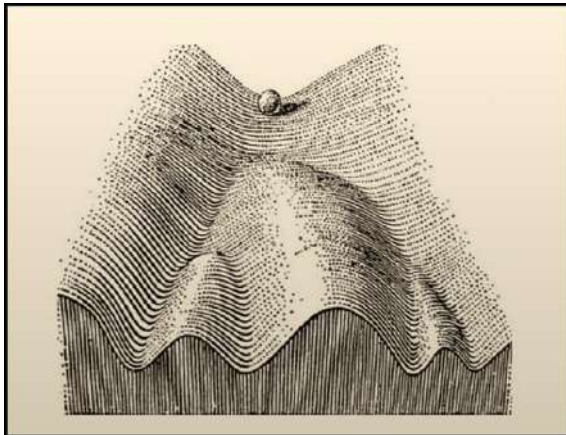


**Gambar 2.** Model penentuan *lineage* pada hierarki hematopoietik mencit dan manusia. Sel terdiferensiasi terminal ditunjukkan di sebelah kanan, dan hubungan *lineage* ditunjukkan dengan tanda panah. Pada mencit (A) HSC dipisahkan atas kelas long-term (LT), intermediate-term (IT) dan short-term (ST) berdasarkan durasi repopulasi. Pada manusia (B), HSC didefinisikan sebagai CD49f dan marker lain, tetapi belum diteliti heterogenitas. Pada mencit, diferensiasi HSC menghasilkan multipoten progenitor (MPP), dan sejumlah *lymphoid-biased progenitor* (seperti LMPP) imatur yang mengalami spesifikasi limfoid. Pada manusia, MPP dapat diidentifikasi dengan hilangnya ekspresi CD49f. Baik mencit maupun manusia mempunyai myelo-erythroid progenitor : CMP, GMP dan MEP. Lin : cocktail yang mengandung populasi myelo-erythroid progenitor untuk semua populasi diferensiasi terminal (sel B, sel T, NK, sel dendritik, monosit, granulosit, megakariosit, dan eritrosit).

Dikutip dari Doulatov S, Notta F, Laurenti E, John E, Dick JE. Hematopoiesis: A human perspective. *Cell Stem Cell* 2012; 10: 120-136.

## REGULASI EPIGENETIK TERHADAP KESEIMBANGAN SELF-RENEWAL DAN DIFERENSIASI PADA HEMATOPOIETIC STEM CELL

Conrad H. Waddington tahun 1940 an mengilustrasikan bahwa sel yang telah mengalami diferensiasi bagaikan sebuah bola yang sedang menggelinding di lembah; sekali masuk ke akhir lembah, tidak mudah menyilang ke lembah yang lain atau kembali ke posisi di puncak. Mekanisme epigenetik yang melibatkan metilasi DNA dan modifikasi histon secara progresif membatasi potensi lineage (Gambar 3).<sup>51,52</sup> Pengetahuan mengenai lanskap epigenetik yang mengatur perkembangan normal dari berbagai tipe sel dipaparkan dalam studi Cui et al., yang melakukan penelitian terhadap hematopoietic stem cell CD133+ dan CD34+ stem cells.<sup>53</sup>



**Gambar 3.** Lanskap epigenetic klasik Waddington. Conrad Waddington mengusulkan konsep lanskap epigenetik untuk menggambarkan proses diferensiasi sel selama perkembangan. Pada berbagai metafor dinamik tersebut, sel (digambarkan sebagai sebuah bola) yang sedang menggelinding, menentukan outcome atau nasib sel.

Dikutip dari [51\(tulisan 51 dihapus\)](#) Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. *Epigenetics: A landscape takes shape. Cell* 2007;128: 635-638.

Kelompok peneliti Cui et al., mendapatkan bahwa diferensiasi sel CD133+ menjadi sel CD36+ (precursor eritrosit atau eritroblast) diikuti oleh perubahan modifikasi histon pada regio genetik yang kritikal berdasarkan *high-resolution genome-wide maps*. H3K4me1, H3K9me1, and H3K27me1 berasosiasi dengan *enhancer* diferensiasi gen sebelum aktivasi dan berkorelasi dengan ekspresi

basal, menunjukkan bahwa monometilasi ini terlibat dalam mempertahankan potensi aktivasi sebelum diferensiasi. H3K27me3 dan H3K9me3 merupakan represi gen tetapi berhubungan dengan *silencing* pada berbagai subset gen. Dari data yang diperoleh, bahwa sejumlah fraksi kecil gen bivalen di dalam HSC/HSP (hematopoietic progenitor cell) tidak memiliki H3K9me3. Asosiasi peningkatan level H3K4me1, H3K9me3, H2A.Z (histon varian) dan RNA polymerase II (Pol II) dengan gen bivalen menunjukkan potensi kehilangan H3K27me3 dan menjadi aktif selama diferensiasi. Hasil ini menunjukkan bahwa modifikasi bivalen selama diferensiasi telah diprogram pada stadium HSC/HSP, dan perubahan ekspresi gen ini mengidentifikasi manfaat *enhancer* dan *promoter*.<sup>53</sup>

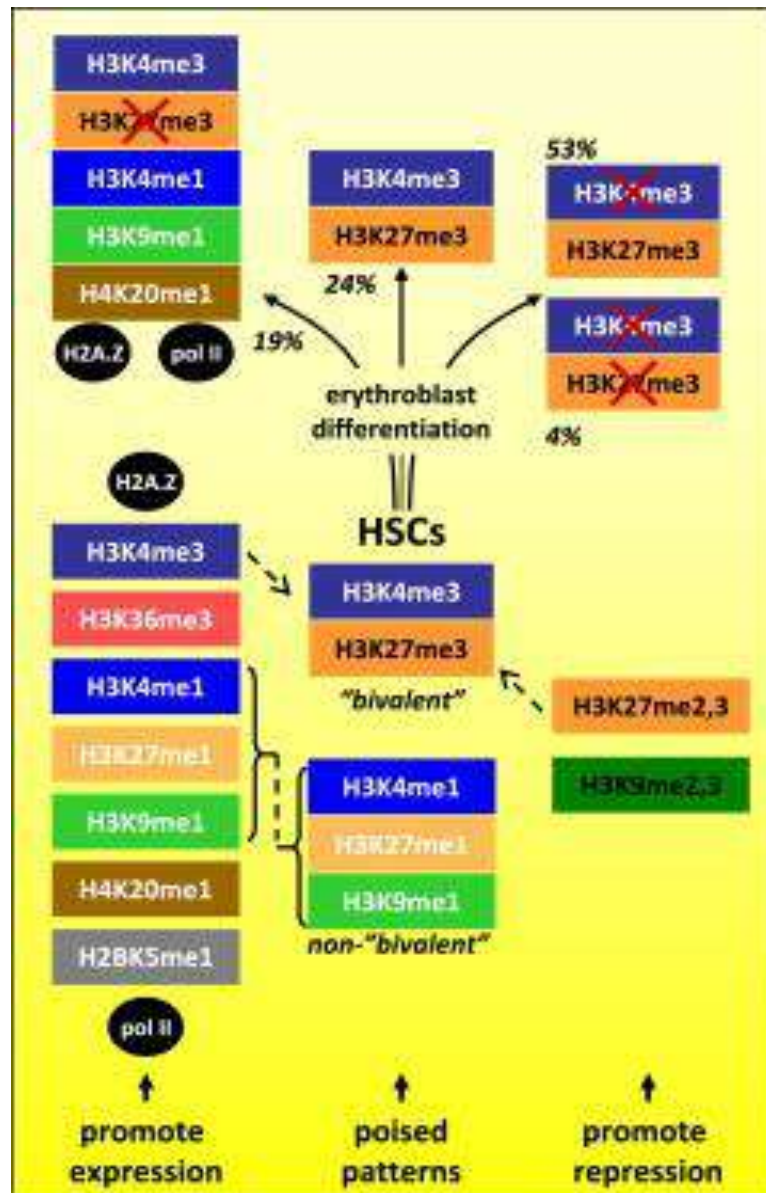
Secara ringkas penemuan hasil studi Cui tentang regulasi epigenetik terhadap diferensiasi adalah sebagai berikut : pola modifikasi kromatin global adalah sama dan berkorelasi dengan ekspresi gen pada dua keadaan sel, misalnya korelasi positif antara ekspresi gen dengan H3K4me3, H3K4me1, H3K9me1, H3K36me3, dan H4K20me1 pada regio *promoter* dan *genes bodies*. Perubahan epigenetik di dalam lokus pengaturan berkorelasi dengan perubahan selama diferensiasi eritroid yaitu dari CD133+/CD34+, berarti epigenetik membatasi *lineage*. Eritroblast yang telah berdiferensiasi mencapai *silencing* dalam pemeriksaan genome-wide dengan menghentikan H3K4me3 *mark* dalam 53% *bivalent genes* yang dideteksi pada HSC/progenitor cells (Gambar 4).<sup>52, 53</sup>

Jadi, studi Cui et al., mendukung efek kombinasi modifikasi histon dalam aktivitas gen dan membuktikan gambaran korelasi umum selama terjadi diferensiasi sel.<sup>53</sup> Namun, aturan umum ini tidak berlaku bagi seluruh kondisi, misalnya CD36 yang diekspresikan dalam kondisi aktif mempunyai H3K9me3 yang bersifat represif pada promoter. Mayoritas gen bivalen pada HSC/progenitor cell mempunyai monovalent H3K4me3 yang diaktivasi di dalam eritroblast, dengan hampir 10% (53 gen) menunjukkan berkurangnya ekspresi gen. Dengan demikian, kelihatan bahwa kode epigenetik lebih kompleks daripada kode genetik.<sup>52</sup>

Untuk mendapatkan pemahaman terhadap studi yang dilakukan Cui et al., tentang diferensiasi sel CD133+ menjadi sel CD36 sebagai prekursor eritrosit (eritroblast), maka dapat dilihat Gambar 5.<sup>53</sup> Sel

CD34+ dan CD133+ pada sumsum tulang manusia atau darah perifer mempertahankan hemopoiesis jangka panjang setelah transplantasi.<sup>54,55</sup> Sel ini dapat berdiferensiasi menjadi tipe sel khusus pada studi *in vitro* dengan kondisi medium yang sesuai. Jalur diferensiasi *in vitro* dari sel CD34+ atau

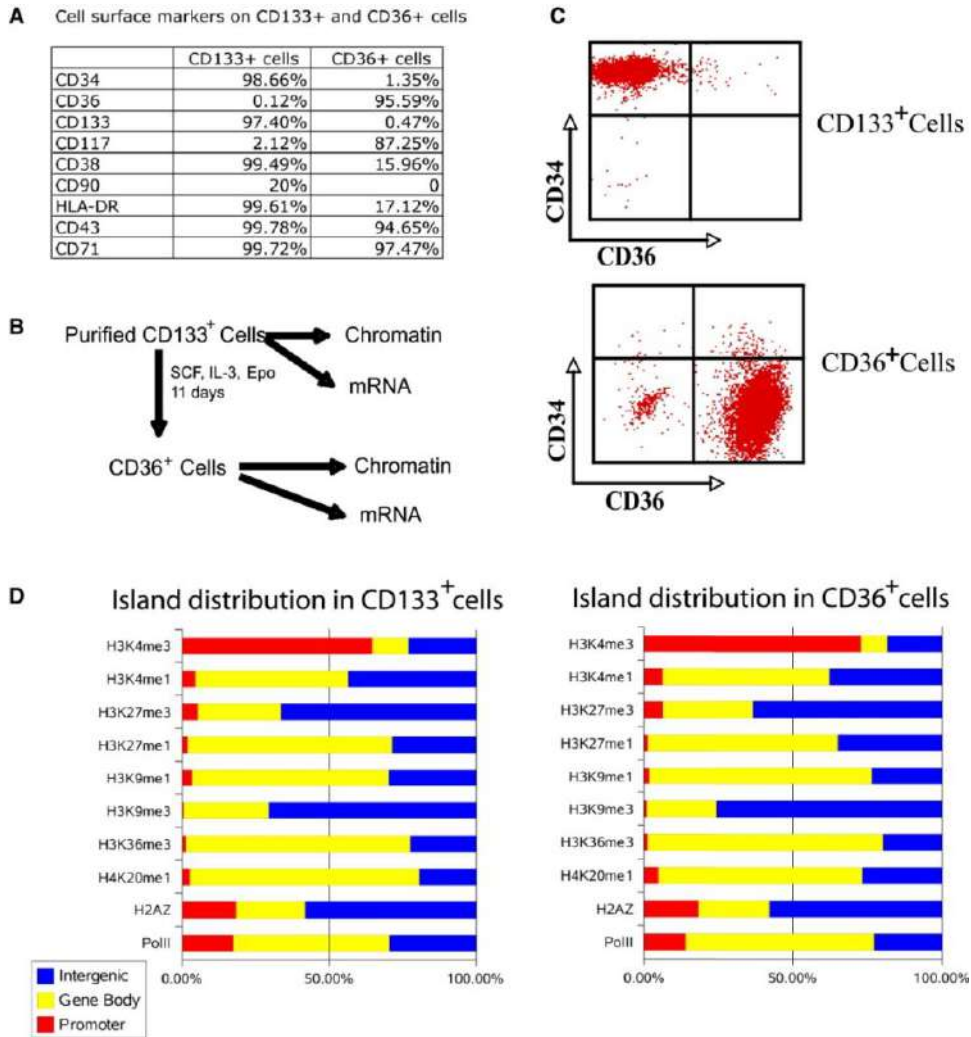
CD133+ adalah memproduksi sel prekursor eritrosit yang selanjutnya diinduksi menjadi sel darah merah matur.<sup>56</sup> Populasi stem cell yang diisolasi dari manusia, termasuk HSC CD34+ atau CD133+ adalah kompleks dan tersusun atas sel progenitor dengan potensi diferensiasi yang berbeda.



**Gambar 4.** Kombinasi modifikasi epigenetik berkorelasi dengan status gen. Gen aktif sering berasosiasi dengan H2A.Z, RNA Poli II, dan modifikasi histon multipel (kiri bawah). Gen represif sering ditandai dengan H3K27me2, H3K27me3, H3K9me2, dan H3K9me3 (kanan bawah). *Poised gene* (tengah) ditandai bivalen H3K4me3 dan H3K27me3 pada HSC/progenitor cell yang siap mengalami tiga kondisi perubahan selama diferensiasi eritroid; aktivasi gen (kiri atas), mempertahankan bivalensi, dan represi gen (kanan atas). Gen bivalen yang diaktivasi di dalam eritroblast (19%) lebih berasosiasi dengan H2A.Z, Pol II, H3K4me1, H3K9me1 dan H4K20me1 di dalam HSC/progenitor cell. Karena itu, nasib gen bivalen dapat diprogram bergantung pada penambahan *mark* modifikasi yang ada di dalam HSC/progenitor cell. H3K4me1, H3K27me1, dan H3K9me1 dapat menggambarkan mekanisme lain dalam aktivasi HSC/progenitor cell.

Dikutip dari Shen X, Orkin SH. *Glimpses of the epigenetic landscape*. Cell 2009; 4: 1-2.

4. Stem Cell Differensiasi



**Gambar 5.** Differensiasi sel CD133<sup>+</sup> menjadi CD36<sup>+</sup>. (A) Marker permukaan sel pada sel CD133<sup>+</sup> dan CD36<sup>+</sup>. Sel ini diwarnai menggunakan antibodi spesifik yang ditunjukkan pada kolom kiri dan dianalisis dengan *flow cytometry*. Fraksi sel ditunjukkan dengan pewarnaan positif untuk masing-masing antibodi. (B) Skema eksperimen. (C) Distribusi genome-wide pada modifikasi berbeda. Jumlah total *island* di dalam regio promoter, *gene body* dan intergenik diidentifikasi untuk masing-masing modifikasi. Grafik menunjukkan fraksi *island* pada setiap regio untuk masing-masing modifikasi sel di dalam sel CD133<sup>+</sup> dan CD36<sup>+</sup>.

Dikutip dari Cui K, Zang C, Roh TY, Schones DE, Childs RW, Peng W, Zhao K. Chromatin signatures in multipotent human hematopoietic stem cells indicate the fate of bivalent genes during differentiation. *Cell Stem Cell* 2009; 4:80-93.

HSC manusia terdiri dari ekspresi CD34 dan CD133 yang tinggi, dengan level *intermediate* CD117 (c-kit) dan CD90 (Thy-1) dan tidak ada atau level rendah dari CD38, HLADR, dan CD71.<sup>57</sup> Ekspresi CD34 dan CD133 lebih dari 98% dan ekspresi CD117 dan CD90 dalam fraksi kecil (2-20%), sehingga jumlah ini sesuai dengan stem cell atau progenitor cell (Gambar 5A).<sup>53</sup> Namun, lebih dari 99% sel ini adalah CD38, HLA-DR dan CD71 positif, menunjukkan bahwa sebagian besar sel merupakan sel progenitor dini.

Differensiasi sel CD133 menjadi CD36 (Gambar 5B).<sup>53</sup> Analisis dengan FACS mengkonfirmasi bahwa lebih dari 98% sel CD133<sup>+</sup> mengekspresikan CD34<sup>+</sup> yang tinggi dan tidak terdeteksi level CD36 (Gambar 5C).<sup>53</sup> Setelah diferensiasi, lebih dari 95% sel mengekspresikan CD36 dengan hilangnya ekspresi CD34 (Gambar 5A, dan 5C).<sup>53</sup> Pada waktu yang sama, CD117 meningkat dari 2.12% di dalam CD133<sup>+</sup> menjadi 87.25% di dalam sel CD36<sup>+</sup>, sedangkan CD38 dan HLA-DR menurun masing-masing menjadi 15.96% dan 17.12%, setelah

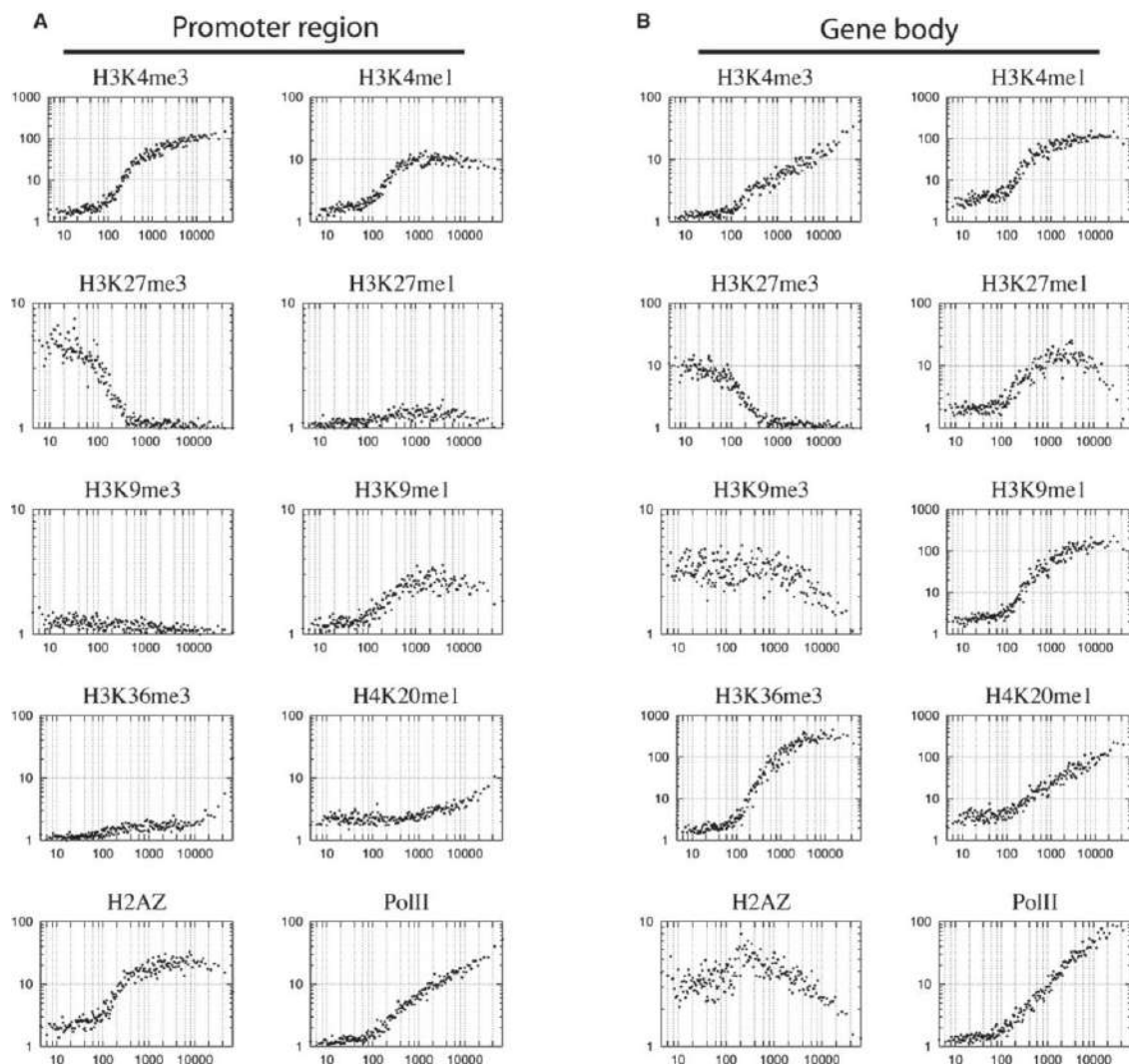


diferensiasi (Gambar 5A).<sup>53</sup>

Analisis metilasi histon seperti H3K4me1, H3K4me3, H3K9me1, H3K9me3, H3K27me1, H3K27me3, H3K36me3, and H4K20me1 histone varian H2A, dan RNA Poli II (RNAP II) dilakukan menggunakan ChIP-Seq. Pola modifikasi histon berbeda pada C133+ dan CD36+. H3K4me3 *islands* pada regio promoter dari sel CD133+ dan CD36+ masing-masing berjumlah 65% dan 73%, sedangkan 71-76% H3K9me3 dideteksi di regio intergenik kurang dari 1% di dalam *regio promoter* (Gambar 5C).<sup>53</sup> Modifikasi lain termasuk H3K4me1, H3K9me1, H3K27me1, H3K36me3, and

H4K20me1 terutama dideteksi di dalam gen yang ditranskripsi (Gambar 5D dan 5E).<sup>53</sup>

H3K9me3 dan H3K27me3 berimplikasi terhadap represi gen. Kedua modifikasi kromatin berhubungan dengan ekspresi gen pada tingkat rendah, dengan H3K27me3 berkorelasi negatif dengan gen yang menunjukkan level ekspresi yang rendah dan *intermediate*. Sebaliknya, H3K9me3 berkorelasi negatif dengan gen yang menunjukkan level ekspresi yang tinggi (Gambar 6).<sup>53</sup> Gen ini tidak berasosiasi dengan H3K27me3, menunjukkan bahwa H3K9me3 dan H3K927me3 memodulasi ekspresi dengan subset gen yang berbeda (Gambar 6).<sup>53</sup>

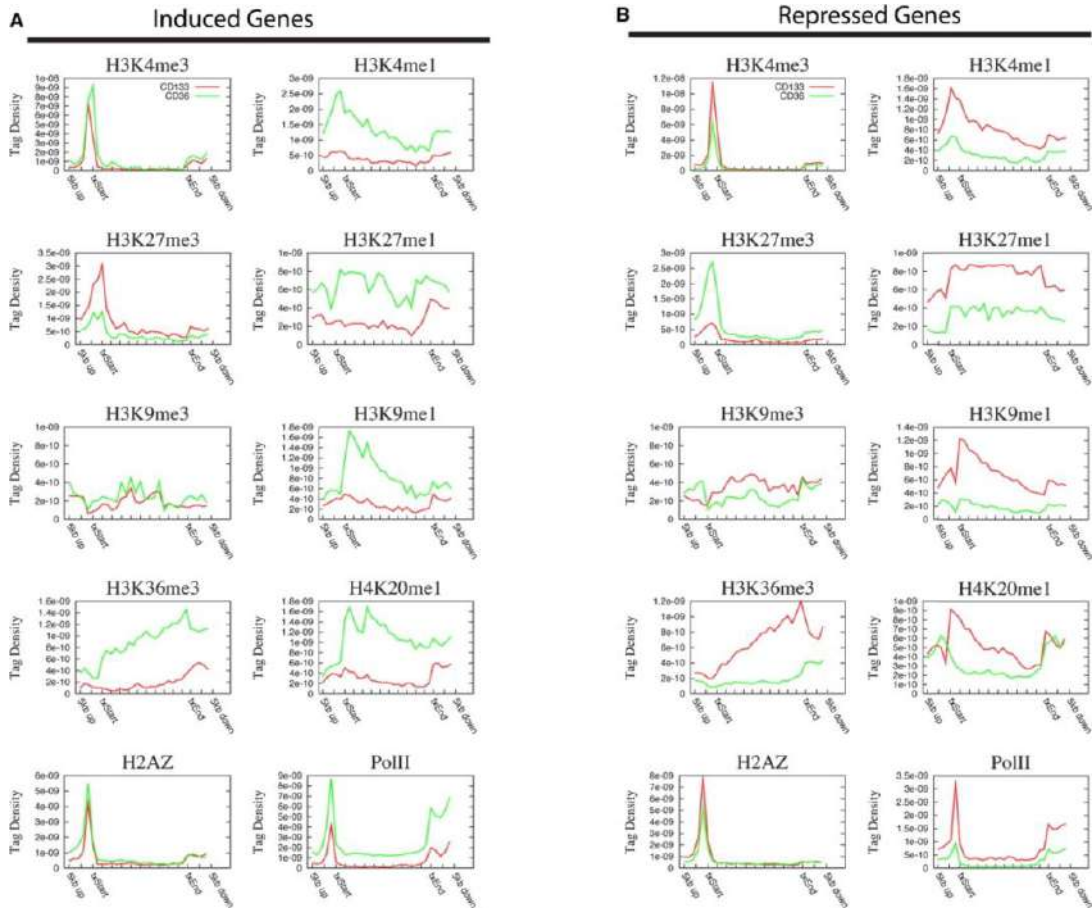


**Gambar 6.** Korelasi antara modifikasi histon dengan ekspresi gen di dalam sel CD36+. Gen dikelompokkan menjadi 100 kumpulan gen (satu titik di dalam gambar) sesuai dengan level ekspresi. Level modifikasi histon di dalam *regio promoter* (A) dan *gene body* (B) dihitung untuk 100 kumpulan gen. Sumbu y menunjukkan level modifikasi histon dan sumbu x menunjukkan level ekspresi.

Dikutip dari Cui K, Zang C, Roh TY, Schones DE, Childs RW, Peng W, Zhao K. Chromatin signatures in multipotent human hematopoietic stem cells indicate the fate of bivalent genes during differentiation. *Cell Stem Cell* 2009; 4:80-93.



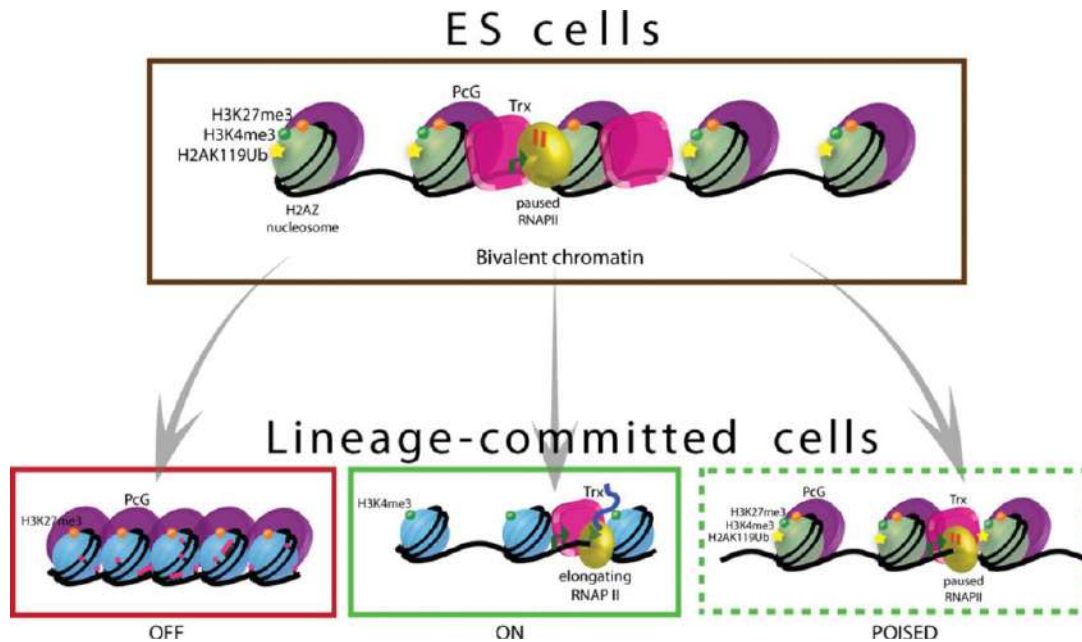
4. Stem Cell Differensiasi



**Gambar 7.** Aktivasi dan represi selama diferensiasi HSC berhubungan dengan perubahan modifikasi histon. Profil modifikasi histon pada gen induksi (A) dan represi (B) selama diferensiasi sel CD133+ (merah) menjadi sel CD36+ (hijau). *Tag density* untuk modifikasi ditunjukkan sepanjang *gene bodies* dan 50 kb dari *gene bodies* pada 5' dan 3'.  
 Dikutip dari Cui K, Zang C, Roh TY, Schones DE, Childs RW, Peng W, Zhao K. *Chromatin signatures in multipotent human hematopoietic stem cells indicate the fate of bivalent genes during differentiation. Cell Stem Cell* 2009; 4:80-93.

Aktivasi dan represi gen selama diferensiasi HSC dari sel CD133+ menjadi CD36+ meliputi profil modifikasi kromatin pada kelompok gen yang diinduksi dan direpresi. Profil modifikasi yang relatif berhubungan dengan *transcriptional start sites* (TSS) menunjukkan pola yang sama untuk gen yang selalu diekspresikan antara sel CD133+ dan CD36. *Active mark* meliputi H3K4me1, H3K9me1, H3K27me1, H3K36me3 dan H4K20me1 meningkat, sedangkan *repressive mark* seperti H3K27me3 menurun pada gen yang diinduksi di dalam sel CD36+ (Gambar 7A).<sup>53</sup> Sebaliknya profil perubahan berlawanan dapat diamati pada *repressive genes* (Gambar 7B).<sup>53</sup> Level H3K4me3 dan H2A.Z terutama terdapat pada regio promoter, menunjukkan perubahan ringan sesuai dengan pola ekspresi, sedangkan Pol II menunjukkan perubahan signifikan pada regio promoter dan *gene body* sesuai dengan pola ekspresi.

*Bivalent domains* pertama kali diidentifikasi sebagai regio H3K27me yang mengandung regio H3K4me yang lebih kecil, terletak di *transcriptional start sites*.<sup>57</sup> Ekspresi gen bivalent selama perkembangan membuat ekspresi gen dalam kondisi *poised* atau kondisi *primed* yang siap untuk aktivasi cepat atau *silencing* stabil pada waktu diferensiasi sel hematopoietik.<sup>58</sup> Protein PRC2 (Polycomb repressive complex 2) dan trithorax group (trxG) menandai gen *promoter* yang meregulasi perkembangan dengan *bivalent domains* terdiri dari modifikasi histon represif dan aktivasi yang saling tumpang tindih dan mempertahankan regulator perkembangan dalam kondisi “poised” untuk aktivasi *embryonic stem cell* (ESC) (Gambar 8)<sup>57,58,59,60,61</sup> Pada *adult stem cell*, regulator perkembangan mengatur spesifikasi *lineage* dengan epigenetik dalam keadaan represif untuk mempertahankan multipotensi.<sup>62</sup>



**Gambar 8.** *Bivalent chromatin domains* menandai gen yang penting dalam pluripotent ES cell. Protein PRC2 dan TrxG masing-masing mengkatalisis tri-methylation histone H3 on lysine 27 (H3K27me3) dan 4 (HeK4me3). Ketika terjadi diferensiasi, *bivalent histone mark* dapat mengalami modifikasi monovalent dengan gen dalam 'on' or 'off'. *Bivalent domain* juga dapat mempertahankan *lineage-committed cell* yang baru terbentuk.

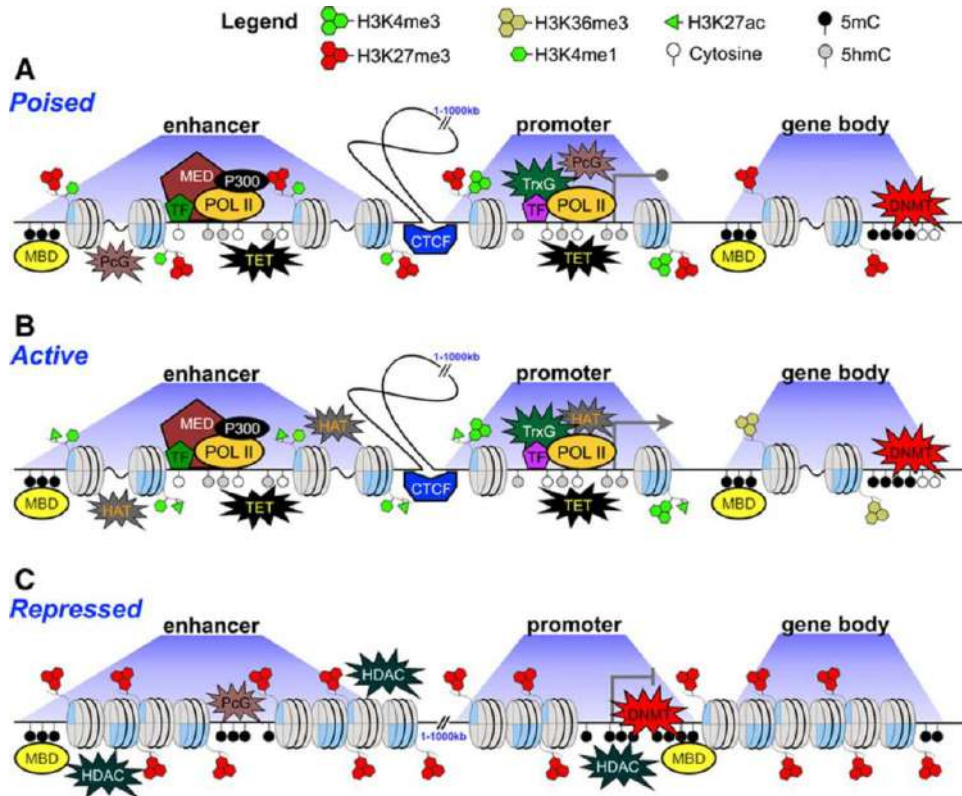
Dikutip dari Sha K, Boyer LA. *The chromatin signature of pluripotent cells*. *Stembook.org*.

*Promoter* yang mengelilingi *transcriptional start sites* berlaku sebagai mesin transkripsi dan tempat RNAPII menyatu selama insiasi transkripsi. Secara umum, dibagi atas status CpG content/metilasi DNA dan modifikasi histon sebagai aktif, represisi atau *poised* (Gambar 5).<sup>63</sup> Gen aktif memiliki *promoter* diperkaya dengan H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac, 5hmC dan yang tidak memiliki 5mc. Sebaliknya *promoter* dengan gen represif adalah H3K27me3 dan H3K9me3, dan 5 mC. *Poised genes*, baik dalam kondisi aktif atau represif selama perkembangan mempunyai *bivalent promoter*, ditandai dengan adanya H3K4me3 dan H3K37me3.<sup>55</sup>

*Enhancer* yang berjumlah sekitar 400.000 di dalam genom manusia berdasarkan analisis modifikasi histon terletak dekat dengan *transcription start site*,<sup>64</sup> mempunyai panjang 200-400 bp.<sup>55</sup> Secara keseluruhan, enhancer yang diperkaya pada DNase I *hypersensitivity* sites dan *histone acetyltransferase* memberikan struktur kromatin yang aktif atau terbuka.<sup>65</sup> Sebagian besar *enhancer* diikat oleh faktor transkripsi multipel. Kompleks mediator, koaktivator transkripsi sering dijumpai pada *enhancer*. Kompleks mediator adalah kompleks multiprotein besar yang diperlukan untuk merekrut RNAP II ke promoter dari gen target yang diregulasi enhancer.<sup>66</sup>

*Enhancer* dapat dibedakan dari *promoter* berdasarkan modifikasi histon. Sama seperti promoter, modifikasi histon dapat digunakan untuk mengelompokkan sebagai aktif, *poised*, atau represif (Gambar 9).<sup>63</sup> Misalnya, meskipun *promoter* dan enhancer sama-sama memiliki H3K27ac, *enhancer* diperkaya H3K4me1, yang berlawanan dengan H3K4me3 yang terlihat pada *promoter*.

Hematopoietic stem cell (HSC) dan **hematopoietic** progenitor cell (HPC) berada dalam kondisi *primed* untuk diferensiasi menjadi *lineage* multipel dengan ekspresi bersama dengan berbagai faktor transkripsi, faktor pertumbuhan, dan reseptornya yang terlibat didalam *lineages* sebelum komitmen menjadi *lineage* yang spesifik.<sup>67</sup> Profil ekspresi gen sebelumnya telah mengkonfirmasi adanya faktor penting di dalam HSC.<sup>68,69,70</sup> Meskipun HSC menunjukkan heterogenisitas dalam ekspresi gen antar sel individu, koekspresi dengan faktor lain dalam satu sel tunggal telah pernah dilaporkan.<sup>71,72</sup> Karena itu, multipotensi HSC dan HPC dapat dihubungkan dengan potensi ekspresi, meskipun dalam level rendah dengan keterlibatan berbagai gen dalam perkembangan *lineage* multipel.<sup>53</sup> Timbul pertanyaan : Apa yang mempertahankan potensi aktivasi dan *silencing* gen ini ?<sup>53</sup>



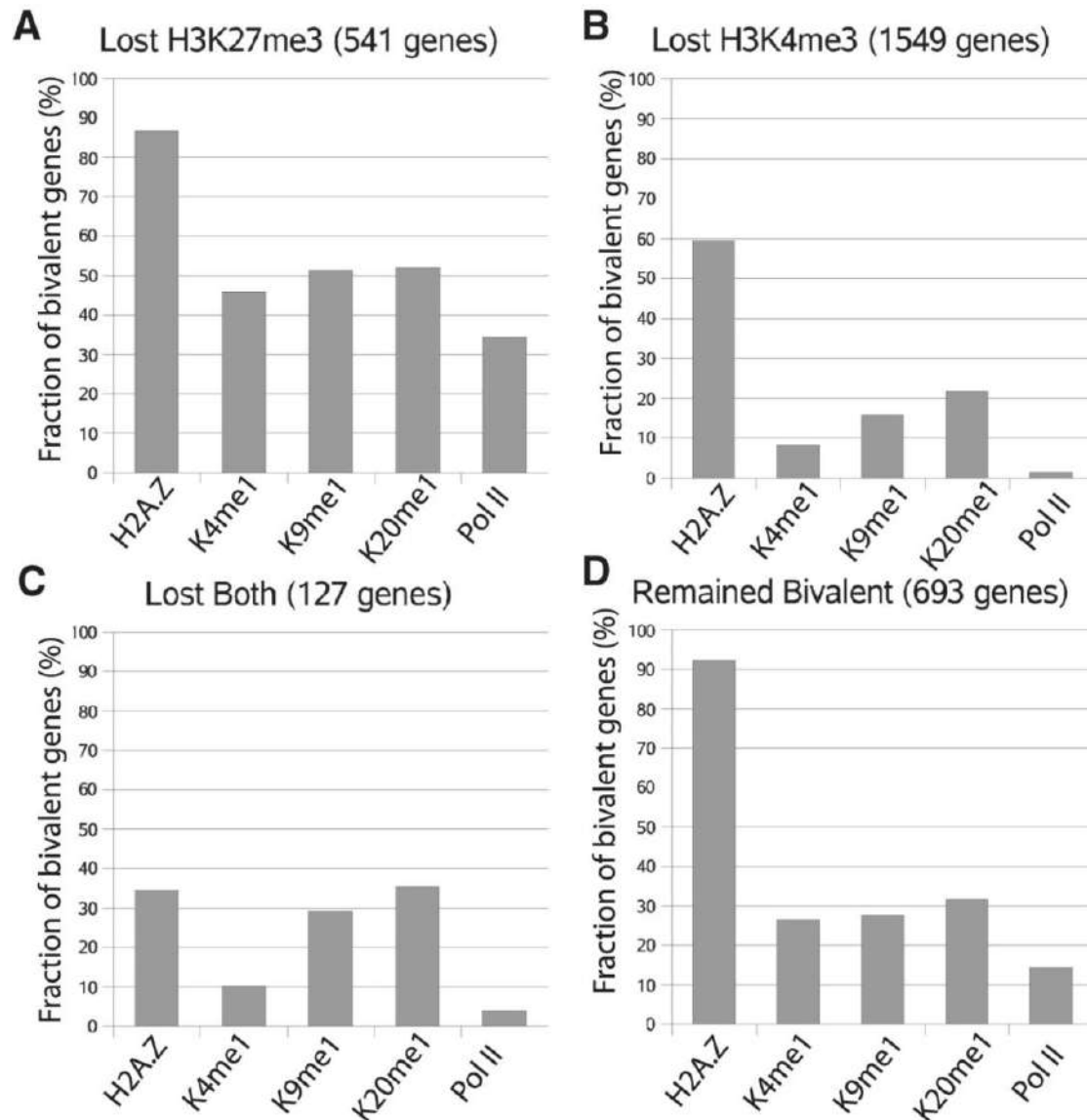
**Gambar 9.** Pengaturan epigenetik dan remodeling pada elemen pengaturan selama perkembangan. A. *Poised enhancer/promoter* terutama dijumpai pada stem cell pluripoten, memiliki modifikasi kromatin epigenetik dengan transkripsi aktif (tanda hijau) dan represif (tanda merah). Misalnya, protein TrxG dan polycomb group (PcG) masing-masing mengkatalisis H3K4me3 dan H3K27me3, terletak pada *poised promoter*. *Poised regulatory element* biasanya tidak mempunyai 5-methylcytosine (5mC) dan 5-hydroxymethylcytosine (5hmC). *Poised enhancer* dapat dibedakan dari *poised promoter* dengan adanya *enhancer-specific mark*, H3K4me, dan terikat pada kompleks Mediator chromatin oleh CCCTC-binding factor (CTCF) pada *distal poised (active) enhancer* dan *promoter*. B. Transisi dari *poised* ke *active regulatory elements* melibatkan hilangnya lokalisis PcG dan demetilasi dan asetilasi H3K27. Gain H3K36me3 di dalam *gene body* juga diamati dalam aktivasi gen. C. Pembentukan heterokromatin berhubungan dengan represi gen. Hal ini dimediasi sebagian oleh hilangnya modifikasi histon represif (H3K4me1, H3K27ac, and 5hmC), pembentukan *repressive mark*, seperti H3K27me3 dan 5mC, konstiksi nuklesom.

DNMT, DNA methyltransferase; HAT, histone acetyltransferase; HDAC, histone deacetylase; MBD, methyl-DNA binding domain protein; MED, mediator complex; PcG, polycomb group complex; POL II, RNA polymerase II; TET, ten eleven translocation dioxygenase; TF, transcription factor; TrxG, trithorax group complex.

Dikutip dari Boland MJ, Nazor KL, Loring JF. Epigenetic regulation of pluripotency and differentiation. *Circ Res.* 2014;115:311-324.

H3K4me3 berhubungan dengan gen aktif sedangkan H3K27me3 berhubungan dengan gen *silent* di dalam CD4+ T cell.<sup>73,74</sup> Koeksistensi H3K4me3 dan H3K27me3 berhubungan dengan penurunan ekspresi gen di dalam CD4+ T cell.<sup>73,74,75</sup> Koeksistensi kedua modifikasi kromatin memberikan mekanisme apakah aktivasi atau represi gen dipertahankan dalam kondisi seimbang. Studi pada ESC menunjukkan bahwa modifikasi bivalen mempertahankan aktivasi atau *silencing* pada gen diferensiasi.<sup>57,76</sup> Diketahui bahwa beberapa *bivalent genes* dapat kehilangan H3K4me3 sedang yang lain kehilangan H3K27me3 selama diferensiasi sel. Cui

et al., melaporkan bahwa 19% *bivalent genes* kehilangan H3K27me3 dan menjadi aktif selama diferensiasi menjadi sel CD36+ (Gambar 10).<sup>53</sup> Sebagian besar gen ini berhubungan dengan modifikasi H3K4me1 dan H3K9me1 pada stadium HSC/HPC dan terikat dengan RNA Pol II, menunjukkan bahwa modifikasi berada dalam kondisi *poised* atau siap untuk aktivasi, yang kehilangan H3K4 me3 setelah diferensiasi. Pol II tidak dideteksi di dalam *promoter*. Hasil ini menunjukkan bahwa nasib *bivalent genes* selama diferensiasi diatur oleh modifikasi kromatin meliputi monometilasi yang terjadi pada stadium HSC/HPS.<sup>53</sup>



**Gambar 10.** Nasib *bivalent genes* setelah diferensiasi dihubungkan dengan pola modifikasi kromatin pada HSC/HPC. Fraksi *bivalent genes* berhubungan dengan H2A.Z, H3K4me1, H3K9me1, H4K20me1, dan Pol II dan ditunjukkan kehilangan H3K27me3 (A), kehilangan H3K4me3 (B), kehilangan kedua (C), or bivalent menetap (D) setelah diferensiasi.

Dikutip dari Cui K, Zang C, Roh TY, Schones DE, Childs RW, Peng W, Zhao K. Chromatin signatures in multipotent human hematopoietic stem cells indicate the fate of bivalent genes during differentiation. *Cell Stem Cell* 2009; 4:80-93.

## REGULASI EPIGENETIK TERHADAP DIFERENSIASI SEL PADA EMBRYONIC STEM CELL

*Embryonic stem cell* (ESC) berasal dari *inner cell mass* pada embrio preimplantasi ditandai adanya *self-renewal* dan diferensiasi menjadi semua tipe sel untuk perkembangan seluruh jaringan dan organ embrio.<sup>76</sup> Pada tingkat molekuler, ES cell memiliki

ekspresi faktor transkripsi Oct4, Sox2, dan Nanog, yang termasuk gen pluripoten yang diperlukan untuk *self-renewal*.<sup>77</sup> Pemeriksaan dengan mikroskop elektron menunjukkan bahwa kromatin pada ES cell lebih homogen, dan relaksasi daripada kromatin dengan sel terdiferensiasi, yang lebih padat.<sup>78</sup> Studi biokimia terhadap struktur kromatin dengan *nuclease digestion* menunjukkan reduksi kondensasi pada ES cell yang tidak terdiferensiasi.<sup>76</sup> Analisis

dengan Western blot menunjukkan bahwa marker heterokromatin H3K9me3 diperkaya pada sel terdiferensiasi.<sup>79</sup> Analisis dengan *genome-wide chromatin immunoprecipitation* (ChIP) on chip atau chromatin immunoprecipitation diikuti dengan *deep sequencing* (ChIP-seq) menunjukkan jumlah heterokromatin H3K9me3 lebih tinggi pada sel terdiferensiasi dan penurunan H3K9ac setelah diferensiasi ES cell.<sup>80,81</sup> Gen pluripoten pada ES cell yang tidak terdiferensiasi bersifat eukromatin dengan kondisi transkripsi aktif, sebaliknya gen yang berhubungan dengan diferensiasi adalah heterokromatin dengan transkripsi *silent*.<sup>76</sup> Konfigurasi ulang pada struktur kromatin selama diferensiasi ES cell dengan regio eukromatin pada gen pluripoten mengalami transformasi menjadi heterokromatin, dan sebaliknya, regio kromatin yang berhubungan dengan gen diferensiasi menjadi eukromatin kembali ke pluripoten. Karena itu, faktor kromatin yang membawa transisi eukromatin dan heterokromatin tampaknya memegang peranan penting dalam *self-renewal* dan penentuan nasib sel (diferensiasi sel) (Gambar 11).<sup>76</sup>

Epigenom pluripoten stem cell sangat berbeda dengan sel somatik. Ketika membandingkan pola modifikasi histon dan metilasi DNA antara sel terdiferensiasi dengan ESC, Hawkins et al., memperkirakan bahwa kurang lebih sepertiga dari jumlah genom dalam struktur kromatin berbeda.<sup>81</sup> Perbedaan ini disebabkan oleh perbedaan ikatan faktor transkripsi dan keadaan remodeling kromatin selama diferensiasi.<sup>81,82</sup> Misalnya, sel terdiferensiasi mempunyai regio lebih besar ditandai oleh H3K9me3 dan H3K27me3 dibandingkan dengan ESC.<sup>81</sup> Domain H3K9me3 dan H3K27me3 secara signifikan lebih besar (2-3 kali lipat) dalam fibroblast dan limfosit T dibandingkan dengan ESC, sedangkan domain H3K36me3 sama antara ESC dengan sel terdiferensiasi.<sup>81,83</sup> Domain H3K27me3 mengalami *remodeled* menjadi seperti ESC selama *reprogramming*.<sup>78</sup> Hal ini menunjukkan bahwa ekspansi domain H3K27me3 mengikuti diferensiasi sel.<sup>63</sup>

Bernstein et al., menunjukkan bahwa ES cell mengandung bivalen dengan analisis *chromatin immunoprecipitation* diikuti dengan *deep sequencing*,<sup>57</sup> dan menunjukkan bahwa regio pengaturan utama yang banyak mengandung faktor transkripsi terlibat dalam *lineage commitment* yang berhubungan dengan modifikasi kromatin aktif H4K3me3 dan modifikasi kromatin silent

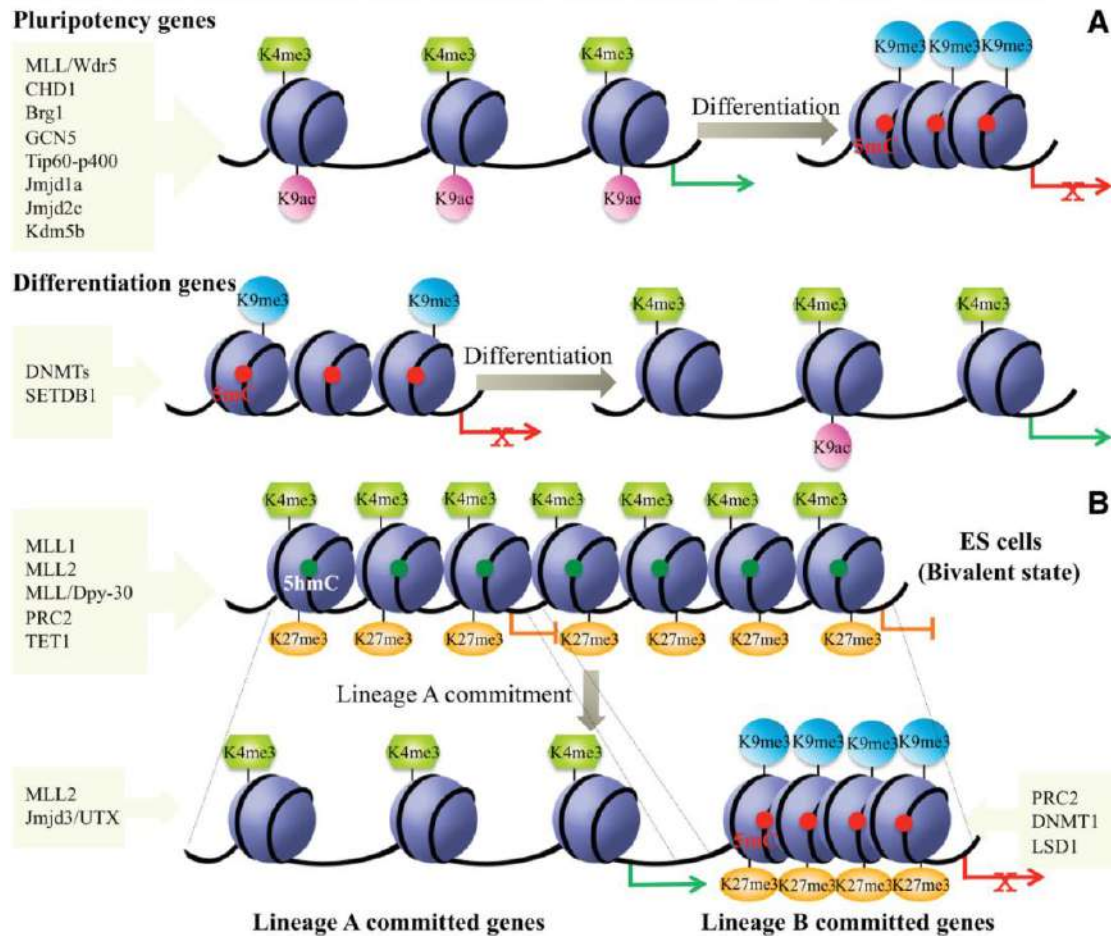
H3K27me3. 5hmC juga diidentifikasi sebagai marker epigenetik aktif untuk kromatin bivalen.<sup>84</sup> *Bivalent domain* pada gen yang diperlukan untuk komitmen ES cell mengalami diferensiasi tetap *silenced*, berisikan H3K27me3, H3K9me3, dan 5mc metilasi DNA, yang membawa kromatin dalam keadaan stabil (Gambar 11).<sup>85,86,87</sup>

Bivalent domain pada ESC sering mengadakan transisi menjadi H3K27me3 yang berekspansi menjadi *lineage-committed cell*, sehingga H3K27me3 terdapat di dalam genom pada 40% sel terdiferensiasi dibandingkan dengan ESC sebanyak kurang lebih 8%.<sup>83</sup> Diferensiasi mengakibatkan penkayaan H3K27me3 yang terjadi pada tipe sel yang spesifik. Represi yang dimediasi oleh Polycomb merupakan mekanisme penting yang menentukan nasib sel sehingga mendukung hasil diferensiasi dengan lanskap kromatin yang semakin dibatasi.<sup>81,83,89</sup> Sebagian besar *bivalent domain* pada ESC yang tidak terdiferensiasi berubah menjadi status monovalen pada sel yang menjadi *lineage* tertentu.<sup>82,89</sup> Sebagai contoh, diferensiasi kardiomyosit dari ESC memerlukan banyak faktor transkripsi kunci seperti GATA6, GATA4, NKX2.5, HAND2, TBX5 dengan *signaling* molekul (BMP2 dan WNT5a) terlibat dalam perkembangan kehilangan H3K27me3 secara bertahap dan peningkatan H3K4me3 sejalan dengan transkripsi ketika diferensiasi berlangsung.<sup>90,91</sup> Sebaliknya, diferensiasi jantung memerlukan represi epigenetik yang dimediasi EZH2 pada faktor transkripsi untuk maturasi kardiomyosit.<sup>91,92</sup> Kehilangan H3K3me2/me3 biasanya diikuti munculnya metilasi DNA.<sup>82</sup>

Pada *embryonic stem cell* (ES) cell yang tidak terdiferensiasi, faktor kromatin yang bersifat *write*, *read* dan *erase* metilasi DNA diekspresi dengan tinggi, dengan deteksi level metilasi DNA yang tinggi.<sup>93,94</sup> Pada waktu diferensiasi ES cell dengan *lineage commitment*, terjadi redistribusi metilasi DNA, yang mempengaruhi diferensiasi dan pemeliharaan identitas tipe sel.<sup>95,96,97,98</sup> Perubahan metilasi DNA terutama terjadi pada regio *promoter* dengan gen stem cell yang spesifik.

Pergeseran keseimbangan antara hidrosimetilasi dan metilasi DNA sepanjang genom dihubungkan dengan pluripotensi dan *lineage commitment*.<sup>84,96</sup> Keseimbangan antara pluripotensi dan *lineage commitment* tergantung pada aktivitas TET dan TDG. Kedua protein bekerja berlawanan dengan metilasi DNA *de novo* sehingga berkontribusi terhadap pemeliharaan regio kromatin bivalen yang aktif.<sup>84,96,98,99</sup>





**Gambar 11.** Mekanisme epigenetik yang terlibat dalam *self-renewal* dan diferensiasi embryonic stem (ES) cell. A, Perubahan modifikasi epigenetik selama diferensiasi ES cell yang aktif terletak di dalam regio kromatin ditandai dengan H3K4me3 dan H3K9ac. Gen diferensiasi ditranskripsi dalam kondisi *silent* dan terletak di dalam regio heterokromatin ditandai oleh H3K9me3 dan 5mC. Konfigurasi ulang pada struktur kromatin berhubungan dengan gen pluripotensi, ditransformasikan menjadi heterokromatin. Sebaliknya, gambaran terjadi pada regio kromatin yang berhubungan dengan diferensiasi. Modifier kromatin yang membawa transisi eukromatin dan heterokromatin meliputi DNA methyltransferase (DNMT); histone methyltransferase SETDB1, MLL/Wdr5 complex; histone demethylase Jmjd1a, Jmjd2c, Kdm5b; histone acetyltransferase GCN5; dan ATP-dependent chromatin remodeling complex CHD1, Brg1, Tip60-p400 complex. B, *Bivalent chromatin domains* dan kontrol epigenetik terhadap *lineage commitment*. Pada sel pluripotent, gen *lineage commitment* berada dalam keadaan *poised* dan menunjukkan modifikasi epigenetik bivalen: H3K4me3 aktif dan H3K27me3 represif. 5hmC terjadi juga pada *bivalent domains*. Pada *lineage commitment*, gen yang mengatur *cell lineage* mempertahankan H3K4me3, menghilangkan H3K27me3, dan menjadi aktif. Gen yang mengatur *lineages* lain mempertahankan H3K27me3, peningkatan H3K9me3 dan 5mC, dan menjadi *silence*. Modifier kromatin yang mengatur *bivalent chromatin domain* meliputi DNA methyltransferase DNMT1; TET1; histone methyltransferase; demethylase complex MLL/Dpy-30, MLL/Jmjd3/UTX complex, PRC2 complex, dan LSD1.

Dikutip dari Zhou Y, Kim J, Yuan X, Braun T. Epigenetic modifications of stem cells. A paradigm for the control of cardiac progenitor cells. *Circ Res*. 2011;109:1067-1081.

Modifikasi histon yang banyak diteliti adalah metilasi H3K4 dan H3K27. Regulasi metilasi H3K4 oleh *histone methyltransferase* dan *demethylase* meliputi perubahan struktur kromatin dan *bivalent chromatin domain* selama diferensiasi ES cell. Metilasi H3K4 dikatalisir oleh trithorax group (TrxG) MLL/set1 MLL/Set1 (myeloid/lymphoid or

mixed-lineage leukemia) complexes (MLL complexes). MLL complexes mempertahankan gen dalam keadaan aktif selama penentuan nasib sel.<sup>100,101</sup> Beberapa MLL complexes telah diidentifikasi di dalam ES cell, yang mengandung subunit katalitik berbeda (hSet1, MLL1, MLL2, MLL3, atau MLL5 dan beberapa subunit inti.<sup>102</sup> Depleksi beberapa unit

inti dapat mengurangi level metilasi H3K4. Hilangnya MLL1 dan MLL2 tidak mengganggu metilasi H3K3 global dan tidak meregulasi *self-renewal* pada ES cell tetapi berperan pada koordinasi dan waktu diferensiasi.<sup>103,104</sup>

Metilasi H3K27 dikatalisir oleh PRC2 (Polycomb repressive complex 2), yang termasuk famili protein PcG (Polycomb group), terlibat dalam *silencing gene* atau mempertahankan *silent gene* dalam kondisi “poised” sebelum aktivasi gen selama diferensiasi EC cell.<sup>105</sup> Analisis genome-wide menunjukkan bahwa beberapa protein PRC2 lebih condong berikatan dengan *silent genes* yang terlibat dalam regulasi perkembangan. Protein PRC2 tidak penting dalam *self-renewal* ES cell tetapi berperan dalam diferensiasi (Gambar 11),<sup>76</sup> karena ES cell yang kehilangan PRC2 protein Suz12 (suppressor of zeste 12 homolog), Ezh1/Ezh2 (enhancer of zeste homolog 1/2), and Jarid2 (Jumonji, AT-rich interactive domain 2) masih bisa berkembang biak dalam kondisi tidak terdiferensiasi pada kultur.<sup>106,107,108</sup> Demikian juga, menghilangkan H3K27me3 oleh histone demethylase Jmjd3 (Jumonji domain-containing 3) dan UTX (ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome) yang hanya diperlukan untuk diferensiasi sel tetapi bukan *self-renewal*, menunjukkan bahwa regulasi metilasi H3K27 dalam regulasi ES cell bersifat dinamik.<sup>109,110</sup>

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Wu J, Belmonte JCI. Stem cells: A renaissance in human biology research. *Cell* 2016; 165: 1572-1585
2. Seita J, Weissman IL. Hematopoietic Stem Cell: Self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2010 ; 26: 640-653.
3. Daley GQ. Hematopoietic stem cell. In : In : Lanza R, Atala A. eds *Essentials of stem cell biology*. Elsevier Inc. 2014; p.219-226.
4. Till JE, Mc CE. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*. 1961; 14:213–222.
5. Becker AJ, Mc CE, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 1963;197:452-454.
6. Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies. *J Cell Physiol*. 1963; 62:327–336.
7. Wu AM, et al. Cytological evidence for a relationship between normal hemopoietic colony forming cells and cells of the lymphoid system. *J Exp Med*. 1968; 127:455- 464.
8. Till JE, McCulloch EA, Siminovitch L A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1964; 51:29.
9. Nakahata T, Gross AJ, Ogawa M: A stochastic model of selfrenewal and commitment to differentiation of the primitive hemopoietic stem cells in culture. *J Cell Physiol* 1982; 113:455.
10. Nakahata T, Ogawa M: Identification in culture of a class of hemopoietic colony-forming units with extensive capability to selfrenew and generate multipotential colonies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:3843.
11. Civin CI, et al. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surfacantigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol*. 1984; 133:157–165.
12. DiGiusto D, et al. Human fetal bone marrow early progenitors for T, B, and myeloid cells are found exclusively in the population expressing high levels of CD34. *Blood*. 1994; 84:421-432.
13. Krause DS, et al. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*. 1996; 87:1-13
14. Michallet M, et al. Transplantation with selected autologous peripheral blood CD34+Thy1+ hematopoietic stem cells (HSCs) in multiple myeloma: impact of HSC dose on engraftment, safety, and immune reconstitution. *Exp Hematol*. 2000; 28:858-870.
15. Negrin RS, et al. Transplantation of highly purified CD34+Thy-1+ hematopoietic stem cells in patients with metastatic breast cancer. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2000; 6:262–271.
16. Vose JM, et al. Transplantation of highly purified CD34+Thy-1+ hematopoietic stem cells in patients with recurrent indolent non-Hodgkin's lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2001; 7(12):680–687.
17. Uchida N, et al. HIV, but not murine leukemia virus, vectors mediate high efficiency gene transfer into freshly isolated G0/G1 human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(20):11939-11944
18. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: An evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 2008; 132:

- 631-644.
19. Doulatov S, Notta F, Laurenti E, John E, Dick JE. Hematopoiesis: A human perspective. *Cell Stem Cell* 2012; 10: 120-136.
  20. Morrison SJ, Weissman IL. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity*. 1994; 1:661-673.
  21. Christensen JL, Weissman IL. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98:14541-14546.
  22. Osawa M, et al. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34<sup>low</sup>/negative hematopoietic stem cell. *Science*. 1996; 273:242-245.
  23. Kiel MJ, et al. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 2005; 121:1109-1121.
  24. Serwold T, Ehrlich LI, Weissman IL. Reductive isolation from bone marrow and blood implicates common lymphoid progenitors as the major source of thymopoiesis. *Blood*. 2009; 113:807-815.
  25. Karsunky H, et al. Flk2<sup>+</sup> common lymphoid progenitors possess equivalent differentiation potential for the B and T lineages. *Blood*. 2008; 111:5562-5570.
  26. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*. 1997; 91:661-672.
  27. Akashi K, et al. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 2000; 404 :193-197.
  28. Pronk CJ, et al. Elucidation of the phenotypic, functional, and molecular topography of a myeloerythroid progenitor cell hierarchy. *Cell Stem Cell*. 2007; 1:428-442.
  29. Muller-Sieburg CE, Whitlock CA, Weissman IL. Isolation of two early B lymphocyte progenitors from mouse marrow: a committed pre-pre-B cell and a clonogenic Thy-1<sup>lo</sup> hematopoietic stem cell. *Cell*. 1986; 44(4):653-662.
  30. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. 1988; 241(4861):58-62.
  31. Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA, Lemischka IR. A stem cell molecular signature. *Science* 2002; 298, 601-604.
  32. Ji H, Ehrlich LI, Seita J, Murakami P, Doi A, Lindau P, Lee H, Aryee MJ, Irizarry RA, Kim K, et al. Comprehensive methylome map of lineage commitment from haematopoietic progenitors. *Nature* 2010; 467: 338-342.
  33. Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA. "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science* 2002; 298: 597-600.
  34. Baum CM, et al. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89 :2804-2808.
  35. Hao QL, et al. Extended long-term culture reveals a highly quiescent and primitive human hematopoietic progenitor population. *Blood*. 1996; 88 :3306-3313.
  36. Huang S, Terstappen LW. Lymphoid and myeloid differentiation of single human CD34<sup>+</sup>, HLADR<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup> hematopoietic stem cells. *Blood*. 1994; 83:1515-1526.
  37. Miller JS. Single adult human CD34(+)/Lin<sup>-</sup>/CD38(-) progenitors give rise to natural killer cells, B-lineage cells, dendritic cells, and myeloid cells. *Blood*. 1999; 93 :96-106.
  38. Uchida N, et al. HIV, but not murine leukemia virus, vectors mediate high efficiency gene transfer into freshly isolated G0/G1 human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95 :11939-11944.
  39. Kang Y, Chao NJ, Aversa, F. Unmanipulated or CD34 selected haplotype mismatched transplants. *Curr. Opin. Hematol*. 2008;15: 561-567.
  40. Vogel W, Scheduling S, Kanz L, Brugger W. Clinical applications of CD34(+) peripheral blood progenitor cells (PBPC). *Stem Cells* 2000; 18: 87-92.
  41. Reya T, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001; 414:105-111.
  42. Weissman I. Stem cell research: paths to cancer therapies and regenerative medicine. *JAMA*. 2005; 294:1359-1366.
  43. Batard P, et al. TGF-(beta)1 maintains hematopoietic immaturity by a reversible negative control of cell cycle and induces CD34 antigen up-modulation. *J Cell Sci*. 2000; 113:383-390.
  44. Garbe A, et al. Transforming growth factor-beta 1 delays formation of granulocyte-macrophage colony-forming cells, but spares more primitive progenitors during ex vivo

- expansion of CD34+ haematopoietic progenitor cells. *Br J Haematol.* 1997; 99:951–958.
45. Sitnicka E, et al. Transforming growth factor beta 1 directly and reversibly inhibits the initial cell divisions of long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Blood.* 1996; 88:82–88.
  46. Fortunel N, et al. High proliferative potential-quiet cells: a working model to study primitive quiescent hematopoietic cells. *J Cell Sci.* 1998; 111:1867-1875.
  47. Hatzfeld J, et al. Release of early human hematopoietic progenitors from quiescence by antisense transforming growth factor beta 1 or Rb oligonucleotides. *J Exp Med.* 1991;174:925–929.
  48. Soma T, Yu JM, Dunbar CE. Maintenance of murine long-term repopulating stem cells in vivo is affected by modulation of transforming growth factor-beta but not macrophage inflammatory protein-1 alpha activities. *Blood.* 1996; 87:4561–4567.
  49. Puri MC, Bernstein A. Requirement for the TIE family of receptor tyrosine kinases in adult but not fetal hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100:12753–12758.
  50. Arai F, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell.* 2004; 118:149-161.
  51. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: A landscape takes shape. *Cell* 2007; 128: 635-638.
  52. Shen X, Orkin SH. Glimpses of the epigenetic landscape. *Cell* 2009; 4: 1-2.53. Cui K, Zang C, Roh TY, Schones DE, Childs RW, Peng W, Zhao K. Chromatin signatures in multipotent human hematopoietic stem cells indicate the fate of bivalent genes during differentiation. *Cell Stem Cell* 2009; 4;80-93.
  53. Cui K, Zang C, Roh TY, Schones DE, Childs RW, Peng W, Zhao K. Chromatin signatures in multipotent human hematopoietic stem cells indicate the fate of bivalent genes during differentiation. *Cell Stem Cell* 2009; 4;80-93.
  54. Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1995; 11:35-71.
  55. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997; 90: 5002-5012.
  56. Giarratana MC, Kobari L, Lapillonne H, Chalmers D, Kiger L, Cynober T, Marden MC, Wajcman H, Douay L. Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 2005; 23, 69–74.
  57. Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell.* 2006;125:315–326.
  58. Sha K, Boyer LA. The chromatin signature of pluripotent cells. ebook, stemcell.org, p.1-21.
  59. Sharma S, Gurudutta G. Epigenetic regulation of hematopoietic stem cells. *Int J Stem Cells.* 2016; 9:36-43.
  60. Spivakov M, Fisher AG. Epigenetic signatures of stem-cell identity. *Nat. Rev. Genet.* 2007; 8: 263-271.
  61. Mendenhall EM, Bernstein BE. Chromatin state maps: New technologies, new insights. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2008; 18: 109-115.
  62. Pietersen AM, van Lohuizen M. Stem cell regulation by polycomb repressors: Postponing commitment. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2008; 20: 201-207.
  63. Boland MJ, Nazor KL, Loring JF. Epigenetic regulation of pluripotency and differentiation. *Circ Res.* 2014;115:311-324.
  64. Bernstein BE, Birney E, Dunham I, Green ED, Gunter C, Snyder M; ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 2012;489:57-74.
  65. Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, Fu Y, Ching CW, Hawkins RD, Barrera LO, Van Calcar S, Qu C, Ching KA, Wang W, Weng Z, Green RD, Crawford GE, Ren B. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet.* 2007;39:311-318.
  66. Kornberg RD. Mediator and the mechanism of transcriptional activation. *Trends Biochem Sci.* 2005;30:235-239.
  67. Hu M, Krause D, Greaves M, Sharkis S, Dexter M, Heyworth C, Enver T. Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes Dev.* 1997; 11: 774-785.
  68. Zhu J, Emerson SG. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene* 2002; 21: 3295-3313.
  69. Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y,



- Mulligan RC, Melton DA. “Stemness”: transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science* 2002; 298:597-600.
70. Venezia TA, Merchant AA, Ramos CA, Whitehouse NL, Young AS, Shaw CA, Goodell MA. Molecular signatures of proliferation and quiescence in hematopoietic stem cells. *PLoS Biol.* 2004; 2, e301.
  71. Ramos CA, Bowman TA, Boles NC, Merchant AA, Zheng Y, Parra I, Fuqua SA, Shaw CA, Goodell MA. Evidence for diversity in transcriptional profiles of single hematopoietic stem cells. *PLoS Genet.* 2006; 2, e159.
  72. Warren L, Bryder D, Weissman IL, Quake SR. Transcription factor profiling in individual hematopoietic progenitors by digital RT-PCR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006;103:17807-17812.
  73. Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 2007;129, 823-837.
  74. Roh TY, Cuddapah S, Cui K, Zhao K. The genomic landscape of histone modifications in human T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006;103 :15782-15787.
  75. Wang Z, Zang C, Rosenfeld JA, Schones DE, Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Peng W, Zhang Q, Zhao K. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat. Genet.* 2008; 40: 897–903.
  76. Zhou Y, Kim J, Yuan X, Braun T. Epigenetic modifications of stem cells. A paradigm for the control of cardiac progenitor cells. *Circ Res.* 2011;109:1067-1081.
  77. Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell.* 2008;132:567–582.
  78. Park SH, Kook MC, Kim EY, Park S, Lim JH. Ultrastructure of human embryonic stem cells and spontaneous and retinoic acid-induced differentiating cells. *Ultrastruct Pathol.* 2004;28:229–238.
  79. Meshorer E, Yellajoshula D, George E, Scambler PJ, Brown DT, Misteli T. Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells. *Dev Cell.* 2006;10:105–116.
  80. Wen B, Wu H, Shinkai Y, Irizarry RA, Feinberg AP. Large histone H3 lysine 9 dimethylated chromatin blocks distinguish differentiated from embryonic stem cells. *Nat Genet.* 2009;41:246–250.
  81. Hawkins RD, Hon GC, Lee LK, Ngo Q, Lister R, Pelizzola M, Edsall LE, Kuan S, Luu Y, Klugman S, Antosiewicz-Bourget J, Ye Z, Espinoza C, Agarwahl S, Shen L, Ruotti V, Wang W, Stewart R, Thomson JA, Ecker JR, Ren B. Distinct epigenomic landscapes of pluripotent and lineage-committed human cells. *Cell Stem Cell.* 2010;6:479-491.
  82. Gifford CA, Ziller MJ, Gu H, et al. Transcriptional and epigenetic dynamics during specification of human embryonic stem cells. *Cell.* 2013;153:1149–1163.
  83. Zhu J, Adli M, Zou JY, et al. Genome-wide chromatin state transitions associated with developmental and environmental cues. *Cell.* 2013;152:642–654.
  84. Pastor WA, Pape UJ, Huang Y, Henderson HR, Lister R, Ko M, McLoughlin EM, Brudno Y, Mahapatra S, Kapranov P, Tahiliani M, Daley GQ, Liu XS, Ecker JR, Milos PM, Agarwal S, Rao A. Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells. *Nature.* 2011;473:394–397.
  85. Jackson M, Krassowska A, Gilbert N, Chevassut T, Forrester L, Ansell J, Ramsahoye B. Severe global DNA hypomethylation blocks differentiation and induces histone hyperacetylation in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.* 2004;24:8862–8871.
  86. Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, Brambrink T, Medeiros LA, Lee TI, Levine SS, Wernig M, Tajonar A, Ray MK, Bell GW, Otte AP, Vidal M, Gifford DK, Young RA, Jaenisch R. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature.* 2006; 441:349–353.
  87. Bilodeau S, Kagey MH, Frampton GM, Rahl PB, Young RA. SetDB1 contributes to repression of genes encoding developmental regulators and maintenance of ES cell state. *Genes Dev.* 2009;23:2484-2489.
  88. Xie W, Schultz MD, Lister R, et al. Epigenomic analysis of multilineage differentiation of human embryonic stem cells. *Cell.* 2013;153:1134-1148.
  89. Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, et al. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature.* 2007;448:553-560.
  90. Paige SL, Thomas S, Stoick-Cooper CL, Wang H, Maves L, Sandstrom R, Pabon L, Reinecke H, Pratt G, Keller G, Moon RT, Stamatoyannopoulos J, Murry CE. A temporal chromatin signature in human embryonic stem



- cells identifies regulators of cardiac development. *Cell*. 2012;151:221–232.
91. Stergachis AB, Neph S, Reynolds A, Humbert R, Miller B, Paige SL, Vernot B, Cheng JB, Thurman RE, Sandstrom R, Haugen E, Heimfeld S, Murry CE, Akey JM, Stamatoyannopoulos JA. Developmental fate and cellular maturity encoded in human regulatory DNA landscapes. *Cell*. 2013;154:888–903.
  92. Delgado-Olguín P, Huang Y, Li X, Christodoulou D, Seidman CE, Seidman JG, Tarakhovskiy A, Bruneau BG. Epigenetic repression of cardiac progenitor gene expression by Ezh2 is required for postnatal cardiac homeostasis. *Nat Genet*. 2012;44:343–347.
  93. Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*. 2010;466:1129–1133.
  94. Meissner A, Gnirke A, Bell GW, Ramsahoye B, Lander ES, Jaenisch R. Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Res*. 2005;33: 5868–5877.
  95. Bibikova M, Laurent LC, Ren B, Loring JF, Fan JB. Unraveling epigenetic regulation in embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008;2: 123–134.
  96. Ficiz G, Branco MR, Seisenberger S, Santos F, Krueger F, Hore TA, Marques CJ, Andrews S, Reik W. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature*. 2011;473:398–402.
  97. Wu H, D'Alessio AC, Ito S, Wang Z, Cui K, Zhao K, Sun YE, Zhang Y. Genome-wide analysis of 5-hydroxymethylcytosine distribution reveals its dual function in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Genes Dev*. 2011;25:679–684.
  98. Koh KP, Yabuuchi A, Rao S, Huang Y, Cunniff K, Nardone J, Laiho A, Tahiliani M, Sommer CA, Mostoslavsky G, Lahesmaa R, Orkin SH, Rodig SJ, Daley GQ, Rao A. Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2011;8:200–213.
  99. Cortazar D, Kunz C, Selfridge J, Lettieri T, Saito Y, MacDougall E, Wirz A, Schuermann D, Jacobs AL, Siegrist F, Steinacher R, Jiricny J, Bird A, Schar P. Embryonic lethal phenotype reveals a function of TDG in maintaining epigenetic stability. *Nature*. 2011;470:419–423.
  100. Krivtsov AV, Armstrong SA. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer*. 2007;7: 823–833.
  101. Young RA. Control of the embryonic stem cell state. *Cell*. 2011;144: 940–954.
  102. Dou Y, Milne TA, Tackett AJ, Smith ER, Fukuda A, Wysocka J, Allis CD, Chait BT, Hess JL, Roeder RG. Physical association and coordinate function of the H3 K4 methyltransferase MLL1 and the H4 K16 acetyltransferase MOF. *Cell*. 2005;121:873–885.
  103. Lubitz S, Glaser S, Schaft J, Stewart AF, Anastassiadis K. Increased apoptosis and skewed differentiation in mouse embryonic stem cells lacking the histone methyltransferase MLL2. *Mol Biol Cell*. 2007;18: 2356–2366.
  104. Ernst P, Fisher JK, Avery W, Wade S, Foy D, Korsmeyer SJ. Definitive hematopoiesis requires the mixed-lineage leukemia gene. *Dev Cell*. 2004;6:437–443.
  105. Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*. 2011;469:343–349.
  106. Peng JC, Valouev A, Swigut T, Zhang J, Zhao Y, Sidow A, Wysocka J. Jarid2/Jumonji coordinates control of PRC2 enzymatic activity and target gene occupancy in pluripotent cells. *Cell*. 2009;139:1290–1302.
  107. Shen X, Liu Y, Hsu YJ, Fujiwara Y, Kim J, Mao X, Yuan GC, Orkin SH. EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency. *Mol Cell*. 2008;32:491–502.
  108. Pasini D, Bracken AP, Hansen JB, Capillo M, Helin K. The Polycomb group protein Suz12 is required for embryonic stem cell differentiation. *Mol Cell Biol*. 2007;27:3769–3779.
  109. De Santa F, Totaro MG, Prosperini E, Notarbartolo S, Testa G, Natoli G. The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing. *Cell*. 2007;130: 1083–1094.

110. Agger K, Cloos PA, Christensen J, Pasini D, Rose S, Rappsilber J, Issaeva I, Canaani E, Salcini AE, Helin K. UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature*. 2007;449:731-734.

## 5

# Differensiasi Reprogram Sel

PENDAHULUAN	109
REPROGRAMMING JANTUNG SECARA LANGSUNG	111
REGULATOR EPIGENETIK	114
MIKRO RNA	114
MOLEKUL KECIL	117
REPROGRAMMING IN VIVO UNTUK REGENERASI JARINGAN	120

“Ideas are like rabbits. You get a couple and learn how to handle them, and pretty soon you have a dozen”

-John Steinbeck-

## PENDAHULUAN

Reprogram sel dapat didefinisikan sebagai upaya untuk menghasilkan tipe sel yang berfungsi normal dari satu jenis sel terdiferensiasi menjadi sel lain tanpa melewati stadium pluripotensi, <sup>1</sup> yang bertujuan untuk menghasilkan sel yang diinginkan untuk keperluan kedokteran regeneratif jangka panjang.<sup>2</sup> Reprogram sel melibatkan penggunaan faktor transkripsi, regulator epigenetik, microRNA, molekul kecil, yang bekerja secara langsung melakukan reprogram satu sel somatik (sel yang sudah terdiferensiasi) menjadi sel lain. <sup>3</sup>Teknologi ini memungkinkan untuk dilakukan karena melibatkan suatu *networking* gen aktif selama proses perubahan yang menginduksi pergeseran lanskap epigenetik, sehingga dapat dihasilkan diferensiasi sel yang baru. Dengan demikian, *reprogramming* sel dapat ditujukan untuk mengubah sel residen di dalam organ yang rusak untuk diregenerasikan menjadi tipe sel secara *in situ* (*setempat*) sehingga dapat mengembalikan fungsi organ.<sup>3</sup>

Konsep sel terdiferensiasi bersifat plastisitas yang dapat direprogram menjadi sel lain pertama kali

digagas dalam eksperimen kloning oleh Gurdon, <sup>4</sup> kemudian dilanjutkan Wilmot, <sup>5</sup> yang menghasilkan seekor domba bernama Dolly. <sup>5</sup>Dalam penelitian ini, faktor yang belum diketahui di dalam sitoplasma oosit menginduksi sel somatik menjadi sel embrionik. Sel embrionik berkembang menjadi fetus, dan akhirnya lahir satu organisme yang hidup. Pengamatan ini merupakan cikal bakal lahirnya reprogram sel secara *in vivo*.<sup>3</sup>

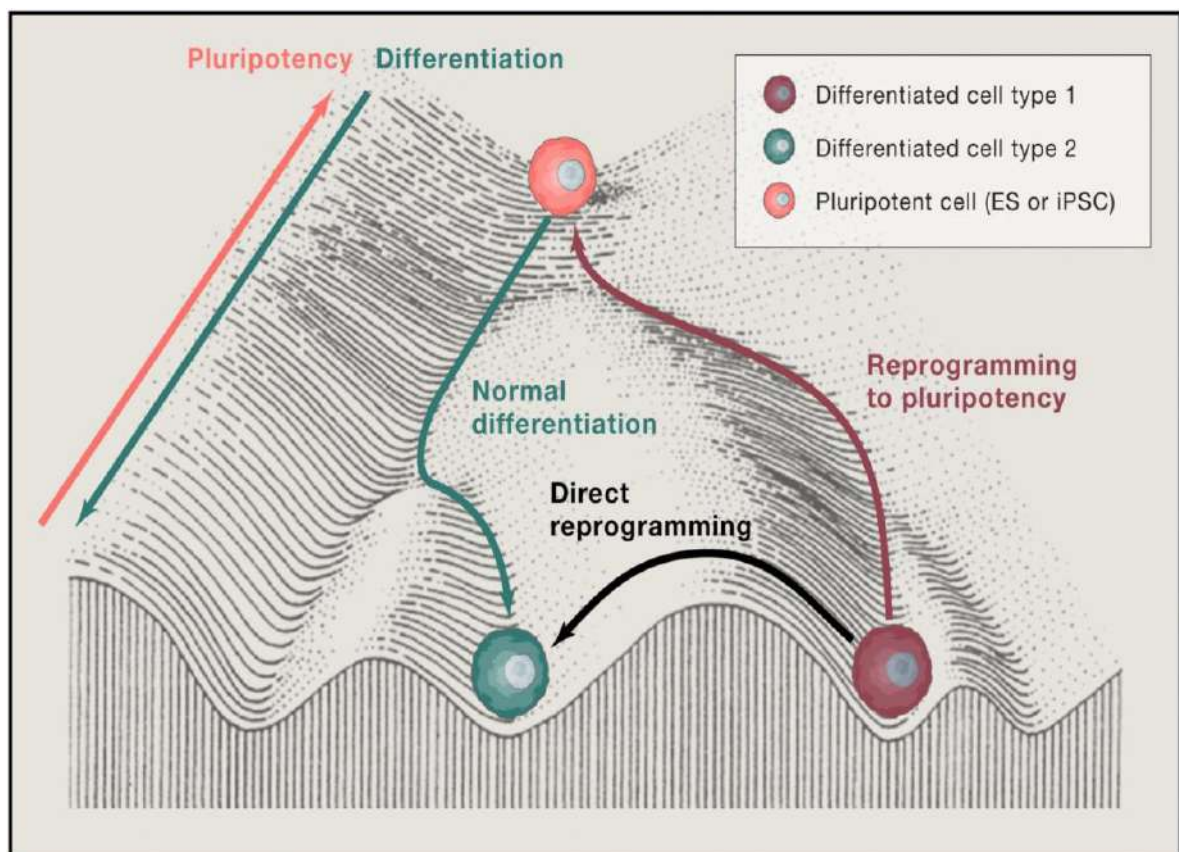
Hampir tiga puluh tahun yang lalu, Davis et al. menggunakan mioblast cDNA tunggal yang menyandi faktor transkripsi MyoD, mengubah fibroblast secara langsung menjadi mioblast. <sup>6</sup> Dengan keberhasilan ini, lahir “direct reprogramming” secara *in vitro*. Penemuan ini sejalan dengan observasi bahwa reprogram nukleus dapat mengubah fibroblast secara cepat setelah berfusi dengan miosit. <sup>7</sup> Setelah itu, diteliti berbagai jenis sel lain, namun gagal mengubah fibroblast menjadi sel lain karena tidak mengekspresikan faktor transkripsi yang menyerupai MyoD. Terakhir ditemukan C/EBPα yang mengubah sel limfosit menjadi sel mieloid untuk sistem hematopoietik. <sup>8</sup>

Nasib sel yang sulit diubah setelah terbentuk sel terdiferensiasi akhirnya dapat ditemukan pemecahan melalui satu *landmark study* oleh Yamanaka, yang menggunakan empat faktor pengubah gen sebagai penentu nasib sel somatik menjadi sel pluripotensi.<sup>9</sup> Kombinasi ini membuka jalan untuk mengetahui aktivitas *reprogramming* nukleus. Mekanisme yang mendasari perubahan nasib sel secara epigenetik dapat dibaca di Bab 3. Akhir-akhir ini, kombinasi “kode” transkripsi secara langsung dapat mereprogram sel menjadi tipe sel yang berfungsi khusus, sehingga mengubah model diferensiasi sel yang dikemukakan oleh Waddington. (Gambar 1).<sup>10</sup>

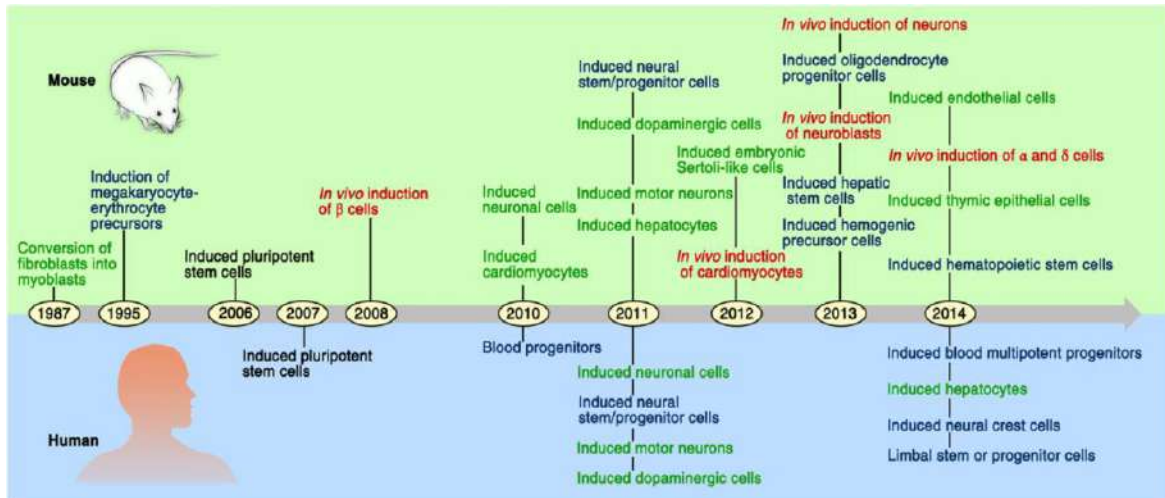
Studi yang dipelopori Yamanaka mengisyaratkan bahwa diferensiasi bukanlah akhir kematian perkembangan sel, melainkan dapat dikembalikan ke fungsi awal sebagai stem cell pluripoten dengan kondisi primitif dengan cara mengubah status

genetik dan epigenetik sehingga mengubah ekspresi gen dan status kromatin selama *reprogramming* dari sel somatik menjadi *induced pluripotent stem cell* (iPSC).<sup>11</sup> Sehingga studi iPSC meletakkan fondasi “reprogramming” dalam teknologi transformatif ilmu biomedik.<sup>3</sup>

Sejak penemuan Yamanaka, maka dikembangkan penggunaan kombinasi faktor transkripsi sel yang menghasilkan insulin dari pankreas sehingga dapat mengatur kondisi hiperglikemia pada model mencit diabetik.<sup>12</sup> Induksi sel neuron dengan faktor transkripsi membuktikan bahwa konversi dapat dilakukan di luar dari lapisan germinal.<sup>13</sup> *Reprogramming* menggunakan kombinasi faktor transkripsi juga telah menghasilkan tipe sel lain seperti hepatosit, dan kardiomyosit.<sup>14,15,16</sup> Sampai saat ini, sejumlah tipe sel yang telah berhasil dilakukan dari *lineage reprogramming* baik pada mencit maupun manusia (Gambar 2).<sup>1</sup>

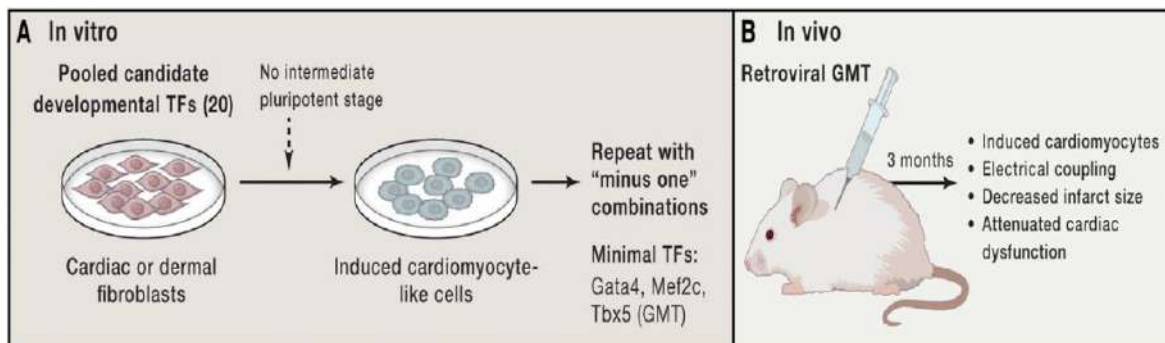


**Gambar 1.** Model Waddington dimodifikasi untuk reprogram sel. Menurut Conrad Waddington bahwa nasib sel diibaratkan sebagai suatu bola yang sedang menggelinding melewati beberapa lembah yang menggambarkan tipe sel terdiferensiasi penuh. Transfer nukleus dan reprogram menunjukkan bahwa sel dapat digelindingkan mencapai puncak melalui perubahan epigenetik pada sel sehingga dapat menjelajah ke atas dan ke bawah dari satu lembah ke lembah lain. Dikutip dari Ladewig J, Mertens J, Kesavan J, Doerr J, Poppe D, Glaue F, Herms, S, Wernet P, Kögler G, Müller F.J, et al. *Small molecules enable highly efficient neuronal conversion of human fibroblasts. Nat. Methods* 2012;9, 575–578.



**Gambar 2.** Perkembangan *lineage reprogramming*. Kemajuan dalam perkembangan *lineage reprogramming* diberi warna berbeda; hijau, biru, dan merah dengan masing-masing menunjukkan induksi tipe sel dengan diferensiasi terminal, stem cell progenitor/precursor, dan *in vivo lineage reprogramming*. Teks di atas menunjukkan waktu kejadian studi pada mencit, sedangkan di bawah menunjukkan waktu kejadian pada manusia.

Dikutip dari Xu J, Du Y, Deng H. Direct lineage reprogramming: strategies, mechanisms, and applications. *Cell Stem Cell* 2015; 16: 119-134.



**Gambar 3.** Skematik pendekatan dalam mengidentifikasi faktor pengatur yang melakukan *reprogramming* direk secara *in vitro* dan *in vivo* menggunakan *reprogramming* jantung. (A) Metode skrining mendapatkan faktor transkripsi yang secara langsung mengubah fibroblast menjadi sel menyerupai kardiomyosit. (B) Pengujian faktor *reprogramming* secara *in vivo* menjadi sel baru dalam kondisi injuri. Penggunaan faktor *reprogramming* secara *in vivo* menghasilkan konversi fibroblast residen menjadi sel menyerupai kardiomyosit dengan interaksi elektrik yang berkontribusi meningkatkan fungsi jantung setelah injuri.

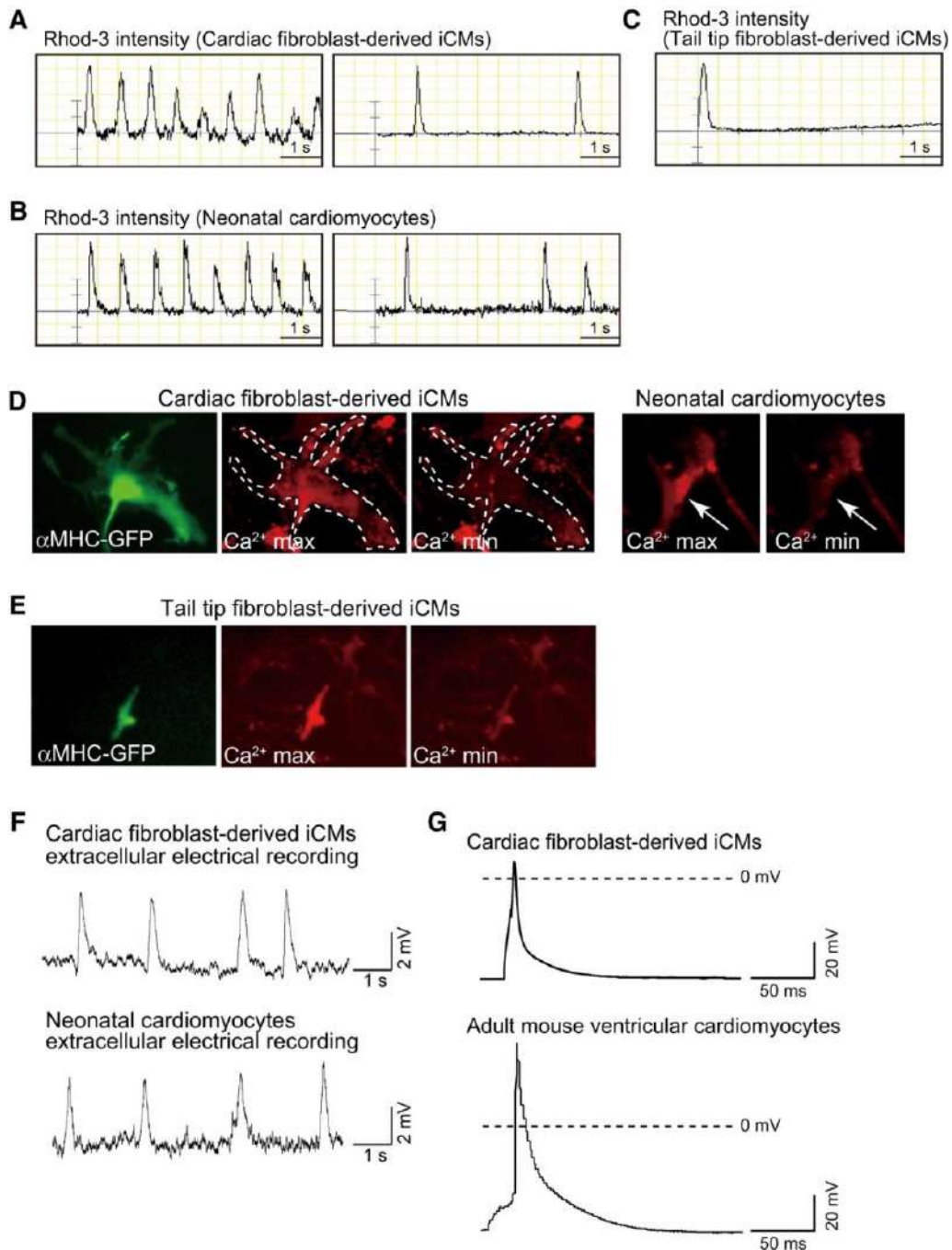
Dikutip dari Srivastava D, DeWitt N. *In vivo cellular reprogramming: the next generation*. 2016;166: 1386-1396.

### REPROGRAMMING JANTUNG SECARA LANGSUNG

Ieda et al., menggunakan kombinasi 3 faktor transkripsi perkembangan jantung - Gata4, Mef2c, dan Tbx5 (GMT), mereprogram fibroblast kulit atau jantung menjadi sel menyerupai kardiomyosit (Gambar 3).<sup>3</sup> Ketiga faktor *reprogramming*, Gata4, Mef2c, dan Tbx5 merupakan faktor transkripsi pada waktu awal

perkembangan jantung.<sup>17,18,19</sup> Faktor-faktor ini berinteraksi satu sama lain, koaktif terhadap ekspresi gen jantung (misalnya, Nppa, Gja5 [Cx40], dan Myh6) dan meningkatkan diferensiasi kardiomyosit.<sup>20, 21, 22, 23</sup> Gata4 dianggap sebagai faktor “pioneer” dalam membuka struktur kromatin dalam loki jantung,<sup>24</sup> sehingga memungkinkan ikatan dengan Mef2c dan Tbx5 pada tempat target yang spesifik, selanjutnya mengakibatkan aktivitas terhadap program jantung.<sup>16</sup>



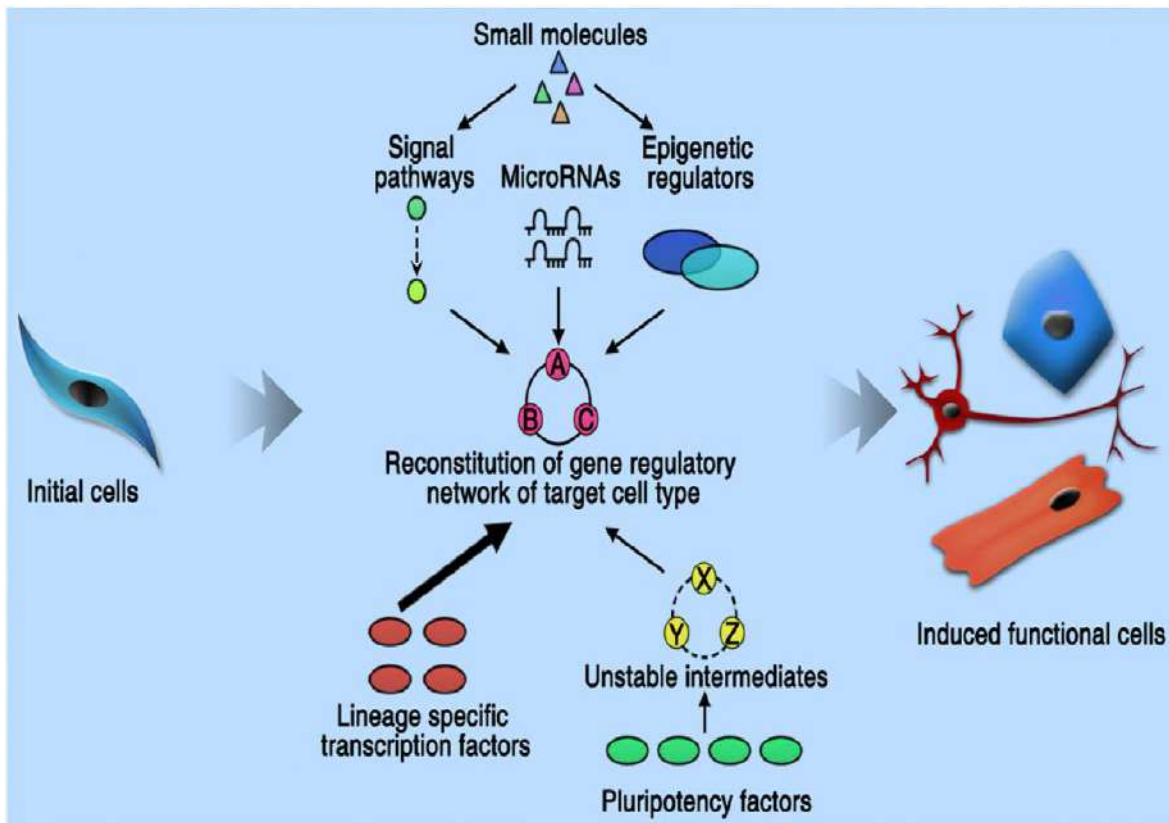


**Gambar 4.** *Induced cardiomyocyte* (iCM) memperlihatkan denyutan spontan, dengan  $\text{Ca}^{2+}$  fluks dan aktivitas elektrik. (A dan B) iCM yang diperoleh dari fibroblast jantung menunjukkan osilasi  $\text{Ca}^{2+}$  dengan berbagai frekuensi (A), sama seperti kardiomyosit neonatus (B). Intensitas Rhod-3. (C) iCM yang diperoleh dari tail-tip dermal fibroblast (TTF) menunjukkan osilasi  $\text{Ca}^{2+}$  spontan dengan frekuensi rendah. (D) Gelombang  $\text{Ca}^{2+}$  spontan dapat diamati pada iCM MHC-GFP+ (dot putih) diperoleh dari fibroblast jantung atau kardiomyosit neonatus (tanda panah) dengan Rhod-3 pada  $\text{Ca}^{2+}$  max dan min. (E) Osilasi  $\text{Ca}^{2+}$  spontan diperoleh dari iCM MHC-GFP+ dengan Rhod-3 pada  $\text{Ca}^{2+}$  max dan min. (F) Kontraksi iCM spontan dengan aktivitas elektrik diukur menggunakan elektroda ekstraseluler. Kardiomyosit neonatus menunjukkan aktivitas elektrik yang sama. (G) Pencatatan elektrik intraseluler dari iCM yang diperoleh dari fibroblast jantung yang dikultur selama 10 minggu menunjukkan potensial aksi yang menyerupai kardiomyosit mencit dewasa. Dikutip dari Ieda M, Fu, JD., Delgado-Olguin P, Vedantham, V., Hayashi Y, Bruneau BG, and Srivastava D. (2010). Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 142, 375–386.

Ekspresi ektopik dari faktor ini memerlukan waktu 2 minggu dalam konversi fibroblast menjadi sel kardiomyosit, setelah kondisi epigenetik stabil yang ditandai dengan metilasi histon dan metilasi DNA. Namun ekspresi gen iCM global sama, dan tidak menyerupai kardiomyosit neonatus.<sup>16</sup> Dalam studi ini penggunaan GMT ini tidak melewati stadium progenitor jantung atau mesodermal, menunjukkan bahwa terjadi konversi direk dari satu tipe sel postnatal ke sel lain.<sup>3</sup> Sehingga *induced cardiomyocyte* (iCM) yang dihasilkan lebih menyerupai kardiomyosit ventrikel dewasa. iCM yang dihasilkan dapat berkontraksi spontan (Gambar 4).<sup>16</sup> Meskipun inisiasi *reprogramming* awal berlangsung cepat yaitu pada hari ke-3, dibandingkan dengan iPSC yang dipelopori Takahashi dan Yamanaka memerlukan waktu 10-20 hari, proses *reprogramming* berlanjut sampai beberapa minggu dengan perubahan pada ekspresi gen, kontraktilitas dan maturasi elektrofisiologi.<sup>16</sup>

*Reprogramming* yang mengkonversi fibroblast menjadi *induced pluripotent stem cell* (iPSC) oleh Yamanaka masih tergolong amat rendah (<0.1%), sedangkan efisiensi *reprogramming* direk secara *in vitro* tanpa melalui pembentukan stem cell lebih tinggi yaitu 20%, namun masih terbatas. Hal ini disebabkan sebagian besar iCM hanya direprogram parsial, berarti masih ada faktor lain yang dapat meningkatkan *reprogramming*, setidaknya secara *in vitro*.<sup>3</sup>

Penemuan akhir-akhir ini mendapatkan bahwa faktor alternatif termasuk regulator epigenetik, microRNA (miRNA) dan molekul kecil dapat digunakan dalam *lineage reprogramming* (Gambar 5).<sup>2</sup> Pemahaman mekanisme molekuler yang mendasari *lineage reprogramming* dapat bermanfaat karena faktor pengubah ini merupakan cara alternatif dalam mengubah nasib sel masa mendatang.<sup>2</sup>



**Gambar 5.** Faktor-faktor yang terlibat dalam *lineage reprogramming*. Faktor *reprogramming* termasuk faktor transkripsi spesifik, regulator epigenetik, miRNA, dan faktor pluripotensi dimanipulasi menjadi sel yang diinginkan. Efek *downstream* adalah pembentukan kembali GRN (gene regulatory network) dengan target tipe sel lain.

Dikutip dari Xu J, Du Y, Deng H. *Direct lineage reprogramming: strategies, mechanisms, and applications*. *Cell Stem Cell* 2015; 16: 119-134.

## REGULATOR EPIGENETIK

Regulasi epigenetik memegang peranan penting dalam membentuk dan mempertahankan identitas sel selama *reprogramming* perkembangan dan *reprogramming* sel.<sup>25</sup> Studi akhir-akhir ini terhadap diferensiasi jantung pada *embryonic stem cell* secara *in vitro* menunjukkan bahwa gen jantung memerlukan pengaturan struktur kromatin secara terprogram.<sup>26,27</sup> Demikian juga *reprogramming* sel diikuti oleh perubahan terhadap lanskap epigenetik.<sup>28,29,30,31,32</sup> Zhou et al, mendapatkan bahwa efisiensi induced cardiomyocyte (iCM) yang rendah disebabkan oleh regulator epigenetik Bmi1 yang bekerja sebagai penghalang epigenetik selama fase awal *reprogramming* iCM,<sup>16</sup> karena Bmi1 secara langsung berikatan dengan regio gen kardiogenik termasuk Gata4 yang ditempati bersama oleh *polycomb repressive complex* (PRC). Dengan menghilangkan atau melakukan *knockdown* Bmi1 menyebabkan terlepasnya represi Gata4 secara endogen sehingga Gata4 dapat menginduksi denyutan terhadap iCM. Jadi, dengan *knockdown* Bmi1 menyebabkan hilangnya level H2AK119ub dan meningkatnya H3K4me3 pada loki jantung sehingga terjadi ekspresi gen kardiogenik.<sup>25</sup> Hal ini konsisten dengan penemuan sebelumnya bahwa monoubikuitilasi H2AK119 oleh PRC1 berhubungan dengan represi gen.<sup>33,34</sup> *Knockdown* Bmi1 juga merelaksasikan kromatin dan meningkatkan aksesibilitas DNA,<sup>35,36,37,38</sup> sehingga melepaskan represi terhadap Gata4. Dengan menghilangkan penghalang Bmi1 juga memungkinkan untuk menggunakan jumlah faktor transkripsi yang lebih kecil misalnya hanya MT (Mef2c, dan Tbx5).<sup>25</sup>

Penghalang epigenetik selama *reprogramming* iPSC juga diketahui.<sup>40,41</sup> Melakukan *knockdown* terhadap Plu1 dapat meningkatkan efisiensi *reprogramming*,<sup>42</sup> sedangkan melakukan *silencing* Plu1 mengurangi efisiensi *reprogramming* iCM, menunjukkan bahwa mekanisme pengaturan epigenetik berbeda antara *reprogramming* iPSC dengan *reprogramming* direk pada sel somatik ke sel lain.<sup>25</sup> Hal ini terjadi karena terdapat interaksi antara regulator epigenetik dengan faktor pengubah gen selama konversi lineage.<sup>2</sup>

Manipulasi regulator epigenetik saja dapat mengubah *lineage reprogramming*. Defisiensi DNA methyltransferase Dnmt1 pada sel  $\beta$  pankreas mengakibatkan konversi ke sel lain.<sup>28</sup> Analisis lebih lanjut mendapatkan bahwa Arx, suatu *master gene* mengalami reaktivasi pada sel  $\beta$  setelah mutasi Dnmt1.<sup>43</sup> Karena itu, menghilangkan metilasi DNA

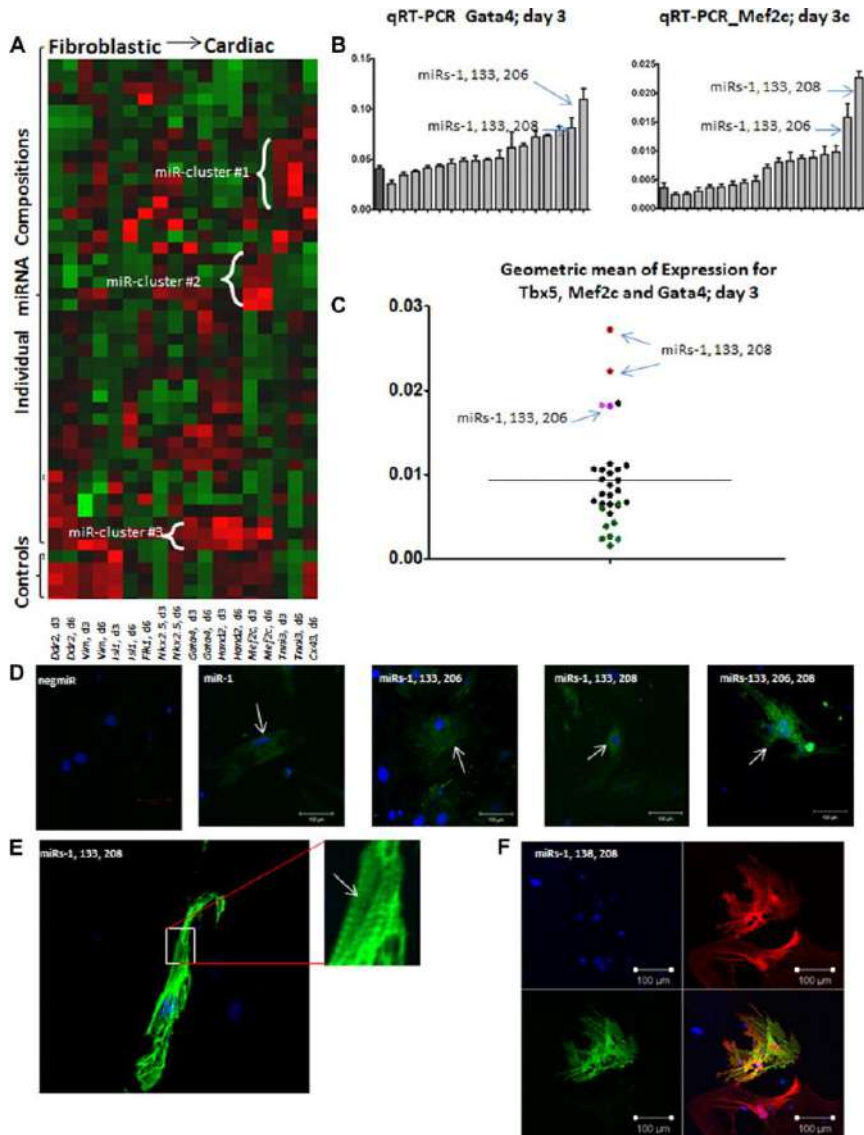
dapat mereaktivasi *master gene* dan cukup mengubah nasib sel. Selain itu, manipulasi terhadap *histone-modifying enzyme* dapat berpengaruh terhadap proses konversi lineage karena modifikasi histon juga berhubungan dengan keadaan kromatin aktif atau silent.<sup>44</sup>

## MIKRO RNA

Pada saat terjadi injuri jantung yang luas bersifat subletal, karena penyumbatan arteri koronaria ekstensif, maka regenerasi jantung yang tidak adekuat dengan fibrosis yang luas oleh jaringan fibroblast dapat mengakibatkan gangguan struktur dan fungsi jantung.<sup>45</sup> Kondisi hilangnya kardiomyosit yang masif sebagai akibat infark miokard ini dengan apoptosis pasca infark merupakan kontribusi utama terhadap progresivitas gagal jantung, dan menimbulkan perburukan terhadap miokardium yang masih viable.<sup>46</sup> Dengan penemuan bahwa regenerasi jantung dapat terjadi, maka penggunaan miRNA untuk mereprogram sel somatik ke sel lain secara langsung merupakan upaya yang menjanjikan.<sup>47</sup>

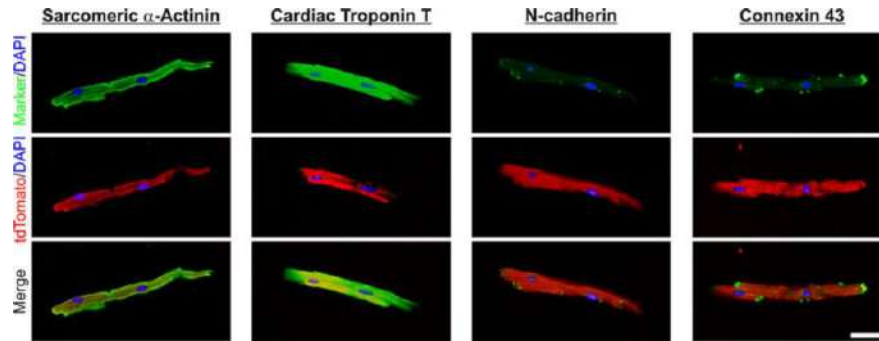
miRNA adalah *RNA noncoding* kecil yang dapat memodulasi ekspresi messenger RNA (mRNA) dengan melakukan ikatan basa antara beberapa nukleotida pada miRNA (the seed sequence) dengan sekuens komplementer di dalam open reading frame atau regio 3' untranslated dari target mRNA sehingga menyebabkan gangguan stabilitas mRNA atau inhibisi sintesis protein. MiRNA disintesis dari prekursor yang lebih panjang menjadi ~ 22 mers melalui kerja mikroprosesor dan enzim Dicer. Di dalam genom sering dijumlah miRNA dalam bentuk klaster dan diekspresikan dalam bentuk tipe sel yang spesifik, sama seperti faktor transkripsi. *Hal yang penting adalah bahwa setiap miRNA dapat menargetkan dan menekan ratusan mRNA; sehingga ekspresi satu miRNA dapat mengubah profil ekspresi dan identitas sel secara dramatis.*<sup>47</sup>

Barangkali kalimat terakhir inilah yang menginspirasi Jayawardena et al., dengan mentornya Victor Dzau melakukan skrining dan mendapatkan bahwa kombinasi miRNA (miRNAs 1, 133, 208, 499) mengubah fibroblast menjadi kardiomyosit secara *in vitro* dan *in vivo*, (Gambar 6)<sup>45</sup> dan efisiensi konversi dapat ditingkatkan sebesar 10 kali lipat dengan menggunakan JAK inhibitor. Sel yang direprogram menunjukkan gen kardiomyosit spesifik dan memperlihatkan susunan sarkomerik, osilasi kalsium spontan dan dengan fenotipe berciri khas menyerupai kardiomyosit.



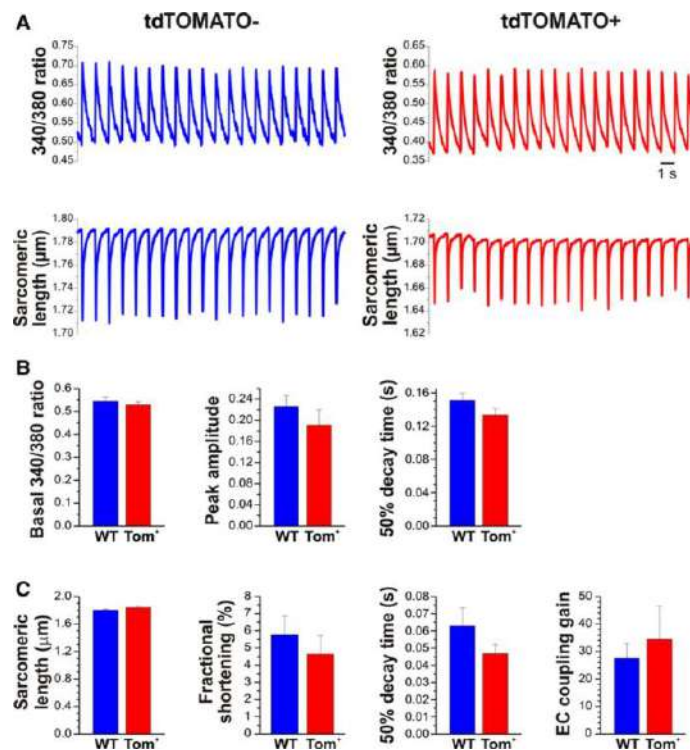
**Gambar 6.** Memasukkan microRNA ke dalam fibroblast jantung dapat menginduksi ekspresi marker kardiomyosit yang spesifik. A, Data ekspresi gen kumulatif fibroblast jantung dewasa yang ditransfeksi dengan miRNA dapat dilihat dalam bentuk *heat map*. Hasil ini memperlihatkan pergeseran dari fibroblastik (Ddr2 dan Vim) menjadi kardiomyosit awal (Isl1, Nkx2.5, Gata4, Hand2, Mef2c) dan ekspresi marker kardiomyosit lanjut (Tnni3, Cx43) antara hari 3 dan 6 setelah transfeksi. Lipatan perubahan ekspresi masing-masing gen ditunjukkan dalam skala hijau sampai hitam (hijau; minimum, merah; maksimum). B, Grafik bar menunjukkan profil ekspresi RNA Gata4 dan Mef2c pada fibroblast jantung pada hari ke 3 setelah transfeksi dengan kombinasi miRNA 1,133, 206 dan 1, 133, 208. Semua kombinasi miRNA diperlihatkan dengan bar abu-abu terang. Warna abu-abu gelap memperlihatkan rata-rata kontrol: untransfected, mock, dan nontargeting miRNA (negmiR). C, *Scatterplot* menunjukkan rata-rata ekspresi normal Gata4, Mef2c dan Tbx pada hari ke 3 setelah transfeksi. Terlihat miRS-1, 133, 208 (merah); dan miRs-1, 133, 206 (nila); mock, negmiR dan untranslated control (hijau); kombinasi miRNA 9hitam). D, Immunostaining ACTININ (hijau) dan DAPI positif (biru) pada fibroblast jantung neonatus 1 minggu setelah transfeksi dengan miR-1; miRs-1, 133, 206; miRs-1, 133, 208; dan miRs-133, 206, 208. Skala bar 100  $\mu$ m. E, Immunostaining TNNI3 (hijau) dengan DAPI positif (biru) pada fibroblast kardiomyosit neonatus 1 minggu setelah transfeksi dengan miRs-1, 133m 208. F, Immunostaining TNNI3 dari DAPI positif (biru) dari fibroblast jantung neonatus diisolasi dari mencit Fsp1Cre/tgTOMATO (merah), 4 minggu setelah transfeksi dengan miRs-1, 138, 208. Skala bar 100  $\mu$ m.

Dikutip dari Jayawardena TM, Egemazarov B, Finch, EA, Zhang L, Payne JA, Pandya K, Zhang Z, Rosenberg P, Mirotsoy M, and Dzau VJ. MicroRNA-mediated in vitro and in vivo direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes. *Circ. Res.* 2012;110, 1465–1473.



**Gambar 7.** Kombinasi mikroRNA (miR combo) mereprogram kardiomyosit yang mengekspresikan marker jantung matur. Tandem dimer Tomato 9tdTomato)+ kardiomyosit dengan imunostaining untuk sarcomeric- $\alpha$ -actinin, cardiac troponin-T, N-cadherin, and connexin-43 (hijau), bersama dengan tdTomato 9 merah P dan DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; biru). Image yang ditunjukkan meliputi tumpang tindih marker jantung dengan DAPI (atas), td Tomato dan DAPI (tengah) dan merger image marker, td Tomato, DAPI (bawah). Skala bar, 100 $\mu$ m.

Dikutip dari Jayawardena TM, Finch EA, Zhang L, Zhang H, Hodgkinson CP, Pratt RE, Rosenberg PB, Mirotsoiu M, and Dzau VJ. MicroRNA induced cardiac reprogramming in vivo: evidence for mature cardiac myocytes and improved cardiac function. *Circ. Res.* 2015;116, 418–424.



**Gambar 8.** Excitation-contraction (EC) coupling pada tandem dimer Tomato (tdTomato)<sup>+</sup> cardiac myocytes. A. Contoh representatif transien kalsium spontan dan kontraktilitas yang diperoleh dari kardiomyosit tdTomato<sup>-</sup> dan tdTomato<sup>+</sup> diberi muatan Fura-2 selama pacing pada 1 Hz dengan rangsangan elektrik. B, parameter kalsium transien diukur menggunakan kardiomyosit tdTomato<sup>-</sup> (wild type, n=22) dan tdTomato<sup>+</sup> (tom<sup>+</sup>; n=12) dilakukan pacing pada 1 Hz seperti pada A. C. Parameter kontraktilitas termasuk panjang sarkomerik (tdTomato<sup>-</sup> = 1.80  $\pm$  0.013; tdTomato<sup>+</sup> = 1.84  $\pm$  0.018; p=0.13), fractional shortening (tdTomato<sup>-</sup> = 5.77  $\pm$  1.08%; tdTomato<sup>+</sup> = 4.64  $\pm$  1.08%; p=0.51), dan contraction decay kinetics (tdTomato<sup>-</sup> = 0.063  $\pm$  0.011; tdTomato<sup>+</sup> = 0.047  $\pm$  0.0053; p=0.31)

EC coupling gain (fractioning shortening/calcium transient amplitude) menggambarkan hubungan antara amplitude transien kalsium dan kontraktilitas (tdTomato<sup>-</sup> = 27.5  $\pm$  5.5; dtTomato<sup>+</sup> = 34.4  $\pm$  12.0; p = 0.55). Tidak ada perbedaan pengukuran yang signifikan antara kardiomyosit dtTomato<sup>-</sup> dan dtTomato<sup>+</sup>.

Dikutip dari Jayawardena TM, Egemnazarov B, Finch EA, Zhang L, Payne JA, Pandya K, Zhang Z, Rosenberg P, Mirotsoiu M, and Dzau V.J. MicroRNA-mediated in vitro and in vivo direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes. *Circ. Res.* 2012;110, 1465–1473.



Studi selanjutnya dari kelompok Jayawardena yang dimuat di *Circulation Research* 2015, menunjukkan bahwa kombinasi miRNA (miRNAs 1, 133, 208, and 499; miR combo) berhasil mereprogram injuri miokardium menjadi kardiomiosit ventrikel matur (Gambar 7)<sup>48</sup> setelah disuntikan ke dalam otot jantung yang mengalami injuri dan terjadi perbaikan fungsi jantung secara progresif dibandingkan dengan kontrol dalam waktu 3 bulan. Hal ini menjelaskan potensi penggunaan miRNA sebagai suatu cara pendekatan meregenerasikan jantung setelah injuri miokard.<sup>48</sup>

Untuk menentukan apakah marker tdTomato+ sel yang menyerupai kardiomiosit berbentuk batang dari hasil konversi fibroblast (Gambar 7)<sup>48</sup> mengekspresikan protein kardiomiosit matur, maka dilakukan profiling immunositokimia. Troponin T jantung dan *sarcomeric- $\alpha$ actinin* terdapat pada kardiomiosit matur. Sedangkan connexin-43 dan N-cadherin, protein yang terlibat dalam komunikasi *gap-junctional* dan adhesi sel antara kardiomiosit, terletak pada membran kardiomiosit dengan tdTomato+, sama seperti kardiomiosit ventrikel dewasa yang normal (wild type).

Ketika diuji sifat elektrofisiologi tdTomato + berbentuk batang dengan tdTomato sel menyerupai kardiomiosit dari mencit transgenik yang disuntikan lentivirus yang mengekspresikan miRNAs 1, 133, 208, or 499 (miR combo) dalam waktu 5-6 minggu setelah injuri mendapatkan bahwa mayoritas sel tdTomato + menunjukkan sarkomer normal dengan transien kalsium cepat dan besar, dan kontraksi dalam respon terhadap depolarisasi. Hal ini menunjukkan bahwa sel yang menyerupai kardiomiosit tdTomato+ memperlihatkan *excitation-contraction coupling* (Gambar 8A).<sup>48</sup> Tidak ada perbedaan antara level kalsium sitosol atau amplitudo puncak dan *decay kinetics* dari depolarisasi yang ditimbulkan transien kalsium antara kardiomiosit tdTomato- dengan dtTomato+ (Gambar 8B).<sup>48</sup>

Dengan overekspresi miRNA miR-9/9\* and miR-124 saja pada fibroblast manusia dapat menginduksi sel menyerupai neuron yang mengekspresi marker MAP2, dan difasilitasi oleh NEUROD2, juga dibutuhkan faktor transkripsi berupa ASCL1 dan MYT1L untuk meningkatkan pembentukan fungsi neuron yang diinduksi.<sup>49</sup> Overekspresi miR-124 juga menginduksi sel neuron manusia yang dimediasi overekspresi via BRN2 dan MYT1L.<sup>50</sup>

Meskipun penelitian menunjukkan bahwa konversi sel dapat dimediasi miRNA, namun mekanisme molekuler yang mendasari proses ini belum diketahui. miRNA mengatur target melalui represi,<sup>51</sup> namun bagaimana miRNA mengaktifasi ekspresi *master gene* untuk target tipe sel merupakan pertanyaan yang belum mendapat jawaban. Kemungkinan adalah bahwa overekspresi miRNA mengurangi regulator *master gene* yang diekspresikan pada awal perkembangan atau transisi sel, yang mengganggu keseimbangan *master regulator* dari *lineage* yang lain. Misalnya miR-124 spesifik untuk neuron mengurangi ratusan level transkrip non-neuron meskipun diekspresikan di dalam sel non-neuron.<sup>52</sup> Inhibisi ini juga menghambat *master gene* non-neuron dan menggeser keseimbangan ke arah ekspresi *master gene* neuron, sehingga menyebabkan konversi neuron. Kemungkinan lain adalah penurunan regulasi ekspresi regulator epigenetik yang meningkatkan perubahan epigenetik global secara *in vitro* dan *in vivo*. Misalnya, miR-124 secara langsung mengatur ekspresi Ezh2, histon H3 lys-27 histone methyltransferase, yang memfasilitasi ekspresi gen target Exh2 spesifik terhadap neuron.<sup>53</sup>

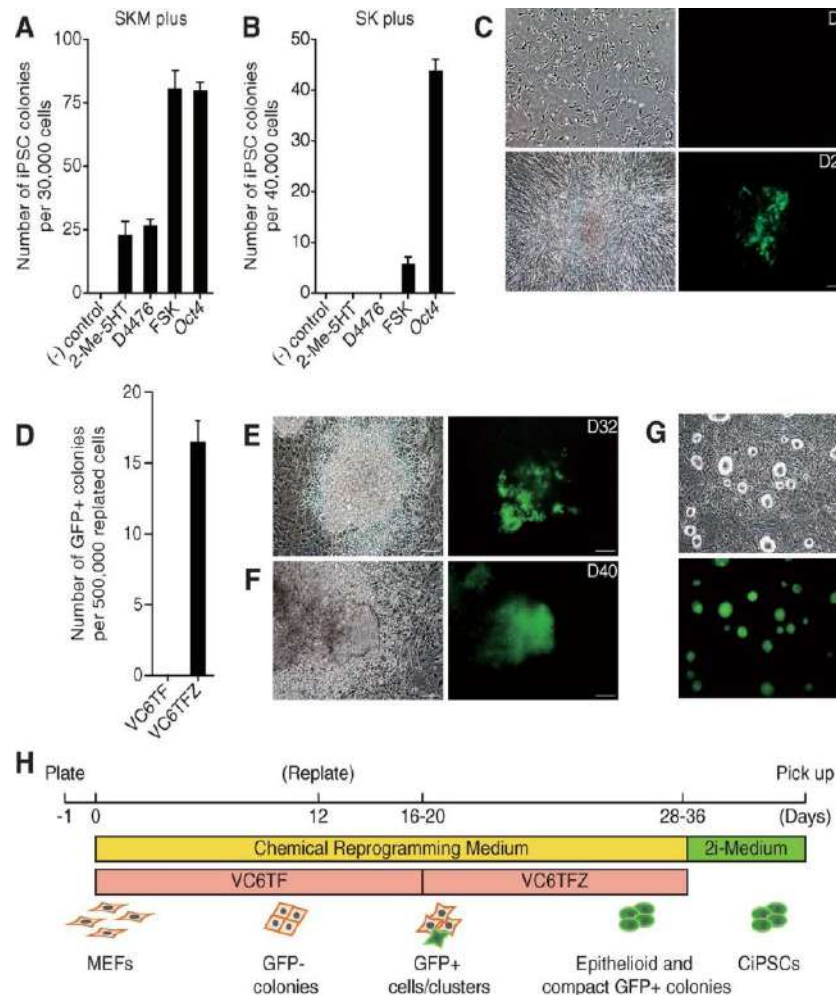
## MOLEKUL KECIL

Ada beberapa keuntungan menggunakan molekul kecil dibandingkan dengan metode tradisional dalam menentukan nasib sel; sel permilabel, tidak bersifat imunologik, lebih *cost-effective*, mudah disintesis, data dipertahankan, terstandarisasi.<sup>2</sup> Yang lebih penting, efeknya dapat disesuaikan dengan konsentrasi dan kombinasi, sehingga memberikan pengaturan ruang dan waktu dibandingkan dengan fungsi protein.<sup>54</sup> Molekul kecil banyak digunakan dalam *reprogramming* iPSC.<sup>54</sup>

Hou et al., menggunakan molekul kecil Forskolin (FSK), 2-methyl-5-hydroxytryptamine (2-Me-5HT), dan D4476, sebagai pengganti Oct 4, setelah dilakukan skrining terhadap lebih dari 10.000 molekul kecil, karena faktor Oct 4 amat dibutuhkan untuk mengubah sel menjadi pluripoten.<sup>55</sup> Dengan kombinasi bersama VC6T [VPA, valproic acid, CHIR99021 (CHIR), 616452, Tranylvypromine], maka dilakukan *reprogramming* dengan gen tunggal, Oct4. (Gambar 9A dan B).<sup>55</sup> Kombinasi molekul-molekul kecil ini (VC6T plus FSK, kelompok Hou dapat mengubah sel somatik mencit menjadi sel yang mengekspresikan E-cadherin, suatu marker transisi mesodermal-epitelium, sebagai awal

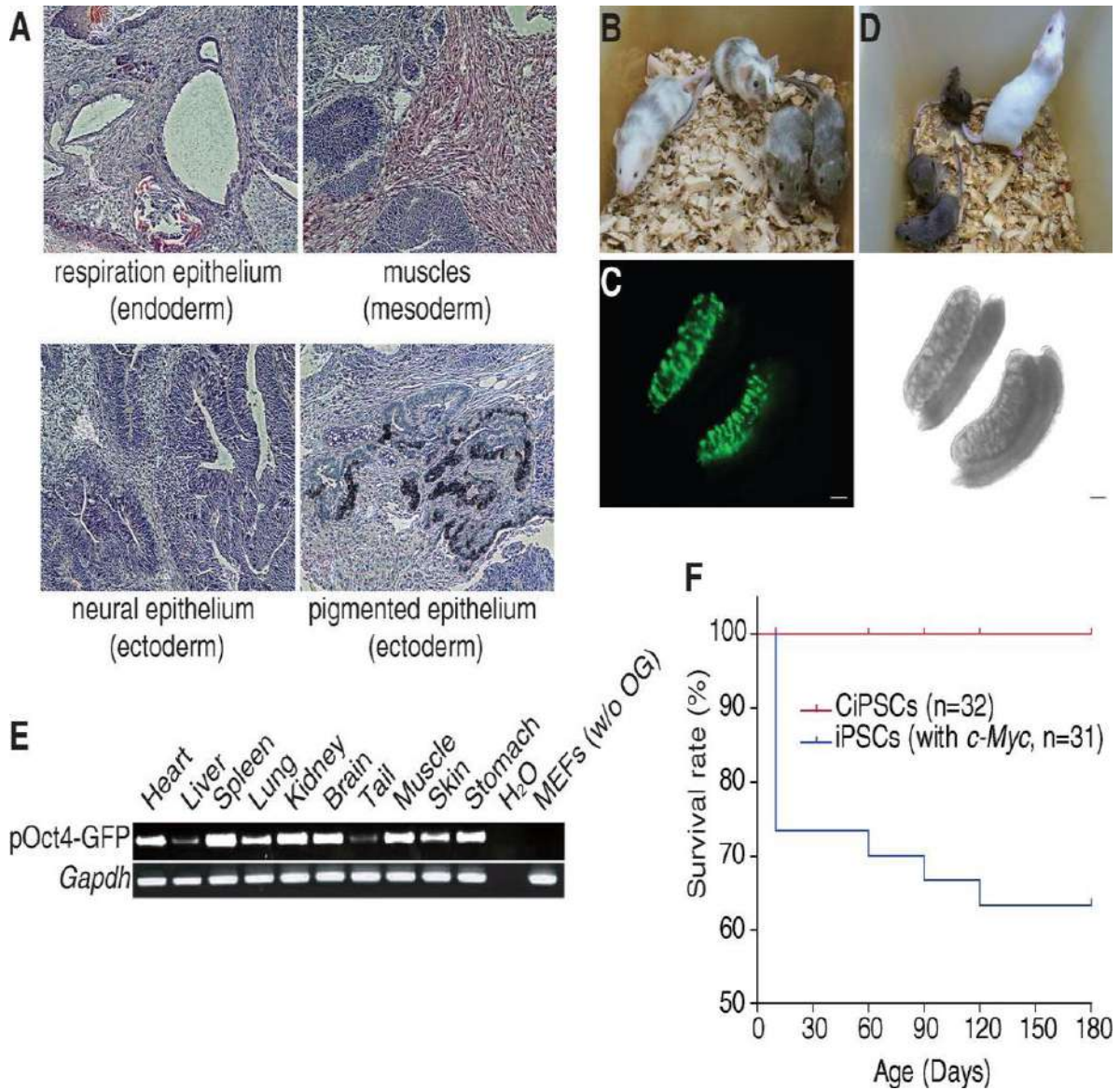
*reprogramming* oleh faktor transkripsi (Gambar 9 C).<sup>55</sup> Meskipun dikombinasikan molekul kecil itu, ekspresi Oct4 dan Nanog belum terdeteksi, berarti kondisi epigenetik masih represi karena hipermetilasi. Untuk memfasilitasi kondisi, ditambahkan doxycycline (DOX) untuk menginduksi Oct4, dan agonis cAMP (FSK, Prostaglandin E2, and Rolipram) dan modulator epigenetik [3-deazaneplanocin A (DZNep), 5-Azacytidine, sodium butyrate, and RG108] pada hari ke 16, maka terbentuk koloni (Gambar 9D dan 9E).<sup>55</sup> Dalam sel ini, tingkat ekspresi dari sebagian besar gen marker pluripotensi masih tinggi tetapi

lebih rendah daripada ESC (embryonic stem cell), berarti *reprogramming* belum lengkap. Setelah diganti ke medium 2i (dual inhibisi ganda) dengan *glycogen synthase kinase-3* dan *mitogen-activated protein kinase* setelah hari ke 28 pasca perlakuan, koloni dengan GFP (green fluorescent positive) berkembang menjadi morfologi seperti ESC (Gambar 9F).<sup>55</sup> Koloni ini dilakukan pasase sebanyak lebih dari 30 kali, dan mempertahankan morfologi menyerupai ESC (Gambar 9 F dan H).<sup>55</sup> Kombinasi komponen 2i, menyerupai ESC, dan sel GFP positif merupakan hasil *chemically induced pluripotent stem cell* (CiPSC).<sup>55</sup>



**Gambar 9.** Pembentukan CiPSC oleh senyawa molekul kecil. (A dan B) Jumlah koloni iPSC diinduksi oleh MEF infeksi SKM (A) atau SK plus senyawa molekul atau Oct 4. (C) Morfologi MEF untuk *reprogramming* kimia pada hari 0 (D0) dan kluster dengan GFP positif dihasilkan VC6TF pada hari ke 20 (D20) setelah pemberian molekul kecil. (D) Jumlah koloni GFP positif diinduksi dengan pemberian DZNep pada hari ke 36. (E-G) Morfologi epitelioid, koloni GFP positif pada hari 32 (D32) setelah pemberian perlakuan (E), suatu CiPSC pada hari ke 40 (D40) setelah perlakuan (F), dan pasase koloni CiPSC. (H) Diagram skematik proses pembentukan CiPSC. Skala bar 100  $\mu$ m. Untuk (D) sel untuk replikasi diambil pada hari ke 12.

Dikutip dari Hou PP, Li YQ, Zhang X, Liu C, Guan JY, Li HG, Zhao T, Ye JQ, Yang WF, Liu K, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science* 2013;341, 651–654.

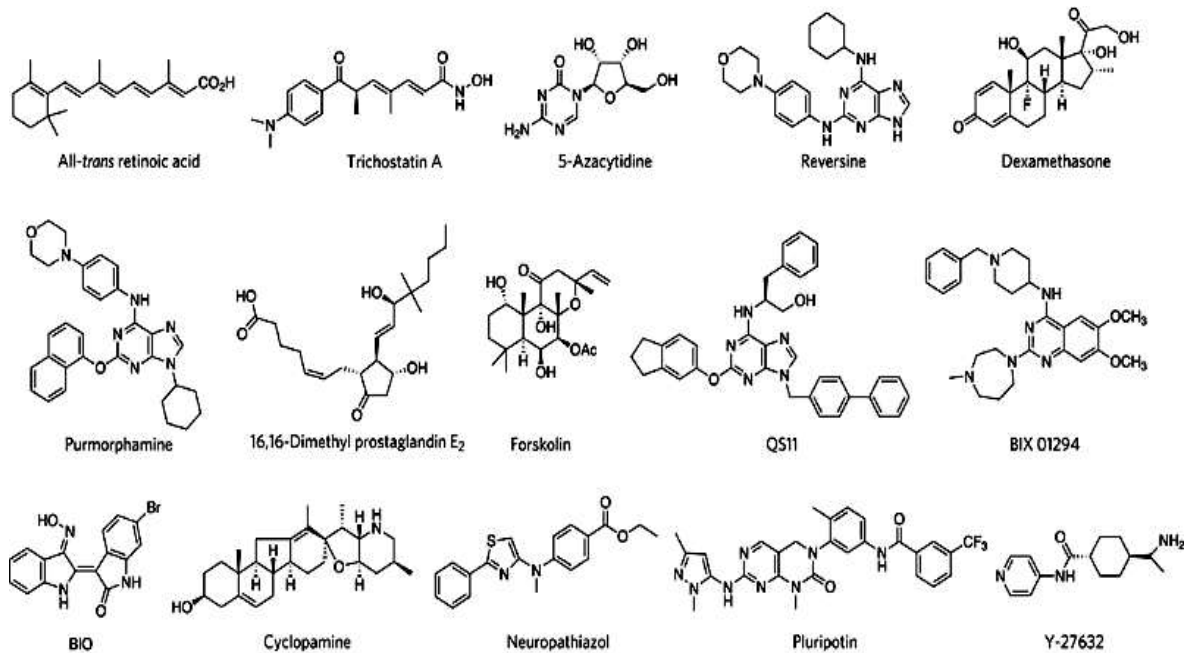


**Gambar 10.** Pluripotensi CiPSC (A). Pengecatan hematoxylin dan eosin pada teratoma yang diperoleh dari CiPSC (klon CiPSC-30). (B-D) mencit kimera (B, klon CiPS-34), kontribusi germline CiPSC di dalam testis, (C, klon CiPS-45) dan anak mencit F2 (D, klon CiPS-34). Skala bar, 100 mm (E) Analisis genomik dengan PCR pada Oct4-GFP kaset di dalam jaringan kimera. (F) Kurva survival kimera. n, jumlah kimera yang diteliti.

Dikutip dari Hou PP, Li YQ, Zhang X, Liu C, Guan JY, Li HG, Zhao T, Ye JQ, Yang WF, Liu K, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science* 2013;341, 651–654.

Dengan penambahan retinoid acid receptor ligand (TTNPB), efisiensi *reprogramming* kimia dapat ditingkatkan sebesar 40 kali, setara dengan *reprogramming* diinduksi faktor transkripsi (hingga 0.2). Sel CiPSC yang diinjeksikan ke dalam mencit imunodefisiensi (SCID) dapat berdiferensiasi menjadi 3 lapisan germinal (Gambar 9A),<sup>55</sup> dan ketika **disuntikan** ke dalam sel embrio dengan 8 sel atau blastocyst, CiPSC

mampu berintegrasi ke dalam organ di dalam ketiga lapisan sel germinal, termasuk gonad dan melahirkan seekor mencit baru (Gambar 9 B-E).<sup>55</sup> Mencit kimera yang dilahirkan 100 % hidup dan tampak sehat sehingga 6 bulan berbeda dengan mencit kimera yang dihasilkan dari iPSC yang diinduksi oleh cMyc dengan survival lebih rendah<sup>56</sup> (Gambar 8F). Hal ini menunjukkan bahwa CiPSC direprogram secara lengkap.<sup>55</sup>



**Gambar 11.** Senyawa molekuler yang mengatur nasib sel. Molekul kecil sintetik dan produk alamiah yang berikatan dengan reseptor nukleus (all-trans asam retinoid dan deksametason), histone-modifying enzyme dan DNA-modifying enzyme (trichostatin A, BIX 01294, dan 5-azacytidine) dan protein kinase dan molekul signaling (reversine, purmorphamine, 16,16-dimethyl prostaglandin E<sub>2</sub>, forskolin, QS11, BIO, Cyclopamine, neuropathiazol, pluripotin, dan Y-27632).

Dikutip dari Xu Y, Shi Y, Ding S. A chemical approach to stem-cell biology and regenerative medicine. *Nature* 2008; 453: 338-344.

Selain itu, beberapa molekul kecil dilaporkan dapat meningkatkan efisiensi konversi neuron dan mengurangi kebutuhan faktor eksogen atau secara langsung dalam menginduksi konversi sel.<sup>57,58,59,60,61,62</sup> Misalnya, Kim et al., dapat mereprogram fibroblast manusia menjadi *neural crest* yang menghasilkan berbagai jenis neuron, glia, melanosit ataupun derivat mesenkimal dengan menggunakan satu overekspresi faktor transkripsi Sox10 bersama dengan aktivasi molekul signaling WNT. Dengan satu klon *neural crest* yang diinduksi dapat menghasilkan keempat *lineage neural crest*.<sup>58</sup>

Molekul kecil yang memodulasi target tunggal atau multipel nasib sel termasuk asam retinoik, analog sitidine, histone-deacetylase inhibitor dan protein kinase inhibitor (Gambar 11).<sup>63</sup>

## REPROGRAMMING IN VIVO UNTUK REGENERASI JARINGAN

Reprogramming secara *in vivo* pertama kali dilakukan pertama kali pada organ pankreas dengan mendapatkan bahwa terdapat plastisitas di antara

tipe sel yang berhubungan. Dengan menggunakan 3 faktor transkripsi, Ngn3 (Neurog3), Pdx1 dan Mafa, Zhou et al., berhasil mengubah sel eksokrin pankreas yang sudah terdiferensiasi menjadi sel menyerupai sel  $\beta$  pankreas pada mencit dewasa. Sel  $\beta$  yang diinduksi dapat berfungsi mengurangi hiperglikemia karena mengekspresi gen yang penting dalam fungsi sebagai sel  $\beta$  (Gambar 12).<sup>64</sup>

Untuk menguji apakah sel-  $\beta$  yang diinduksi dari sel eksokrin menghasilkan insulin, maka disuntikan pAd-M3 (adenovirus yang mengekspresikan 3 kombinasi gen Ngn3, Pdx1 dan Mafa) ke dalam hewan coba dengan sel- $\beta$  yang dirusak oleh streptozotocin (STZ), ternyata kadar hewan coba dengan hiperglikemia menunjukkan penurunan secara signifikan dibandingkan dengan hewan coba yang diinjeksi virus nGFP sebagai kontrol (Gambar 12 d).<sup>64</sup> Di samping itu, hewan pAd-M3 menunjukkan toleransi terhadap glukosa meningkat, dan peningkatan kadar insulin dalam serum (Gambar 12e)<sup>64</sup> dan memiliki jumlah insulin lebih tinggi pada sel- $\beta$  yang diinduksi (Gambar 12f).<sup>64</sup>

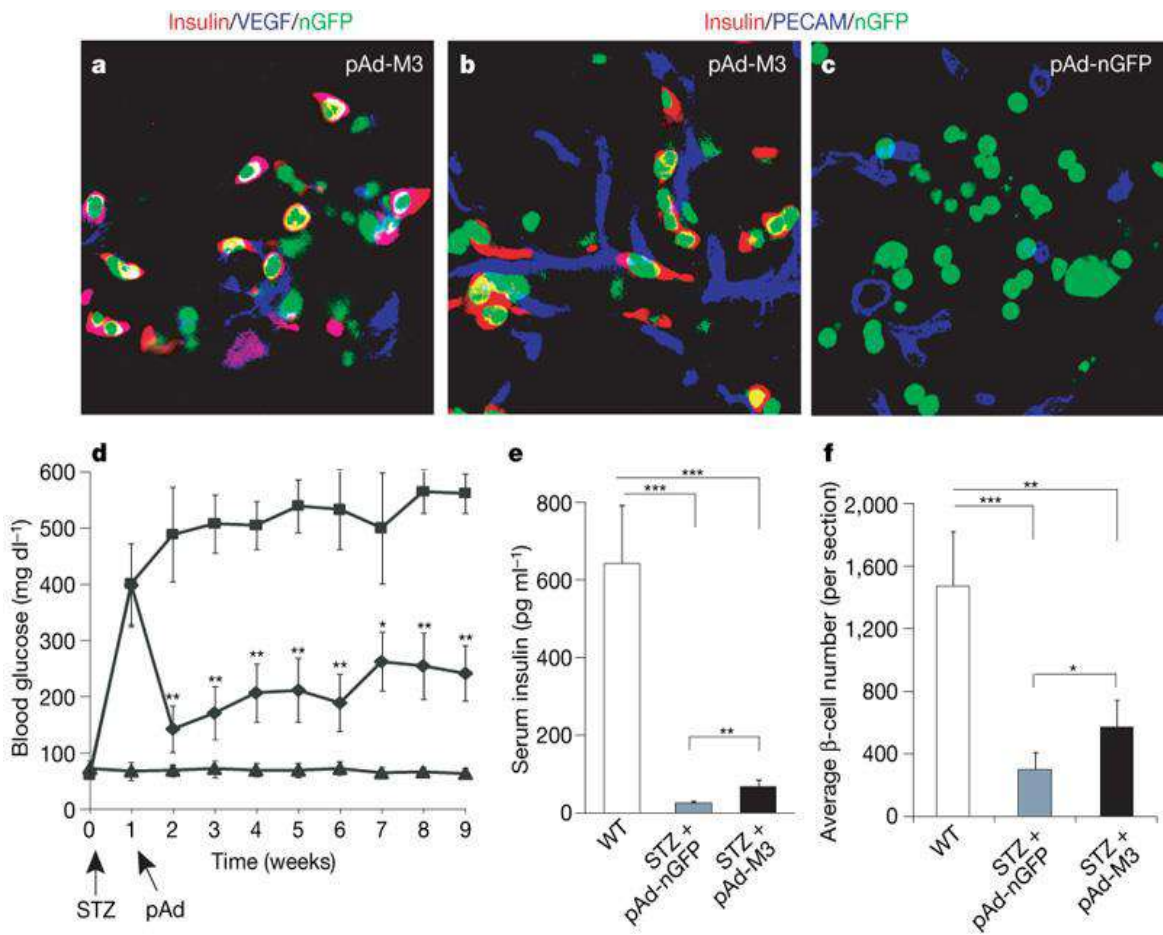
Hasil studi ini menunjukkan bahwa pankreas memiliki plastisitas yang dibawa lahir.<sup>65</sup> Meskipun



tanpa ekspresi faktor transkripsi yang dipaksakan, mencit dewasa dapat bertahan hidup setelah hilangnya sel-β yang masif yang diinduksi oleh toksin difteri seperti dilaporkan Thorel et al., bahwa sel pankreas memiliki tingkat plastisitas yang belum diketahui sebelumnya.<sup>66</sup> Jumlah sel β dapat bertambah banyak dengan berjalannya waktu, dengan sejumlah sel β baru yang terbentuk dari sel, seperti terlihat dari hasil turunannya. Namun, sifat plastisitas pankreas dalam konversi direk secara *in vivo* belum diketahui dapat diterapkan untuk organ atau jaringan lain.<sup>4</sup>

Studi *reprogramming* jantung yang menggunakan

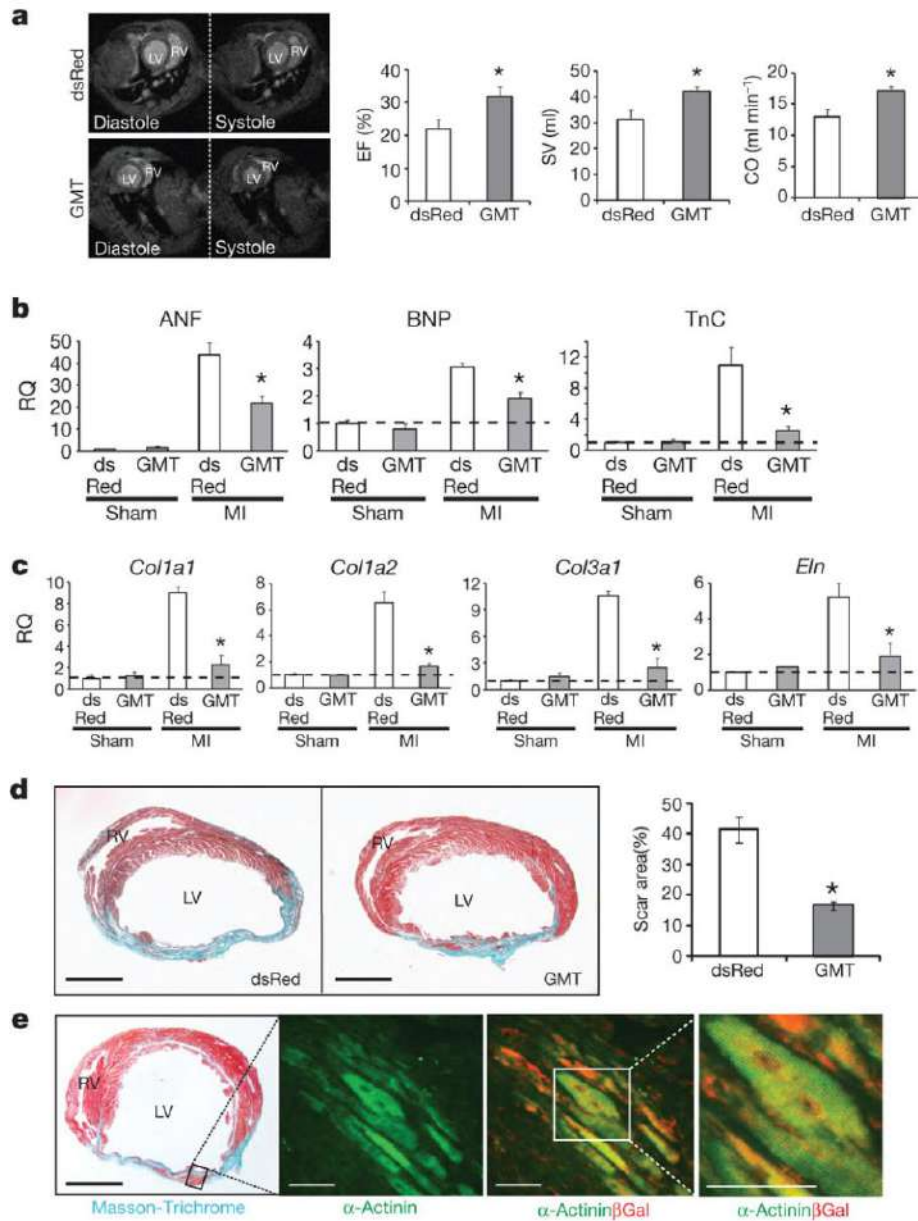
kombinasi faktor transkripsi GMT (Gata 4, Mef2c dan Tbx5 secara *in vitro*,<sup>16</sup> meletakkan dasar bagi penggunaan GMT secara *in vivo* langsung ke dalam jantung dengan terapi gen yang mengkonversi nonmiosit terutama fibroblast menjadi *induced cardiomyocyte* (iCM).<sup>67,68</sup> Kualitas konversi secara *in vivo* jauh lebih baik daripada *in vitro*, dengan jumlah sel yang direprogram menjadi sel yang dapat berdenyut dengan transkriptom yang lebih menyerupai kardiomiosit endogen.<sup>3</sup> Kardiomiosit yang direprogram sangat menyerupai kardiomiosit ventrikel dewasa dan secara elektrik dapat menyatu dengan iCM baru yang terbentuk dengan kardiomiosit endogen (Gambar 13).<sup>67</sup>



**Gambar 12.** Sel β yang baru memperbaiki pembuluh darah dan mengurangi hiperglikemia. a-c, sel β mensintesis VEGF (a) dan menginduksi remodeling angiogenik local (b). Pembuluh darah (PECAM1) terletak berdekatan dengan sel-β yang diinduksi (b) versus sel terinfeksi sebagai kontrol (c). d, perbaikan glukosa darah puasa pada mencit diabetik setelah injeksi dengan pAd-M3 (mutiara) dibandingkan dengan kontrol dengan virus nGFP (kotak). Segitiga, kontrol non-diabetik. STZ, streptozotocin. Tanda panah menunjukkan waktu injeksi. n=6-8 hewan coba. e, kadar insulin serum tidak puasa 6 minggu setelah injeksi. n=6-8 hewan coba. f, jumlah insulin rata-rata per bagian 8 minggu setelah injeksi. n= 3 hewan coba. Pulo Langerhans dan sel β yang diinduksi dihitung sebagai sampel pAd-M3. Satu tanda bintang p<0.05; dua tanda bintang =<0.01; tiga tanda bintang, p<0.001. Data dipreseantasikan sebagai mean±s.d.

Dikutip dari Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton, D.A. *In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells.* Nature 2008; 455: 627-632.





**Gambar 13.** Pemeriksaan ejection fraction (EF), stroke volume (SR) dan cardiac output (CO) ventrikel kiri dilakukan dengan MRI dalam waktu 12 minggu setelah infark miokard ( $n=9$  untuk setiap kelompok,  $p<0,05$ ). Keempat panel sebelah kiri menunjukkan pencitraan toraks pada saat jantung dalam keadaan diastolik akhir (relaksasi) atau sistolik (kontraksi) dari mencit dsRed atau GMT, dibandingkan dengan kontrol *sham-operated* dan *strain-matched*. LV, left ventricle; RV, right ventricle. **b**, qPCR dari atrial natriuretic factor (ANF), brain natriuretic peptide (BNP) dan tenascin (TnC) dengan RNA diekstraksi dari zona batas jantung 4 minggu setelah infark dan injeksi dsRed atau GMT. RQ, relative quantification. **c**, qPCR dari collagen type 1 (*Col1a1*), *Col1a2*, *Col3a1* dan elastin (*Eln*) pada RNA yang diekstraksi dari zona batas jantung 4 minggu setelah infark miokard dan injeksi dsRed atau GMT. Data **b** dan **c** dibandingkan terhadap mencit *sham-operated* yang disuntikkan dsRed, diindikasikan dengan garis-terputus-putus.  $n=3$  untuk setiap genotype. \* $P<0,05$ . **d**, Pengecatan Masson Trichrome pada potongan jantung 8 minggu post-MI disuntikkan dsRed atau GMT dengan kuantifikasi ukuran jaringan parut. Skala bar,  $500\mu\text{m}$ . dsRes,  $n=8$ ; GMT,  $n=9$ ; \* $p<0,05$ . **e**, pengecatan Masson-Trichrome (kiri) dan imunofluorescent untuk  $\alpha$ -actinin dan/atau  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$  Gal; kanan) pada GMT yang disuntikkan pada jantung mencit periostin-Cre: R26R-lacZ 4 minggu pasca-pembedahan. Skala bar,  $500\mu\text{m}$  pada panel kiri,  $50\mu\text{m}$  pada ketiga panel kanan. Error bar : sem.

Dikutip dari Qian L, Huang Y, Spencer CI, Foley A, Vedantham V, Liu L, Conway SJ, Fu JD, and Srivastava D. *In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes*. Nature 2012;485, 593–598.

Besaran infark berkurang dan perbaikan fungsi jantung terjadi setelah diberikan GMT pada mencit yang dilakukan ligase koronaria (Gambar 13b). Pemberian kaset polysistonic MGT yang menghasilkan peningkatan level Mef2c, mengakibatkan *reprogramming* lebih optimal secara *in vivo*.<sup>69</sup> Hal ini menunjukkan pentingnya pengaturan dosis tiap faktor. Pembentukan iCM *in vivo* yang baru dapat meningkatkan densitas kapiler. Namun, pemberian terapi ajuvan dapat meningkatkan angiogenesis sehingga meningkatkan fungsi lebih lanjut setelah *reprogramming* direk. Pemberian thymosin  $\beta$ 4- suatu protein yang mengikat 43 asam amino pada G-actin dapat meningkatkan angiogenesis dan survival sel, proliferasi dan migrasi.<sup>70,71</sup> meningkatkan regenerasi yang dimediasi GMT sehingga meningkatkan ejeksi fraksi pada setiap denyutan jantung.<sup>67</sup> Thymosin  $\beta$ 4 juga mengaktifasi sel epikardial, yang memiliki efek regeneratif. Pemberian vascular endothelial growth factor (VEGF) bersama dengan GMT dapat memberikan efek perbaikan fungsi jantung yang sama.<sup>72</sup>

*Reprogramming in vivo* juga memberikan reduksi fibrosis secara signifikan, karena iCM mensekresi faktor yang menghambat ekspresi kolagen dan aktivitas matrix metalloproteinase. Fibroblast yang diinfeksi faktor *reprogramming* yang gagal mereprogramnya secara intrinsik akan berubah sehingga tidak meningkatkan fibrosis. Kombinasi efek ini bertanggung jawab terhadap perbaikan fungsi jantung dan mengurangi pembentukan jaringan parut setelah injuri.<sup>3</sup>

Di samping dapat membentuk kardiomyosit, *reprogramming* direk dapat membentuk miosit khusus yang tidak berkontraksi sebagai sel *pacemaker*. Ekspresi Tbx18 jelas dapat menginduksi nasib sel kardiomyosit dengan aktivitas yang menyerupai *pacemaker*.<sup>73</sup> Adenoviral yang membawa Tbx18 secara *in vivo* pada model kelinci coba dengan bradikardia dapat mengembalikan denyutan jantung menjadi normal, menunjukkan potensi perbaikan mekanik *pacemaker*. Meskipun diperlukan penyempurnaan, regenerasi *pacemaker* dan sel konduksi khusus lainnya dapat mengoreksi gangguan irama jantung.<sup>74</sup> Namun diperlukan transkriptom sel sebagaimana dilaporkan Vedantham et al., untuk sel *pacemaker* dengan pendekatan sekuensi RNA menggunakan sel tunggal di masa mendatang.<sup>75</sup>

Jantung dewasa sedikit mempunyai progenitor aktif dengan kapasitas regeneratif terbatas seperti

ketidakmampuan menggantikan jaringan rusak oleh kejadian iskemik. Sebaliknya zona khusus otak mempunyai derajat plastisitas dan kapasitas migrasi yang tinggi.<sup>76,77</sup> Misalnya, stem cell neural dapat bermigrasi ke area otak yang rusak dan berdiferensiasi menjadi *lineage* neural pada model rodent dengan injuri otak.<sup>78,79</sup>

Dengan menggunakan faktor transkripsi Sox2, Niu et al., mereprogram astrosit endogen menjadi neuroblast yang mampu berproliferasi.<sup>80</sup> Kemudian, faktor pertumbuhan *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) dan noggin atau histone deacetylase inhibitor valproic acid merangsang induksi neuroblast membentuk neuron yang berfungsi secara elektrofisiologik berintegrasi dengan neural lain. Pendekatan ini secara efektif mengkonversi astrosit medula spinalis menjadi stem cell neural yang berproliferasi membentuk interneuron sinaps di medula spinalis pada model mencit dengan atau tanpa injuri berat.<sup>81</sup>

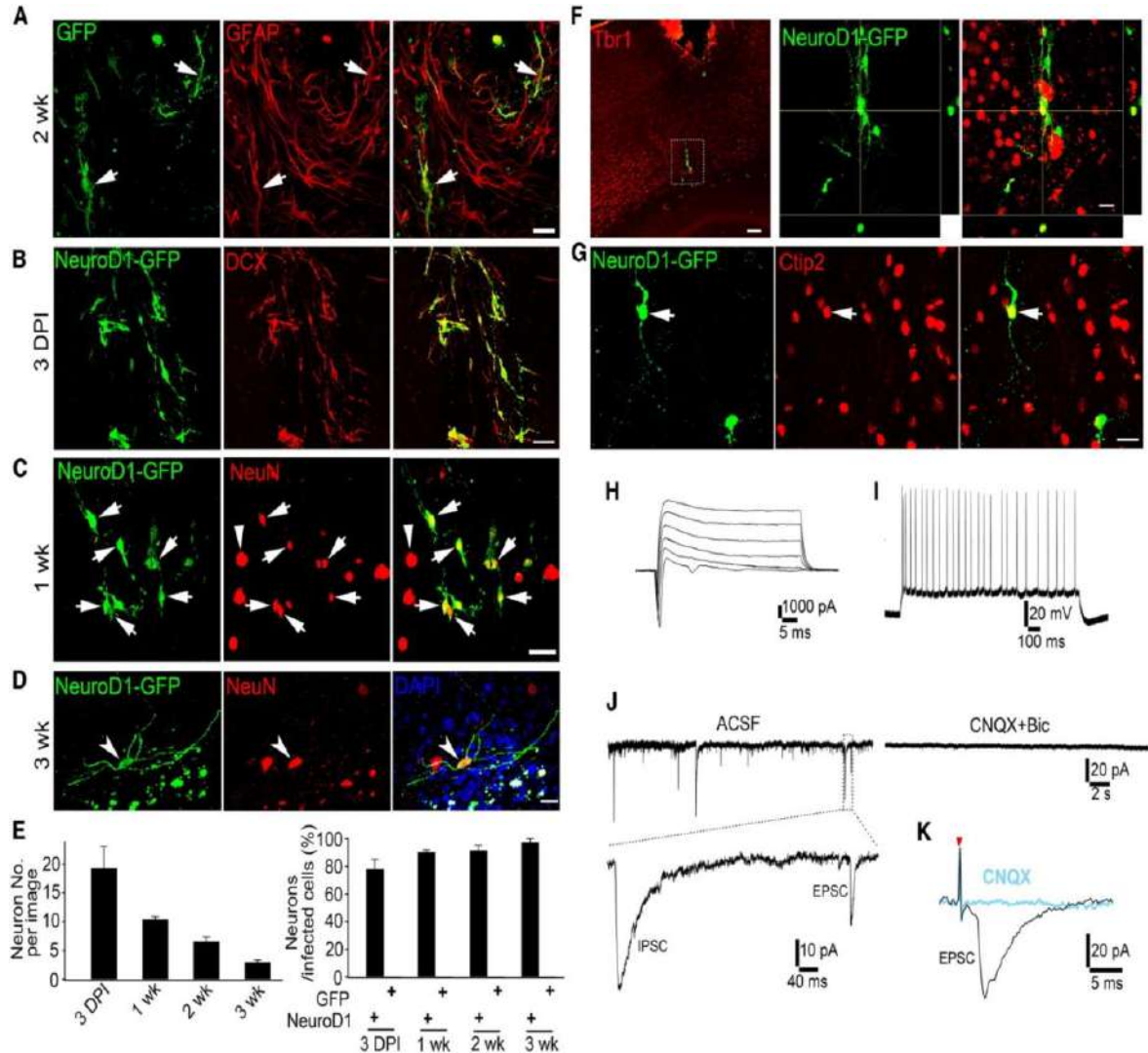
Mekanisme konversi yang dimediasi Sox2 dari astrosit residen menjadi progenitor neural adalah melalui progresivitas dari neuroblast Asc11+ dan Dcx+ sebagai progenitor *intermediate*.<sup>82</sup> Penggunaan Asc11 saja telah cukup untuk mereprogram astrosit menjadi neuron yang diinduksi.<sup>83</sup> Sox2 juga dapat mereprogram perisit di dalam otak menjadi neuron diinduksi, hal ini menunjukkan bahwa efeknya tidak hanya untuk astrosit.<sup>84</sup> Sel glia yang menjadi reaktif oleh injuri luka tusukan atau sel glia karena penyakit Alzheimer dapat direprogram menggunakan NeuroD1 membentuk neuron glutamatergik dan neuron GABAergik.<sup>84</sup> Jadi, faktor spesifik dapat menginduksi nasib neuron.<sup>3</sup>

Gliosis adalah suatu proses injuri otak yang melibatkan aktivasi sel glia berproliferasi dan menjadi hipertrofik di area otak dengan injuri.<sup>85,86,87,88</sup> Sel glia, termasuk astrosit, sel NG2, mikroglia, mengalami respon reaktif terhadap injuri untuk membentuk sistem pertahanan terhadap invasi mikroorganisme dan sitotoksin di jaringan sekitarnya.<sup>85,86,87,88</sup> Jika terjadi aktivasi, sel glia reaktif menempati area injuri dan menghasilkan faktor neuroinhibitori untuk mencegah pembentukan neuron, sehingga terbentuk jaringan parut glia di dalam otak.<sup>88</sup> Kondisi ini dapat dijumpai pada stroke, injuri medulla spinalis, glioma, dan gangguan neurodegeneratif seperti Alzheimer.<sup>88,89,90,91</sup>

Dalam penelitian Guo et al., mendapatkan bahwa penggunaan retrovirus yang menyandi faktor

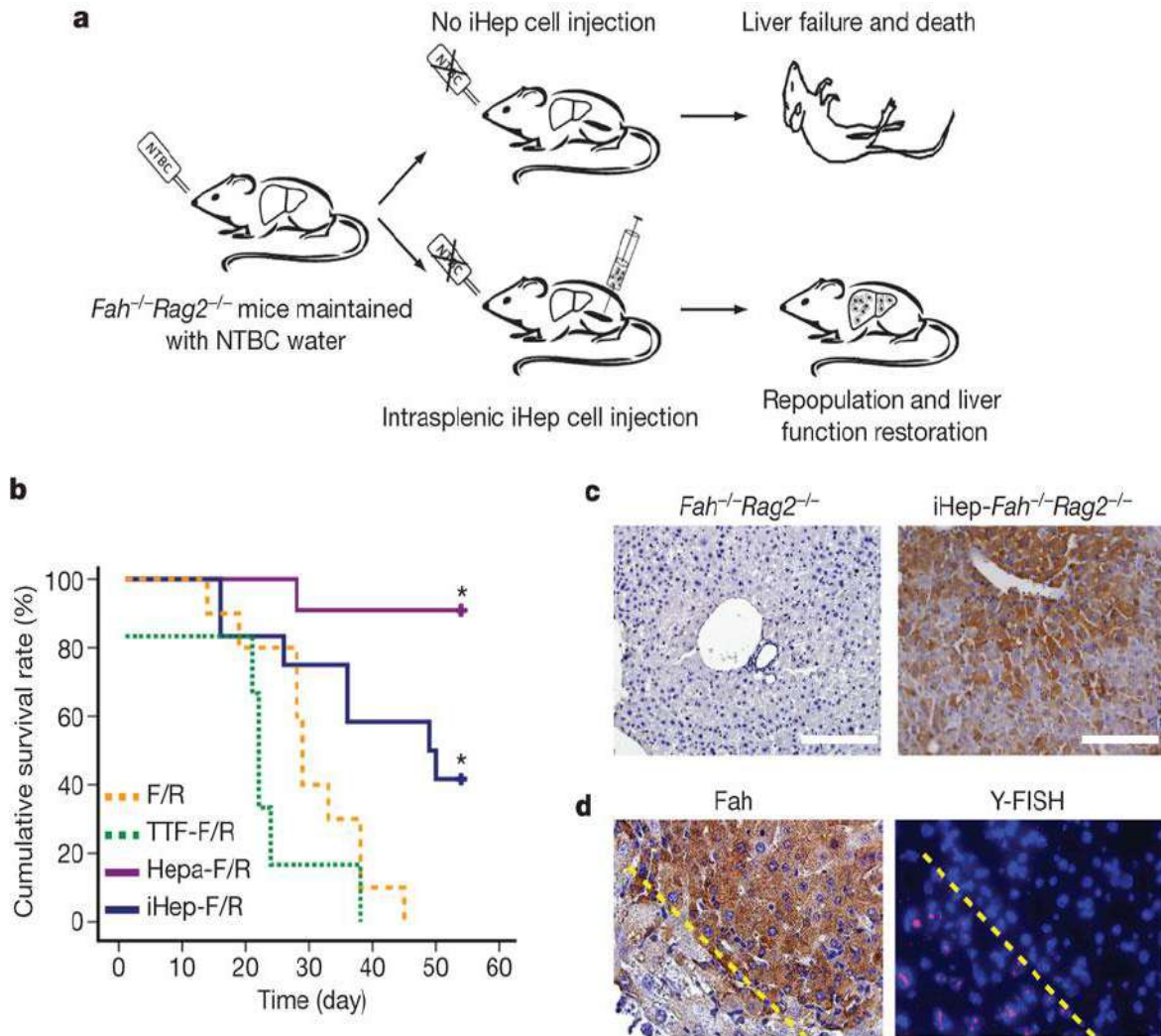
transkripsi tunggal NeuroD1 dapat mereprogram astrosit dan sel NG2 menjadi neuron di dalam korteks mencit secara *in vivo*.<sup>85</sup> Rekaman elektrofisiologik menunjukkan respon sinaptik secara spontan pada neuron yang dikonversi

NeuroD1 (Gambar 14).<sup>85</sup> Dengan reprogram secara *in vivo* dari sel glia reaktif menjadi neuron yang berfungsi dapat menjadi suatu pendekatan terapeutik pada gangguan otak akibat injuri atau penyakit.<sup>85</sup>



**Gambar 14.** Konversi sel glia reaktif menjadi neuron secara *in vivo* setelah injuri otak. (A) Penyuntikan retrovirus yang mengekspresikan GFP (hijau) ke dalam korteks mencit menunjukkan astrosit reaktif positif GFAP (merah) di tempat injuri 14 hari pascasuntikan (DPI). (B dan C) Sel diinfeksi NeuroD1-IRES-GFP (hijau) bersifat imunopositif untuk marker neuron DCX (B, 3DPI) dan NeuN (C, 7 DPI). (D) Setelah 21 DPI, neuron dikonversi dari NeuroD1 (NeuN positif, kepala panah) menunjukkan pembentukan banyak neuron. Skala bar, 20mm untuk (A) dan (D); 40 mm untuk (B) dan (C). (E) Data kuantitatif menunjukkan jumlah neuron dikonversi per area dan efisiensi konversi setelah infeksi NeuroD1. (F dan G) Neuron dikonversi dari NeuroD1 menunjukkan imunopositif terhadap marker neuron kortikal Tbr1 (F) dan deep layer marker Ctip2 (G, 12 DPI). Skala bar : 100 mm untuk image kekuatan rendah, 40 mm untuk image kekuatan tinggi. (H dan I) Gambaran representatif untuk rekaman kortikal menunjukkan arus  $\text{Na}^+$  dan  $\text{K}^+$  (H) dan potensial aksi ulangan (I) pada neuron dikonversi dari NeuroD1 (30 DPI). (J) Gambaran representatif menunjukkan kejadian sinaptik spontan pada neuron dikonversi NeuroD1 (26 DPI) pada rekaman kortikal. (K) Kejadian *evoked synaptic* yang direkam dari neuron yang dikonversi.

Dikutip dari Guo Z, Zhang L, Wu Z, Chen Y, Wang F, and Chen G. *In vivo* direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model. *Cell Stem Cell* 2014;14, 188–202.



**Gambar 15.** Transplantasi sel iHep ke dalam hati mencit  $Fah^{-/-}Rag2^{-/-}$ . Kurva survival Kaplan Meier dari mencit yang ditransplantasi hepatosit primer (Hepa-F/R,  $n=10$ ), mencit  $Fah^{-/-}Rag2^{-/-}$  yang ditransplantasi sel iHep (iHep-F/R,  $n=2$ ), mencit  $Fah^{-/-}Rag2^{-/-}$  ditransplantasi TTF (TTF-F/R,  $n=6$  dan kelompok mencit  $Fah^{-/-}Rag2^{-/-}$  sebagai kontrol (F/R,  $n=10$ ) setelah dihentikan NTBC. \*  $p<0,02$ , log-rank test. c, Repopulasi sel iHep pada hati  $Fah^{-/-}Rag2^{-/-}$  ditentukan dengan imunostaining Fah (pengecatan sitoplasma berwarna coklat). d, Sel iHep betina ditransplantasikan ke dalam hati  $Fah^{-/-}Rag2^{-/-}$ . Potongan hati serial diwarnai dengan imunostaining Fah dan pengecatan kromosom Y FISH (titik merah). Batas nodul  $Fah^{+}$  diindikasikan dengan garis kuning.

Dikutip dari Huang P, He Z, Ji S, Sun H, Xiang D, Liu C, Hu Y, Wang X, Hui L. Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature*. 2011;475:386-389.

Dua kelompok peneliti menunjukkan secara independen bahwa fibroblast mencit dapat direprogram secara langsung menjadi sel hepatosit dikenal sebagai *induced hepatocyte* (iHep) menggunakan faktor transkripsi.<sup>92,93</sup> Sekiya dan Suzuki<sup>93</sup> menunjukkan bahwa induksi menggunakan fibroblast mencit dilakukan dengan transduksi *Hnf4a* dan *Foxa1*. Sel iHep menunjukkan morfologi khas dengan ekspresi gen hepar dan berfungsi

sebagai hepatosit. Namun Morris et al., akhir-akhir ini mengemukakan bahwa sel yang diinduksi dengan metode Sekiya dan Suzuki berasal dari progenitor endoderm daripada hepatosit yang terdiferensiasi.<sup>94</sup> Studi Morris mendapatkan bahwa sel yang diinduksi mempunyai kapasitas berdiferensiasi baik menjadi sel menyerupai hepatosit atau sel menyerupai usus secara *in vitro*, bergantung pada level ekspresi *Hnf4* dan *Foxa1* dan kombinasi faktor transkripsi lain.



Transplantasi sel yang diinduksi ke dalam hati dan kolon masing-masing dapat berdiferensiasi menjadi hepatosit matur dan epitelium kolon. Hal ini menunjukkan bahwa lingkungan mikro penting sebagai penentu nasib sel.<sup>95</sup>

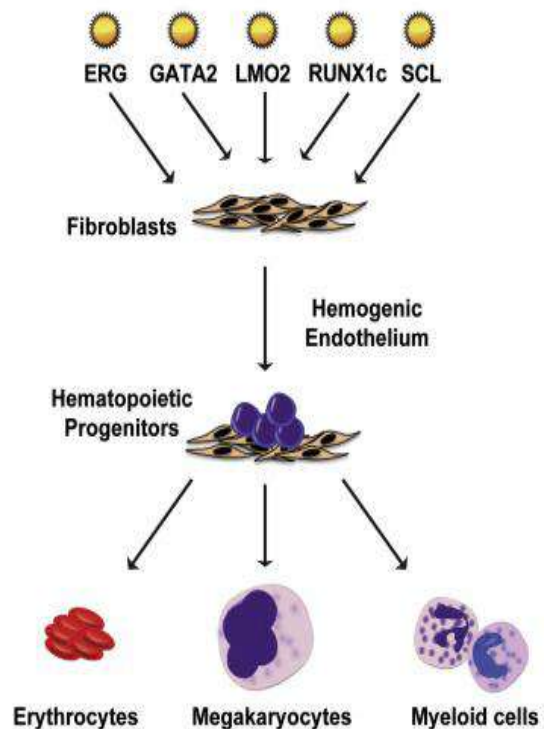
Studi Huang et al., menunjukkan bahwa fibroblast tail–tip mencit dapat direprogram menggunakan Gata4, Hnf1a dan Foxa3 dengan inaktivasi p19<sup>arf</sup> menjadi sel hepatosit. Hasil sel ini menunjukkan morfologi epitel dengan ekspresi gen hepar dan dapat berfungsi sebagai hepatosit. Sel iHep dapat memperbaiki mencit dengan defisiensi fumarylacetoacetate-hydrolase (Fah 2/2) dan dapat menyelamatkan hampir separuh mencit ini dari kematian (Gambar 15).<sup>92</sup> Strategi ini tentu akan bermanfaat untuk rekayasa hepar sehingga dapat digunakan dalam kedokteran regeneratif.

Stem cell yang menyerupai hematopoietik dapat mengadakan *engraftment* jangka panjang menjadi multilineage yang dihasilkan dari progenitor limfoid dan mieloid dengan sel efektor mieloid dilakukan ekspresi ektopik menggunakan 6 faktor transkripsi Run1t1, Hlf, Lmo2, Prdm5, Pbx1, dan Zfp37 yang secara selektif mengekspresikan stem cell atau progenitor hematopoietic (Gambar 16).<sup>96</sup> Keberhasilan *engraftment* hematopoietic stem cell (HSC) memerlukan lingkungan mikro sumsum tulang sebagai *niche* untuk HSC dalam penentuan nasib sel.

Batta et al., menunjukkan bahwa fibroblast mencit dapat direprogram menjadi progenitor hematopoietik multilineage melalui ekspresi ektopik dengan faktor transkripsi Erg, Gata2, Lmo2, Runx1c, dan Scl. Pembentukan sel hematopoietik didahului oleh pembentukan endotelium hemogenik, menyerupai perkembangan darah masa embrio. Hasil ini menunjukkan bahwa kombinasi faktor transkripsi cukup mereprogram perkembangan sel melalui berbagai tahapan kompleks, dinamik secara *in vitro* (Gambar 16). *Reprogramming* direk dapat memberikan platform untuk membuka tabir mekanisme nasib perkembangan sel pada tingkat molekuler.

Akhir-akhir ini Han et al., melaporkan bahwa fibroblast mencit dapat direprogram secara langsung menjadi sel endotel menggunakan 5 faktor transkripsi yaitu Foxo1, Er71, Klf2, Tal1 dan Lmo2.<sup>97</sup> Sel endotel yang terbentuk (iEC, *induced endothelial cell*) dapat berfungsi sebagai sel endotel matur

dengan melepaskan *nitric oxide* dengan rangsangan asetilkolin atau *vascular endothelila growth factor*. Transplantasi sel endotel yang diinduksi ini dapat meningkatkan angiogenesis dan perfusi anggota gerak pada model mencit dengan iskemia anggota gerak (Gambar 17).<sup>97</sup> Hal ini menunjukkan potensi terapi untuk tujuan regeneratif pada penyakit vaskuler iskemik.<sup>95</sup>

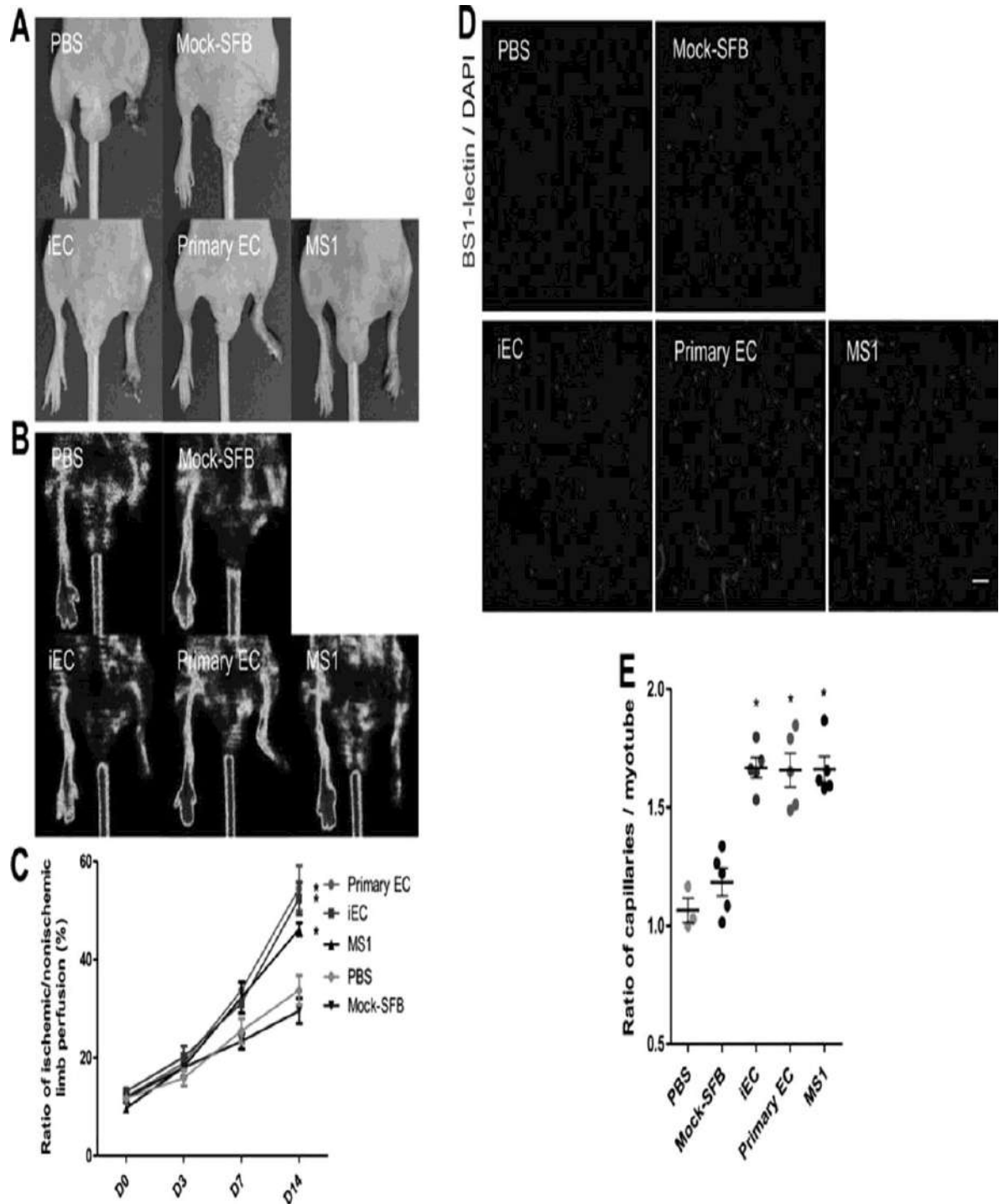


**Gambar 16.** Ekspresi ektopik dengan faktor transkripsi Erg, Gata2, Lmo2, Runx1c, dan Scl dapat mereprogram fibroblast menjadi hematopoietic progenitor cell dan menghasilkan berbagai jenis sel darah.

Dikutip dari Batta K, Florkowska M, Kouskoff V, Lacaud G. Direct reprogramming of murine fibroblasts to hematopoietic progenitor cells. *Cell Rep.* 2014;9:1871–1884.

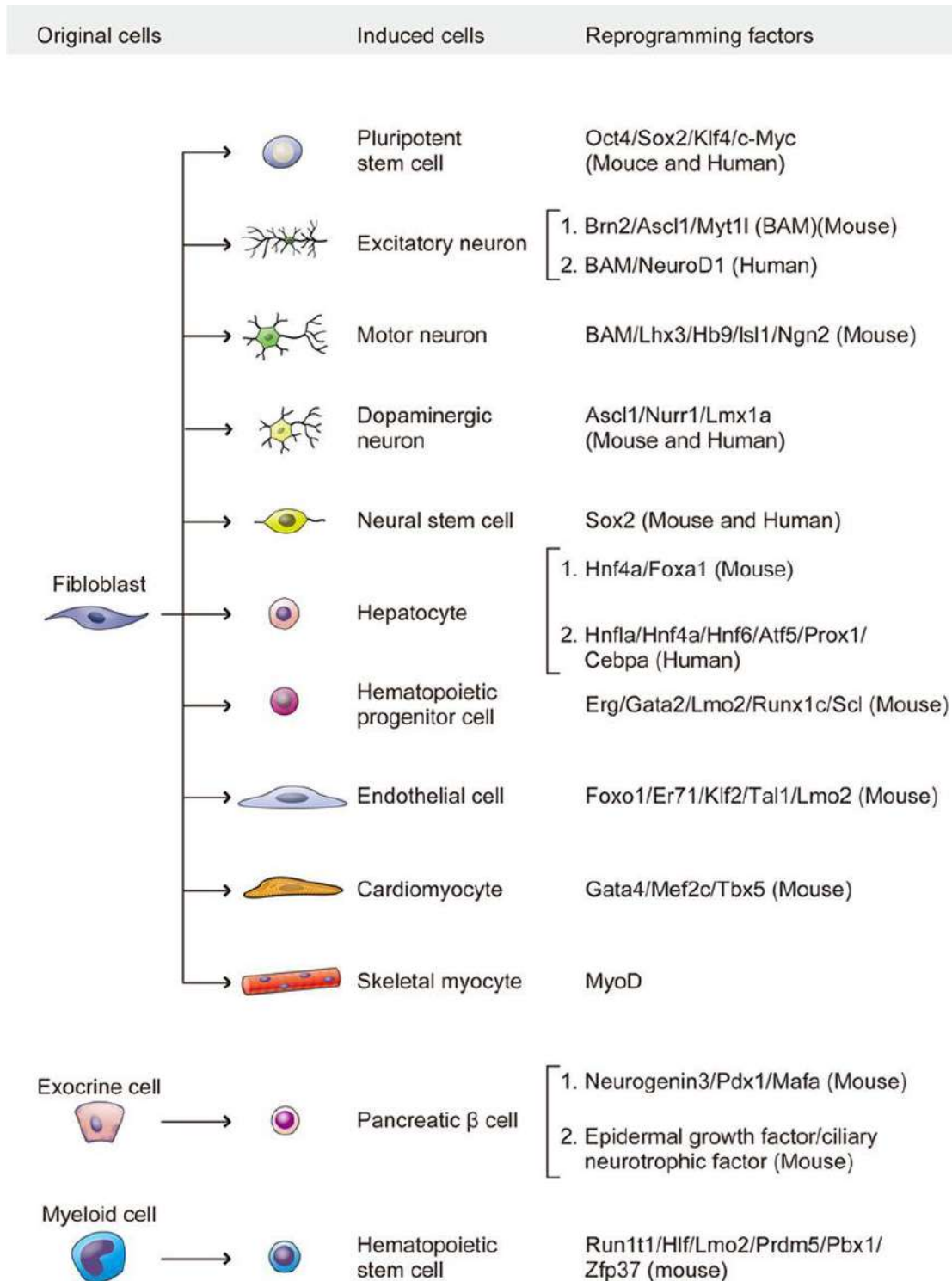
Dari pemaparan mengenai *reprogramming* direk di atas menunjukkan bahwa teknik ini berpotensi menghasilkan sejumlah tipe sel dari fibroblast, meliputi pankreas, kardiomyosit, neuron, hepar, *hematopoietic stem/progenitor cell*, sel endotel (Gambar 18).<sup>13,16,64,92,95,97,98</sup> Penemuan ini menunjukkan bahwa sel memiliki plastisitas yang jauh lebih besar dari perkiraan sebelumnya, setelah penemuan iPSC oleh Takahashi dan Yamanaka yang menginspirasi pendekatan menghasilkan tipe sel yang spesifik ini. *Reprogramming* direk saat ini menjadi fokus utama dalam penelitian biologi dasar.<sup>95</sup>





**Gambar 17.** Peningkatan perfusi anggota gerak menggunakan *induced endothelial cell* (iEC) pada model mencit dengan iskemia anggota gerak. A, Foto memperlihatkan suntikan iEC intramuskuler untuk menyelamatkan anggota gerak. B, *Laser Doppler perfusion imaging* (LDPI) menunjukkan pemulihan perfusi setelah implantasi iEC. C, Kuantifikasi LDPI. D, Pemeriksaan histologi iskemia anggota gerak yang diambil 14 hari setelah pembedahan menunjukkan peningkatan densitas kapiler pada mencit ditransplantasi iEC. E, Perhitungan densitas kapiler. n 3-5 hewan coba pada setiap kelompok. Data dipresentasikan dalam mean±SEM.

Dikutip dari Han JK, Chang SH, Cho HJ, Choi SB, Ahn HS, Lee J, Jeong H, Youn SW, Lee HJ, Kwon YW, Cho HJ, Oh BH, Oettgen P, Park YB, Kim HS. Direct conversion of adult skin fibroblasts to endothelial cells by defined factors. *Circulation*. 2014;130:1168-1178.



**Gambar 18.** Ringkasan *reprogramming* direk menggunakan faktor transkripsi spesifik. Sejumlah tipe sel, termasuk *induced pluripotent stem cell* dan berbagai sub tipe sel, neuron, kardiomyosit, sel endotel, *hematopoietic stem/progenitor cell*, hepatosit, sel otot skeletal dan sel  $\beta$  pankreas dapat diinduksi dari sel heterogen dengan overekspresi faktor transkripsi. BAM menunjukkan Brn2, Ascl1 dan Myt1l.

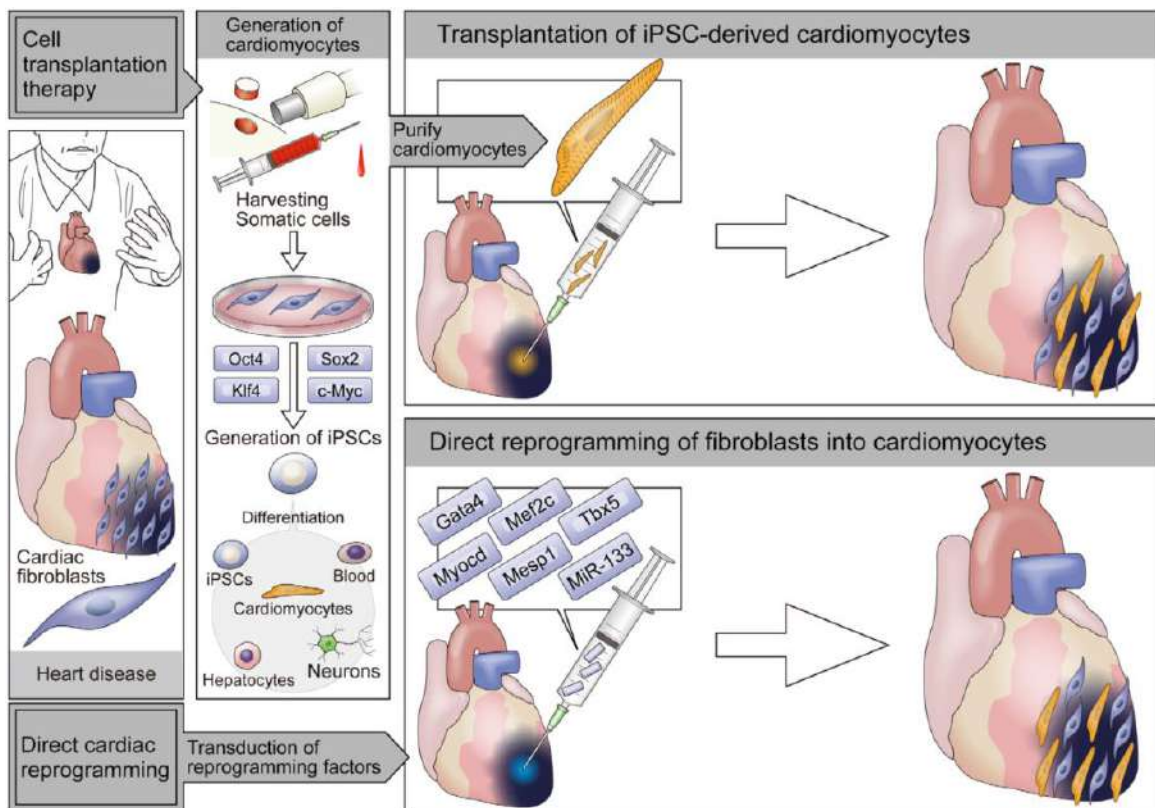
Dikutip dari Sadahiro T, Yamanaka S, Ieda M. *Direct cardiac reprogramming. Progress and challenges in basic biology and clinical applications. Circ Res.* 2015;116:1378-1391.

*Reprogramming in vivo* pada jantung dapat menghasilkan iCM (*induced cardiomyocyte*) matur dalam memperbaiki infark miokard. Suntikan faktor *reprogramming* secara langsung ke dalam otot yang rusak dapat mengkonversi populasi fibroblast jantung, yang berjumlah >50% dari sel jantung menjadi iCM. Pendekatan *reprogramming in vivo* mempunyai beberapa keuntungan. Pertama, proses mudah, kedua, terhindar dari induksi sel pluripoten sebelum diferensiasi jantung sehingga mempunyai risiko pembentukan tumor yang jauh lebih kecil, dan ketiga, suntikan langsung dengan faktor transkripsi tidak memerlukan transplantasi sel, namun kelangsungan hidup sel jangka panjang dengan *reprogramming in vivo* merupakan suatu tantangan (Gambar 19).<sup>99,100,101,102,103,104</sup>

Hasil penelitian pada hewan coba memberikan *proof-of concept* bahwa *reprogramming in vivo* direk ini merupakan pendekatan kedokteran

regeneratif, namun tantangan selain survival sel jangka panjang dan efisiensi *reprogramming* harus dapat diatasi sebelum teknologi ini dapat dimanfaatkan untuk kesehatan manusia. Menghilangkan rintangan epigenetik untuk meningkatkan *reprogramming* dapat meningkatkan efisiensi *reprogramming*.<sup>25</sup> Alternatif lain adalah interferensi CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) *genome editing* untuk mengatasi rintangan dalam konversi nasib sel.

Uji klinis terhadap hewan besar diperlukan untuk menguji keamanan dan efikasi, terutama terhadap organ jantung, karena diperlukan jumlah sel besar untuk regenerasi daripada hewan kecil. Isu **keamanan** tidak hanya meliputi cara pemberian, tetapi juga potensi sel reprogram parsial dalam menimbulkan gangguan aritmia. Untuk kondisi yang belum mempunyai pendekatan yang efektif, perbaikan minimal merupakan suatu keberhasilan.



**Gambar 19.** Terapi regeneratif jantung masa mendatang. Hilangnya jaringan jantung digantikan oleh jaringan fibrosa terutama terdiri dari fibroblast jantung dan matrik ekstraseluler. Pendekatan transplantasi sel menggunakan kardiomyosit yang diperoleh dari *induced pluripotent stem cell* (iPSC) (atas). Pendekatan *reprogramming* direk dapat mengkonversi fibroblast jantung endogen secara langsung menjadi kardiomyosit dengan faktor transkripsi secara *in situ* (bawah).

Dikutip dari Sadahiro T, Yamanaka S, Ieda M. *Direct cardiac reprogramming. Progress and challenges in basic biology and clinical applications. Circ Res. 2015;116:1378-1391.*

## DAFTAR PUSTAKA

1. Graf T, Enver T. Forcing cells to change lineages. *Nature* 2009; 462: 587-594.
2. Xu J, Du Y, Deng H. Direct lineage reprogramming: strategies, mechanisms, and applications. *Cell Stem Cell* 2015; 16: 119-134.
3. Srivastava D, DeWitt N. In vivo cellular reprogramming: the next generation. 2016; 166: 1386-1396.
4. Gurdon JB, Elsdale TR, Fischberg, M. Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature* 1958;182:64-65.
5. Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut, I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 1996; 380: 64-66.
6. Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 1987; 51:987-1000.
7. Blau HM, Pavlath GK, Hardeman EC, Chiu CP, Silberstein L, Webster, SG, Miller SC, Webster C. Plasticity of the differentiated state. *Science* 1985; 230:758-766.
8. Xie H, Ye M, Feng R, Graf T. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* 2004; 117:663-676.
9. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-676.
10. Ladewig J, Mertens J, Kesavan J, Doerr J, Poppe D, Glaue F, Herms S, Wernet P, Kögler G, Müller, FJ, et al. Small molecules enable highly efficient neuronal conversion of human fibroblasts. *Nat. Methods* 2012; 9:575-578.
11. Zaret KS, Mango SE. Pioneer transcription factors, chromatin dynamics, and cell fate control. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2016; 37: 76-81.
12. Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 2008; 455:627-632.
13. Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Südhof TC, Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 2010; 463:1035-1041.
14. Huang P, He Z, Ji S, Sun H, Xiang D, Liu C, Hu Y, Wang X, Hui L. Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature* 2011; 475:386-389.
15. Sekiya S, Suzuki A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature* 2011; 475: 390-393.
16. Ieda, M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, Srivastava D. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 2010; 142: 375-386.
17. Olson EN. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. *Science* 2006; 313:1922-1927.
18. Srivastava D. Making or breaking the heart: from lineage determination to morphogenesis. *Cell* 2006;126: 1037-1048.
19. Zhao R, Watt AJ, Battle MA, Li J, Bondow BJ, Duncan SA. Loss of both GATA4 and GATA6 blocks cardiac myocyte differentiation and results in acardia in mice. *Dev. Biol.* 2008; 317:614-619.
20. Bruneau BG, Nemer G, Schmitt JP, Charron F, Robitaille L, Caron S, Conner DA, Gessler M, Nemer M, Seidman CE, et al. (2001). A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell* 2001; 106: 709-721.
21. Garg V, Kathiriyai IS, Barnes R, Schluterman MK, King IN, Butler CA, Rothrock CR, Eapen RS, Hirayama-Yamada, K, Joo K, et al. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature* 2003; 424, 443-447.
22. Ghosh TK, Song FF, Packham EA, Buxton S, Robinson TE, Ronksley J, Self T, Bonser AJ, Brook JD. Physical interaction between TBX5 and MEF2C is required for early heart development. *Mol. Cell. Biol.* 2009; 29: 2205-2218.
23. Lin Q, Schwarz J, Bucana C, Olson EN. Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science* 1997; 276: 1404-1407.
24. Cirillo LA, Lin F.R, Cuesta I, Friedman D, Jarnik M, Zaret KS. Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA 4. *Mol. Cell* 2002; 9: 279-289.
25. Zhou Y, Wang L, Vaseghi HR, Liu Z, Lu R, Alimohamadi S, Yin C, Fu JD, Wang GG, Liu J, Qian L. Bmi1 is a key epigenetic barrier to direct cardiac reprogramming. *Cell Stem Cell* 2016; 18: 382-395.
26. Paige SL, Thomas S, Stoick-Cooper CL, Wang H, Maves L, Sandstrom R, Pabon L, Reinecke

- H, Pratt G, Keller G, et al. A temporal chromatin signature in human embryonic stem cells identifies regulators of cardiac development. *Cell* 2012; 151: 221-232.
27. Wamstad JA, Alexander JM, Truty RM, Shrikumar A, Li F, Eilertson KE, Ding H, Wylie JN, Pico AR, Capra JA, et al. Dynamic and coordinated epigenetic regulation of developmental transitions in the cardiac lineage. *Cell* 2012; 151: 206-220.
  28. Dhawan S, Georgia S, Tschen SI, Fan G, Bhushan, A. (2011). Pancreatic b cell identity is maintained by DNA methylation-mediated repression of Arx. *Dev. Cell* 2011;20: 419-429.
  29. Liang G, Zhang Y. Embryonic stem cell and induced pluripotent stem cell: an epigenetic perspective. *Cell Res.* 2013; 23, 49-69.
  30. Luna-Zurita L, Bruneau BG. Chromatin modulators as facilitating factors in cellular reprogramming. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2013; 23:556-561.
  31. Onder TT, Kara N, Cherry A, Sinha AU, Zhu N, Bernt KM, Cahan P, Marcarci BO, Unternaehrer J, Gupta PB, et al. Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming. *Nature* 2012; 483:598-602.
  32. Tursun B, Patel T, Kratsios P, Hobert O. Direct conversion of *C. elegans* germ cells into specific neuron types. *Science* 2011; 331: 304-308.
  33. Cao R, Tsukada Y, Zhang Y. Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *Mol. Cell* 2005; 20: 845-854.
  34. Wang H, Wang L, Erdjument-Bromage H, Vidal M, Tempst P, Jones RS, Zhang Y. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* 2004; 431: 873-878.
  35. Abdouh M, Hanna R, El Hajjar J, Flamier A, Bernier G. The polycomb repressive complex 1 Protein BMI1 Is required for constitutive heterochromatin formation and silencing in mammalian somatic Cells. *J. Biol. Chem.* 2016; 291: 182-197.
  36. Eskeland R, Leeb M, Grimes GR, Kress C, Boyle S., Sproul D, Gilbert N, Fan Y, Skoultschi AI, Wutz, A., and Bickmore, W.A. Ring1B compacts chromatin structure and represses gene expression independent of histone ubiquitination. *Mol. Cell* 2010; 38: 452-464.
  37. Francis NJ, Kingston RE, Woodcock CL. Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. *Science* 2004;306:1574-1577.
  38. Levine SS, Weiss A, Erdjument-Bromage H, Shao Z, Tempst P, Kingston, RE. The core of the polycomb repressive complex is compositionally and functionally conserved in flies and humans. *Mol. Cell. Biol.* 2002; 22: 6070-6078.
  39. Shao Z, Raible F, Mollaaghababa R, Guyon JR, Wu CT, Bender W, Kingston RE. Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex. *Cell* 1999; 98, 37-46.
  40. Buganim Y, Itskovich E, Hu YC., Cheng AW, Ganz K, Sarkar S, Fu D, Welstead GG, Page DC, Jaenisch, R. (2012). Direct reprogramming of fibroblasts into embryonic Sertoli-like cells by defined factors. *Cell Stem Cell* 2012;11:373-386.
  41. Theunissen TW, Jaenisch, R. Molecular control of induced pluripotency. *Cell Stem Cell* 2014; 14: 720-734.
  42. Kidder BL, Hu G, Yu Z-X, Liu C, Zhao, K. Extended self renewal and accelerated reprogramming in the absence of Kdm5b. *Mol. Cell. Biol.* 2013; 33: 4793-4810.
  43. Courtney M, Gjernes E, Druelle N, Ravaud C, Vieira A, Ben-Othman N, Pfeifer A, Avolio F, Leuckx G, Lacas-Gervais S, et al. The inactivation of Arx in pancreatic a-cells triggers their neogenesis and conversion into functional b-like cells. *PLoS Genet.* 2013; 9: e1003934.
  44. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001; 293:1074-1080.
  45. Jayawardena TM, Egemnazarov B., Finch EA, Zhang L, Payne JA, Pandya K, Zhang Z, Rosenberg P, Mirotso M, Dzau VJ. MicroRNA-mediated in vitro and in vivo direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes. *Circ. Res.* 2012; 110: 1465-1473.
  46. Fish KM. Mesenchymal stem cells drive cardiac stem cell chemotaxis, proliferation, and phenotype via CXCR4 and cKit signaling. *Circ Res.* 2016;119:891-892.
  47. Sridharan R, Plath K. Small RNAs loom large during reprogramming. *Cell Stem Cell.* 2011;8:599-601.
  48. Jayawardena TM, Finch EA, Zhang L, Zhang H, Hodgkinson CP, Pratt RE, Rosenberg PB, Mirotso M, Dzau VJ. MicroRNA induced cardiac reprogramming in vivo: evidence for mature cardiac myocytes and improved cardiac function. *Circ. Res.* 2015; 116, 418-424.
  49. Yoo AS, Sun AX, Li L, Shcheglovitov A, Portmann T, Li Y, Lee-Messer, C, Dolmetsch RE, Tsien RW, Crabtree GR. MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to



- neurons. *Nature* 2011; 476: 228–231.
50. Ambasudhan R, Talantova M, Coleman R, Yuan X, Zhu S, Lipton SA, Ding S. Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions. *Cell Stem Cell* 2011; 9:113-118.
  51. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136: 215-233.
  52. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 2005; 433: 769-773.
  53. Neo WH, Yap K, Lee SH, Looi LS, Khandelia P, Neo SX, Makeyev EV, Su IH. MicroRNA miR-124 controls the choice between neuronal and astrocyte differentiation by fine-tuning *Ezh2* expression. *J. Biol. Chem.* 2014; 289, 20788-20801.
  54. Li WL, Li K, Wei WG, Ding, S. Chemical approaches to stem cell biology and therapeutics. *Cell Stem Cell* 2013b; 13: 270-283.
  55. Hou PP, Li YQ, Zhang X, Liu C, Guan JY, Li HG, Zhao T, Ye JQ, Yang WF, Liu K, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science* 2013; 341: 651-654.
  56. Nakagawa M, Takizawa N, Narita M, Ichisaka T, Yamanaka S. Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient *Myc*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010; 107:14152-14157.
  57. Cheng L, Hu W, Qiu B, Zhao J, Yu Y, Guan W, Wang M, Yang W, Pei G. Generation of neural progenitor cells by chemical cocktails and hypoxia. *Cell Res.* 2014; 24, 665–679.
  58. Kim YJ, Lim H, Li Z, Oh Y, Kovlyagina I, Choi IY, Dong X, Lee G. Generation of multipotent induced neural crest by direct reprogramming of human postnatal fibroblasts with a single transcription factor. *Cell Stem Cell* 2014; 15: 497-506.
  59. Ladewig J, Mertens J, Kesavan J, Doerr J, Poppe D, Glaue F, Herms S, Wernet P, Kögler G, Müller FJ, et al. Small molecules enable highly efficient neuronal conversion of human fibroblasts. *Nat. Methods* 2012; 9: 575-578.
  60. Liu ML, Zang T, Zou Y, Chang JC, Gibson JR, Huber KM, Zhang CL. Small molecules enable neurogenin 2 to efficiently convert human fibroblasts into cholinergic neurons. *Nat. Commun.* 2013; 4, 2183.
  61. Sayed N, Wong WT, Ospino F, Meng S, Lee J, Jha A, Dexheimer P, Aronow BJ, Cooke JP. Transdifferentiation of human fibroblasts to endothelial cells: role of innate immunity. *Circulation* 2015; 131:300-309.
  62. Zhu S, Ambasudhan R, Sun W, Kim HJ, Talantova M, Wang X, Zhang M, Zhang Y, Laurent T, Parker J, et al. Small molecules enable OCT4-mediated direct reprogramming into expandable human neural stem cells. *Cell Res.* 2014A 24: 126-129.
  63. Xu Y, Shi Y, Ding S. A chemical approach to stem-cell biology and regenerative medicine. *Nature* 2008; 453: 338-344.
  64. Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal, J, Melton DA. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 2008; 455, 627-632.
  65. Juhl K, Bonner-Weir S, Sharma, A. Regenerating pancreatic beta-cells: plasticity of adult pancreatic cells and the feasibility of in-vivo neogenesis. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 2010; 15: 79-85.
  66. Thorel F, Nèpote V, Avril I, Kohno K, Desgraz R, Chera S, Herrera PL. Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. *Nature* 2010; 464: 1149-1154.
  67. Qian L, Huang Y, Spencer CI, Foley A, Vedantham V, Liu L, Conway SJ, Fu JD, Srivastava, D. In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature* 2012; 485:593-598.
  68. Inagawa K, Miyamoto K, Yamakawa H, Muraoka N, Sadahiro T, Umei T, Wada R, Katsumata Y, Kaneda R, Nakade K, et al. Induction of cardiomyocyte-like cells in infarct hearts by gene transfer of *Gata4*, *Mef2c*, and *Tbx5*. *Circ. Res.* 2012; 111:1147-1156.
  69. Ma H, Wang L, Yin C, Liu J, Qian L. In vivo cardiac reprogramming using an optimal single polycistronic construct. *Cardiovasc Res* 2015;108; 217-219.
  70. Bock-Marquette I, Saxena A, White MD, Dimaio JM, Srivastava, D. Thymosin beta4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair. *Nature* 2004; 432, 466-472.
  71. Smart N, Risebro CA, Melville AA, Moses K, Schwartz RJ, Chien KR, Riley PR. Thymosin beta4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization. *Nature* 2007; 445: 177-182.
  72. Mathison M, Gersch RP, Nasser A, Lilo S,

- Korman M, Fourman M, Hackett N, Shroyer K, Yang J, Ma Y, et al. In vivo cardiac cellular reprogramming efficacy is enhanced by angiogenic preconditioning of the infarcted myocardium with vascular endothelial growth factor. *J. Am. Heart Assoc.* 2012; 1, e005652.
73. Kapoor N, Liang W, Marban E, Cho HC. Direct conversion of quiescent cardiomyocytes to pacemaker cells by expression of Tbx18. *Nat. Biotechnol.* 2013; 31:54–62.
  74. MacRae C.A. In vitro and in vivo reprogramming for the conduction system. *Trends Cardiovasc. Med.* 2016; 26:21-22.
  75. Vedantham V, Galang G, Evangelista M, Deo RC, Srivastava, D. RNA sequencing of mouse sinoatrial node reveals an upstream regulatory role for Islet-1 in cardiac pacemaker cells. *Circ. Res.* 2015; 116: 797-803.
  76. Kriegstein A, Alvarez-Buylla, A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 2009; 32: 149-184.
  77. Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 2008; 132: 645-660.
  78. Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall, O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat. Med.* 2002; 8: 963-970.
  79. Lugert S, Vogt M, Tchorz JS, Müller M, Giachino C, Taylor V. Homeostatic neurogenesis in the adult hippocampus does not involve amplification of Ascl1(high) intermediate progenitors. *Nat. Commun.* 2012; 3: 670.
  80. Niu W, Zang T, Zou Y, Fang S, Smith DK, Bachoo R, Zhang CL. In vivo reprogramming of astrocytes to neuroblasts in the adult brain. *Nat. Cell Biol.* 2013; 15: 1164-1175.
  81. Su Z, Niu W, Liu ML, Zou Y, Zhang, C.L. In vivo conversion of astrocytes to neurons in the injured adult spinal cord. *Nat. Commun.* 2014; 5:3338.
  82. Niu W, Zang T, Smith DK, Vue TY, Zou Y, Bachoo R, Johnson JE, Zhang CL. SOX2 reprograms resident astrocytes into neural progenitors in the adult brain. *Stem Cell Reports* 2015; 4:780-794.
  83. Liu Y, Miao Q, Yuan J, Han S, Zhang P, Li S, Rao Z, Zhao W, Ye Q, Geng J, et al. Ascl1 converts dorsal midbrain astrocytes into functional neurons in vivo. *J. Neurosci.* 2015; 35, 9336-9355.
  84. Karow M, Sánchez R, Schichor C, Masserdotti G, Ortega F, Heinrich C, Gascoñ n, S, Khan MA, Lie DC, Dellavalle A., et al. Reprogramming of pericyte-derived cells of the adult human brain into induced neuronal cells. *Cell Stem Cell* 2012; 11: 471-476.
  85. Guo Z, Zhang L, Wu Z, Chen Y, Wang F, Chen, G. In vivo direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model. *Cell Stem Cell* 2014; 14:188–202.
  86. Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 2005; 50: 427-434.
  87. Robel S, Berninger B, Götz M. The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. *Nat. Rev. Neurosci.* 2011; 12: 88-104.
  88. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010; 119:7-35.
  89. Gwak YS, Kang J, Unabia GC, Hulsebosch CE. Spatial and temporal activation of spinal glial cells: role of gliopathy in central neuropathic pain following spinal cord injury in rats. *Exp. Neurol.* 2012; 234: 362-372.
  90. Verkhratsky A, Olabarria M, Noristani HN, Yeh CY, Rodriguez JJ. Astrocytes in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* 2010; 7: 399-412.
  91. Verkhratsky A, Sofroniew MV, Messing A, deLanerolle NC, Rempe D, Rodriguez JJ, Nedergaard M. Neurological diseases as primary gliopathies: a reassessment of neurocentrism. *ASN Neuro* 2012; 4: 4.
  92. Huang P, He Z, Ji S, Sun H, Xiang D, Liu C, Hu Y, Wang X, Hui L. Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature.* 2011; 475:386-389.
  93. Sekiya S, Suzuki A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature.* 2011; 475:390-393.
  94. Morris SA, Cahan P, Li H, Zhao AM, San Roman AK, Shivdasani RA, Collins JJ, Daley GQ. Dissecting engineered cell types and enhancing cell fate conversion via CellNet. *Cell.* 2014; 158:889–902.
  95. Sadahiro T, Yamanaka S, Ieda M. Direct cardiac reprogramming. Progress and challenges in basic biology and clinical applications. *Circ Res.* 2015; 116:1378-1391.
  96. Batta K, Florkowska M, Kouskoff V, Lacaud G. Direct reprogramming of murine fibroblasts to hematopoietic progenitor cells. *Cell Rep.* 2014; 9:1871–1884.
  97. Han JK, Chang SH, Cho HJ, Choi SB, Ahn HS, Lee J, Jeong H, Youn SW, Lee HJ, Kwon YW, Cho HJ, Oh BH, Oettgen P, Park YB, Kim HS.

- Direct conversion of adult skin fibroblasts to endothelial cells by defined factors. *Circulation*. 2014;130:1168–1178.
98. Riddell J, Gazit R, Garrison BS, Guo G, Saadatpour A, Mandal PK, Ebina W, Volchkov P, Yuan GC, Orkin SH, Rossi DJ. Reprogramming committed murine blood cells to induced hematopoietic stem cells with defined factors. *Cell*. 2014;157:549–564.
  99. Blum B, Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic stem cells. *Adv Cancer Res*. 2008;100:133–158.
  100. Zhang M, Methot D, Poppa V, Fujio Y, Walsh K, Murry CE. Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:907–921.
  101. Nussbaum J, Minami E, Laflamme MA, Virag JA, Ware CB, Masino A, Muskheli V, Pabon L, Reinecke H, Murry CE. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB J*. 2007;21:1345–1357.
  102. Tsuji O, Miura K, Okada Y, et al. Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:12704–12709.
  103. Palpant NJ, Murry CE. Regenerative medicine: Reprogramming the injured heart. *Nature*. 2012;485:585–586.
  104. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*. 2008;322:949–953.

## 6

# Stem Cell: Plastisitas dan Dediferensiasi

PENDAHULUAN	135
KARDIOMIOGENESIS	136
PROBLEMA EVALUASI REGENERASI KARDIOMIOSIT	137
DEDIFERENSIASI KARDIOMIOSIT	140
PLASTISITAS HEMATOPOIETIC STEM CELL PADA KARDIOMIOGENESIS	142
DEDIFERENSIASI PANKREAS	146

*“By prevailing over all obstacles and distractions, one may unfailingly arrive at his chosen goal or destination”*

*-Christopher Columbus-*

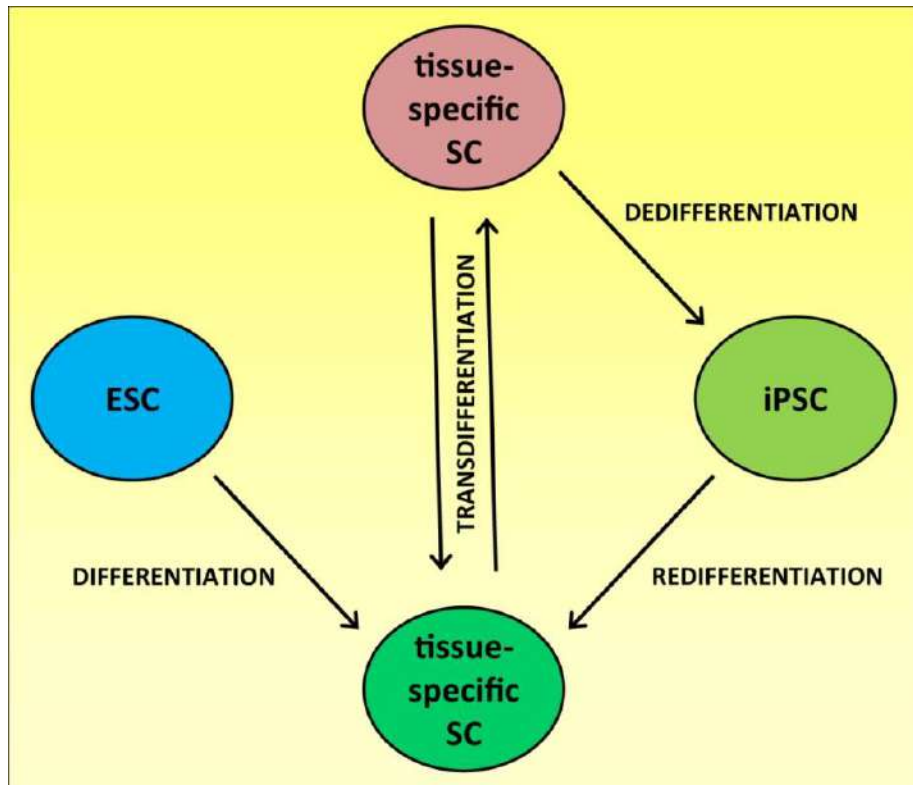
## PENDAHULUAN

Penemuan sel somatik yang direprogram melalui ekspresi faktor transkripsi menjadi sel menyerupai *embryonic stem cell* dikenal sebagai *induced pluripotent stem cell* (iPSC) telah membuka jalan bagi kedokteran regeneratif.<sup>1</sup> Penemuan ini telah menggeser fokus penelitian pada komunitas peneliti dengan menggunakan *adult stem cell* yang terdiferensiasi untuk menghasilkan tipe sel yang spesifik untuk jaringan lain, yang dikenal dengan sel plastisitas, transdiferensiasi atau *lineage reprogramming*.<sup>2,3,4</sup>

Kapasitas regenerasi organ tubuh manusia terbatas dalam memperbaiki kerusakan jaringan dan organ seperti jantung, pankreas, hati, darah. Dengan aktivasi terhadap stem cell *niche*, maka sel dapat berproliferasi untuk menggantikan sel yang rusak misalnya di dalam hati. Namun, beberapa hewan lain mampu beregenerasi menggantikan kerusakan organ yang luas, misalnya organ jantung pada zebrafish, dan regenerasi anggota gerak pada salamander.<sup>5</sup> Dengan mempelajari daya regenerasi pada tingkat

molekuler dan seluler, dapat dikembangkan strategi regenerasi pada manusia.<sup>6</sup>

Mekanisme yang berhubungan dengan regenerasi alamiah adalah dediferensiasi, yaitu perubahan dari sel terdiferensiasi menjadi sel yang kurang terdiferensiasi dari *lineage* sendiri. Proses ini memungkinkan sel berproliferasi kembali sebelum rediferensiasi, sehingga dapat menggantikan sel yang rusak (Gambar 1).<sup>7</sup> Sedangkan transdiferensiasi adalah mekanisme alamiah yang pertama kali diamati pada lensa mata salamander satu abad yang lalu.<sup>5</sup> Proses ini melalui dediferensiasi dan berubah menjadi *lineage*, sehingga berdiferensiasi menjadi tipe sel lain.<sup>5</sup> Bab ini akan memfokuskan pembahasan plastisitas stem cell terutama organ jantung dan pankreas, proses dediferensiasi dan transdiferensiasi yang mengubah fenotipe sel pada tingkat molekuler dan sel, termasuk faktor transkripsi yang berperan pada perubahan *lineage* sel, faktor epigenetik yang berpengaruh terhadap ekspresi profil sel, sehingga diharapkan dapat bermanfaat dalam regenerasi dan perbaikan terhadap sel yang mengalami kerusakan akibat penyakit jantung dan diabetes **melitus** serta penyakit lainnya.



**Gambar 1.** Sumber stem cell untuk kedokteran regeneratif. *Embryonic stem cell* (ESC) menghasilkan tiga lapisan sel germinal dan merupakan sumber sel ideal untuk stem cell yang khusus untuk jaringan. Namun, kekhawatiran etika dan politik, risiko pembentukan tumor dan kemungkinan rejeksi imun membuat ESC alogenik sulit diterapkan dalam terapi. Penemuan *induced pluripotent stem cell* (iPSC) dari sel pasien dapat mengatasi kekhawatiran tersebut. Namun, isu keamanan berkaitan dengan *reprogramming* telah terpecahkan. Fenomena plastisitas stem cell (atau transdiferensiasi), yaitu kemampuan menghasilkan stem cell yang spesifik untuk jaringan dengan tipe stem cell organ lain, memberikan sumber stem cell yang dapat diaplikasikan untuk kedokteran regeneratif. Penggunaan *adult stem cell* akan terhindar dari kekhawatiran etika dan politik, imunologik dan potensi pembentukan tumor, yang dapat terjadi pada transplantasi ESC atau iPSC.

Dikutip dari Bilousova G, Roop DR. *Altering cell fate: from thymus epithelium to skin stem cells. Cell* 2016; 165: 1598-1608.

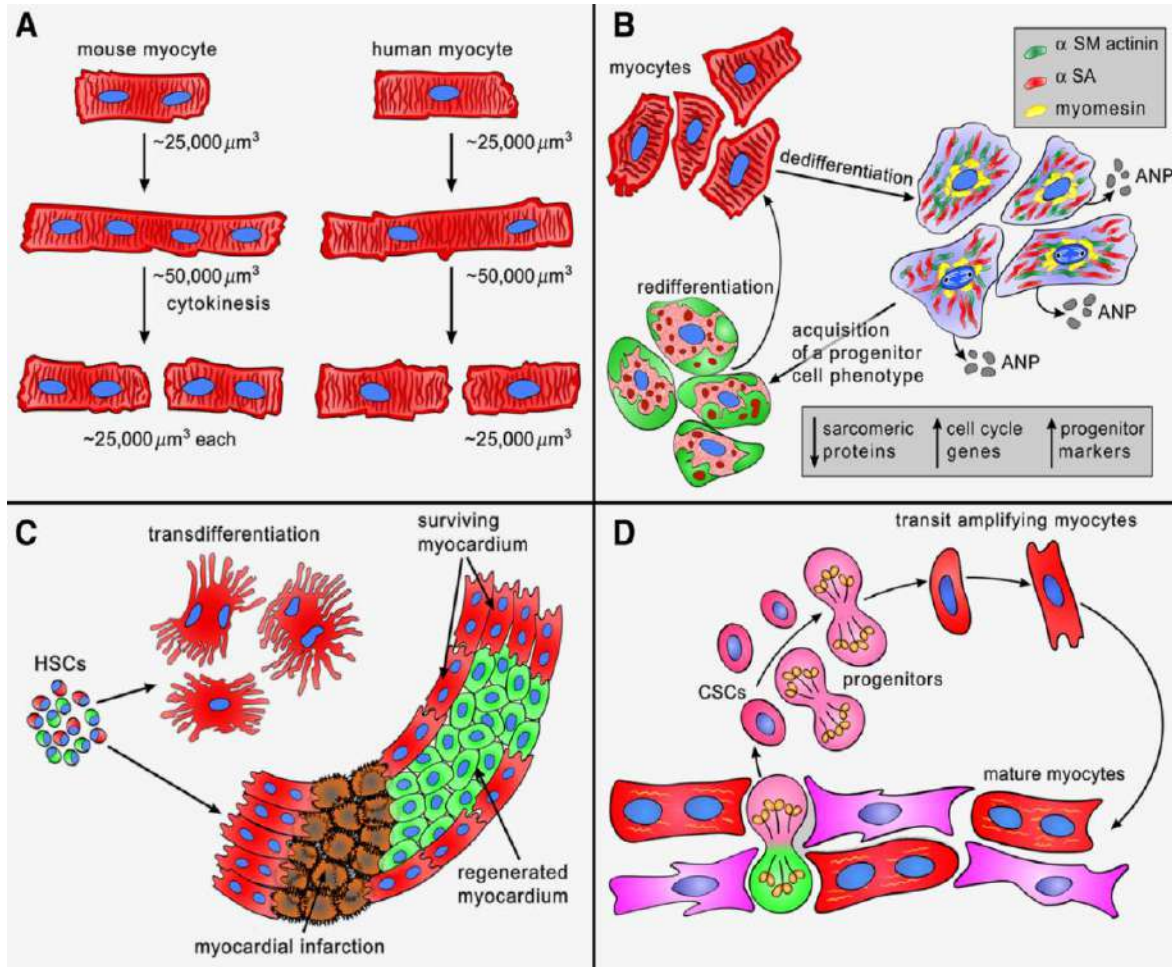
## KARDIOMIOGENESIS

Paradigma lama menyatakan bahwa jantung merupakan suatu organ yang tersusun atas jumlah miosit yang telah ada sejak lahir dan tidak pernah berubah sepanjang hidupnya hingga kematian.<sup>8</sup> Perubahan struktur protein yang terjadi dianggap sebagai mekanisme untuk mempertahankan performan dan kelangsungan hidup sel.<sup>8,9,10</sup> Secara ilmiah, pandangan ini tidak benar akibat kesalahan teknik, misalnya kesulitan dalam mengidentifikasi nuklei yang sedang bermitosis,<sup>11</sup> level sintesis DNA yang diukur dengan inkorporasi <sup>3</sup>H-thymidine terabaikan,<sup>12</sup> sehingga menganggap bahwa jantung tidak mampu beregenerasi setelah terjadi infark.<sup>13</sup>

Dogma ini telah berubah dengan ditemukan bahwa kardiomyosit mempunyai daya regenerasi. Terdapat

5 sumber potensi kardiomyosit pada jantung dewasa (Gambar 2).<sup>13</sup> : 1. Kardiomyosit bukan sel terdiferensiasi terminal dan dapat masuk kembali dalam siklus sel dan membelah, (2) Dediferensiasi kardiomyosit secara *in vivo* untuk mendapatkan fenotipe sel primitif kemudian berkembang biak, (3) Kardiomyosit berasal dari *engraftment* dan komitmen *hematopoietic stem cell* (HSC), (4) Kardiomyosit merupakan progeni *cardiac stem cell* (CSC) residen, yang mengatur perubahan sel secara fisiologik dan perbaikan jantung setelah injuri, (5) Kardiomyosit dihasilkan dari kombinasi keempat mekanisme sel ini. Terapi sel pada jantung dekomposisi harus didasarkan pada pengetahuan biologi dasar. Karena itu, pemahaman asal kardiomyosit merupakan hal yang penting untuk perkembangan strategi dalam meningkatkan respon pertumbuhan miokardium (Gambar 3).<sup>13</sup>





**Gambar 2.** A-D. Mekanisme potensi kardiomiogenesis.  $\alpha$ -SA menunjukkan  $\alpha$ -sarcomeric actin; ANP, atrial natriuretic peptide; HSC, hematopoietic stem cells; SM, smooth muscle; CSC, cardiac stem cell  
 Dikutip dari Leri A, Rota M, Pasqualini FS, Goichberg P, Anversa P. *Origin of cardiomyocytes in the adult heart. Circ Res.* 2015;116:150-166.

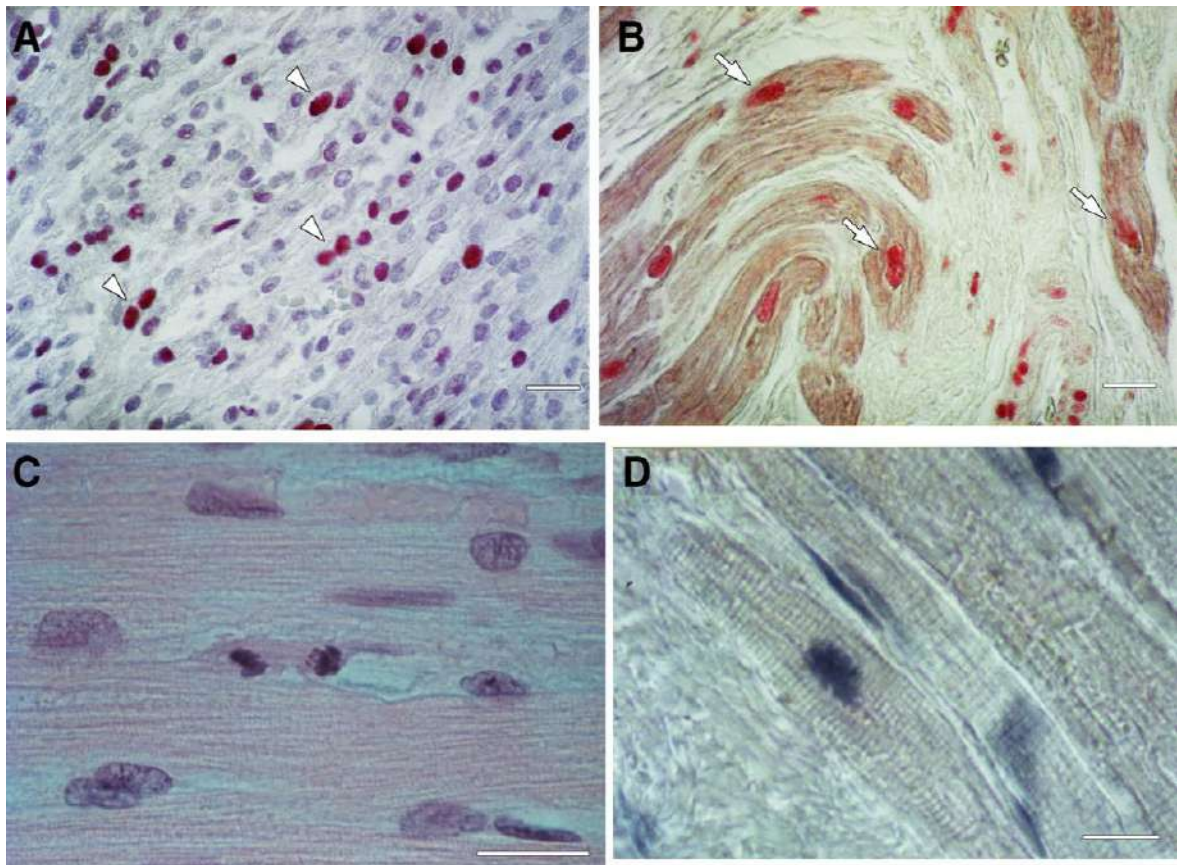
**PROBLEMA EVALUASI REGENERASI KARDIOMIOSIT**

Kesulitan terjadi pada evaluasi proliferasi miosit dengan berbagai metodologi pengukuran.<sup>13</sup> Pengukuran jumlah miosit ventrikel yang ideal tanpa kematian sel merupakan pendekatan satu-satunya yang dapat menunjukkan derajat hiperplasi sel miosit.<sup>13</sup> Namun, hilangnya miosit yang luas, bersamaan dengan injuri miokard pada berbagai tempat dan timbulnya jaringan parut menyebabkan analisis penggantian sel pada jantung dekompensasi terlalu rendah.<sup>13</sup>

Beberapa laporan mengemukakan bahwa miosit ventrikel manusia dapat masuk kembali ke dalam siklus sel dan mensintesis DNA.<sup>14,15,16</sup> Namun,

apakah replikasi DNA menyebabkan ploidi, kariokinesis tanpa sitokinesis, atau kariokinesis diikuti sitokinesis menimbulkan perdebatan.<sup>13</sup> Meskipun studi morfometrik menunjukkan bahwa regenerasi miosit dapat terjadi pada jantung hipertrofik berat tanpa perubahan sel mononukleus dan binukleus, namun sulit menghitung jumlah mitotik di dalam miosit.<sup>13</sup>

Lokalisasi *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) pada kardiomyosit fetus dan dewasa pada manusia dan identifikasi pembelahan miosit pada pemeriksaan potongan histologik pertama kali diperoleh pada pertengahan tahun 1990 an (Gambar 4).<sup>16,17,18</sup> Pengukuran indeks pembelahan miosit dan sel interstitial memberikan estimasi terhadap fenomena ini.



**Gambar 3.** Siklus sel dan pembelahan kardiomyosit. A, Prolifering cell nuclear antigen (PCNA) diekspresikan di dalam beberapa nuklei (kepala panah) pada miokardium fetus manusia diambil dari otopsi. B, Lokalisasi nukleus PCNA di dalam kardiomyosit (panah) pada jantung manusia dengan kardiomyopati iskemik. PCNA dideteksi menggunakan alkali fosfatase diberi label streptavidin dan sarcomeric actin ( $\alpha$ -SA) dengan immunoperoxidase. C, Pembelahan miosit manusia terdapat pada zona batas pada pasien yang meninggal akibat infark miokard yang luas. Pengecatan hematoxylin dan eosin. D, Gambaran mitosis miosit pada jantung dengan kardiomyopati iskemik. Myofibril,  $\alpha$ -SA (coklat muda); nuklei, hematoxyline (biru). Skala bar 10 $\mu$ m.

Dikutip dari Leri A, Rota M, Pasqualini FS, Goichberg P, Anversa P. *Origin of cardiomyocytes in the adult heart. Circ Res.* 2015;116:150-166.

Dengan menggunakan teknik yang lebih canggih dapat diperoleh bukti replikasi kardiomyosit dan kariokinesis dan sitokinesis.<sup>19,20,21</sup> Penggunaan imunolabeling dan mikroskop konfokal mendapatkan resolusi pencitraan dan akurasi data kuantitatif.<sup>13</sup> Pemeriksaan histologik rutin tidak mampu mendeteksi gambaran mitosis di dalam kardiomyosit pada jantung normal, ekspresi protein siklus sel, pembelahan nukleus dan pembelahan sel miosit dapat diidentifikasi menggunakan imunolabeling dengan marker sel proliferasi Ki-67 dan mikroskop konfokal.<sup>20,21</sup>

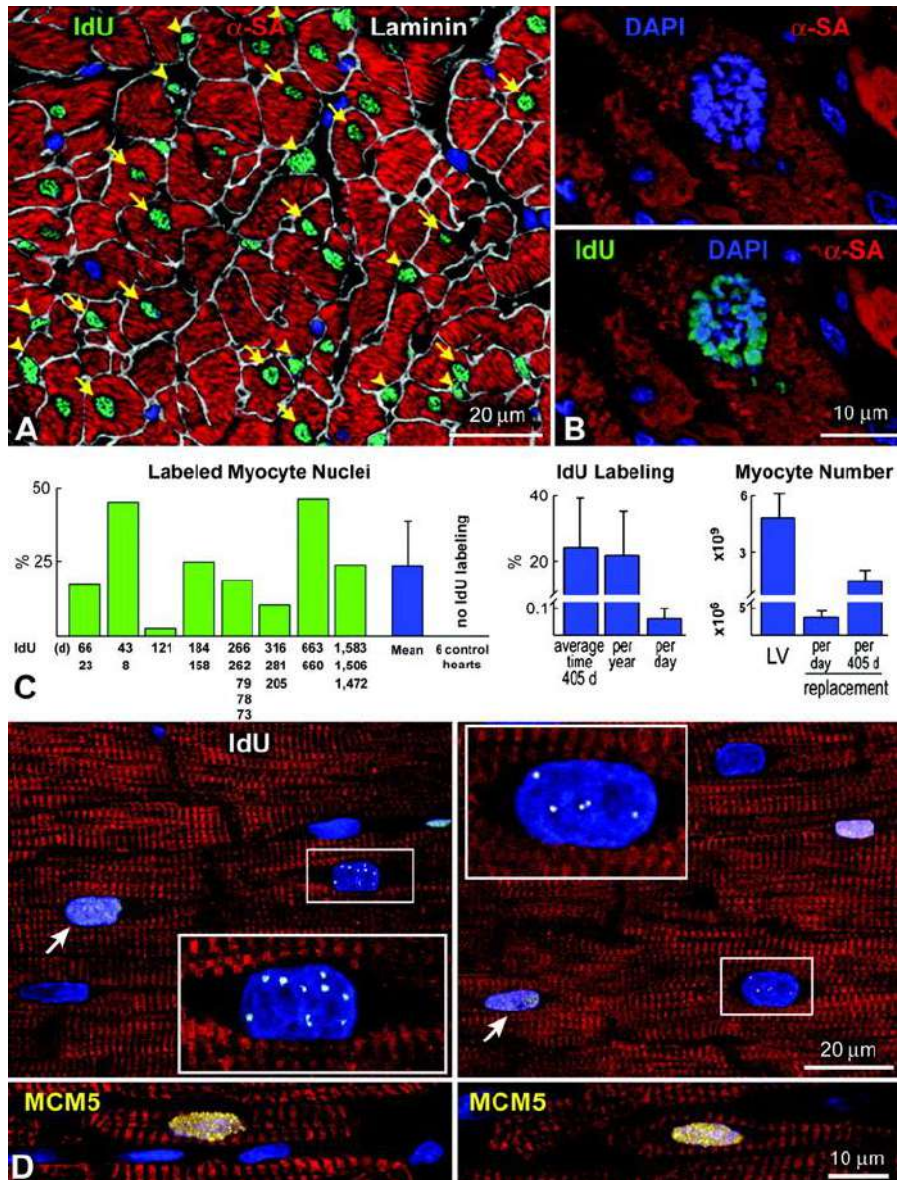
Terdapat 2 studi dalam mengukur kecepatan sintesis DNA pada kardiomyosit jantung manusia. Pendekatan pertama dilakukan Bergmann et al.,

berdasarkan penggunaan  $^{14}\text{C}$  yang terjadi selama uji coba senjata nuklir di atmosfer pada waktu perang dingin. Atmosfer  $^{14}\text{C}$  masuk ke dalam pertumbuhan dan dimakan manusia, sehingga dapat ditandai pembelahan sel di dalam DNA. Setelah perjanjian pembatasan uji coba nuklir 1963, kadar  $^{14}\text{C}$  di atmosfer menurun drastis. Dengan demikian, kondisi *pulse chase assay* dapat digunakan untuk menghitung pertanggalan sel, dengan mengidentifikasi saat kadar  $^{14}\text{C}$  di atmosfer bersesuaian dengan DNA. Sebagaimana terjadi, non-kardiomyosit pada jantung manusia didapati lebih muda daripada pasien, dengan 18% pergantian per tahun dalam selang waktu rata-rata 4 tahun. DNA yang diperoleh dari isolasi nuklei kardiomyosit (menggunakan pengecatan troponin nukleus) lebih



muda daripada pasien meskipun tidak semua non-kardiomiosit. Sebelum diinterpretasi sebagai pembelahan sel, perlu disingkirkan poliploidisasi. Untuk melakukan hal ini, peneliti melakukan sortir nuklei kardiomiosit dengan isi DNA dan analisis DNA diploid. Nuklei kardiomiosit diploid juga lebih muda daripada pasien, menunjukkan bukti adanya

pembelahan sel. Modeling matematik menunjukkan regenerasi kardiomiosit bergantung pada usia, dengan 1% kardiomiosit mengalami *renewal* per tahun pada usia 20 tahun, dan 0,4% pada usia 75 tahun. Berdasarkan hal ini, 45% kardiomiosit diprediksi mengalami *renewal* pada kehidupan normal dan 55% sel menetap sejak lahir.<sup>22</sup>



**Gambar 4.** IdU di dalam kardiomiosit manusia. A. Beberapa nuklei miosit (panah) dan nonmiosit (kepala panah) diberi label IdU (hijau). Miosit positif terhadap  $\alpha$ -sarcomeric actinin ( $\alpha$ -SA, merah). Laminin (putih) sebagai pembatas miosit dan sel *interstitial*. B. Kromosom metafase pada nukleus miosit yang membelah (panel atas) diberi label IdU (panel bawah). C. Persentase nuklei miosit yang positif terhadap idU pada masing-masing 8 pasien disuntik analog timidin. Interval antara pemberian IdU hingga kematian pasien ditunjukkan dalam grafik. Juga ditunjukkan pembentukan miosit rata-rata pada 8 pasien. D. Nuklei miosit yang ditunjukkan dalam kotak persegi panjang dengan label IdU bertitik-titik (putih). Label IdU nuklei miosit difus (panah). Kedua label IdU titik dan difus diambil dari sampel miokardium pada saat pasien meninggal. Kontrol positif untuk MCM5 (kuning) ditunjukkan pada kedua panel bawah.

Dikutip dari Kajstura J et al. *Cardiomyogenesis in the adult human heart. Circ Res* 2010;107:305–315.

Pendekatan kedua dilakukan Kajstura et al., dengan kecepatan sintesis DNA jantung diperoleh dari hasil pemeriksaan jantung post-mortem dari pasien dengan kanker yang diberi analog iododeoxuridine (IdU).<sup>16</sup> Obat ini dapat masuk ke dalam DNA yang baru terbentuk, dan menimbulkan sensitisasi sel terhadap terapi radiasi. IdU diberikan dalam bentuk suntikan bolus atau infus selama beberapa minggu dengan masa terapi dan kematian dari 7 hari sampai 4,3 tahun. Dengan menggunakan pemeriksaan signal IdU dan identifikasi kardiomyosit secara imunohistokimia, peneliti mendapatkan kecepatan tinggi pada label DNA kardiomyosit, berkisar 2,5%-46%. Tidak ada pengecatan IdU pada jantung kontrol dari pasien tanpa kanker yang tidak terpapar dengan radiosensitizer. Modeling matematik menunjukkan bahwa pergantian kardiomyosit dengan kecepatan 22% per tahun, dibandingkan dengan 20% untuk fibroblast dan 13% untuk sel endotel, berarti masa hidup masing-masing sel sebesar 4,5, 5 dan 8 tahun. Sel jantung yang baru terbentuk menunjukkan fenotipe dewasa dengan sel terdiferensiasi dan tidak menunjukkan protein p16<sup>INK4a</sup> yang bersifat penuaan. Jumlah nuklei yang dilaporkan sebagai diploid berjumlah 83% dengan pemeriksaan mikroskop konfokal dan flow cytometry yang menggambarkan pembelahan sel, bukan peningkatan plodi nukleus.<sup>16</sup>

Sulit untuk mempertemukan kedua studi, karena perbedaan amat mencolok sebesar 50 kali lipat.<sup>10,23,24</sup> Perbedaan yang penting tampaknya berhubungan dengan aktivitas sintesis DNA kardiomyosit dengan kecepatan lebih tinggi pada pasien kanker diterapi IdU.<sup>24</sup> Kajstura et al., melaporkan bahwa sintesis DNA (berdasarkan imunolabelling marker proliferasi sel Ki 67) tiga kali lebih rendah pada jantung pasien kontrol tanpa kanker daripada jantung pasien dengan kanker. Tidak disingkirkan kontribusi DNA repair, yang dapat menyamar sebagai replikasi DNA pada *assay* ini. Hal ini terutama terjadi pada pasien yang mendapat terapi radiasi plus radiosensitizer.<sup>24</sup> Kajstura et al., menyatakan bahwa hanya nuklei kardiomyosit senesen (tua) yang mengandung troponin, sehingga membuat studi Bergmann dan kawan-kawan mendapat proliferasi yang rendah. Namun studi Bergmann berikutnya mendapatkan bahwa hampir semua nuklei kardiomyosit diidentifikasi dengan pengecatan troponin.<sup>25</sup> Penemuan Kajstura et al., berkontradiksi dengan prinsip yang telah diterima baik. Pertama, penemuan ini mendapatkan bahwa lebih dari 80% nuklei kardiomyosit adalah diploid, sedangkan sebagian laporan menyatakan poliploid.

Jika nuklei adalah poliploid berarti perkiraan poliploidisasi menjadi dasar peneliti terhadap sintesis DNA.

Kedua studi memberikan bukti amat kuat bahwa jantung manusia bersifat plastisitas. Bukti morfometrik sintesis DNA dan peningkatan jumlah kardiomyosit pada penyakit jantung. Pembelahan kardiomyosit atau pembentukan sel progenitor dapat terjadi pada manusia, namun dengan proses yang sangat lambat.<sup>25</sup>

## DEDIFERENSIASI KARDIOMIOSIT

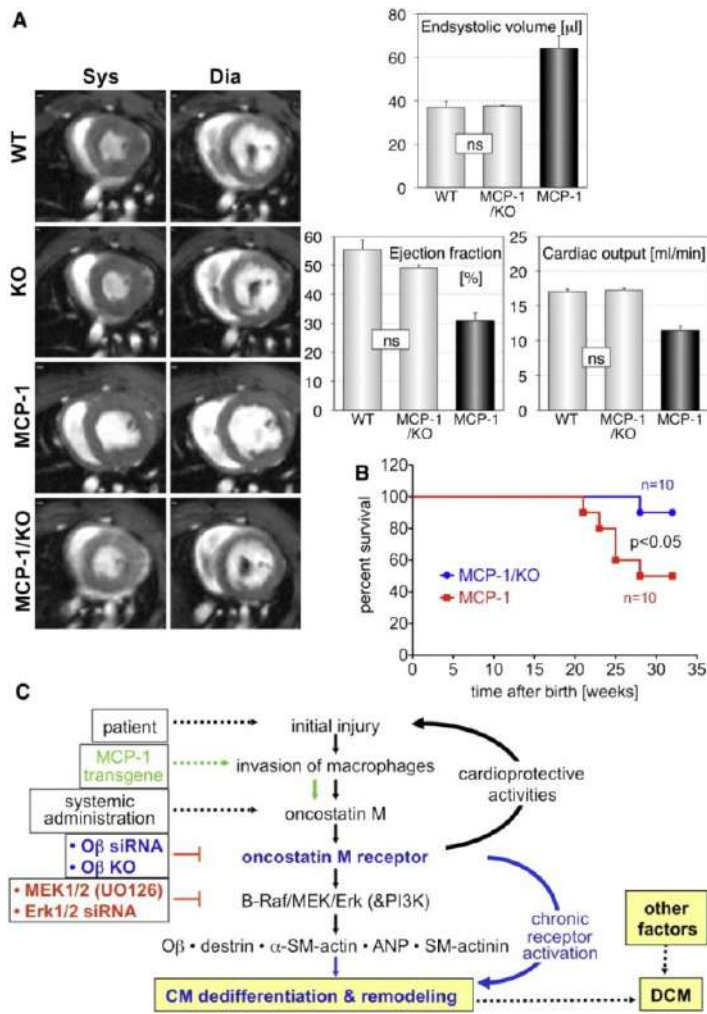
Dediferensiasi kardiomyosit pada jantung mamalia didasarkan pada interpretasi mikroskop elektron; ditandai dengan hilangnya materi kontraktil secara parsial dan *Z line* abnormal. Retikulum endoplasmik dan T-tubule berkurang sedangkan jumlah mitokondria meningkat dengan akumulasi glikogen. Di samping itu peningkatan gen fetus merupakan ciri proses konversi myosit postmitotik menjadi sel imatur.<sup>9,26</sup> Marker stem cell *Run1*, sebagai faktor transkripsi yang mengatur diferensiasi *hematopoietic stem cell* (HSC) menjadi sel darah matur,<sup>26</sup> level mRNA surface antigen c-kit yang terdapat di dalam HSC, stem cell paru,<sup>27,28</sup> meningkat hanya pada preparat kultur dari dediferensiasi myosit.

Kubin et al., mengemukakan bahwa dediferensiasi myosit merupakan mekanisme dasar proses replikasi pada myosit postmitotik pada manusia. Setelah *reprogramming* molekuler ini, kardiomyosit dapat membelah dan berkontribusi terhadap pengaturan homeostatik organ dan bertanggung jawab terhadap integritas struktur dan fungsi miokardium setelah injuri. Oncostatin M (OCM) yang mengaktivasi reseptor OSM di dalam kardiomyosit mengubah myosit dewasa menjadi sel fetus-neonatus.<sup>26</sup> Dediferensiasi kardiomyosit dimediasi OCM membantu mempertahankan performan jantung dan menurunkan kematian setelah infark, menunjukkan bahwa manfaat dediferensiasi meningkatkan tahanan terhadap hipoksia, sehingga lebih bersifat toleran terhadap iskemia.<sup>29, 30, 31</sup>

Manfaat dediferensiasi kardiomyosit pada kerusakan miokard akut berubah menjadi beban terhadap kondisi penyakit kronik dengan pemaparan kardiomyosit terhadap signaling OCM (Gambar 5).<sup>26</sup> Misalnya, pada *dilated cardiomyopathy* yang kronik menyebabkan daya kontraksi menurun sehingga mengakibatkan dilatasi ventrikel bersamaan dengan peningkatan muatan hemodinamik.<sup>26</sup> Fenomena ini

menjelaskan mengapa evolusi berlawanan dengan aktivasi jalur regeneratif dediferensiasi/rediferensiasi pada mamalia. Jalur ini mungkin hanya terjadi pada zebrafish dan salamander yang tidak memerlukan muatan tekanan untuk mempertahankan tekanan darah tinggi.<sup>32</sup> Manipulasi terhadap jalur ini memungkinkan *reprogramming* kardiomyosit secara komprehensif, menyebabkan proliferasi sel progenitor jantung *in situ*, sehingga dapat

meningkatkan fungsi jantung.<sup>26</sup> Jadi, data ini menjelaskan bahwa OCM, suatu sitokin inflamatori merupakan signal protektif pada awal stadium injuri jantung melalui dediferensiasi kardiomyosit, dengan aktivasi ekspresi gen stem cell berupa *Runx1*, *c-kit*, and *Dab2*. Namun, signaling OCM persisten, seperti terjadi pada gangguan jantung kronik, mencegah kardiomyosit dari rediferensiasi dalam mempertahankan daya dan fungsi kontraksi.<sup>33</sup>



**Gambar 5.** Perbaikan fungsi jantung pada hewan transgenik dengan inaktivasi Ob Allele (A) (A). MRI *short axis* pada midventrikel end systolic (Sys)/End-diastolic (Dia) pada WT, OCM receptor-KO (KO), MCP-1 dan MCP-1 KO pada mencit usia 6 bulan. Hilangnya reseptor OCM pada mencit MCP-1 mengakibatkan geometrik ventrikel kiri dengan menipis ventrikel dan perbaikan fungsi ventrikel kiri dapat dipertahankan. Perbaikan secara signifikan terjadi pada semua parameter fungsional. Error bar menggambarkan standard error. (B) Kurva survival Kaplan Meier menunjukkan penurunan survival MCP-1/KO dibandingkan dengan mencit MCP-1 (ditunjukkan pada grafik). (C). Model menggambarkan fungsi OCM selama injuri miokardium akut dan kronik. Injuri awal (misalnya infark miokard) menyebabkan invasi makrofag, yang melepaskan oncostatin M. Aktivasi Ob pada awalnya melindungi kardiomyosit dengan dediferensiasi dan remodeling awal. Signaling OCM kontinu mengganggu fungsi jantung dan mengakibatkan gagal jantung.

Dikutip dari Kubin T, P.ing J, Kostin S, Gajawada P, Hein S, Rees W, Wietelmann A, Tanaka M, L.rchner H, Schimanski S, Szibor M, Warnecke H, Braun T. *Oncostatin M is a major mediator of cardiomyocyte dedifferentiation and remodeling. Cell Stem Cell.* 2011;9:420-432.



**Tabel 1.** Perkiraan Jumlah Pergantian Kardiomyosit pada Mamalia Dewasa

Pergantian kardiomyosit Per tahun (%)	Spesies	Metode	Referensi
0,5-1,9	Manusia	Accelerator mass spectrometry	Bergmann et al., 2009 <sup>22</sup>
10-40	Manusia	Ki67, phospho-H3, Aurora B, IdU	Kajstura et al., 2010 <sup>16</sup>
7-23	Manusia	Accelerator mass spectrometry	Kajstura et al. 2012 <sup>35</sup>
0,04-4,5	Manusia	Phospho-3	Mollova, et al., 2013 <sup>36</sup>
1,3-4	Mencit	BrdU	Malliaras et al., 2013 <sup>37</sup>
0.74	Mencit	15N, imaging mass spectrometry	Senyo et al 2013 <sup>38</sup>
1.09	Mencit	[ <sup>3</sup> H] thymidine	Soonpaa and Field, 1997 <sup>39</sup> ; Soonpaa et al., 2013 <sup>40</sup>

Dikutip dari Garbern JC, Lee RT. Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration. *Cell Stem Cell* 2013; 12: 689-698.

## PLASTISITAS HEMATOPOIETIC STEM CELL PADA KARDIOMIOGENESIS

Kini pergantian miosit pada jantung dewasa telah diterima secara umum. Perdebatan hanya terjadi pada besarnya proses ketimbang proses itu sendiri.<sup>23</sup> Mollova et al., mendapatkan bahwa kardiogenesis pada dewasa muda adalah 1,9% pada usia 20 thun menggunakan *imaged based assay* pada sampel jaringan dari jantung donor sebelum transplantasi. Sehingga dengan semua studi yang ada (Tabel 1),<sup>34</sup> menunjukkan bahwa pergantian kardiomyosit pada mamalia postnatal menunjukkan angka yang amat kecil, sekitar 1% per tahun dan angka ini menurun dengan berlanjutnya usia.<sup>34</sup>

Sel tidak terdiferensiasi mengalami perkembangan terbatas pada prenatal dan mekanisme ini bersifat ireversibel pada kehidupan dewasa. Pemikiran ini ditantang oleh beberapa contoh yang menyatukan bahwa satu tipe sel atau satu turunan sel dapat berubah menjadi tipe turunan sel lain.<sup>41</sup> Kemampuan *adult stem cell* menghasilkan sel di luar dari jaringannya sendiri dikenal sebagai plastisitas sel.<sup>13</sup> Saat ini, istilah plastisitas dan transdiferensiasi digunakan sebagai sinonim.<sup>13</sup>

Konsep transdiferensiasi *hematopoietic stem cell-bone marrow progenitor cell* (HSC-BMPC) didasarkan pada identifikasi sel jantung perempuan di dalam sel jantung laki-laki sebagai resipien.<sup>42</sup>

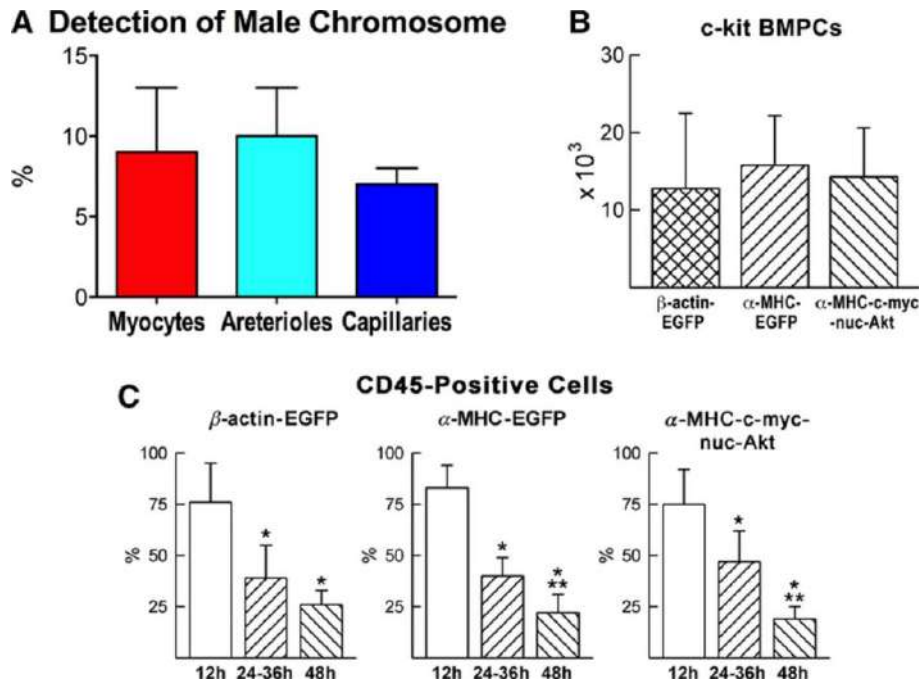
Transplantasi dengan gender berbeda menunjukkan bahwa pada laki-laki didapati jumlah miosit dan pembuluh darah koroner mengandung kromosom Y. Hal ini menunjukkan adanya kimerisme, yang berarti sel laki-laki dapat berkolonisasi di dalam jantung perempuan dan berdiferensiasi menjadi struktur miosit dan koroner (Gambar 6).<sup>13</sup> Adanya sel laki-laki di dalam jantung perempuan menunjukkan bahwa sel menyerupai stem cell dapat bermigrasi ke alograft jantung dan memberikan tiga turunan sel jantung yaitu kardiomyosit, sel endotel dan sel otot polos.<sup>13</sup>

Kini, HSC-BMPC dengan c-kit positif merupakan stem cell yang mampu berkomitmen menjadi turunan sel jantung untuk menggantikan sel infark pada miokardium dan meningkatkan fungsi ventrikel.<sup>43</sup> Hasil ini menunjukkan bahwa diferensiasi sel yang **disuntikan** menjadi fenotipe miogenik dan vaskuler sebagai mekanisme pemulihan miokard setelah infark.<sup>13</sup> Berbagai studi telah mengkonfirmasi pengamatan ini.<sup>44,45,46,47,48,49,50</sup>

HSC-BMPC dengan c-kit positif merupakan kelas progenitor hematopoietik yang menimbulkan perdebatan terhadap plastisitas stem cell.<sup>13</sup> Namun, CD34+ cells, CD133+ cells, *endothelial progenitor cells* dan *side population cell* sumsum tulang telah menunjukkan berbagai tingkat transdiferensiasi.<sup>51,52,53,54</sup> Dalam laporannya, Yeh et al. mendapatkan bahwa CD34+ cell yang diperoleh dari darah perifer dapat mengadakan transdiferensiasi menjadi

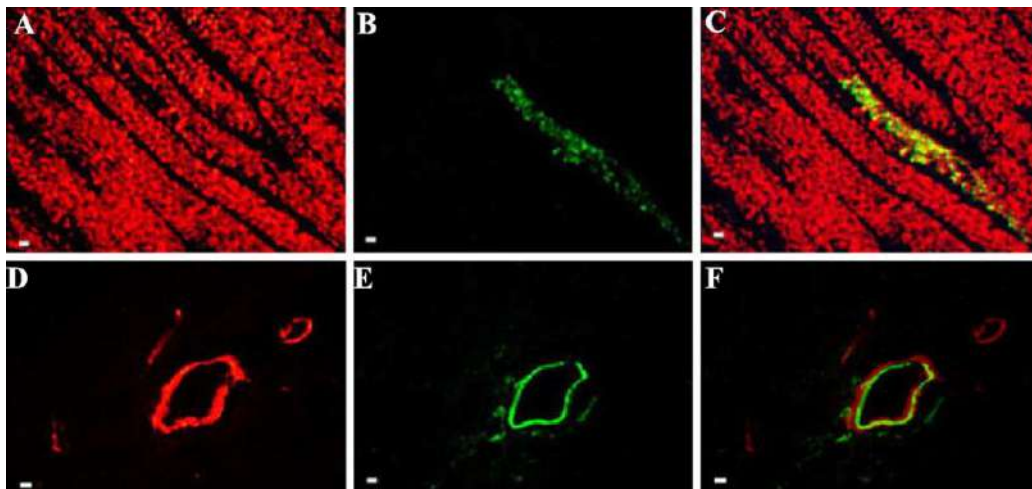
kardiomiosit, sel endotelial matur dan sel otot polos secara *in vivo*. Transdiferensiasi dapat ditingkatkan dengan injuri jaringan (Gambar 7).<sup>55</sup> Karena itu,

penggunaan CD34+ cells sebagai terapi sel merupakan metode yang dapat digunakan untuk kerusakan miokardium.<sup>55</sup>



**Gambar 6.** Stem cell *homing* dan regenerasi miokard. A. Deteksi sel laki-laki di dalam jantung perempuan dengan resipien laki-laki. B. Jumlah bone marrow progenitor cell (BMPC) yang terdapat di dalam miokardium mencit 48 jam setelah injeksi BMPS. C. BMPC dengan fraksi CD45+ dari 12-48 jam setelah implantasi sel. Hasil mean ± SD. \*P<0.05 vs 12 hours; \*\*P<0.05 vs 24 - 36 hours.

Dikutip dari Leri A, Rota M, Pasqualini FS, Goichberg P, Anversa P. Origin of cardiomyocytes in the adult heart. *Circ Res.* 2015;116:150-166.

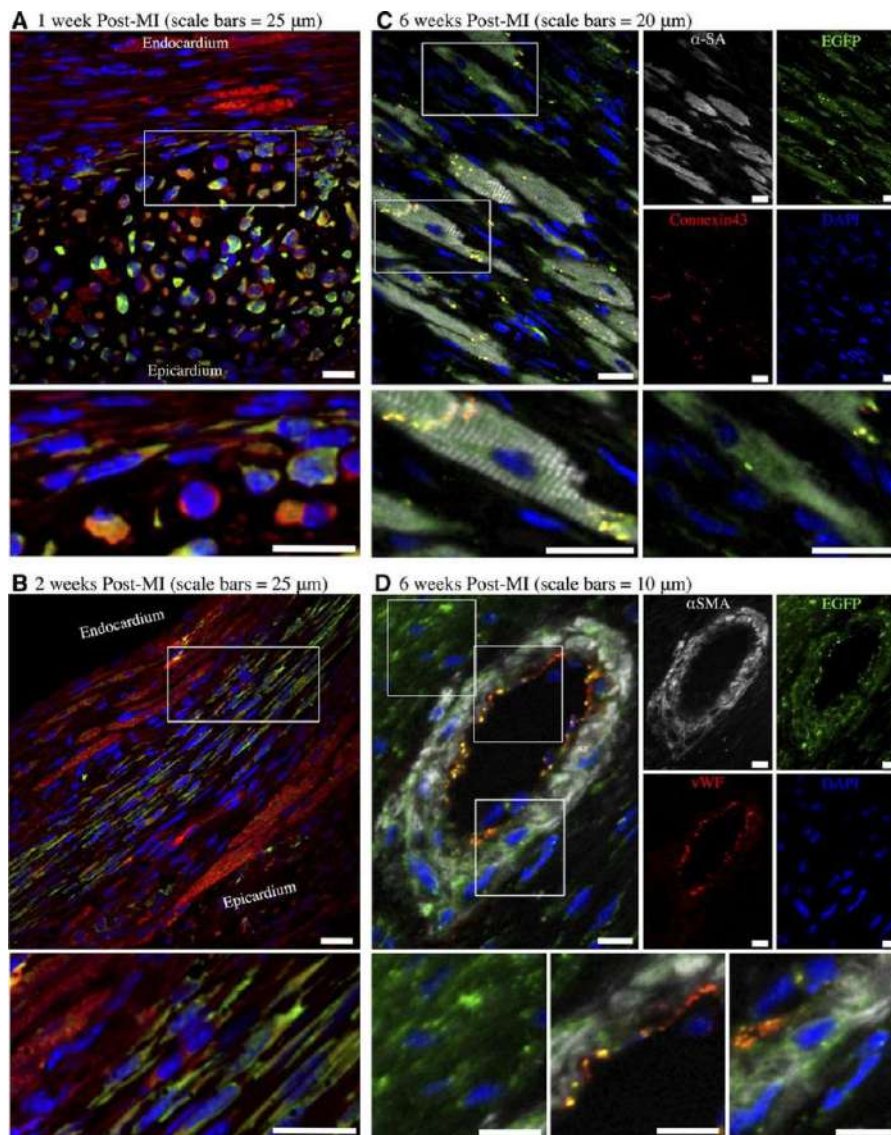


**Gambar 7.** Pengecatan imunoflouresen menunjukkan transdiferensiasi CD34+ cell darah perifer yang disuntikkan secara intravena ke dalam mencit tanpa infark miokard. Potongan jaringan jantung yang diperoleh 12 hari setelah suntikan dan dilakukan pengecatan untuk HLA-ABC (B dan E), cardiac troponin T (A) dan otot polos dengan α-actin (D). Image C dan F adalah hasil *merger* dari pengecatan ganda. Pembesaran x200. Scaca bar = 10 mm.

Dikutip dari Yeh ETH, Zhang S., Wu HD, Körbling M, Willerson JT, Estrov Z. Transdifferentiation of human peripheral blood CD34+ enriched cell population Into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells *in vivo*. *Circulation* . 2003;108:2070-2073.

*Mesenchymal stromal cell* sumsum tulang juga telah menunjukkan kemampuan menjadi turunan kardiomyosit, meskipun fungsi utama dimediasi oleh pelepasan faktor pertumbuhan dan sitokin dengan mengaktifasi *cardiac stem cell* residen. <sup>56</sup>c-kit pada *cortical bone-derived stem cell* dapat menghasilkan mioisit dan pembuluh darah koroner. <sup>57</sup> *Cortical bone-derived stem cell* dapat mengadakan transdiferensiasi secara langsung menjadi mioisit dan secara tidak

langsung membentuk arteriole dan kapiler koroner dengan mengsekresi faktor proangiogenik yang merangsang neovaskularisasi endogen. Karena itu, CD34+ cell, CD133+ cell, *endothelial progenitor cell*, bone marrow *side population cells*, *mesenchymal stromal cells* dan *cortical bone-derived stem cell* dapat menghasilkan miokardium baru. Namun, faktor parakrin juga relevan dalam mekanismes ini, sama halnya dengan transdiferensiasi. <sup>13</sup>



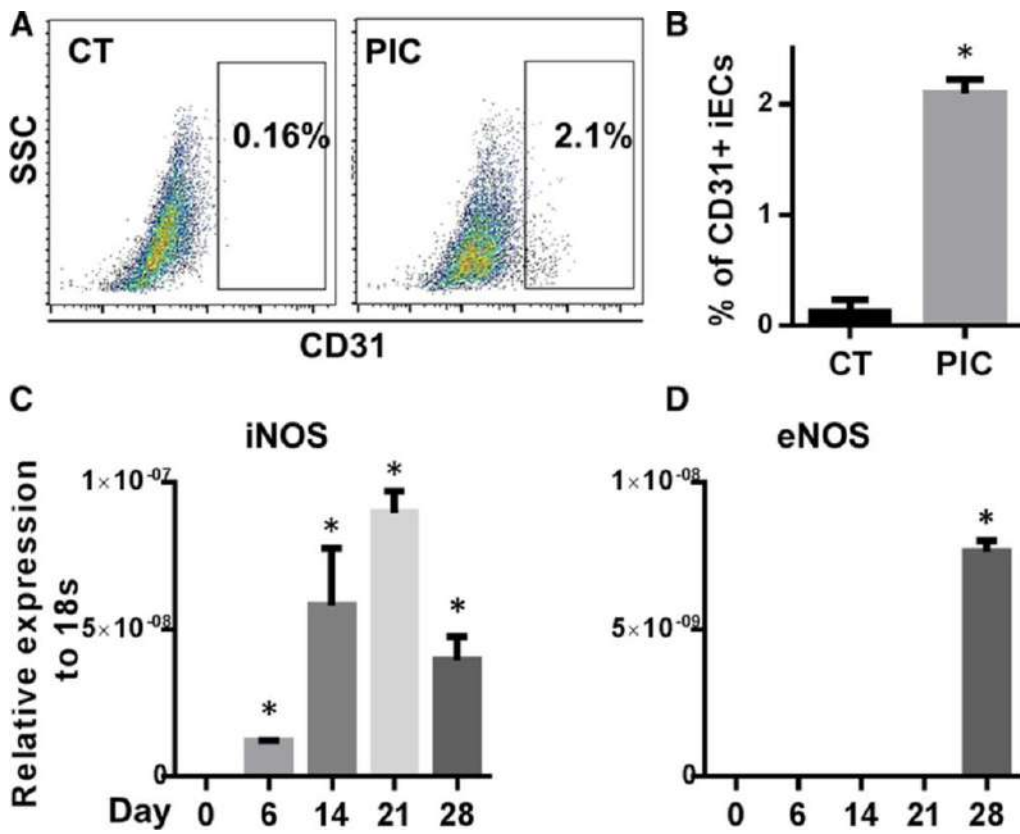
**Gambar 8.** Cortical bone stem cell bertumbuh dan berdiferensiasi selama 6 minggu. A. 1 minggu pasca infark miokard dan (B). 2 minggu pasca infark miokard, sampel diberikan *immunostaining* untuk  $\alpha$ -sarcomeric actin ( $\alpha$ -SA; putih), connexin 43 (merah), dan EGFP (hijau) atau (D)  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA; putih), von Willebrand factor (vWF; merah), dan EGFP (hijau). Nuklei diberi label 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; biru). EGFP : enhanced green fluorescent protein.

Dikutip dari Duran JM, Makarewich CA, Sharp TE, Starosta T, Zhu F, Hoffman NE, Chiba Y, Madesh M, Berretta RM, Kubo H, Houser SR. Bone-derived stem cells repair the heart after myocardial infarction through transdifferentiation and paracrine signaling mechanisms. *Circ Res.* 2013;113:539-552.

Untuk mengetahui diferensiasi *cortical bone marrow stem cell* (CBSC), Duran et al., melakukan kokultur CBSC dengan *neonatal rat ventricular myocyte* dan diwarnai dengan  $\alpha$ -sarcomeric actin. Pewarnaan ini menunjukkan adanya *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) positive cell mengekspresikan  $\alpha$ -sarcomeric actin dan menyatu dengan connexin 43 *gap junction*, sehingga tampak sebagian EGFP cell yang berkontraksi setelah dikultur selama 72 jam. Hal ini membuktikan bahwa CBSC dapat mengadakan transdiferensiasi menjadi sel yang mengekspresikan protein jantung spesifik secara *in vitro*. Dalam penelitian secara *in vivo*, diperoleh bahwa suntikan CBSC dalam 2 minggu setelah infark miokard pada mencit menunjukkan pemanjangan dan penyatuan aksis kontraksi, dengan adanya organisasi sarkomerik dari ekspresi  $\alpha$ -sarcomeric actin di dalam sitoplasma (Gambar

8B).<sup>56</sup> EGFP cell mengadakan *engrafting* terhadap miosit endogen, sehingga membuktikan adanya transdiferensiasi CBSC menjadi kardiomyosit.<sup>56</sup>

Dalam studi Sayed et al., mendapatkan bahwa fibroblast dapat mengalami transdiferensiasi menjadi sel endotel menggunakan molekul kecil toll-like receptor 3 agonist Poly I:C, dikombinasikan dengan faktor pertumbuhan sel endotel. Sel endotel yang diinduksi dapat meningkatkan perfusi anggota gerak dan neovaskularisasi pada anggota gerak iskemik. Transdiferensiasi yang efektif ini memerlukan aktivasi imun alamiah.<sup>58</sup> Timbul pertanyaan : Molekul apa yang meningkatkan transdiferensiasi ? Kelompok studi ini mendapatkan bahwa aktivator imunitas alamiah polyinosinic:polycytidylic acid, dapat mengaktivasi NO (nitric oxide) yang dihasilkan melalui iNOS *signaling* (Gambar 9).<sup>59</sup>



**Gambar 9.** Transdiferensiasi berhubungan dengan aktivasi imunitas alamiah dan ekspresi *inducible nitric oxide synthase* (iNOS). BJ fibroblast pada pasase 8 dilakukan perlakuan protokol transdiferensiasi untuk menghasilkan induced endothelial cells (iEC). A. Data FACS CD31+iEC pada hari ke 28. Sel diberi perlakuan protokol transdiferensiasi dengan dan tanpa polyinosinic:polycytidylic acid (PIC). B. Perhitungan persentase CD31+ cell dengan analisis FACS. Level ekspresi gen relatif iNOS (C) dan eNOS (D) selama transdiferensiasi pada hari ke 0, 6, 14, 21, dan 28 dengan real time polymerase chain reaction (PCR). \*P<0.05, vs ekspresi gen pada hari 0. \*P<0.05, vs CT diberi vehicle. Data dipresentasikan sebagai means±SEM dengan 3 eksperimen independen.

Dikutip dari Meng S, Zhou , Gu Q, Chanda PK, Ospino F, Cooke JP. Transdifferentiation requires OS activation. Role of RING1A S-nitrosylation. *Circ Res.* 2016;119:e129-e138.



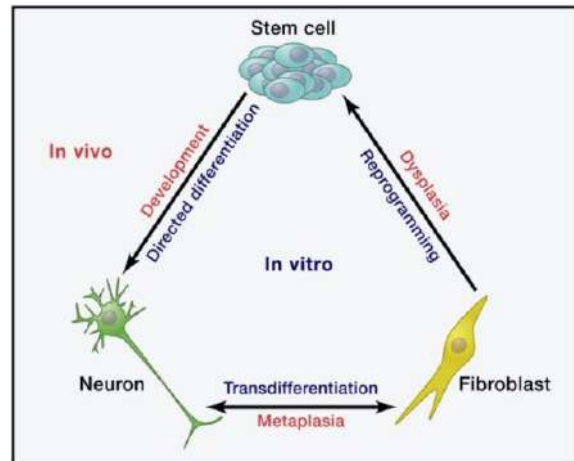
Selanjutnya NO menyebabkan pembentukan S nitrosothiol pada *epigenetic modifier ring finger protein 1A* (RING1A), suatu anggota *polycomb repressive complex* (PRC), yang bekerja mengurangi kadar H3K27 trimethylation, dengan berikatan terhadap kromatin. Pelepasan represi epigenetik oleh nitrosilasi RING1A merupakan faktor penting terjadi transdiferensiasi efektif.

Hasil studi menunjukkan bahwa iNOS diperlukan untuk memberikan S-nitrosothiol yang secara langsung berikatan dengan *epigenetic modifier* sehingga mengatur remodeling kromatin selama transdiferensiasi. Karakteristik S-nitrosylation adalah memberikan efek epigenetik, yaitu menyebabkan S-nitrosilasi RING 1A dan menyebabkan disosiasi dari kromatin, sehingga mengganggu kemampuan PRC mempertahankan trimetilasi H3K27. Perubahan ini dapat meningkatkan plastisitas epigenetik,<sup>60,61</sup> yang **dikonfirmasi** dengan pemeriksaan *chromatin immunoprecipitation-qPCR* pada regio promoter yang sesuai.<sup>58,62</sup>

Aktivasi imunitas alamiah juga dapat meningkatkan ekspresi family *histone acetyltransferase* dan menekan histone deacetylase dan DOT1L (DOT1-like histone lysine methyltransferase). Perubahan terhadap keseimbangan *epigenetic modifier* diharapkan meningkatkan *epigenetic plasticity*.<sup>58</sup> Transdiferensiasi dari fibroblast menjadi sel endotel bermanfaat dalam regenerasi kardiovaskuler. Misalnya, strategi ini efektif mengubah proses penyembuhan dengan mencegah pembentukan jaringan parut (scar) dan mempermudah pembentukan jaringan pembuluh darah, dalam respon terhadap injuri.<sup>59</sup>

## DEDIFERENSIASI PANKREAS

Pada awalnya progresivitas stem/progenitor cell ke arah sel terdiferensiasi dipikirkan sebagai suatu perkembangan satu arah. Namun sekarang, nasib sel yang sudah terdiferensiasi bersifat fleksibel.<sup>63,64,65</sup> Identitas sel tidak hanya dapat dimanipulasi melalui diferensiasi stem cell (sama dengan perkembangan normal), tetapi juga dediferensiasi (seperti displasia) dan transdiferensiasi (seperti metaplasia) (Gambar 10).<sup>65</sup> Transisi sel terdiferensiasi menjadi tipe sel lain (metaplasia) atau menjadi fenotipe yang lebih tidak terdiferensiasi (displasia) dalam mekanisme *in vivo*.<sup>65</sup> Menentukan nasib atau identitas sel merupakan fokus penelitian regeneratif.<sup>65,66</sup>



**Gambar 10.** Perubahan identitas sel *in vivo* dan *in vitro*. Identitas sel merupakan sejumlah lanskap epigenetik sel, yang dapat berubah melalui proses *in vivo*, termasuk perkembangan, metaplasia, dan displasi. Juga dapat dimanipulasi melalui protokol peneliti seperti *directed differentiation*, transdiferensiasi, dan *reprogramming* pada sel mamalia.

Dikutip dari Cherry AB, Daley GQ. Reprogramming cellular identity for regenerative medicine. *Cell* 2012; 148: 1110–1122.

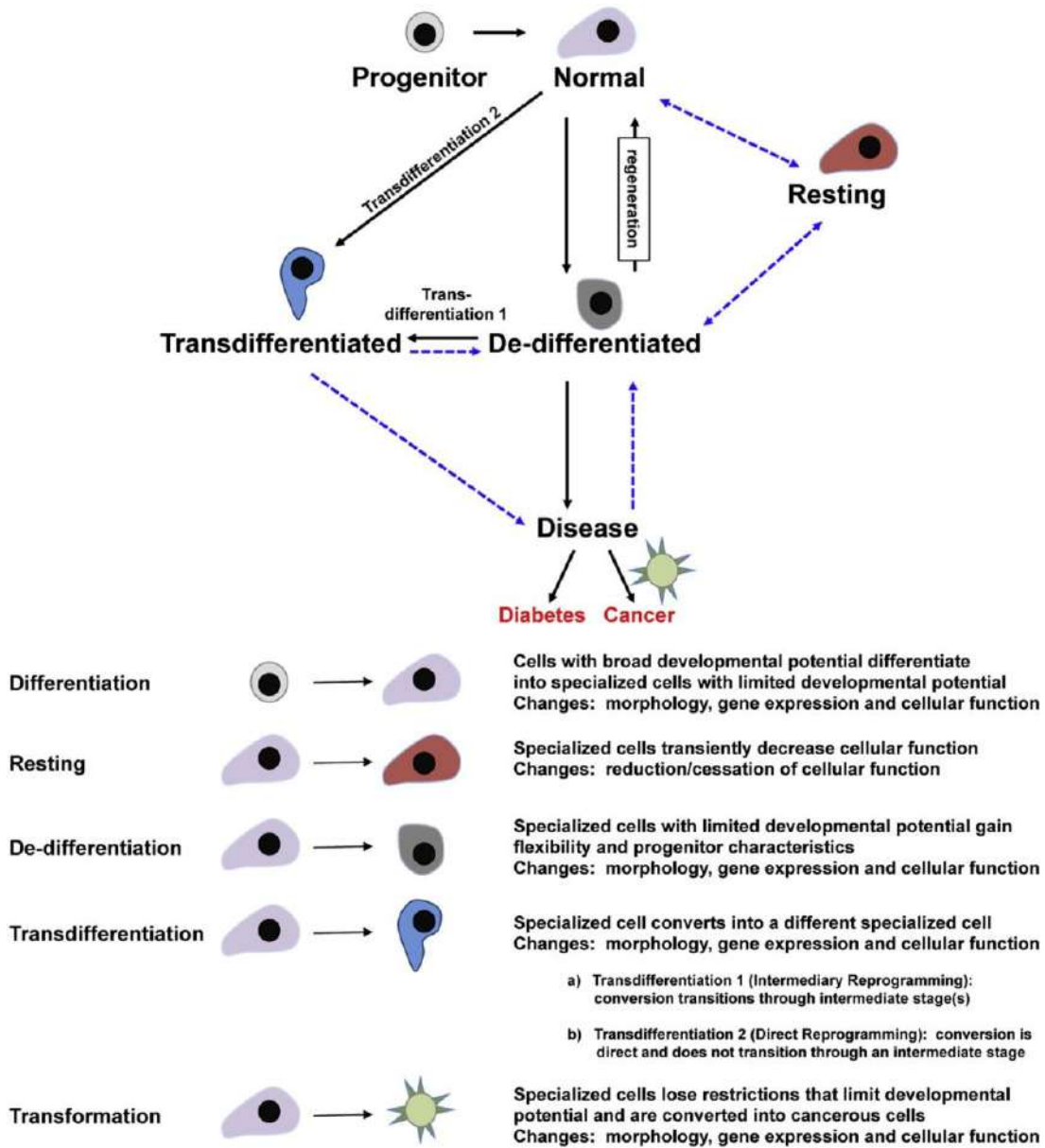
Banyak bukti mengemukakan bahwa sebagian besar tipe sel terdiferensiasi akhir pada pankreas dapat berubah menjadi sel pankreas lain, sehingga mendukung plastisitas sel dari sel terdiferensiasi. Peningkatan plastisitas sel ini mungkin merupakan suatu strategi mekanisme pertahanan yang memungkinkan sel pankreas terdiferensiasi masuk ke siklus istirahat dan menghindari injuri atau kematian yang disebabkan injuri berkelanjutan.<sup>65</sup>

Pankreas adalah organ yang berasal dari turunan endoderm yang memiliki sel eksokrin yang mensekresi enzim pencernaan yang memberikan suplai ke dalam usus melalui saluran duktus, sedangkan sel endokrin berfungsi mengatur glukosa darah melalui sekresi hormon, termasuk insulin dan glukagon masing-masing dihasilkan oleh sel  $\beta$  dan sel  $\alpha$  pankreas. Meskipun fungsi kedua jenis sel sangat berbeda tetapi sama-sama berasal dari satu progenitor, sehingga memicu peneliti mengidentifikasi pengatur identitas sel di dalam pankreas selama perkembangan dan mekanisme yang mengatur fleksibilitas nasib sel setelah diferensiasi terminal terjadi. Plastisitas sel pankreas dapat didefinisikan sebagai kemampuan sel terdiferensiasi (eksokrin dan endokrin) menjadi tipe sel lain di dalam turunan organ yang sama dengan kehilangan gambaran fungsi dan sel matur.<sup>65</sup>



Transdiferensiasi adalah perubahan satu tipe sel pankreas matur menjadi turunan sel lain. Proses ini dapat terjadi secara langsung tanpa melewati transisi *intermediate* seperti *reprogramming* atau melalui ekspresi oleh faktor

transkripsi atau melalui jalur dediferensiasi menjadi stadium yang menyerupai progenitor kemudian melakukan rediferensiasi menjadi turunan sel lain dalam kondisi injuri jaringan (Gambar 11).<sup>66</sup>

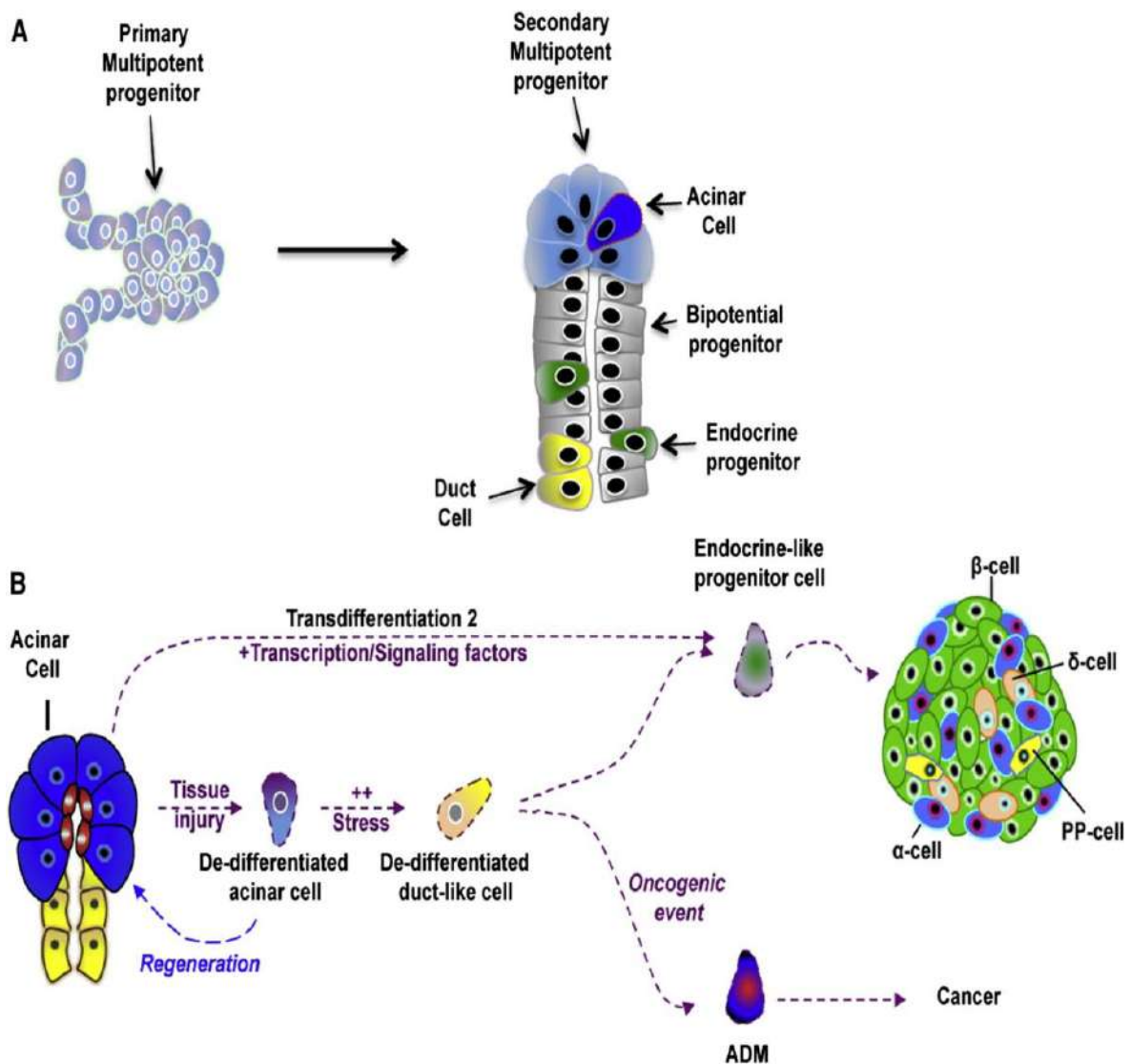


**Gambar 11.** Transisi antara sel terdiferensiasi dalam respon terhadap manipulasi genetik atau injuri dan kaitan dengan penyakit pankreas. Skema ini menggambarkan transisi sel yang berpotensi terjadi sebagai respon terhadap injuri. Sel “Normal” dapat berubah menjadi nasib sel baru yang disebut sel mengalami “Transdiferensiasi” atau kehilangan fungsi dan menjadi “Dediferensiasi”. Transisi menjadi fenotipe sel baru dapat terjadi secara langsung atau melalui keadaan dediferensiasi. Kondisi “Resting” juga mungkin terjadi, ketika sel berhenti berfungsi secara normal tetapi mendapat identitas sel dan dapat kembali berfungsi normal. Stres berkepanjangan, injuri atau aktivasi jalur onkogenik dapat mengubah sel “Dediferensiasi” menjadi kondisi penyakit, menyebabkan patogenesis. Keadaan ini juga terjadi jika sel “Transdiferensiasi” tidak stabil dan mengalami modulasi. Proses sel yang sakit kembali menjadi sel “Normal” merupakan implikasi terapi sel. Panah biru terputus-putus menggambarkan hipotesis perubahan nasib sel.

Dikutip dari Puri S, Folias AE, Hebrok M. *Plasticity and dedifferentiation within the pancreas: development, homeostasis, and disease. Cell Stem Cell* 2015; 16: 18-31.

Dediferensiasi didefinisikan sebagai hilangnya karakteristik sel terdiferensiasi terminal, baik keadaan matur dan berubah nasib menjadi imatur baik bersifat diturunkan atau stimulasi eksternal. **Alternatif** lain adalah bahwa sel yang mengalami dediferensiasi berhenti berfungsi tetapi berada dalam keadaan *resting* ketika kerusakan berlangsung.<sup>65</sup> Sel eksokrin acinar pankreas dapat mengadakan dediferensiasi menjadi fenotipe sel menyerupai duktus akibat respon terhadap stres seperti injuri

atau inflamasi. Sel acinar mengalami perubahan morfologi, dengan reduksi ekspresi dari marker acinar matur bersamaan dengan peningkatan ekspresi faktor yang diekspresikan pada perkembangan embrio normal. Sel yang mengalami dediferensiasi menunjukkan kualitas sel duktus dan sel progenitor selama perkembangan pankreas termasuk ekspresi Sox9, Hnf6, Hes1, Pdx1, dan Nestin, istilah sel menyerupai duktus untuk menjelaskan populasi sel ini.<sup>67, 68, 69, 70, 71, 72, 73</sup>

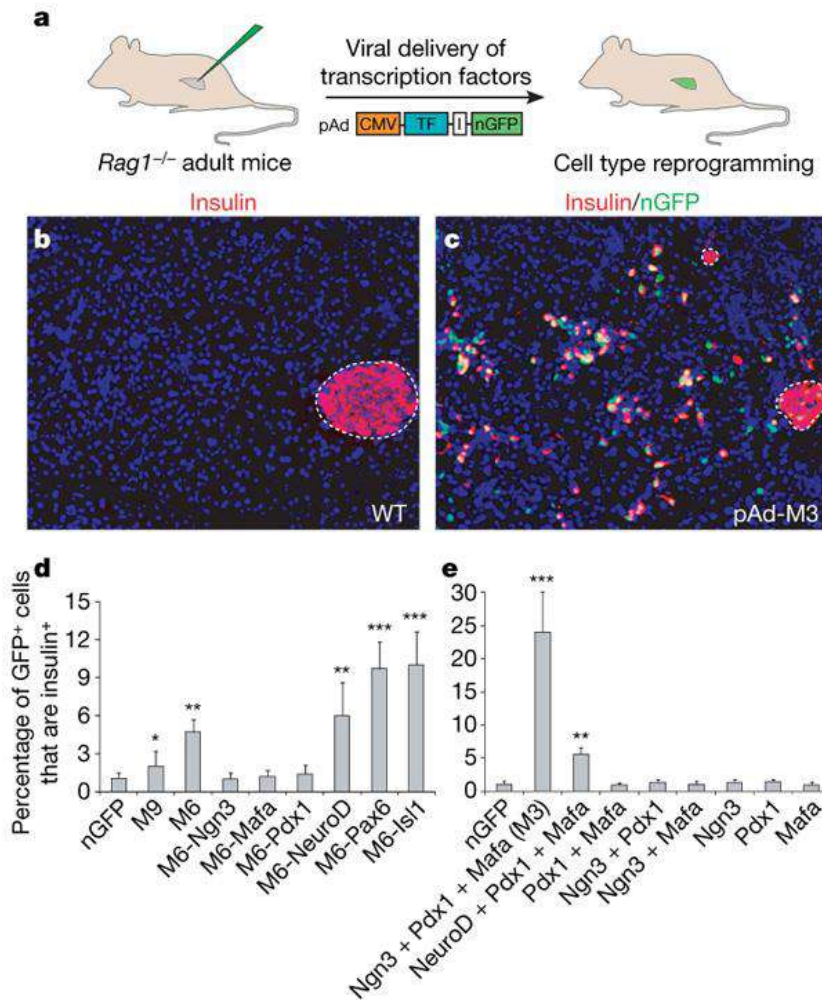


**Gambar 12.** Dediferensiasi acinar menyerupai sel progenitor multipoten embrio. (A) Skema menggambarkan berbagai turunan pankreas berasal dari satu sel progenitor multipoten yang berhubungan dekat dengan sel acinar. (B) Skema menunjukkan bagaimana stres sel (akibat injuri, ekspresi faktor transkrips, tekanan metabolik, inflamasi) menyebabkan dediferensiasi sel acinar matur. ADM, acinar-to-ductal metaplasia.

Dikutip dari Puri S, Folias AE, Hebrok M. *Plasticity and dedifferentiation within the pancreas: development, homeostasis, and disease. Cell Stem Cell* 2015; 16: 18-31.

Dediferensiasi sel acinar menciptakan sel progenitor fakultatif yang mampu mengadakan repopulasi berbagai tipe sel pankreas. Selama perkembangan awal pankreas, sel progenitor multipoten berada pada ujung cabang epitel membelah dan meninggalkan progeni berdiferensiasi menjadi duktus dan sel endokrin yang membentuk trunkus percabangan (Gambar 12 A). Progenitor multipoten di bagian ujung akhirnya berdiferensiasi menjadi sel acinar, menunjukkan bahwa sel acinar merupakan sel progenitor multipoten embrio.<sup>74,75</sup> Dediferensiasi

sel yang menyerupai duktus dapat dilihat pada injuri pankreas, termasuk ligase duktus parsial dan pankreatitis yang diinduksi zat kimia, menunjukkan bahwa sel pankreas dapat mengadopsi keadaan menyerupai progenitor yang membantu repopulasi organ setelah injuri. Misalnya, ketika analog kolesistokinin caerulein digunakan untuk merangsang sel acinar mengsekresi jumlah enzim pencernaan secara berlebihan, maka respon sel acinar adalah menghentikan ekspresi enzim pencernaan dan melakukan ekspresi faktor progenitor/stres.<sup>71,73,76</sup>



**Gambar 13.** Kombinasi 3 faktor transkripsi menginduksi sel insulin pada pankreas mencit dewasa secara *in vivo*. a, Diagram skematik strategi eksperimen. Adenovirus yang menyandi faktor transkripsi dan nGP dihubungkan dengan elemen IRES (I) disuntikan ke dalam pankreas mencit dewasa (*Rag2/2*). CMV, cytomegaloviral promoter. B, Pankreas Wild type (WT) dengan dominan jaringan eksokrin dan sel-β insulin<sup>+</sup> diberi tanda lingkaran. Nuklei diberi pengecatan biru dengan DAPI. C, Satu bulan setelah infeksi dengan kombinasi Ngn3, Pdx1, dan Mafa oleh virus (pAd-M3), banyak sel insulin<sup>+</sup> tampak di luar pulo pankreas. D,E Jumlah induksi satu bulan setelah infeksi. M9, M6: campuran 9 dan 6 jenis masing-masing virus berbeda. Data dipresentasikan sebagai means±sd; n=53 hewan coba. 1000 sel GFP1 dihitung per hewan coba. Satu bintang p<0.05, dua bintang p<0.01; tiga bintang, P< 0.001.

Dikutip dari Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. *In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells.* Nature 2008; 455: 627-632.

*Reprogramming* direk dari pankreas eksokrin menjadi populasi endokrin menggunakan faktor eksogen menunjukkan bahwa sel dapat dengan cepat mengalami transdiferensiasi direk.<sup>77,78</sup> Zhou et al., menggunakan tiga faktor transkripsi Ngn3 (juga dikenal sebagai Neurog3), Pdx1 dan Mafa, dapat mereprogram sel eksokrin pankreas pada mencit dewasa menjadi sel yang menyerupai sel- $\beta$ . Sel ini mengekspresikan gen sel  $\beta$  dan mensekresi insulin yang berfungsi mengurangi hiperglikemia.<sup>77</sup>

Faktor transkripsi dimasukkan ke dalam pankreas melalui vector adenovirus. Vektor ini menginfeksi sel eksokrin pankreas, tidak sel pulo pankreas yang terutama mengandung sel  $\beta$  endogen (Gambar 13 b).<sup>77</sup> Sel- $\beta$  yang diinduksi dapat dilihat sebagai sel insulin + yang berada di luar pulo pankreas.<sup>77</sup> Label 5-bromodeoxyuridine (BrdU) secara kontinu dalam reprogram 10 hari pertama menunjukkan bahwa sel- $\beta$  yang diinduksi sebesar 3,2% telah membelah. Sebagai perbandingan, 12,9% sel  $\beta$  endogen pada hewan yang sama diinkorporasi BrdU. Tidak ada induksi Sox9 atau Hnf6, berarti bahwa *reprogramming in vivo* dari sel eksokrin menjadi sel- $\beta$  adalah konversi langsung tipe sel dan tidak melibatkan dediferensiasi (Gambar 14).<sup>77</sup> Sel eksokrin dan sel- $\beta$  memiliki progenitor yang sama selama embriogenesis, ditandai dengan pembelahan dan ekspresi gen meliputi Sox9 dan Hnf6 yang dikenal sebagai *Onecut1*.<sup>75</sup>

Li et al. melaporkan bahwa menggunakan strategi ekspresi adenovirus untuk membawa kombinasi tiga faktor transkripsi pada mencit dewasa, sel acinar pankreas dapat diubah menjadi sel menyerupai sel  $\delta$  dan sel  $\alpha$ , dua jenis subtype sel endokrin. Jadi, pendekatan kombinasi dapat menghasilkan populasi subtype sel.<sup>78</sup>

Penelitian lain juga melaporkan bahwa sel acinar dapat direprogram menjadi sel- $\beta$  baik *in vitro*<sup>79,80,81</sup> maupun *in vivo*<sup>82</sup> menggunakan *epidermal growth factor* (EGF) dan ciliary neurotrophic factor (CNTF). Perlakuan dengan EGF dan CNTF menyebabkan *reprogramming* sel acinar pada mencit hiperglikemik menghasilkan massa sel- $\beta$  yang dapat berfungsi mengembalikan dan mempertahankan normoglikemia dalam proses indirek bergantung pada Ngn3 dan signaling melalui Stat3.<sup>82</sup>

Ablasi sel- $\beta$  menyebabkan sel  $\alpha$  yang mengekspresikan glukagon dan sel  $\delta$  yang mengekspresikan somatostatin menjadi sel  $\beta$

menghasilkan insulin.<sup>83,84</sup> Selanjutnya, konversi sel  $\beta$  menjadi sel menyerupai sel  $\alpha$  setelah kehilangan Pdx1 menunjukkan bahwa tidak ada bukti keadaan progenitor endokrin (kurangnya ekspresi Arx dan Ngn3), hal ini menunjukkan bahwa konversi direk melalui keadaan hybrid dengan sel menunjukkan baik sifat  $\alpha$  dan  $\beta$ .<sup>85</sup> Agregasi kembali pulo pankreas manusia menyebabkan sel yang mengekspresikan glukagon terus mengekspresikan Pdx1 dan Nkx6.1.<sup>86</sup> Sel ini menyerupai sel multihormon positif yang dapat dihasilkan dari *embryonic stem cell* manusia selama *directed differentiation*, sedangkan lingkungan yang kurang sesuai menyebabkan aktivasi gen spesifik sel  $\beta$  dan  $\alpha$ .<sup>87</sup> Konversi sel  $\beta$  menjadi sel endokrin lain selanjutnya dediferensiasi juga telah terjadi (Gambar 14).<sup>88,89</sup> Konversi ini antara sel endokrin dipermudah oleh kesamaan struktur kromatin antara berbagai sel endokrin yang berbeda. Karena itu, supresi identitas sel  $\beta$  mungkin akan menghilangkan faktor yang merepresi identitas sel endokrin non- $\beta$ .

Pemahaman plastisitas sel pankreas berkontribusi terhadap manifestasi berbagai penyakit pankreas yang berpengaruh terhadap pendekatan terapeutik. Mengetahui faktor yang **meningkatkan**, menghambat, atau menstabilkan proses akan membawa implikasi terhadap berbagai strategi pengobatan untuk terapi penggantian sel  $\beta$ , diabetes dan kanker pankreas. Pada model kanker **pankreas**, tindakan menghilangkan aktivitas onkogenik Kras pada lesi prekursor dapat mengembalikan sel ke arah acinar sehingga mengurangi beban tumor.<sup>90,91</sup>

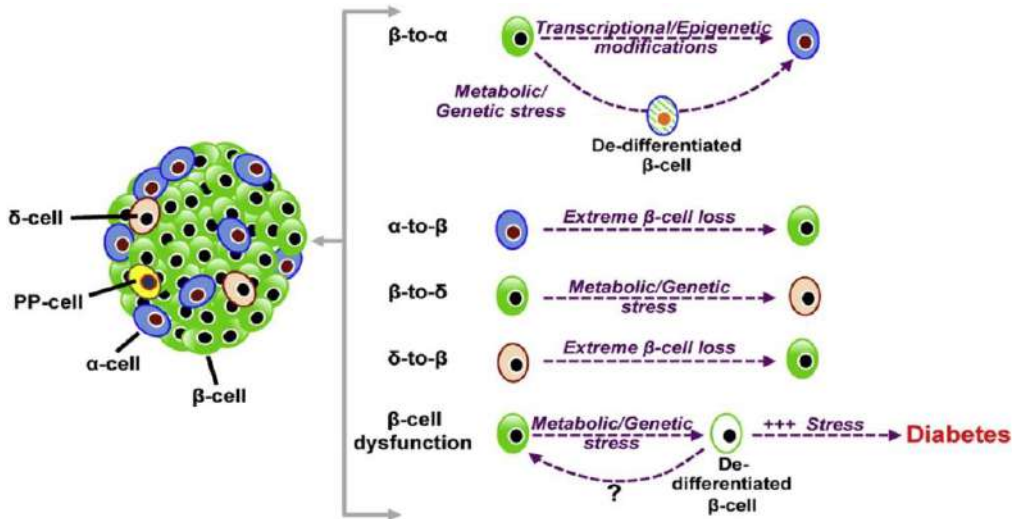
Selain itu, *reprogramming* direk secara *in vivo* juga telah berhasil dilakukan pada berbagai organ lainnya.<sup>92,93,94,95,96,97,98,99</sup> Sel glial, terutama astroosit juga telah dikonversi menjadi neuroblast atau neuron secara *in vivo*.<sup>97,99,100</sup> Misalnya, pada model mencit penyakit Alzheimer, Guo et al., telah berhasil mereprogram sel glia reaktif menjadi neuron fungsional, sehingga dapat diaplikasikan untuk perbaikan otak.<sup>100</sup> Jadi, penggunaan berbagai kombinasi faktor transkripsi efektif mereprogram satu *lineage* sel ke sel lain (Gambar 15).<sup>101</sup> dan ini menunjukkan bahwa sel yang telah terdiferensiasi masih memiliki sifat plastisitas<sup>101</sup>

Faktor transkripsi yang pertama kali ditemukan yaitu MyoD tahun 1980 an, di laboratorium Harold Weintraud mampu menginduksi pembentukan myotube **dari** cell line fibroblast.<sup>102</sup> Namun, bukti pengaturan resiprokal dari lineage-restricted gene berasal dari sistem darah. Dengan menggunakan



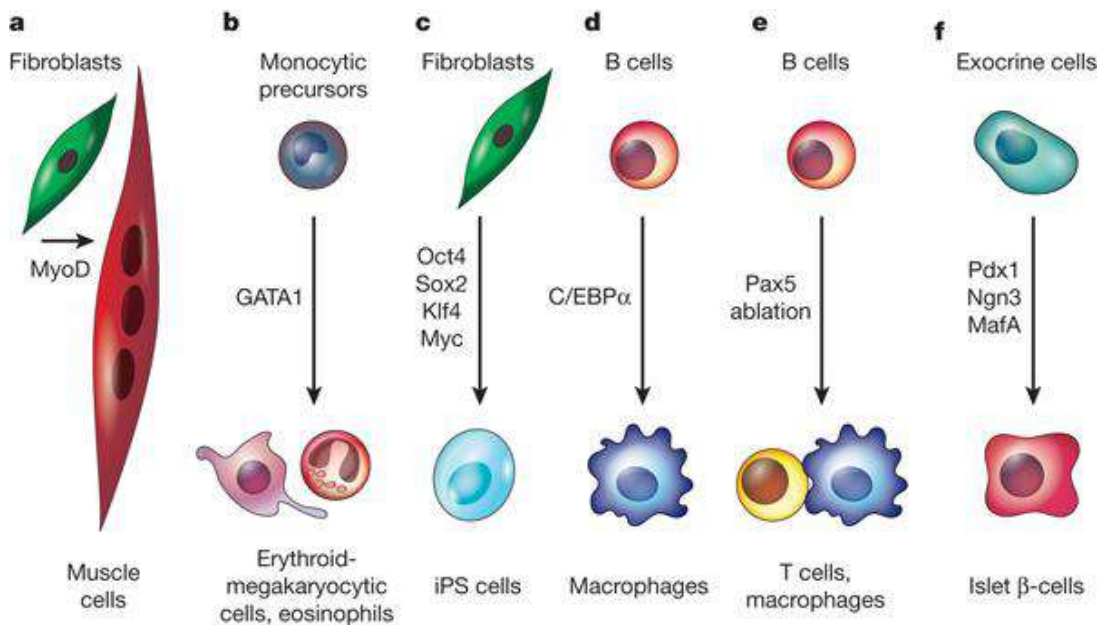
faktor transkripsi GATA1, tidak hanya menginduksi ekspresi marker turunan erythroid-megakariosit, tetapi juga mengurangi marker monositik.<sup>103,104</sup> Level GATA1 yang lebih rendah menginduksi pembentukan eosinofil, sesuai dengan level eosinofil (Gambar 14). Perubahan monositik ke erythroid juga dipengaruhi arah yang berlawanan ekspresi PU.1 (dikenal Sfp1) pada cell line erythroid-megakariosit yang menginduksi

konversi monocytic lineage, dengan represi GATA1.<sup>105</sup> Sel terdiferensiasi penuh juga dapat diubah menggunakan C/EBPα, suatu faktor transkripsi yang diperlukan untuk mengubah progenitor sel B dan sel T menjadi makrofag fungsional<sup>106</sup> dengan frekuensi mendekati 100%.<sup>107,108</sup> Sel B matur yang menghasilkan immunoglobulin juga dapat diubah dengan frekuensi lebih rendah (Gambar 14).<sup>101</sup>



**Gambar 14.** Konversi sel endokrin di dalam pulau pankreas. Perubahan nasib sel antara sel endokrin dapat terjadi dalam kondisi stres yang berbeda. Hal ini terjadi secara direk atau melalui dediferensiasi. Stres berkelanjutan pada sel β dapat menyebabkan dediferensiasi menjadi diabetes.

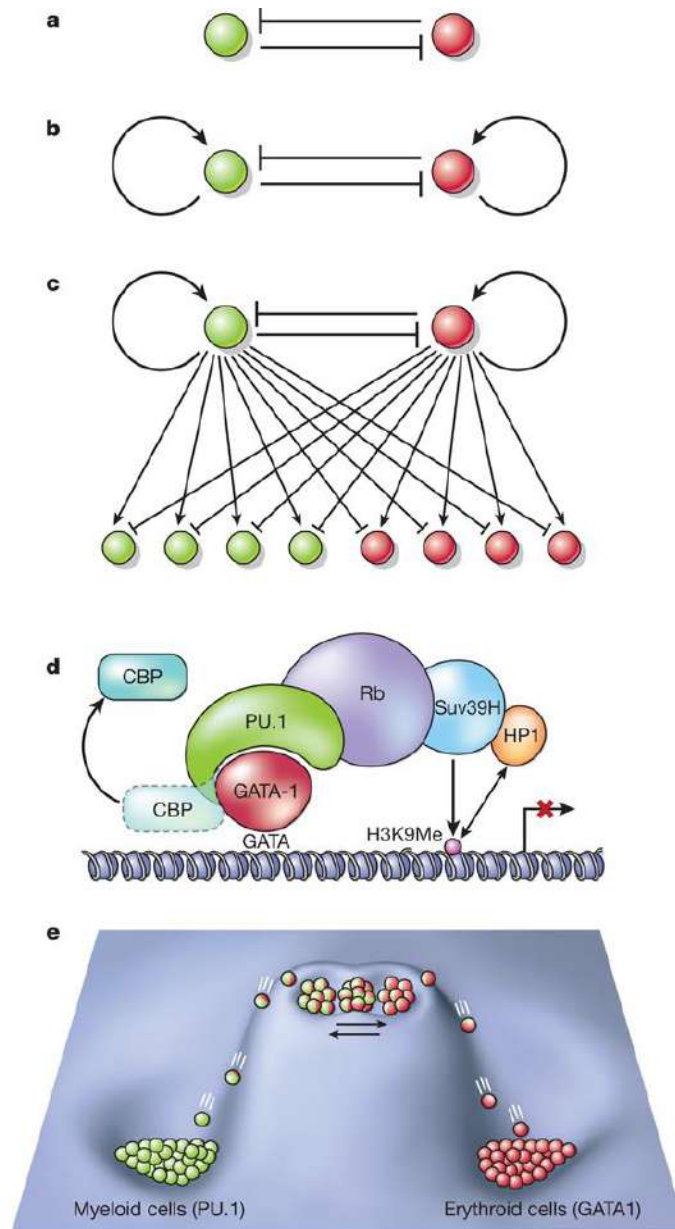
Dikutip dari Puri S, Folias AE, Hebrok M. Plasticity and dedifferentiation within the pancreas: development, homeostasis, and disease. *Cell Stem Cell* 2015; 16: 18-31.



**Gambar 15.** Overekspresi faktor transkripsi atau ablasi menyebabkan perubahan nasib atau identitas sel.

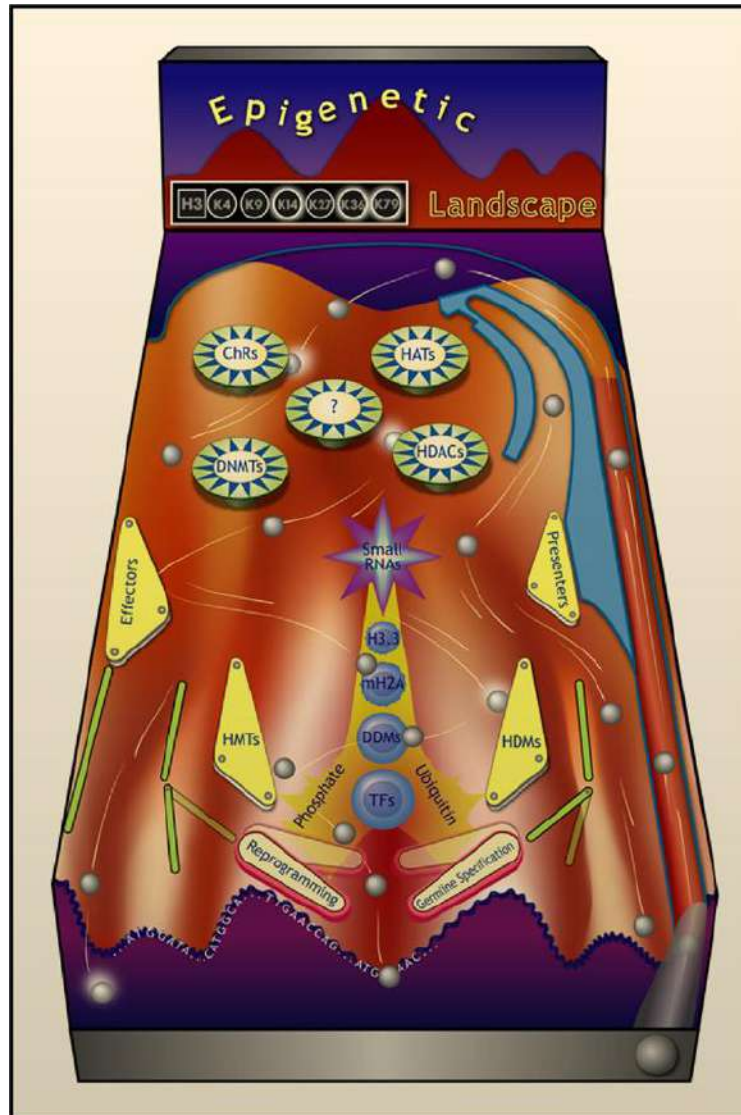
Dikutip dari Graf T, Tariq Enver T. Forcing cells to change lineages. *Nature* 2009;462: 587-594.





**Gambar 16.** Faktor transkripsi dengan antagonisme menyilang : **paradigma** PU.1 : GATA 1. A, Dalam formulasi sederhana dari antagonisme menyilang, kedua regulator (masing-masing hijau dan merah) secara negatif berpengaruh satu sama lain. B, Motif **antagonisme** menyilang dengan kedua faktor juga mengatur sendiri. C, Kedua faktor ditunjukkan secara positif dan negatif mengatur repertoire sendiri terhadap gen target. D, Skema mekanisme biokimia yang mendasari GATA1 disatu sisi dari antagonisme PU.1:GATA1. Untuk mengaktivasi gen target pada sel eritroid GATA1 merekrut histone acetylase CREB-binding protein. Overekspresi PU.1 menggeser CREB-binding protein (CBP) dengan berikatan dengan GATA1 dan merekrut Rb juga Suv39H protein. Hal ini menyebabkan metilasi lysine 9 pada histone H3 dan merekrut HP1a, menyebabkan represi gen target. E, Representasi antagonisme PU.1 : GATA1 sebagai model binary attractor dalam lanskap epigenetik Waddington yang dimodifikasi. Dasar dua warna dibagian atas, dan dasar dangkal menggambarkan progenitor monositik/eritroid yang mengekspresikan rasio PU.1 dan GATA1. Progenitor ini berfluktuasi antara kedua keadaan yang berbeda yang ditentukan oleh PU.1 dan GATA1. Sel pada ujung adalah spektrum yang mengarah ke diferensiasi monositik dan eritroid. Ketika terjadi komitmen spontan atau diinduksi, faktor ini keluar dari *basin* dasar dan bergulir menuju *attractor* di *basin* bawah. Warna hijau adalah sel monositik mengekspresikan level PU.1 yang tinggi sedangkan yang berwarna merah adalah sel eritroid yang mengekspresikan GATA1 tinggi.

Dikutip dari Graf T, Tariq Enver T. Forcing cells to change lineages. *Nature* 2009;462: 587-594.



**Gambar 17.** Pandangan molekuler epigenetik sekarang. Faktor yang telah dikenal meregulasi fenomena epigenetik ditunjukkan sebagai pergerakan bola menilang lanskap yang diusulkan Waddington. Tidak ada aturan kejadian molekuler yang bersifat teratur, sehingga sekuensi tidak diketahui. Protein efektor mengenal modifikasi histon, sedangkan protein presenter adalah substrat yang spesifik untuk enzim pengubah histon. H3.3 dan macroH2A ditunjukkan hanya sebagai representatif histon varian yang masing-masing terlibat dalam aktivasi dan represi transkripsi. ChR, chromatin remodelers; DNMTs, DNA methyltransferases; HATs, histone acetyltransferases; HDACs, histone deacetylases; HMTs, histone methyltransferases; HDMs, histone demethylases; DDMs, DNA demethylases dan TFs, transcription factors (menggambarkan komponen genetik dari proses epigenetik).

Dikutip dari Goldberg AD, Allis D, Bernstein E. *Epigenetics: A landscape takes shape. Cell* 2007; 128: 635-638.

Timbul pertanyaan mengapa reprogram sel darah oleh faktor transkripsi memiliki frekuensi atau efisiensi konversi yang tinggi? Faktor apa yang berpengaruh terhadap konversi ini? Efisiensi yang tinggi pada **reprogramming** sistem darah menunjukkan bahwa ekspresi faktor transkripsi dapat berinteraksi dengan komponen endogen anyaman transkripsi sel resipien, berarti dapat mengubah lanskap epigenetik seperti

terlihat pada Gambar 15.<sup>101</sup> Faktor transkripsi GATA1 atau PU.1 merupakan faktor yang paling mendasar terhadap perkembangan **hematopoietik** sehingga berlaku sebagai paradigma melintasi interaksi faktor transkripsi.<sup>109,110</sup> Antagonisme Pu.1 dan GATA1 dalam lineage normal adalah terkait pengaturan sel monositik dan erithroid oleh masing-masing PU.1 dan GATA.1 (Gambar 16).<sup>101</sup>

Studi pada konversi sel mielomonositik yang dimediasi GATA1 menunjukkan bahwa faktor ini secara langsung berikatan dengan protein PU.1.<sup>111</sup> Level GATA.1 yang tinggi menghambat PU.1 dengan menggeser c-Jun, suatu kofaktor PU.1, sehingga menyebabkan kolaps program monositik.<sup>112</sup> Sebaliknya PU.1 yang diekspresikan di dalam prekursor eritroid berinteraksi dengan GAT1 berikatan dengan *promoter* gen target, termasuk globin  $\alpha$  dan  $\beta$  juga EKLf (atau KLF1), dan mengkonversi kompleks aktif menjadi represif melalui pergantian koaktivator CREB-binding protein (CBP) dan **rekrutmen** protein retinoblastoma (Gambar 16d).<sup>101</sup> Karena itu, faktor transkripsi ini tidak hanya “akselerator” dalam menginduksi program ekspresi gen, tetapi juga “mengerem” dengan menginaktivasi regulator kunci dari tipe sel alternatif, sehingga menyebabkan hilangnya marker fenotipe lama. Ketika kedua faktor **transkripsi** menjadi dominan maka komitmen mengubah menjadi tipe sel lain terjadi.<sup>101</sup>

Pada organ lain seperti jantung, saraf, pankreas, hati, tentu faktor transkripsi yang berperan dalam reprogram sel *in vivo* secara direk tidak dapat mengubah seluruh kondisi anyaman transkripsi endogen pada tingkat epigenetik. Misalnya, Zhou et al., melaporkan bahwa penghalang epigenetik Bmi1 adalah faktor kunci yang menyebabkan efisiensi reprogram jantung secara direk dari fibroblast menjadi kardiomyosit sangat kecil dengan proses lambat.<sup>113</sup> Hampir semua perkembangan sel bersifat epigenetik, sedangkan sekuensi DNA bersifat statik,<sup>114</sup> sebagaimana disampaikan oleh Conrad Waddington tentang konsep lanskap epigenetik yang menggambarkan nasib perkembangan sel.<sup>115</sup> Sel yang sedang bergulir melewati rintangan di dalam lembah dan akhirnya menentukan menentukan nasib sel akhir. Dengan kemajuan pengetahuan *reprogramming in vivo*, maka lanskap ini juga mengalami modifikasi (Gambar 17).<sup>116</sup>

## DAFTAR PUSTAKA

1. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-676
2. Anderson DJ, Gage FH, Weissman IL. Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat Med* 2001; 7: 393-395.
3. Weissman IL1, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:387-403.
4. Xu J, Du Y, Deng H. Direct lineage reprogramming: strategies, mechanisms, and applications. *Cell Stem Cell* 2015;16:119-134.
5. Jopling C, Boue S, Belmonte JCI. Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011; 12: 79-89.
6. Tanaka EM. The molecular and cellular choreography of appendage regeneration.
7. Bilousova G, Roop DR. Altering cell fate: from thymus epithelium to skin stem cells *Cell* 2016; 165: 1598-1608.
8. Laflamme MA, Murry CE. Heart regeneration. *Nature.* 2011;473:326-335.
9. Braun T, Martire A. Cardiac stem cells: paradigm shift or broken promise? A view from developmental biology. *Trends Biotechnol.* 2007;25:441-447.
10. Yi BA, Wernet O, Chien KR. Regenerative medicine: developmental paradigms in the biology of cardiovascular regeneration. *J Clin Invest.* 2010;120:20-28.
11. Anversa P, Kajstura J. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res.* 1998;83:1-14.
12. Soonpaa MH, Field LJ. Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. *Circ Res.* 1998;83:15-26.
13. Leri A, Rota M, Pasqualini FS, Goichberg P, Anversa P. Origin of cardiomyocytes in the adult heart. *Circ Res.* 2015;116:150-166.
14. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Role of cardiac stem cells in cardiac pathophysiology: a paradigm shift in human myocardial biology. *Circ Res.*2011;109:941-961.
15. Wohlschlaeger J, Levkau B, Brockhoff G, Schmitz KJ, von Winterfeld M, Takeda A, Takeda N, Stypmann J, Vahlhaus C, Schmid C, Pomjanski N, B.cking A, Baba HA. Hemodynamic support by left ventricular assist devices reduces cardiomyocyte DNA content in the failing human heart. *Circulation.* 2010;121:989-996.
16. Kajstura J, Urbanek K, Perl S, et al. Cardiomyogenesis in the adult human heart. *Circ Res.* 2010;107:305-315.
17. Quaini F, Cigola E, Lagrasta C, Saccani G, Quaini E, Rossi C, Olivetti G, Anversa P. End-stage cardiac failure in humans is coupled with the induction of proliferating cell nuclear antigen and nuclear mitotic division in ventricular myocytes. *Circ Res.* 1994;75:1050-1063.

18. Beltrami CA, Di Loreto C, Finato N, Rocco M, Artico D, Cigola E, Gambert SR, Olivetti G, Kajstura J, Anversa P. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), DNA synthesis and mitosis in myocytes following cardiac transplantation in man. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29:2789-2802.
19. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami CA, Anversa P. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2001;344:1750–1757.
20. Urbanek K, Quaini F, Tasca G, Torella D, Castaldo C, Nadal-Ginard B, Leri A, Kajstura J, Quaini E, Anversa P. Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:10440–10445.
21. Urbanek K, Torella D, Sheikh F, De Angelis A, Nurzynska D, Silvestri F, Beltrami CA, Bussani R, Beltrami AP, Quaini F, Bolli R, Leri A, Kajstura J, Anversa P. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:8692–8697.
22. Bergmann, O. et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in human. *Science* 2009; 324: 98-102.
23. Vunjak-Novakovic G. A protein for healing infarcted heart. *Nature* 2015; 525:461-462
24. Laflamme MA, Murry CE. Heart regeneration. *Nature.* 2011;473:326–335.
25. Bergmann O. et al., Identification of cardiomyocyte nuclei and assessment of ploidy for the analysis of cell turnover. *Exp Cell Res* 2010; 317: 188-194.
26. Kubin T, Pilling J, Kostin S, Gajawada P, Hein S, Rees W, Wietelmann A, Tanaka M, Lachner H, Schimanski S, Szibor M, Warnecke H, Braun T. Oncostatin M is a major mediator of cardiomyocyte dedifferentiation and remodeling. *Cell Stem Cell.* 2011;9:420–432.
27. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001;410:701–705.
28. Bearzi C, Rota M, Hosoda T, et al. Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:14068–14073.
29. Ausma J, Thone´, F, Dispersyn GD, Flameng W, Vanoverschelde JL, Ramaekers FC, Borgers, M. Dedifferentiated cardiomyocytes from chronic hibernating myocardium are ischemia-tolerant. *Mol. Cell. Biochem.* 1998; 186, 159-168.
30. Dispersyn GD, Mesotten L, Meuris B, Maes A, Mortelmans L, Flameng W, Ramaekers F, Borgers, M. Dissociation of cardiomyocyte apoptosis and dedifferentiation in infarct border zones. *Eur. Heart J.* 2002; 23:849-857.
31. Taegtmeyer H, Sen S, Vela, D. Return to the fetal gene program: a suggested metabolic link to gene expression in the heart. *Ann. N Y Acad. Sci.* 2010; 1188: 191-198.
32. Laube F, Heister M, Scholz C, Borchardt T, Braun, T. Reprogramming of new cardiomyocytes is induced by tissue regeneration. *J. Cell Sci.* 2006; 119, 4719–4729.
33. Morrissey EE. Rewind to recover: dedifferentiation after cardiac injury. *Cell Stem Cell* 2011; 4: 387-388.
34. Garbern JC, Lee RT. Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration. *Cell Stem Cell* 2013; 12: 689-698.
35. Kajstura J, Rota M, Cappelletta D, Ogo´ rek B, Arranto C, Bai Y, Ferreira- Martins J, Signore S, Sanada F, Matsuda A, et al. Cardiomyogenesis in the aging and failing human heart. *Circulation* 2012; 126:1869-1881.
36. Mollova M, Bersell K, Walsh S, Savla J, Das LT, Park SY, Silberstein LE, Dos Remedios CG, Graham D, Colan S, Kuhn, B. Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2013; 110:1446-1451.
37. Malliaras K, Zhang Y, Seinfeld J, Galang G, Tseliou E, Cheng K, Sun B, Aminzadeh M, Marbán E. Cardiomyocyte proliferation and progenitor cell recruitment underlie therapeutic regeneration after myocardial infarction in the adult mouse heart. *EMBO Mol Med* 2013; 5:191-209.
38. Senyo SE, Steinhauser ML, Pizzimenti CL, Yang VK, Cai L, Wang M, Wu TD, Guerin-Kern JL., Lechene CP, Lee RT. Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature* 2013; 493:433-436.
39. Soonpaa MH, Field LJ. Assessment of cardiomyocyte DNA synthesis in normal and injured adult mouse hearts. *Am. J. Physiol.* 1997; 272: H220-H226.
40. Soonpaa MH, Rubart M, Field LJ. Challenges measuring cardiomyocyte renewal. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013; 1833: 799-803.
41. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Identity

- deception: not a crime for a stem cell. *Physiology* (Bethesda). 2005;20:162-168.
42. Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med*. 2002;346:5–15.
  43. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001;410:701-705.
  44. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:10344–10349.
  45. Kuramochi Y, Fukazawa R, Migita M, Hayakawa J, Hayashida M, Uchikoba Y, Fukumi D, Shimada T, Ogawa S. Cardiomyocyte regeneration from circulating bone marrow cells in mice. *Pediatr Res*. 2003;54:319-325.
  46. Kajstura J, Rota M, Whang B, et al. Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion. *Circ Res*. 2005;96:127–137. d
  47. Lagostena L, Avitabile D, De Falco E, Orlandi A, Grassi F, Iachininoto MG, Ragone G, Fucile S, Pompilio G, Eusebi F, Pesce M, Capogrossi MC. Electrophysiological properties of mouse bone marrow c-kit+ cells co-cultured onto neonatal cardiac myocytes. *Cardiovasc Res*. 2005;66:482–492.
  48. Rota M, Kajstura J, Hosoda T, et al. Bone marrow cells adopt the cardiomyogenic fate in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:17783–17788.
  49. Li TS, Hayashi M, Ito H, Furutani A, Murata T, Matsuzaki M, Hamano K. Regeneration of infarcted myocardium by intramyocardial implantation of ex vivo transforming growth factor-beta-preprogrammed bone marrow stem cells. *Circulation*. 2005;111:2438–2445.
  50. Xaymardan M, Cimini M, Fazel S, Weisel RD, Lu WY, Martin U, Harvey RP, Li RK. c-Kit function is necessary for in vitro myogenic differentiation of bone marrow hematopoietic cells. *Stem Cells*. 2009;27:1911–1920.
  51. Yoon YS, Wecker A, Heyd L, Park JS, Tkebuchava T, Kusano K, Hanley A, Scadova H, Qin G, Cha DH, Johnson KL, Aikawa R, Asahara T, Losordo DW. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest*. 2005;115:326–338.
  52. Kawamoto A, Iwasaki H, Kusano K, Murayama T, Oyamada A, Silver M, Hulbert C, Gavin M, Hanley A, Ma H, Kearney M, Zak V, Asahara T, Losordo DW. CD34-positive cells exhibit increased potency and safety for therapeutic neovascularization after myocardial infarction compared with total mononuclear cells. *Circulation*. 2006;114:2163–2169.
  53. Iwasaki H, Kawamoto A, Ishikawa M, Oyamada A, Nakamori S, Nishimura H, Sadamoto K, Horii M, Matsumoto T, Murasawa S, Shibata T, Suehiro S, Asahara T. Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery after myocardial infarction. *Circulation*. 2006;113:1311–1325.
  54. Yoon J, Choi SC, Park CY, Choi JH, Kim YI, Shim WJ, Lim DS. Bone marrow-derived side population cells are capable of functional cardiomyogenic differentiation. *Mol Cells*. 2008;25:216–223.
  55. Yeh ETH, Zhang S, Wu HD, Körbling M, Willerson JT, Estrov Z. Transdifferentiation of human peripheral blood CD34+ enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo. *Circulation*. 2003;108:2070-2073.
  56. Duran JM, Makarewich CA, Sharp TE, Starosta T, Zhu F, Hoffman NE, Chiba Y, Madesh M, Berretta RM, Kubo H, Houser SR. Bone-derived stem cells repair the heart after myocardial infarction through transdifferentiation and paracrine signaling mechanisms. *Circ Res*. 2013;113:539-552.
  57. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*. 2004;428:668-673.
  58. Sayed N, Wong WT, Frank Ospino F, Shu Meng S, Lee J, Jha A, Dexheimer P, Aronow BJ, Cooke JP. Transdifferentiation of human fibroblasts to endothelial cells. Role of innate immunity. *Circulation*. 2015;131:300-309.
  59. Meng S, Zhou J, Gu Q, Chanda PK, Ospino F, Cooke JP. Transdifferentiation requires iNOS activation. Role of RING1A S-nitrosylation. *Circ Res*. 2016;119:e129-e138.
  60. Chen T, Dent SY. Chromatin modifiers and



- remodellers: regulators of cellular differentiation. *Nat Rev Genet.* 2014;15:93–106.
61. Lyssiotis CA, Foreman RK, Staerk J, Garcia M, Mathur D, Markoulaki S, Hanna J, Lairson LL, Charette BD, Bouchez LC, Bollong M, Kunick C, Brinker A, Cho CY, Schultz PG, Jaenisch R. Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of klf4. *Proc Nat Acad Sci USA.* 2009;106:8912-8917.
  62. Lee J, Sayed N, Hunter A, Au KF, Wong WH, Mocarski ES, Pera RR, Yakubov E, Cooke JP. Activation of innate immunity is required for efficient nuclear reprogramming. *Cell.* 2012;151:547-558.
  63. Cohen DE, Melton, D. Turning straw into gold: directing cell fate for regenerative medicine. *Nat. Rev. Genet.* 2011; 12: 243-252.
  64. Graf T. Historical origins of transdifferentiation and reprogramming. *Cell Stem Cell* 2011; 9: 504-516.
  65. Cherry AB., Daley, G.Q. Reprogramming cellular identity for regenerative medicine. *Cell* 2012; 148:1110-1122.
  66. Puri S, Folias AE, Hebrok M. Plasticity and dedifferentiation within the pancreas: development, homeostasis, and disease. *Cell Stem Cell* 2015; 16: 18-31.
  67. Shi G, DiRenzo D, Qu C, Barney D, Miley D, Konieczny SF. Maintenance of acinar cell organization is critical to preventing Kras-induced acinar-ductal metaplasia. *Oncogene* 2013; 32:1950-1958.
  68. Seymour PA, Freude KK, Dubois, C.L., Shih, H.P., Patel, N.A., and Sander, M. A dosage-dependent requirement for Sox9 in pancreatic endocrine cell formation. *Dev. Biol.* 2008; 323:19-30.
  69. Song SY, Gannon M, Washington MK, Scoggins CR, Meszoely IM, Goldenring JR, Marino CR, Sandgren EP, Coffey RJ, Jr, Wright CV, Leach SD. Expansion of Pdx1-expressing pancreatic epithelium and islet neogenesis in transgenic mice overexpressing transforming growth factor alpha. *Gastroenterology* 1999; 117:1416-1426.
  70. Jacquemin P, Lemaigre FP, Rousseau GG. The Onecut transcription factor HNF-6 (OC-1) is required for timely specification of the pancreas and acts upstream of Pdx-1 in the specification cascade. *Dev. Biol.* 2003; 258: 105–116.
  71. Jensen JN, Cameron E, Garay MV, Starkey TW, Gianani R, Jensen J. Recapitulation of elements of embryonic development in adult mouse pancreatic regeneration. *Gastroenterology* 2005; 128: 728-741.
  72. Miyamoto Y, Maitra A, Ghosh B, Zechner U, Argani P, Iacobuzio-Donahue C A, Sriuranpong V, Iso T, Meszoely IM, Wolfe, MS, et al. Notch mediates TGF alpha-induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell* 2003; 3:565-576.
  73. Morris JP, Cano DA, Sekine S, Wang SC, Hebrok M. Beta-catenin blocks Kras-dependent reprogramming of acini into pancreatic cancer precursor lesions in mice. *J. Clin. Invest.* 2010a; 120: 508-520.
  74. Solar M, Cardalda C, Houbracken I., Marti'n, M., Maestro, M.A., De Medts, N., Xu, X, Grau V, Heimberg H, Bouwens L, Ferrer J. Pancreatic exocrine duct cells give rise to insulin-producing beta cells during embryogenesis but not after birth. *Dev. Cell* 2009;17:849-860.
  75. Zhou Q, Law AC., Rajagopal J, Anderson WJ, Gray PA, Melton DA. A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis. *Dev. Cell* 2007; 13:103-114.
  76. Siveke JT, Lubeseder-Martellato C, Lee , Mazur PK, Nakhai H, Radtke F, Schmid, RM. Notch signaling is required for exocrine regeneration after acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2008; 134: 544–555.
  77. Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 2008; 455: 627-632.
  78. Li W, Nakanishi M, Zumste A., Shear M, Wright C, Melton DA, Zhou Q. In vivo reprogramming of pancreatic acinar cells to three islet endocrine subtypes. 2014; *eLife* 3, e01846.
  79. Baeyens L, De Breuck S, Lardon J, Mfopou JK, Rooman I, Bouwens L. In vitro generation of insulin-producing beta cells from adult exocrine pancreatic cells. *Diabetologia* 2005; 48: 49-57.
  80. Baeyens L., Bonne´ , S, German MS, Ravassard P, Heimberg H, Bouwens, L. Ngn3 expression during postnatal in vitro beta cell neogenesis induced by the JAK/STAT pathway. *Cell Death Differ.* 2006; 13:1892-1899.
  81. Baeyens L, Bonne, S., Bos, T., Rooman, I., Peleman, C., Lahoutte, T., German, M.,

- Heimberg, H., and Bouwens, L. Notch signaling as gatekeeper of rat acinar-to-beta-cell conversion in vitro. *Gastroenterology* 2009; 136:1750-1760, e1713.
82. Baeyens L, Lemper M, Leuckx G, De Groef S, Bonfanti P, Stange G, Shemer R, Nord C, Scheel DW, Pan F.C., et al. Transient cytokine treatment induces acinar cell reprogramming and regenerates functional beta cell mass in diabetic mice. *Nat. Biotechnol.* 2014; 32:76-83.
  83. Chera S, Baronnier D, Ghila L, Cigliola V, Jensen JN, Gu G, Furuyama K, Thorel F, Gribble FM, Reimann F, Herrera PL. Diabetes recovery by age-dependent conversion of pancreatic d-cells into insulin producers. *Nature* 2014; 514: 503–507.
  84. Thorel F, Nepote V, Avril I, Kohno K, Desgraz R, Chera S, Herrera PL. Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. *Nature* 2010; 464: 1149-1154.
  85. Gao T, McKenna B, Li C, Reichert, M, Nguyen J, Singh T, Yang C, Pannikar A, Doliba N, Zhang T., et al. Pdx1 maintains b cell identity and function by repressing an a cell program. *Cell Metab.* 2014; 19: 259-271.
  86. Spijker HS, Ravelli RB, Mommaas-Kienhuis, A.M., van Apeldoorn, A.A., Engelse, MA, Zaldumbide, A., Bonner-Weir S, Rabelink TJ, Hoeben RC, Clevers H, et al. Conversion of mature human b-cells into glucagon-producing a-cells. *Diabetes* 2013; 62: 2471-2480.
  87. Rezanian A, Riedel MJ, Wideman RD, Karanu F, Ao Z, Warnock GL, Kieffer TJ. Production of functional glucagon-secreting a-cells from human embryonic stem cells. *Diabetes* 2011; 60, 239–247.
  88. Talchai C, Xuan S, Lin HV, Sussel L, Accili D. Pancreatic b cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic b cell failure. *Cell* 2012; 150: 1223–1234.
  89. Puri S, Akiyama H, Hebrok, M. VHL-mediated disruption of Sox9 activity compromises b-cell identity and results in diabetes mellitus. *Genes Dev.* 2013; 27: 2563–2575.
  90. Collins MA, Bednar F, Zhang Y, Brisset JC, Galban S, Galban CJ, Rakshit, S, Flannagan KS, Adsay NV, Pasca di Magliano, M. Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. *J. Clin. Invest.* 2012; 122:639-653.
  91. Ying H, Kimmelman AC, Lyssiotis CA, Hua S, Chu GC, Fletcher-Sananikone, E, Locasale JW, Son J., Zhang H, Coloff JL, et al. Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell* 2012; 149:656-670.
  92. Song K, Nam YJ, Luo X, Qi X, Tan W, Huang GN, Acharya A, Smith CL, Tallquist MD, Neilson E.G., et al. Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. *Nature* 2012; 485:599-604.
  93. Inagawa K, Miyamoto K, Yamakawa H, Muraoka N, Sadahiro T, Umei T, Wada R, Katsumata Y, Kaneda R, Nakade K, et al. Induction of cardiomyocyte-like cells in infarct hearts by gene transfer of Gata4, Mef2c, and Tbx5. *Circ. Res.* 2012; 111: 1147-1156.
  94. Jayawardena TM, Egemnazarov B, Finch EA, Zhang L, Payne JA, Pandya K, Zhang Z, Rosenberg P, Mirotsov M, Dzau V.J. (2012). MicroRNA-mediated in vitro and in vivo direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes. *Circ. Res.* 2012; 110, 1465–1473.
  95. Mathison M, Gersch RP, Nasser A, Lilo S, Korman M, Fourman M., Hackett, N, Shroyer K, Yang J, Ma Y, et al. (2012). In vivo cardiac cellular reprogramming efficacy is enhanced by angiogenic preconditioning of the infarcted myocardium with vascular endothelial growth factor. *J. Am. Heart Assoc.* 1, e005652.
  96. Montana CL, Kolesnikov AV, Shen SQ, Myers CA, Kefalov VJ, Corbo JC. Reprogramming of adult rod photoreceptors prevents retinal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2013; 110, 1732–1737. 1, e005652.
  97. Niu W, Zang T, Zou Y, Fang S, Smith DK, Bachoo, R, Zhang CL. In vivo reprogramming of astrocytes to neuroblasts in the adult brain. *Nat. Cell Biol.* 2013; 15: 1164-1175.
  98. Rouaux C, Arlotta P. Direct lineage reprogramming of postmitotic callosal neurons into corticofugal neurons in vivo. *Nat. Cell Biol.* 2013; 15; 214-221.
  99. Torper O, Pfisterer U, Wolf DA, Pereira M, Lau S, Jakobsson J, Björklund, A., Grealish, S., and Parmar, M. (2013). Generation of induced neurons via direct conversion in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 7038-7043.
  100. Guo Z, Zhang L, Wu Z, Chen Y., Wang F, Chen G. In vivo direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model. *Cell Stem Cell* 2014; 14, 188-202.
  101. Graf T, Tariq Enver T. Forcing cells to change lineages. *Nature* 2009; 462: 587-594.

102. Davis R L, Weintraub H, Lassar A. B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 1987; 51: 987-1000.
103. Kulesa H, Frampton J, Graf T. GATA-1 reprograms avian myelomonocytic cell lines into eosinophils, thromboplasts, and erythroblasts. *Genes Dev.* 1995; 9:1250-1262.
104. Visvader J E, Elefanty A G, Strasser A, Adams J. M. GATA-1 but not SCL induces megakaryocytic differentiation in an early myeloid line. *EMBO J.* 1992; 11:4557-4564.
105. Nerlov C, Graf T. PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev.* 1998; 12: 2403-2412.
106. Zhang P. et al. Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP $\alpha$ . *Immunity* 2004; 21:853-863.
107. Xie H, Ye M, Feng R, Graf, T. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* 2004; 117:663–676.
108. Laiosa C V, Stadtfeld M, Xie H, de Andres-Aguayo L, Graf T. Reprogramming of committed T cell progenitors to macrophages and dendritic cells by C/EBP $\alpha$  and PU.1 transcription factors. *Immunity* 2006; 25:731-744.
109. Arinobu Y. et al. Reciprocal activation of GATA-1 and PU.1 marks initial specification of hematopoietic stem cells into myeloerythroid and myelolymphoid lineages. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 416-427.
110. Iwasaki, H. & Akashi, K. Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell. *Immunity* 2007; 26: 726-740.
111. Graf, T. Differentiation plasticity of hematopoietic cells. *Blood* 2002; 99: 3089-3101.
112. Zhang P. et al. Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1999; 96:8705-8710.
113. Zhou Y, Wang L, Vaseghi HR, Liu Z, Lu R, Alimohamadi S, Yin C, Fu JD, Wang GG, Liu J, Qian L. Bmi1 is a key epigenetic barrier to direct cardiac reprogramming. *Cell Stem Cell* 2016; 18: 382-395.
114. Shen X, Orkin SH. Glimpses of the epigenetic landscape. *Cell Stem Cell* 2009; 4: 1-2.
115. Waddington, C.H. (1957). *The Strategy of the Genes; a Discussion of Some Aspects of Theoretical Biology* (London: Allen & Unwin).
116. Goldberg AD, Allis D, Bernstein E. Epigenetics: A landscape takes shape. *Cell* 2007; 128: 635-638.

# INDEKS

## A

adenovirus, 120, 150  
 adult stem cell, 10, 11, 12, 36, 38, 48, 69, 70, 89, 98  
 ageing, 68, 84  
 allogenik, 20  
 amplifikasi, 55, 57  
 angina, 18, 19, 36  
 angiogenik, 14, 121  
 angiotensin converting enzyme inhibitor, 32  
 antropologik, 61  
 apoptosis, 19, 20, 33, 38, 53, 91, 108, 114, 155  
 aritmia, 20, 23, 53, 129  
 arteri koronaria, 28, 114  
 Arx, 114, 131, 150  
 asetilasi, 30, 31, 32, 33, 46, 47, 48, 51, 52, 100  
 asimetrik, 4, 9, 48, 69, 70  
 assay, 56, 57, 65, 76, 90, 138, 140, 142  
 astrosit, 123, 124, 150  
 aterosklerosis, 51, 52, 60, 61  
 atrium, 11, 28  
 autologous, 17, 18, 19, 28, 36, 38, 39, 40, 104  
 azacytidine, 120

## B

bakteri, 2, 3, 4  
 baseline, 11, 18, 19, 24, 28, 61  
 basement membrane, 9, 14, 15, 16, 70  
 binukleus, 137  
 biologi, iv, 1, 3, 17, 50, 126, 136  
 bisulfite sequencing, 54, 55, 108  
 bivalen, 80, 94, 95, 98, 100, 101, 102, 103  
 bivalent domains, 98, 103  
 bivalent genes, 94, 96, 97, 98, 100, 101, 106  
 blastocyst, 10, 71, 72, 76, 77, 84, 119  
 Bmi1, 114, 130, 154, 159  
 bone marrow-derived stem cell, 12, 18

## C

C/EBPa, 109, 151, 159  
 cardiac stem cell, 20, 23, 27, 38, 131, 136, 137, 144  
 cardiac troponin T, 8, 143  
 CD133, 17, 25, 36, 94, 96, 97, 98, 142, 144  
 CD34+, 8, 13, 17, 18, 19, 24, 25, 28, 36, 39, 90, 91, 94  
 CD36, 94, 96, 97, 98, 100  
 cDNA, 109, 130  
 cell line, 29, 130, 150  
 ChIP, 42, 47, 51, 57, 58, 59, 75, 97, 102  
 ChIP-seq, 57, 58, 59, 102  
 chromatin immunoprecipitation, 47, 102  
 c-kit, 20, 28, 91, 96, 140, 141, 142, 156  
 connexin-43, 116, 117  
 CpG island, 45, 46  
 cytosine, 43, 45, 50, 54, 55, 56, 82

## D

darah, 2, 3, 4, 9, 12, 13, 15, 18, 19, 25, 27, 32, 60, 61  
 deasetilasi, 31, 32, 42, 47, 51  
 dediferensiasi, 135, 140, 141, 146, 147, 148, 150, 151  
 diabetes, iv, 32, 34, 49, 50, 51, 52, 61, 63, 64, 135, 150,  
 diferensiasi, iv, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 19, 20, 27, 30, 43  
 dilated cardiomyopathy, 17, 36, 140  
 disfungsi endotel, 51, 52, 61  
 displasia, 146  
 DNA, iv, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 29, 30, 31, 42, 43, 44, 45, 46  
 Dnmt1, 82, 114  
 Dnmt3, 82  
 dogma, 3  
 dormant, 7, 9, 26, 27, 91

## E

ectoderm, 10, 71, 72, 79  
 ekspresi, iv, 2, 3, 11, 29, 30, 31, 32, 33, 43, 44, 45, 47  
 ekspresi gen, iv, 2, 3, 29, 30, 31, 32, 33, 43, 44, 45, 47  
 ekstraembrionik, 71  
 ekstraseluler, 4, 71, 112, 129  
 ekstrinsik, 70, 73  
 embrio, 2, 10, 43, 45, 68, 69, 71, 72, 74, 76, 77, 91, 92,  
 101, 119, 126, 148, 149  
 embryonic stem cell, 10, 11, 29, 35, 48, 69, 76, 84, 86,  
 87, 89, 98, 102, 108, 114, 118, 135, 150  
 endoderm, 10, 69, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 125, 146  
 endomiokard, 28  
 endoteliasasi, 17  
 endotelium, 126  
 endothelial progenitor cell, 12, 17, 144  
 engraftment, 20, 90, 104, 126, 136  
 enhancer, 11, 44, 45, 82, 84, 94, 99, 100, 104  
 enzim, 2, 3, 4, 31, 44, 45, 47, 50, 52, 54, 55, 56, 57, 58  
 epiblast, 71, 72, 76, 77, 85, 86  
 epidemiologik, 61  
 epigenetic memory, 29, 63  
 epigenetik, iv, 29, 31, 43, 44, 45, 48, 49, 50, 51, 52, 58  
 eraser, 44, 45, 50, 62  
 eritroblast, 94, 95  
 ES cell, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 80, 81, 82, 85, 99,  
 101, 102, 103, 104, 107  
 eukariotik, 4, 6  
 eukromatin, 29, 42, 50, 75, 102, 103  
 Ezh2, 104, 108, 117, 132

## F

FACS, 8, 19, 96, 145  
 famili, 47, 73, 75, 104  
 fenotipe, iv, 12, 15, 28, 29, 31, 44, 90, 91, 114, 135,  
 136, 140, 142, 146, 147, 148, 154  
 FGF, 73  
 fibroblast, 7, 10, 29, 32, 33, 35, 40, 61, 71, 74, 77, 78

fibrosis, 20, 22, 32, 34, 41, 53, 64, 114, 123  
 flavanol, 61, 67  
 fosforilasi, 30, 46, 47, 48, 73  
 fotosintesis, 4  
 Foxa1, 125  
 fraksi ejeksi, 17, 22, 25, 32

## G

GATA4, 102, 130  
 Gata-6, 71  
 gen, iv, 3, 29, 31, 32, 33, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 50  
 genetika, iv, 3  
 genom, iv, 29, 42, 43, 45, 50, 51, 54, 55, 57, 58, 60, 78,  
 99, 102, 114  
 genome-wide association, 51  
 genomik, 55, 57, 82, 119  
 germline, 48, 71, 72, 84, 119  
 glukosa, 4, 49, 50, 52, 61, 120, 121, 146  
 gugus, 43, 45, 47, 54, 61, 62

## H

H3K27me3, 44, 75, 94, 95, 97, 98, 99, 100, 101, 102  
 H3K36me3, 94, 97, 98, 100, 102  
 H3K4 me3, 100  
 H3K4me1, 94, 95, 97, 98, 99, 100, 101  
 H3K9me1, 94, 95, 97, 98, 100, 101  
 H4K20me1, 94, 95, 97, 98, 101  
 Hand2, 115  
 hati, 4, 13, 45, 90, 92, 125, 126, 135, 154  
 heat map, 115  
 hematopoiesis, 13, 35, 36, 69, 90, 92, 104, 106, 108  
 hepar, 125, 126  
 hepatosit, 110, 125, 126, 128  
 heterokromatin, 29, 42, 50, 75, 82, 100, 102, 103  
 hipermetilasi, 52, 118  
 hipertensi, 32, 34, 60  
 hipertrofi jantung, 32, 34, 53  
 histon, 29, 30, 31, 42, 44, 45, 46, 47, 48, 50, 51, 52, 59  
 histone demethylase, 44, 103, 104  
 histone-modifying enzyme, 114, 120  
 Hnf4, 125  
 homeostasis, 26, 52, 61, 64, 108, 147, 148, 151, 157  
 hormon, 146  
 HSC, 12, 13, 14, 26, 27, 70, 71, 89, 90, 91, 92, 93, 94

## I

immortal, 68  
 immunostaining, 7  
 in situ, 59, 109, 129, 141  
 in vitro, 7, 8, 10, 13, 28, 38, 56, 57, 71, 73, 83, 89, 90  
 in vivo, iv, 7, 8, 13, 20, 37, 47, 65, 67, 71, 72, 75, 77  
 induced cardiomyocyte, 113, 114, 121  
 induksi, 78, 79, 91, 98, 111, 123, 125, 129, 149, 150  
 infark, 7, 8, 11, 17, 18, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 53  
 injuri, iv, 7, 9, 17, 19, 26, 32, 52, 53, 69, 89, 111, 114  
 inner cell mass, 10, 71, 72, 84, 90, 101, 108  
 iNOS, 66, 145, 146, 156

insulin, 49, 61, 110, 120, 121, 146, 149, 150, 157, 158  
 interleukin-6, 73  
 intrakoronaria, 17, 20, 28  
 intramiokard, 18, 20, 22, 28  
 intravena, 18, 20, 22, 143  
 intrinsik, 33, 70, 123  
 iPSC, 29, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 110, 113, 114, 117,  
 118, 119, 126, 129, 135, 136  
 iskemik, 17, 18, 20, 22, 24, 25, 26, 28, 61, 123, 126,  
 138, 145

## J

jantung, 3, 4, 7, 8, 11, 12, 18, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 27  
 jaringan, iv, 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 19, 20, 22, 23, 28, 29

## K

kalsium, 9, 114, 116, 117  
 kanker, 4, 7, 46, 90, 140, 150  
 karbohidrat, 4, 61  
 kardiomiopati, 17, 20, 28, 138  
 kardiomiosit, 3, 7, 8, 11, 19, 20, 21, 22, 27, 28, 29, 32  
 kardiovaskuler, iv, 11, 22, 36, 50, 51, 52, 60, 61, 146  
 kariokinesis, 137, 138  
 klaster, 28, 48, 49, 114, 118  
 Klf 4, 77, 78, 88  
 kofaktor, 45, 47, 80, 154  
 kolon, 126  
 koloni, 13, 79, 83, 90, 91, 118  
 kondrosit, 19  
 kontraktilitas, 29, 33, 113, 116  
 kromatin, 5, 29, 30, 31, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50  
 kromosom, 2, 3, 4, 5, 6, 20, 42, 46, 51, 125, 142  
 kultur, 5, 7, 10, 19, 20, 28, 71, 73, 74, 76, 104, 140

## L

limfoid, 90, 91, 93, 126  
 limfosit T, 13, 91, 102  
 lineage, 9, 13, 38, 44, 71, 72, 73, 79, 81, 82, 86, 88, 91

## M

Mafa, 120, 149, 150  
 makrofag, 27, 51, 61, 91, 141, 151  
 mamalia, 7, 45, 48, 90, 91, 140, 141, 142, 146  
 Marker, 13, 37, 90, 96, 140  
 master gene, 114, 117  
 matriks ekstraseluler, 53  
 Mef2c, 111, 114, 115, 121, 123, 132, 158  
 megakariosit, 91, 93, 151  
 meiosis, 5  
 mencit, 7, 10, 11, 13, 14, 28, 29, 32, 52, 60, 71, 72, 73  
 mesenchymal stem cell, 7, 21, 37, 38  
 mesenchymal stromal cell, 26  
 mesoderm, 10, 69, 73, 79  
 metabolisme, 4, 61, 62  
 metaplasia, 146, 148, 157  
 microenvironment, 26, 70



mieloeritroid, 90  
 mieloid, 90, 91, 109, 126  
 mielomonositik, 154  
 mikroglia, 123  
 mikroskop konfokal, 8  
 mikroskop, 1, 2, 5, 7, 8, 13, 75, 101, 138, 140  
 mikroskop cahaya, 2, 5  
 mikroskop *fluorescence*, 7  
 miokard, 7, 8, 11, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 28  
 miokardium, 20, 28, 114, 117, 136, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144  
 miRNA, 42, 48, 49, 53, 54, 63, 79, 113, 114, 115, 117  
 mitosis, 3, 5, 6, 34, 68, 138, 155  
 modifikasi kovalen, 43  
 molekul, 2, 3, 4, 5, 18, 19, 31, 42, 48, 54, 55, 56, 57, 75, 79, 80, 102, 109, 113, 117, 118, 120, 145, 153  
 monoclonal antibody, 8, 13, 36, 104  
 mononukleus, 137  
 mRNA, 48, 49, 52, 53, 83, 87, 114, 140  
 multilineage, 13, 37, 90, 91, 107, 126  
 multipoten, 19, 22, 29, 76, 89, 91, 148, 149  
 multipotensi, 12, 13, 14, 90, 98, 99  
 MyoD, 109, 150

## N

Naïve, 76  
 Nanog, 71, 72, 73, 74, 75, 77, 78, 81, 82, 84, 85, 86, 87, 88, 101, 118  
 N-cadherin, 116, 117  
 ncRNA, 42, 48, 49  
 neonatus, 112, 113, 115  
 neovaskularisasi, 17, 144, 145  
 neural crest, 120, 132  
 neuroblast, 123, 150  
 NeuroD1, 123, 124  
 neurodegeneratif, iv, 123  
 neuron, 2, 77, 110, 117, 120, 123, 124, 126, 128, 131  
 Ngn3, 120, 149, 150, 157  
 niche, 1, 9, 26, 27, 35, 70, 71, 84, 91, 106, 126, 135  
 Nkx2.5, 11, 20, 32, 33, 115  
 NO, 145, 146  
 nonhematopoietic, 12, 19, 26  
 nukleotida, 3, 29, 48, 53, 114  
 nukleus, 2, 3, 5, 6, 32, 33, 42, 47, 75, 82, 109, 110, 120, 138, 139, 140

## O

Oct3/4, 73, 75, 77, 78, 84, 85, 86, 87  
 oklusi, 28  
 OKSM, 78, 80, 82, 83  
 oligopoten, 91  
 onkogenik, 29, 147, 150  
 organ, iv, 1, 27, 32, 33, 34, 101, 109, 119, 120, 121, 129, 135, 136, 140, 146, 149, 150, 154  
 overekspresi, 7, 32, 52, 73, 77, 82, 117, 120, 128

## P

pacemaker, 64, 123, 133  
 pancreas, 147, 148, 149, 150, 151, 157  
 pankreas, 110, 114, 120, 126, 128, 135, 146, 147, 148  
 paracrine factor, 38  
 parakrin, 7, 20, 21, 23, 144  
 pascainfark, 28  
 pascamitotik, 27  
 PCR, 42, 54, 55, 56, 57, 59, 107, 119, 145  
 Pdx1, 120, 148, 149, 150, 157, 158  
 pembelahan, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 31, 43, 45, 48, 68, 69  
 pembuluh darah, 14, 15, 17, 19, 27, 28, 51, 52, 121, 142, 144  
 penelitian, iv, 7, 10, 12, 13, 17, 18, 20, 22, 25, 28, 73, 91, 94, 109, 117, 123, 126, 129, 135, 145, 146  
 penyakit, iv, 2, 9, 10, 11, 18, 20, 22, 24, 25, 26, 31, 32  
 perfusi, 15, 17, 20, 126, 127, 145  
 piring petri, 28, 89  
 piRNA, 48, 49  
 plasenta, 13, 71, 92  
 plastisitas, 14, 69, 109, 120, 123, 126, 135, 136, 140, 142, 146, 150  
 platelet, 91  
 pluripoten, 10, 68, 69, 71, 72, 74, 75, 76, 77, 78, 80, 89, 100, 101, 102, 110, 117, 129  
 poised, 77, 81, 98, 99, 100, 103, 104  
 PRC1, 75, 114, 131  
 PRC2, 75, 82, 98, 99, 103, 104, 108  
 primed, 71, 73, 76, 86, 98, 99  
 profibrotik, 32  
 progenitor, 12, 13, 14, 17, 25, 36, 37, 38, 39, 40, 90  
 prokariotik, 4  
 proliferasi, 4, 5, 7, 8, 14, 15, 20, 47, 51, 53, 71, 72, 74  
 promoter, 45, 46, 47, 48, 51, 57, 59, 65, 66, 77, 79, 81, 82, 87, 94, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 146, 149, 154  
 protein, 2, 3, 4, 7, 8, 11, 20, 29, 31, 32, 33, 34, 38, 41  
 proteomik, 82  
 pyrosequencing, 55

## Q

quiescent, 26, 27, 39, 77, 91, 105, 106, 133

## R

radioaktif, 7  
 radiosensitif, 13  
 reactive oxygen species, 52  
 reader, 44, 45, 50  
 rediferensiasi, 135, 141, 147  
 refrakter, 18  
 regenerasi, iv, 4, 5, 7, 13, 20, 21, 23, 25, 26, 28, 69, 114, 123, 129, 135, 136, 137, 139, 143, 146  
 regulator, 53, 64, 70, 73, 75, 77, 78, 98, 109, 113, 114, 117, 152, 154  
 rejeksi, 10, 11, 136  
 remodeling, 11, 15, 17, 20, 28, 38, 43, 44, 50, 53, 77, 80, 81, 82, 87, 100, 102, 103, 121, 141, 146, 155  
 replikasi, iv, 2, 3, 5, 6, 50, 61, 68, 77, 78, 137, 138, 140

represif, 48, 75, 77, 80, 82, 94, 95, 98, 99, 100, 103, 154  
 repressive mark, 98, 100  
 reproduksi, 2, 4  
 reprogram, 109, 110, 118, 124, 129, 150, 153, 154  
 reprogramming, iv, 29, 40, 43, 63, 77, 78, 79, 80, 81  
 reseptor, 4, 16, 54, 73, 91, 120, 140, 141  
 resveratrol, 61, 62, 67  
 retikulum endoplasmik, 2  
 retrospektif, 13  
 RNA, 3, 29, 31, 42, 43, 44, 45, 48, 49, 50, 52, 63, 64  
 RNAi, 48  
 ROS, 52

## S

salamander, 135, 141  
 saraf, 2, 7, 9, 27, 154  
 sekuensi, iv, 15, 29, 30, 31, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 51, 53, 54, 55, 56, 57, 60, 61, 123, 153, 154  
 sel, iv, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 19  
 self renewal, iv, 9, 12, 14, 48, 75, 84, 131  
 sentrosom, 5, 70  
 serum-free, 10  
 side population cells, 41, 144, 156  
 signaling, 16, 19, 32, 38, 48, 53, 61, 70, 73, 74, 75, 85  
 silencing, 45, 46, 48, 49, 52, 54, 64, 67, 82, 87, 94, 98, 99, 100, 104, 108, 114, 131  
 simetrik, 4, 9, 69, 70  
 sintesis, 3, 7, 8, 114, 136, 138, 140  
 siRNA, 48, 49, 52, 83  
 sistem renin angiotensin, 32  
 sitokin, 20, 32, 33, 61, 73, 79, 141, 144  
 sitokinesis, 5, 6, 137, 138  
 sitosol, 117  
 Southern blot hybridization, 54  
 Sox2, 73, 75, 77, 78, 79, 80, 81, 86, 87, 101, 123  
 Stat3, 73, 150  
 stem cell, iv, 1, 2, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18  
 stres, 32, 33, 52, 54, 61, 148, 149, 151  
 studi, 3, 11, 20, 22, 25, 28, 29, 32, 49, 50, 51, 52, 59, 71, 76, 77, 79, 91, 94, 110, 111, 113, 120, 137, 138  
 sumoilasi, 46, 48  
 sumsum tulang, 9, 13, 19, 20, 22, 24, 25, 26, 27, 90, 91, 95, 126, 142, 144

## T

Tbx5, 111, 114, 121, 130, 132, 158  
 terapi, iv, 2, 9, 10, 11, 20, 23, 24, 25, 28, 29, 33, 49, 89  
 teratoma, 10, 11, 29, 35, 76, 83, 119, 134  
 totipoten, 71, 76  
 transcription start sites, 59  
 transdiferensiasi, 43, 135, 136, 142, 143, 144, 145, 146  
 transendokard, 20  
 transfeksi, 83, 115  
 transgenik, 32, 117, 141  
 transkripsi, 3, 4, 20, 29, 31, 32, 33, 43, 45, 46, 47, 48  
 translasi, 3, 30, 44, 48, 49  
 transplatasi, 19  
 trithorax group, 98, 100, 103  
 trophectoderm, 71, 72, 73, 84  
 tumor, 10, 11, 87, 129, 136, 150

## U

undifferentiated, 9, 35, 48, 71, 75, 85, 134

## V

valproic acid, 32, 117, 123  
 vascular endothelial growth factor, 14, 16, 19, 26, 123  
 vaskuler, 14, 17, 21, 49, 52, 60, 61, 126, 142  
 ventrikel, 11, 17, 20, 22, 24, 26, 28, 32, 113, 117, 121  
 vitamin, 61

## W

writer, 44, 45, 50, 62

## X

X chromosome, 104  
 xeno-free, 10

## Z

zebrafish, 135, 141  
 zigot, 5  
 zona, 20, 28, 122, 123, 138