KEMAMPUAN SEL LIMPA NORMAL MENCEGAH TERJADINYA PENYAKIT AUTOIMMUNE PADA MENCIT IL-2R β ^{-/-}

(CAPACITY OF NORMAL SPLEEN CELLS ON PREVENTING AUTOIMMUNE DISEASES IN IL-2R β ^{-/-} MICE)

Muhaimin Rifa'i

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang

ABSTRACT

Adoptive transfer is a potentially curative treatment for both inherited and acquired diseases of hematopoietic compartment and organ failure. The aim of this experiment was to know the potency of normal unfractionated spleen cells to prevent pathological autoimmunity in IL-2R β ^{-/-} mice. Here, we show that the normal unfractionated spleen cells have a capacity to prevent autoimmune diseases when adoptively transferred to IL-2R β ^{-/-} mice. Intravenously, and adoptively transferred of normal unfractionated spleen cells (10^7) to IL-2R β ^{-/-} mice (3 wks) gave an evidence on preventing the lethal phenotype due to autoimmune disease in IL-2R β ^{-/-} mice. The donor cells have a capacity to reverse the status of recipient cells from memory to naïve type. In addition, donor cells also have a capacity to regulate the development of granulocyte cells into normal level of homeostasis. These findings suggest that normal unfractionated spleen cells could in the future be used in clinical settings to cure autoimmune diseases.

Keywords : autoimmune, spleen cells, IL-2R β ^{-/-}, mice

PENDAHULUAN

Sel T regulator CD4⁺CD25⁺ sub-populasi CD4 merupakan sel penting yang saat ini diyakini mempunyai potensi untuk menanggulangi berbagai penyakit *autoimmune* (1,2,3,4,5,6,7). Namun demikian, sel lain dari populasi CD8 telah dilaporkan memiliki kemampuan sebagai regulator (1,6,8,9).

Mencit yang tidak mampu mengekspresikan IL-2R β merupakan model penyakit *autoimmune* pada hewan yang mudah dipelajari. Mencit ini menunjukkan gejala pelonjakan jumlah sel-sel granulosit dan menunjukkan akumulasi sel-sel memori. Mencit yang tidak mengekspresikan IL-2R β juga mengalami gejala anemia yang serius. Abnormalitas pada model penyakit *autoimmune* ini disebabkan oleh berbaliknya sel T dari status *naïve* menjadi memori. Adanya akumulasi sel-sel memori pada mencit IL-2R β ^{-/-} masih menjadi perdebatan para ilmuwan sampai saat ini. Van Parijs *et al.* (1997), Refaeli *et al.* (1998) dan Kneitz *et al.* (1995) mengajukan suatu teori bahwa sel yang mengalami defisiensi IL-2R β menjadi resisten terhadap program kematian sel (*apoptosis*) (10,11,12). Teori ini menjadi dasar untuk menerangkan mengapa sel T pada IL-2R β ^{-/-} tetap hidup dalam waktu lama walaupun antigen spesifik sudah tidak terdapat pada individu tersebut. Sampai saat ini teori ini tidak bisa dikesampingkan. Pada penelitian ini akan

ditunjukkan adanya kemampuan sel limpa yang tidak dipisahkan untuk menghalangi terjadinya akumulasi sel-sel memori, sehingga penemuan ini mempunyai implikasi yang luas pada bidang kesehatan dan memberikan kemudahan aplikasi klinik pada masa yang akan datang.

METODE

Pada penelitian ini digunakan mencit yang telah dilakukan rekayasa genetika sehingga tidak mengekspresikan protein IL-2R β . Mencit ini dikenal dengan istilah IL-2R β *knockout* (IL-2R β ^{-/-}). Mencit ini mempunyai garis keturunan C57BL/6^{CD45.2/CD45.2}. Mencit dengan genotif L-2R β ^{-/-} diperoleh dengan mengawinkan L-2R β ^{+/-} dengan L-2R β ^{+/-}. Hasil perkawinan ini menghasilkan individu yang mengikuti hukum Mendel yaitu mencit dengan genotif IL-2R β ^{+/+}, L-2R β ^{+/-}, dan L-2R β ^{-/-}. Mencit dengan genotif L-2R β ^{-/-} dapat diperiksa dengan sidik DNA.

Mencit dengan genotif L-2R β ^{-/-} (umur 3 minggu) ditransfer dengan 10^7 total sel limpa dari mencit normal yang mempunyai garis keturunan C57BL/6^{CD45.1/CD45.1}. Hasil transfer diamati 7 minggu setelah transfer. Status sel T dan sel granulosit diamati dengan menggunakan antibodi-monoklonal. Antibodi-monoklonal yang digunakan adalah *fluorescein isothiocyanate* (FITC)-*conjugated anti-mouse* CD8 α (clone 53-6.7), *phycoerythrin* (PE)- atau *allophycocyanin* (APCn)-*conjugated anti-mouse* CD4 (clone GK1.5), *biotin-conjugated anti-mouse* CD122 (clone 5H4, FITC atau *biotin-conjugated anti-mouse* CD45.1 (clone A20), dan FITC-*conjugated anti-mouse* CD44 (clone IM7),

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. XXI, No.1, April 2005
Korespondensi: Muhaimin Rifa'i; Fakultas Matematika dan
Ilmu Pengetahuan Alam Unibraw, Jl. Veteran Malang 65145.
e-mail: rifa123@brawijaya.ac.id

PE-conjugated anti-mouse CD62L (clone MEL-14), FITC-conjugated anti-mouse Gr-1 (clone RB6-8C5). Antibodi yang berkonjugasi dengan biotin divisualisasi dengan menggunakan streptavidine-PE-Cy5. Pada penelitian ini data dianalisis dengan menggunakan FACS Calibur™ flow cytometer (BD-Biosciences, San Jose, CA). Sel memori ditunjukkan dengan ekspresi CD44⁺CD62L⁻ sedang sel *naive* ditunjukkan dengan ekspresi CD44⁻CD62L⁺. Sel-sel granulosit ditandai dengan ekspresi Gr-1⁺.

HASIL PENELITIAN

Mencit kimera (mencit hasil transfer) dapat diamati dengan melihat adanya komposisi darah yang berasal dari donor (CD45.1⁺) dan *recipient* (CD45.1⁻) (Gambar 1). Hasil pengamatan memberikan bukti bahwa mencit yang telah ditransfer dengan 10⁷ sel limpa dari mencit normal akan berkembang menjadi mencit sehat yang tidak menunjukkan gejala penyakit *autoimmune*. Sel-sel limpa yang tidak dipisahkan nampak berfungsi sebagai *down-regulator*. Hal ini diketahui karena mencit IL-2Rβ^{-/-} yang berumur 3 minggu telah menunjukkan gejala penyakit *autoimmune* dan hilang gejalanya 7 minggu setelah transfer.

DISKUSI

Mencit IL-2Rβ^{-/-} yang tidak dimanipulasi akan menunjukkan penyakit *autoimmune* yang sangat serius dan akan mati pada umur sekitar 10-12 minggu. Hasil analisis dengan menggunakan flow cytometry diperoleh bukti bahwa mencit IL-2Rβ^{-/-} yang tidak dimanipulasi dengan menggunakan sel limpa dari mencit normal akan berkembang menjadi mencit sakit yang didominasi oleh sel T memori yang aktif dan jumlah granulosit yang melimpah mencapai 65% dari sel limfosit (Gambar2). Sebaliknya

mencit L-2Rβ^{-/-} yang dimanipulasi akan berkembang menjadi mencit sehat yang didominasi oleh sel T *naive* dan jumlah grunulosit pada kisaran normal. Pada mencit normal, sel granulosit berkisar sekitar 25% dari sel limfosit (data tidak ditampilkan). Sel limpa yang tidak dipisahkan terbukti mampu membalik status sel T memori menjadi T *naive* baik dari populasi CD4 maupun CD8. Data ini memberikan suatu gambaran bahwa penumpukan sel-sel memori yang aktif mengakibatkan dampak fisiologi yang tidak menguntungkan. Hal ini bisa dijelaskan karena sel-sel yang teraktifasi akan memberikan kesempatan gen-gen untuk berekspresi secara optimal. Padahal dalam sistem homeostasis terkadang ekspresi gen ditekan sedemikian rupa untuk mencapai kondisi yang menguntungkan dalam konteks fisiologi. Ekspresi gen yang tidak terkendali akan mengakibatkan akumulasi produk gen yang sesungguhnya tidak diperlukan tubuh pada saat itu. Akumulasi produk gen baik berupa sitokin, kemokin, enzim, maupun protein struktural akan mengganggu homeostasis pada level sel maupun jaringan. Itulah sebabnya mencit yang mengalami defisiensi IL-2Rβ akan mati pada usia sangat muda akibat hilangnya keseimbangan pada sistem homeostasis kecuali jika dilakukan suatu rekayasa, *gene therapy*. Yang sangat menarik dari penelitian ini bahwa sel T dari donor berkembang menjadi sel-sel memori sedangkan sel *recipient* berbalik menjadi *naive* (Gambar 3). Hasil mengejutkan dari penelitian ini adalah proporsi CD122⁺ donor dari populasi CD8 mencapai sekitar 48% (Gambar 4). Pada mencit normal (bukan hasil manipulasi) proporsi CD122⁺ pada populasi CD8 sekitar 10% (data tidak ditampilkan). Dari hasil penelitian ini diduga bahwa subpopulasi CD8⁺CD122⁺ mempunyai kontribusi yang besar dalam meregulasi sel-sel memori menjadi *naive*.

Gambar 1. Mencit kimera dianalisis dengan flow cytometri. Sampel diambil dari sel limpa. CD45.1⁺ merupakan sel yang berasal dari donor sedangkan CD45.1⁻ merupakan sel yang berasal dari *recipient*. (a) dan (b) berturut-turut analisis sel T CD4 dan CD8. R3 dan R5 merupakan sel T berasal dari donor sedangkan R2 dan R4 merupakan sel T berasal dari *recipient*.

Gambar 2. Mencit L-2R $\beta^{-/-}$ yang tidak dimanipulasi menunjukkan dominasi sel T memori dengan marker CD44⁺CD62L⁻ (a) dan perkembangan sel granulosit di atas ambang normal dengan marker Gr-1⁺ (b).

Gambar 3. Sel T pada mencit kimera menunjukkan status yang berlawanan antara *recipient* dan donor. (a) Sel T *recipient* berada pada status *naive*, CD44⁺CD62L⁺. (b) Sel T donor berada pada status memori, CD44⁺CD62L⁻.

Gambar 4. Ekspresi CD122 pada mencit kimera menunjukkan peningkatan yang tajam (47,88%). Pada mencit normal yang tidak dimanipulasi, ekspresi CD122 hanya berkisar 10% (data tidak ditampilkan).

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa sel limpa normal mempunyai kemampuan untuk mencegah dan menyembuhkan penyakit *autoimmune*. Sel limpa normal dapat membalik status sel memori menjadi sel *naive*. Pada penelitian ini diperoleh informasi bahwa sel limpa normal dapat mencegah terjadinya akumulasi sel T memori baik dari populasi CD4 maupun CD8. Sel limpa normal juga berfungsi untuk mengendalikan jumlah sel-sel granulosit sehingga berada pada level normal dalam konteks

homeostasis. Untuk uji pada manusia harus diketahui derajat keselarasan MHC dari donor dan recipient, *MHC matching*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini disampaikan ucapan terima kasih kepada Prof. Izumi Nakashima dan Haruhiko Suzuki dari Nagoya University sehubungan dengan diskusi dan saran berkaitan dengan penelitian ini.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Rifa'i M, Kawamoto Y, Nakashima I, and Suzuki H. *Essential Roles of CD8+CD122+ Regulatory T Cells in the Maintenance of T cell Homeostasis*. J. Exp. Med. 2004; 200:1123-1134
2. Sakaguchi S. *Naturally Arising CD4⁺ regulatory T cells for Immunologic Self-Tolerance and Negative Control of Immune Responses*. Annu. Rev. Immunol. 2004; 22: 531-562.
3. Shevach EM. *Regulatory T Cells in Autoimmunity*. Annu. Rev. Immunol. 2000; 18:423-449.
4. Chatenoud L, B Salomon, and JA Bluestone. *Suppressor T Cells--They're back and Critical for Regulation of Autoimmunity*. Rev. Immunol. 2001; 182:149-163.
5. Von Herrath MG, and LC Harrison. *Antigen-induced Regulatory T Cells in Autoimmunity*. Nat. Rev. Immunol. 2003; 3:223-232.
6. Suci-Foca N, JS Manavalan, and R Cortesini. *Generation and Function of Antigen-Specific Suppressor and Regulatory T cells*. Transpl. Immunol. 2003; 11: 235-244.
7. Bach JF. *Regulatory T Cells under Scrutiny*. Nat. Rev. Immunol. 2003; 3:189-198.
8. Najafian N, T Chitnis, AD Salama, B Zhu, C Benou, X Yuan, MR Clarkson, Sayegh, and SJ Khoury. *Regulatory Functions of CD8⁺CD28⁻ T Cells in an Autoimmune Disease Model*. J. Clin. Invest. 2003; 112:1037-1048.
9. Suzuki H, YW Zhou, M Kato, TW Mak, and I Nakashima. *Normal Regulatory $\alpha\beta$ T Cells Effectively Eliminate Abnormally Activated T Cells Lacking the Interleukin 2 Receptor β in vivo*. J. Exp. Med. 1999; 190:1561-1572.
10. Van Parijs L, A Biuckians, A Ibragimov, FW Alt, Willerford, and AK Abbas. *Functional Responses and Apoptosis in CD25 (IL-2R α)-deficient lymphocytes Expressing a Transgenic Antigen Receptor*. J. Immunol. 1997; 158: 3738-3745.
11. Refaeli Y, L Van Parijs, CA London, J Tschopp, and AK Abbas. *Biochemical Mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T Cell Apoptosis*. Immunity. 1998; 8: 615-623.
12. Kneitz B, T Herman, S Yonehara, and A Schimpl. *Normal Clonal Expansion but Impaired Fas-mediated Cell Death and Anergy in IL-2 Deficient Mice*. Eur. J. Immunol. 1995; 25: 2572-2577.