

Therapi genetik

Darmono

Profesor riset bidang Toksikologi

Sebagai hasil dari perkembangan penelitian bidang ilmu kedokteran, para peneliti yakin bahwa transplantasi gen pada pasien penderita penyakit genetik yang parah dapat disembuhkan. Transplantasi gen tersebut dinamakan “human gen therapy” yang merupakan salah satu teknologi genetik yang sering disebut rekayasa teknologi genetika, dimana terapi ini dilakukan berdasar pada pengetahuan mengenai bagaimana gen bekerja dalam tubuh. Banyak keuntungan yang dapat diperoleh dalam terapi gen ini, tetapi karena ilmu ini merupakan ilmu baru, penerapannya banyak menemukan kendala, baik dalam segi tehnik, ataupun terjadinya suatu efek pada generasi berikutnya.

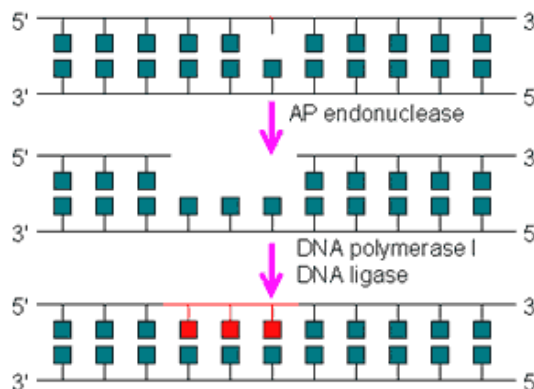
Beberapa penyakit genetik dapat diobati dengan beberapa cara tanpa melibatkan rekayasa genetik, misalnya diobati dengan obat tertentu, transfusi darah, perubahan pola makan (diet) atau transplantasi organ tubuh. Perlakuan tersebut dapat menyembuhkan penyakit yang disebabkan oleh tidak berfungsinya gen, misalnya dengan pemberian faktor pembeku darah dapat mengobati pasien penderita hemofilia. Sedangkan pengobatan dengan rekayasa genetika adalah merupakan pendekatan alternatif untuk beberapa penyakit karena kelainan gen. Pada gen terapi tersebut dilakukan penyisipan gen normal yang mempunyai informasi yang benar kedalam DNA dari sel yang menderita gen malfungsi. Penambahan gen tersebut dinamakan gen insersi. Penambahan gen yang benar tersebut menyebabkan sel yang defek dapat berfungsi normal kembali dan dapat mengurangi atau menghilangkan gejala dari penyakit genetik tersebut. Misalnya pada pengobatan penyakit hemofilia dengan faktor pembeku darah, sekali disisipkan gen yang benar kedalam sel, sel dapat kembali normal untuk memproduksi sendiri faktor pembeku darahnya. Terapi gen juga dapat digunakan untuk penyakit tertentu yang mungkin bukan karena penyakit genetik. Misalnya, penyakit kanker ganas, biasanya dilakukan dengan operasi pengambilan jaringan tumor, dengan radiasi dan atau kemoterapi, belakangan ini peneliti merencanakan pengobatan pasien penderita tersebut dilakukan dengan penghambatan pembentukan sel darah putih secara genetik.

Pada dasarnya proses terapi gen ini adalah menyisipkan atau sebaliknya mendelesi sebagian dari gen pada pasien yang menderita gen defek, sehingga penderita akan menjalani hidup normal kembali. Ada dua methoda untuk menyisipkan materi gen kedalam khromosom manusia, yang pertama adalah tehnik ex-vivo dan yang kedua adalah tehnik invivo. Tehnik ex-vivo dilakukan dengan jalan operasi dengan mengeluarkan sel dari jaringan yang terkena, menyuntikkan atau menyisipkan DNA baru (DNA yang memperbaiki penyakit) kedalam sel tersebut dan dibiarkan untuk membelah dan memperbanyak diri dalam biakan jaringan. Kemudian jaringan baru tersebut dimasukkan kembali pada lokasi tubuh penderita yang mengalami kelainan. Hal tersebut juga dapat dilakukan dengan mengkultur sumsum tulang (zat pembentuk darah) dari pasien, karena bila diinjeksikan kembali, darah akan bersirkulasi keseluruh jaringan tubuh. Model operasi pengambilan jaringan ini dapat menyebabkan rasa sakit pada pasien, dan biasanya pasien akan mengalami rasa sakit dua kali yaitu waktu pengambilan sel dari tubuh dan waktu mengembalikan sel yang diperbaiki kembali kedalam tubuh.

Pada terapi gen dengan methoda invivo, pasien tidak perlu dioperasi atau bahkan anasthesi. Pada proses ini DNA yang benar diinjeksikan kedalam sel melalui satu atau dua tipe virus sebagai pembawa dan yang sering digunakan adalah virus yang sangat sederhana. Dr. Richard Mulligan dari MIT (Medical Institute of Technology, Amerika) Menciptakan sintesis retrovirus yang sangat sesuai untuk

membawa gen DNA untuk terapi gen. Virus tersebut tidak mempunyai DNA virus (DNA virus yang menyebabkan penyakit) dan virus tersebut hanya membawa DNA baru yang telah disisipkan kedalamnya, setelah disuntikkan pada tubuh pasien penderita, virus tersebut mati. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa dengan menggunakan retrovirus tersebut keamanannya terjamin dan mempunyai efek yang lama. Tetapi sayangnya DNA baru yang diinjeksikan hanya membantu sel yang baru dan tidak menolong memperbaiki sel yang sudah ada yang mengalami kelainan. Tipe virus lain yang digunakan untuk tehnik invivo adalah adenovirus, yaitu sejenis virus penyebab flu. Walaupun virus ini juga akan segera mati setelah diinjeksikan untuk terapi DNA, virus ini juga menyerang sistem imun, sehingga pasien akan menderita radang tenggorokan atau flu sesaat/ sementara. Adenovirus bekerja seperti pada retrovirus, tetapi lebih cepat yaitu sekitar 48 jam dan hanya memerlukan dosis yang lebih kecil dibanding dengan retrovirus. Metode lain untuk terapi gen adalah splicing gen (gen splicing), yaitu pemotongan gen pada pasangan basa. Pemotongan pasangan basa tersebut dilakukan secara kimiawi dengan menggunakan bahan kimia disebut sebagai enzim restriksi, yang berperan sebagai gunting untuk memotong DNA. Berbagai jenis enzim yang dapat memotong/meristriksi satu sequence nukleotida.

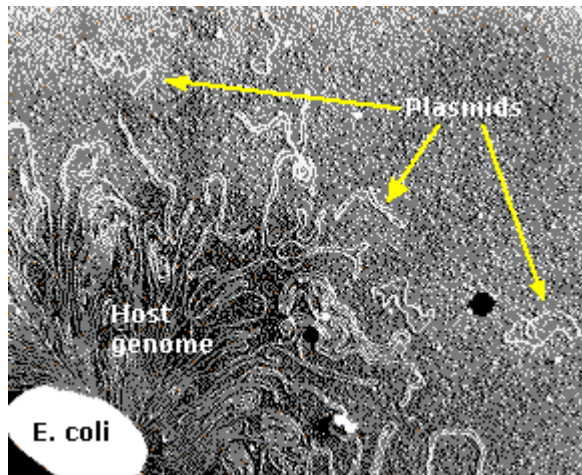
Begitu mengenali sequens yang cocok pada strand DNA, enzim tersebut memotong dan memisahkan bagian dari pasangan basa tersebut dan meninggalkan strand tunggal pada akhir dari helix pasangan ganda (Gb.11.1). Kemudian peneliti memasukkan sequens yang dikehendaki pada rantai yang terbuka tersebut untuk memperbaiki kelainan gen tersebut, sehingga rantai pasangan basa kembali menjadi normal, hal ini disebut DNA ligase.



Gambar.11.1. Menunjukkan adanya nukleotida yang tidak mempunyai pasangan (atas), kemudian dilakukan pemotongan/splicing (tengah) dan dilakukan ligasi untuk memperbaiki struktur DNA tersebut (bawah)

Bentuk materi genetik apapun dapat displise/dipotong bersamaan, misalnya bakteri dan DNA ayam dapat dipotong dan dikombinasikan. Yang lebih sering perlakuan splise digunakan untuk usaha yang lebih penting yaitu untuk produksi insulin dan hormone pertumbuhan untuk pengobatan pada penyakit manusia. Jaman dahulu insulin hanya didapatkan dari pancreas kadaver (mayat/orang meninggal) yang diperlukan sekitar 50 kadaver untuk satu dosis saja. Dengan tehnik modern yaitu tehnik splising gen, insulin dapat dicukupi untuk penderita diabetes berapa saja. Yaitu dengan cara gen yang memproduksi insulin dari DNA manusia displise kedalam DNA plasmid, plasmid kemudian diinfeksi ke bakteri, kemudian bakteri dipupuk ditumbuhkan dan dikembangkan, yang akhirnya sejumlah besar insulin dapat diproduksi dan kemudian dipanen. Plasmid adalah molekul DNA yang dapat ditemukan dalam bakteri yang dipisahkan dari kromosom bakteri (Gb.11.2). Ciri khas dari plasmid adalah: i) sangat

kecil, hanya mempunyai beberapa ribu pasangan basa, ii) biasanya hanya dibawa oleh hanya satu atau beberapa gen, iii) berbentuk sirkuler iv) hanya mempunyai satu replikasi yang murni.

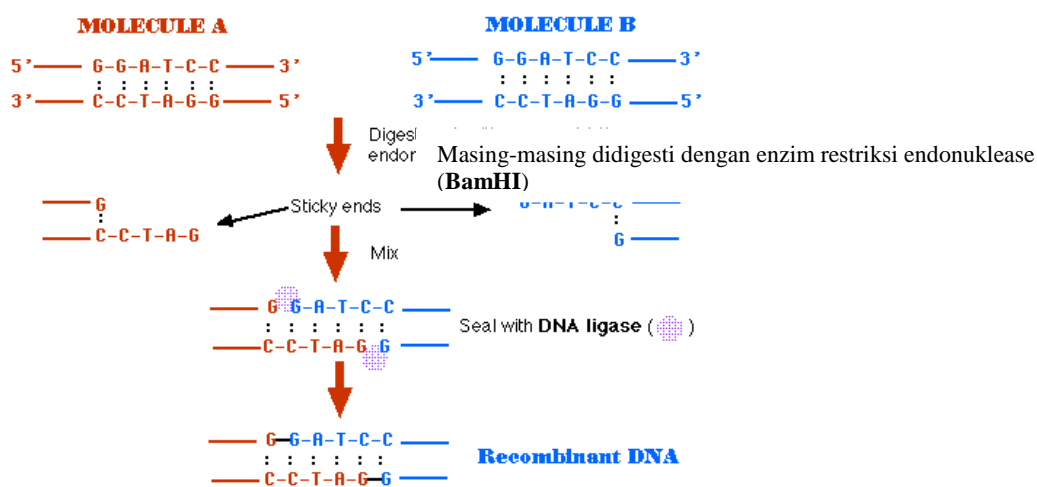


Gambar 11.2. bakteri untuk

Gambaran elektron mikroskop dari sel *Escherichia coli* yang di ruptur/dirobek mengeluarkan DNANYa. Gambar menunjukkan molekul DNA tunggal yang berisi 4,6 juta pasangan basa yang dikode sekitar 4300 gen. Gambar panah menunjukkan plasmid (bentuk sirkuler) (Adopsi dari: H. Potter and D. Dressler, Harvard Medical School.).

DNA rekombinasi (Recombinant DNA)

DNA rekombinasi adalah DNA baru yang dibuat dengan mengkombinasi dua jenis DNA atau lebih menjadi satu jenis molekul DNA baru dengan cara splise dan ligasi. Jenis DNA baru tersebut akan sangat berguna apabila molekul tersebut dilipat gandakan (direplikasi) menjadi banyak supaya dapat dianalisis, misalnya dapat disquensing atau keperluan analisis lainnya. Memproduksi banyak kopi molekul DNA rekombinasi yang identik tersebut dinamakan cloning. Kloning dapat dilakukan secara in vitro dengan proses yang disebut “polymerase chain reaction (PCR)”. Bagaimana proses DNA rekombinasi dilakukan seperti terlihat pada gambar 11.3.



Gambar 11.3. Skema proses splising dengan endonuklease (*Bam*HI/GATCC) dari dua DNA murni, kemudian dua molekul DNA tersebut direkombinasikan dan memperoleh klon DNA baru.

Pada setiap kasus, DNA rekombinan harus dibawa oleh sel supaya dapat diperbanyak dan dapat dimasukkan kedalam tubuh resipien/penerima. Hal tersebut dilakukan dengan memasukkan DNA rekombinan kedalam bagian molekul dari organisme yang disebut vector. Vektor dapat berupa virus, bagian dari bakteri dan sel mamalia yang memelihara molekul DNA rekombinan tersebut. Jadi dalam hal ini misalnya sebagai hospes adalah *E. coli* dan sebagai vector adalah plasmid. Dengan menggunakan prosedur seperti ini, banyak gen manusia telah di-klon dalam *E. coli* atau sejenis ragi. Hal tersebut memungkinkan untuk pertama kali diproduksi sejumlah protein manusia yang tidak terbatas secara invitro. Pemiakan sel (*E.coli*, ragi/yeast, sel mamalia) yang ditransformasi oleh gen manusia dapat digunakan untuk industri human protein seperti:

- i) insulin untuk penderita diabetes,
- ii) factor kloting VIII untuk pria penderita hemofilia A,
- iii) factor IX untuk penderita hemofilia B,
- iv) hormone pertumbuhan,
- v) erythropoietin (EPO) untuk pengobatan anemia,
- vi) tiga tipe interferon,
- vii) beberapa interleukin,
- viii) “granulocyte-macrophage colony stimulating factor” (GM-CSF) untuk menstimulasi susmsum tulang setelah transplantasi
- ix) “granulocyte colony-stimulating factor” (G-CSF) untuk menstimulasi produksi neutrofil, misalnya setelah dilakukan khemoterapi dan untuk memobilisasi hematopoietik stem sel dari sumsum tulang dan masuk dalam sirkulasi darah,
- x) “tissue plasminogen activator”(TPA) untuk melisis penggumpalan darah,
- xi) “adenine deaminase” ADA untuk pengobatan SCID (penyakit imunodefisiensi kombinasi),
- xii) angiostatin dan endostatin untuk percobaan obat anti kanker,
- xiii) parathyroid hormon,
- xiv) leptin,
- xv) antigen permukaan hepatitis B (HBs Ag) untuk vaksinasi penyakit hepatitis B,
- xvi) C1 inhibitor (C1INH) digunakan untuk pengobatan penyakit “hereditary angioneurotic edema” (HANE).

Terapi genetik untuk gangguan sistem imun

Salah satu kemajuan paling menarik di bidang terapi gen dalam beberapa tahun terakhir adalah pembentukan sel T antigen-spesifik sebagai vektor untuk pengobatan secara genetik yang diturunkan secara in vivo. Berbeda dengan aplikasi tradisional terapi gen, kegunaan yang unik, spesifisitas dan memori dari kemampuan sel T, peneliti atau dokter dapat menerapkan berbagai taktik dan strategi dalam pengobatan penyakit genetik sistem imun. Sel T dapat dimodifikasi untuk menghasilkan produk terapeutik atau produk regeneratif ke lokasi peradangan dan kerusakan jaringan. Selain itu, sel T bisa diubah untuk memodulasi interaksi seluler atau untuk memperbaiki cacat genetik sendiri untuk memperbaiki penyakit. Strategi-strategi modifikasi genetik yang berhubungan dengan pengobatan penyakit autoimun pada model hewan eksperimental akan menjadi fokus dari bab ini, dengan penekanan khusus pada Analog dari multiple sclerosis (MS), diabetes mellitus tergantung insulin (IDDM) dan rheumatoid arthritis (RA). Gen terapi, dalam bentuk yang paling sederhana, dapat diwakili oleh penggantian gen hilang atau cacat tunggal untuk memperbaiki gangguan monogenik. Penyakit gangguan genetik, seperti kekurangan adenosine deaminase (ADA) atau cystic fibrosis (CF),

sangat menarik untuk dijadikan target percobaan terapi gen secara eksperimental sejak uji klinis pada manusia pertama dimulai pada pasien defisiensi ADA pada tahun 1990. Dalam pengertian yang lebih luas, terapi gen dapat dianggap tidak hanya untuk penggantian gen endogen yang rusak, tetapi juga dapat menggabungkan penambahan gen asing atau yang dimodifikasi untuk mengubah fungsi biologis. Sehingga dalam hal ini penyakit yang multigenik, patologi yang mendasari gangguan kompleks atau yang tidak dikenal, sebagai penyakit autoimun, juga dapat menjadi kandidat untuk terapi gen dengan memanfaatkan jalur endogen atau pengendalian biologis atau membuat gen yang baru. Strategi ini dapat dikategorikan dalam empat kelompok umum yaitu: modifikasi jaringan target; pengiriman produk terapeutik; pengiriman produk regeneratif, dan perubahan interaksi selular.

Satu kesalahpahaman tentang sel T adalah bahwa dia sangat tahan terhadap modifikasi genetik. Meskipun benar bahwa T sel terbukti relatif lebih sulit untuk dimodifikasi daripada jenis sel lain, rekayasa DNA dapat dilakukan melalui berbagai teknik (Tabel 11.1). Semua pendekatan terbagi dalam dua kategori besar yaitu: nonviral (biasanya plasmid) serapan DNA, disebut "transfection," dan serapan DNA virus yang dibantu, disebut "transduksi". Masing-masing pendekatan modifikasi tersebut mempunyai kerugian dan keuntungan. Secara umum, metode nonviral cenderung kurang efisien tetapi sangat stabil dan dengan efek samping yang lebih sedikit, sementara metode virus sangat efisien namun memerlukan biaya yang tinggi dan kerugian yang nyata termasuk efek samping yang serius.

Tabel 11.1 Metoda viral dan non-viral yang digunakan untuk modifikasi sel-T

Non-Viral	Viral Vectors
DEAE/dextran	Retrovirus
DMSO/Polybrene	Adenovirus
Calcium phosphate co-precipitation	Adeno-associated virus(AAV)
Cationic liposome	Herpes simplex virus(HSV)
Electroporation	Cytomegalovirus
Direct microinjection	Lentivirus
Biolistic particle("gene gun")	

Vektor virus, merupakan pengobatan sistem imun dengan pendekatan genetik paling sering digunakan dalam bidang terapi gen. Semua vektor virus yang direkayasa untuk dapat ber-replikasi-dan segera mati setelah diberikan, sehingga dapat meminimalkan risiko infeksi pada hospes. Vektor retroviral sangat efektif, tetapi terbatas karena hanya dapat menyebabkan "transduce aktif" dalam pembelahan sel. Menariknya, seorang peneliti telah memanipulasi sisi negatif ini yaitu secara khusus merangsang (meng-induce) populasi sel T antigen-spesifik yang mengalami pembelahan sebagai respons terhadap antigen serumpun. Sebaliknya, vektor adenoviral memiliki kemampuan transducing baik secara aktif terhadap sel yang membelah dan yang tidak membelah. Namun, vektor adenoviral dan

vektor retroviral, mengikuti ekspresi gen sementara, yaitu gen statis (silence) dan efek posisional. Mereka juga cenderung untuk mendorong respon kekebalan yang kuat pada hospes. Sementara ini sebagian besar eksperimen terapi gen virus telah dilakukan dengan menggunakan vektor retroviral dan adenoviral, vektor virus tersebut digunakan sebagai dasar dari virus adeno-asosiasi (AAV), virus herpes simpleks (HSV) dan juga sitomegalovirus (CMV) telah digunakan. Salah satu vektor baru yang paling menjanjikan adalah berdasarkan lentivirus. Vektor Lentiviral, seperti vektor adenoviral, menggabungkan mekanisme kerja sistem tersebut yaitu terhadap sel yang membelah dan tidak membelah, tetapi mereka tidak rentan terhadap gen silence dan tidak menimbulkan sejumlah respon imun yang kuat. Dilain pihak virus HIV secara alamiah cocok untuk infeksi sel T, tetapi disisi lain virus yang berasal HIV menimbulkan ancaman yang paling serius dari semua terapi virus berdasarkan kompetensi replikasi. Dalam kasus HIV, hal ini jelas akan menimbulkan bencana, namun sebetulnya "aman" seperti pada adenovirus dapat menerapkan immunocompromised pada pasien sakit parah. Walaupun kemungkinan ini bisa digunakan, tetapi ada risiko bahwa integrasi vektor dapat menyebabkan transformasi ganas pada jaringan hospes atau menimbulkan komplikasi tak terduga yang berkaitan dengan kondisi pasien yang sedang dirawat. Namun, transfer gen virus-mediated tetap merupakan teknologi terkemuka dalam teknologi terapi gen dewasa ini.

Pendekatan lain yang sedang aktif diteliti adalah penggunaan sel induk (stem-sel) untuk terapi gen. Sel induk dapat berasal dari berbagai bentuk, tetapi kepentingan tertentu untuk imunologi adalah sel induk hematopoietic (HSC). HSCs mampu repopulating kompartemen seluruh hematopoietic, termasuk sistem kekebalan tubuh, sehingga mereka calon yang sempurna untuk terapi gen strategies dengan penargetan sel nenek moyang jangka panjang dengan promotor yang tepat, ekspresi dari gen bisa dibatasi tertentu dari garis keturunan. Sedangkan DNA plasmid dan DNA virus dapat digunakan in-vivo atau ex-vivo, tergantung pada pendekatan terapeutik, HSCs hampir secara eksklusif diubah dari ex-vivo dan kembali ke hospes sehingga sistem hematopoietic yang kurang dapat terisi kembali. Virus telah terbukti efektif sebagai vektor dalam pengobatan pada penyakit genetik manusia ADA-SCID.

Penelitian terakhir melaporkan bahwa sel-T yang dimodifikasi secara genetik dapat dilakukan dengan memproduksi transgenik pada hewan coba. Dengan melakukan mikro-injeksi DNA kedalam sel telur yang telah dibuahi, semua sel dari hewan transgenik dapat berpotensi mengekspresikan transgen. Sel-T kemudian dapat dipanen dari hewan transgenik tersebut. Gen yang diekspresikan terbatas pada sel-T saja melalui sel-T promotor spesifik seperti CD4+. Tetapi beberapa kendala dapat terjadi bila terjadi kematian gen, sehingga gen tidak dapat diekspresikan atau gen tidak dapat berpenetrasi kedalam jaringan. Gen mungkin tidak dapat inkorporasi dengan sel germinal, sehingga gagal untuk ditransmisikan kepada keturunannya, tetapi hal ini masih diteliti lebih lanjut sebab dan akibatnya. Secara umum metoda modifikasi genetik sel-T telah mulai diaplikasikan dengan menggunakan model hewan coba untuk pengobatan penyakit autoimun, tetapi yang telah dipublikasikan adalah tiga penyakit autoimun yang dicoba secara eksperimental yaitu: experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), nonbase diabetic (NOD) mice dan collagen-induced arthritis (CIA). Model eksperimen tersebut dilakukan berdasarkan penyakit pada manusia yaitu penyakit multipel sklerosis (MS), insulin dependen diabetes melitus (IDDM) dan rheumatoid arthritis (RA).

Terapi stem sel (sel punca/sel induk)

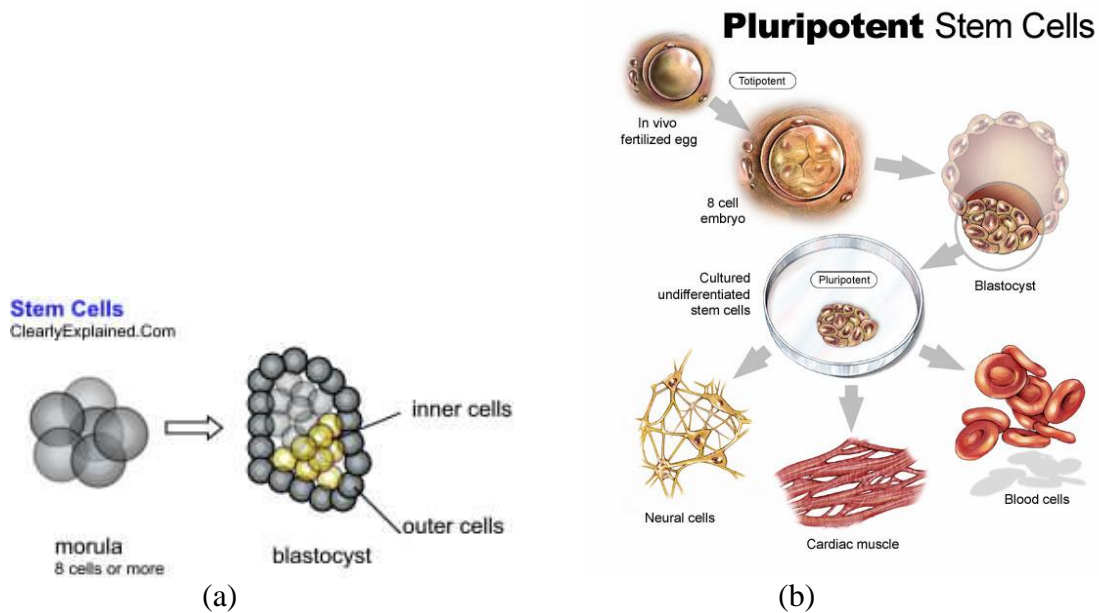
Diawali dari terbentuknya tubuh manusia, sel adalah merupakan bagian dasar dari kehidupan. Sel mengandung DNA, yang merupakan materi genetik dan mempunyai kemampuan untuk membelah diri dan bereplikasi membentuk turunan sel yang juga mengandung DNA identik dengan sel induknya. Seperti telah diterangkan bagian depan ada dua bentuk sel dalam tubuh yaitu sel somatik dan sel germinal, sedangkan sel induk/stem sel adalah sel yang berasal dari embryo, yang nantinya akan

membentuk sel somatik dan sel germinal. Pada waktu germinal sel (ova) berkombinasi dengan germinal sel (spermatozoa) pada saat terjadi proses reproduksi, keduanya akan membentuk zygot, yang kemudian membelah diri melalui beberapa fase pembelahan membentuk bola kecil yang berisi sekumpulan sel (sel pluripoten), maka bentukan itulah yang disebut stem sel.

Ada tiga tipe stem sel yang utama, ketiganya diambil dari lokasi yang berbeda dan digunakan untuk terapi yang berbeda pula, tetapi masih terdapat beberapa kontroversi. Ketiga jenis terapi stem sel tersebut adalah: Embryonic stem cells (ES), adult stem cells, dan umbilical stem cells.

Stem sel embryo (Embryonic Stem Cells/ES)

Stem sel embryo dapat diperoleh dari fase awal pertumbuhan embryo (Gb.11.4), yang berbentuk blastosit. Stem sel tersebut diperoleh dari perkembangan baru dari sekumpulan sel yang sangat berpotensi untuk membelah diri yang akan membentuk sel dalam jaringan pada tubuh manusia. Banyak peneliti yakin bahwa penelitian stem sel embryo merupakan prospek yang cerah dan sangat berpotensi untuk dapat menyembuhkan berbagai penyakit kelainan genetik. Mereka percaya bahwa penyakit seperti Parkinson's Disease, Alzheimer, kerusakan sumsum tulang belakang serta penggantian organ dapat diobati dengan cara ini. Tetapi pengobatan sistem ini masih terjadi kontroversi, karena adanya perlakuan dengan pengambilan embryo yang berumur sekitar lima sampai enam hari. Banyak kontroversi terutama terjadi antara pihak ilmuwan, pemerintah dan pemuka agama yang merupakan puncak perdebatan diantara mereka mengenai penggunaan embryo tersebut.



Gambar 11.4 Awal terbentuknya stem sel (a), dan pluripoten stem sel yang akan membentuk jaringan (b).

Adult stem cell (stem sel dari orang dewasa)

Stem sel dari orang dewasa dapat diperoleh dari bagian tubuh/jaringan yang khusus dari orang dewasa. Karena jaringan orang dewasa telah mengalami perkembangan dan telah terbentuk fungsinya masing-masing maka stem sel diambil dari daerah yang akan berkembang seperti sumsum tulang. Sel dari organ tersebut tidaklah sepenuhnya pluripoten dan hanya akan membentuk jaringan tertentu saja. Tetapi jenis stem sel ini telah digunakan untuk beberapa tujuan seperti kloning, terapi diabetes, dan

darah buatan. Banyak kontroversi terjadi pada penelitian stem sel dewasa kloning ini dan pengaruh dari kloning tersebut. Kloning stem sel dewasa hanya terbatas dilakukan pada hewan saja dan sangat tidak etis bila dilakukan pada orang sehingga sampai sekarang belum pernah dilakukan.

Stem sel umbilikus (umbilical cord stem cells)

Umbilikus cord stem sel dapat diperoleh dari bayi yang baru lahir (umbilikus/ari-ari). Banyak sekali sampai jutaan multipotent (tidak sebanyak pluripotent dari embrio, tetapi lebih banyak potensial daripada stem sel dewasa), dimana stem sel terdapat dalam umbilical cord dan darah yang terkandung didalamnya. Stem sel tersebut dapat disimpan dalam bank stem sel dan akan dapat digunakan kemudian untuk sumsum tulang, anemia, dan pengobatan kanker. Disamping itu stem sel umbilical cord ini tidak banyak terjadi kontroversi, karena biasanya umbilikus ini dibuang atau dikubur saja setelah bayi lahir.