NATURAL B, Vol. 1, No. 3, April 2012

Sel T Regulator $CD4^+CD25^+$ Meningkatkan Toleransi Donor dan Resipien pada Transplantasi Allogenik

Muhaimin Rifa'i *

Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang

Diterima tanggal 21 Maret 2012, direvisi tanggal 9April 2012

ABSTRAK

Toleransi donor terhadap resipien merupakan tujuan akhir dari segala macam transplantasi, baik transplantasi organ maupun sumsum tulang. Aktivasi dan induksi sel T regulator terbukti dapat meningkatkan toleransi antara donor dan resipien. Penelitian ini menjelaskan pentingnya sel T regulator, $CD4^+CD25^+$ dalam transplansi sumsum tulang allogenik. Injeksi sel sumsum tulang sebanyak (3-5) x 10^5 terbukti dapat meningkatkan penerimaan sel T oleh resipien, baik populasi sel T CD4 maupun populasi sel T CD8. Sel T naïve $CD4^+CD62L^+$ meningkat pada resipien yang menerima ko-transfer sel sumsum tulang dan sel T regulator. Pada penelitian ini juga ditunjukkan bahwa sel granulosit dan sel B dapat berkembang normal pada resipien yang menerima kotransfer sel T regulator. Hal yang menarik bahwa sel-sel yang kebal terhadap radiasi tetap berada pada periferal dan tidak berinterferensi dengan sumsum tulang. Hasil penelitian ini dapat memberikan ilustrasi sebagian fungsi sel T regulator *in vivo* yaitu bagaimana sel regulator bekerja *in vivo* dengan jumlah hanya sekitar 5-10% dari sel T CD4 periferal.

Kata kunci : $CD4^+CD25^+$, sel T regulator, GVHD, transplantasi sumsum tulang

ABSTRACT

To gain transplantation tolerance between donor and resipiens is the ultimate goal of all transplantations, either solid or bone marrow transplantation. Activation and induction of regulatory T cells are shown to increase tolerance between donor and resipien. This study describes the importance of regulatory T cells, $CD4^+CD25^+$ in allogeneic bone marrow transplantation. Injection of bone marrow cells as much as (3-5) x 10^5 shown to increase donor T cell engraftments in resipien, both CD4 and CD8 populations. Naive T cells, $CD4^+CD62L^+$ cells increased in resipiens receiving bone marrow co-transfer with regulatory T cells. In this study also demonstrated that granulocytes and B cells can better develop on a recipient that receives co-transfer of regulatory T cells. Interestingly, the cells that are resistant to radiation remain on the peripheral and does not interfere with the bone marrow. The results of this study could illustrate, at least partially, how naturally occurring Tregs exert their regulatory function in vivo as they constitute only 5 – 10% of peripheral $CD4^+$ T cells.

Key word : $CD4^+CD25^+$, regulatory T cells, GVHD, bone marrow transplanstatio

---

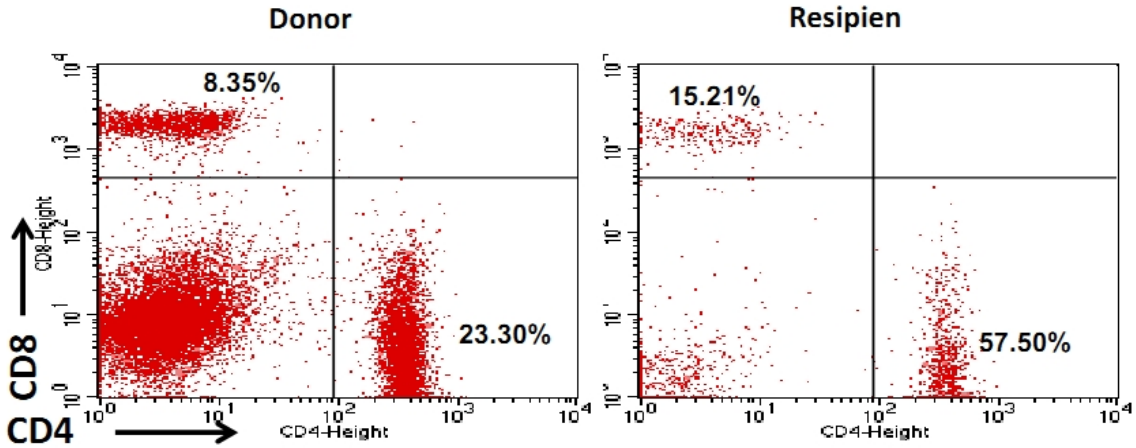
PENDAHULUAN

Hingga saat ini transplantasi sumsum tulang masih mempunyai dua hambatan besar. Pertama munculnya reaksi penolakan dan yang kedua adalah munculnya reaksi GVHD (*graft versus host disease*). Telah banyak usaha dilakukan di bidang kedokteran untuk menghadapi masalah ini, namun belum ada tanda-tanda keberhasilan yang memadai [1-6]. Telah diketahui dalam ilmu Imunolagi bahwa regulasi respon imun terhadap *self antigen* merupakan proses yang sangat komplek. Di

----
*Coresponding author :
E-mail: rifa123@ub.ac.id

satu sisi harus melakukan supresi terhadap sel-sel imun yang melakukan aktivasi, sementara di sisi lain harus tetap mempertahankan diri dari invader yang masuk. Dalam kondisi ini diperlukan pengaturan yang sangat ketat sehingga hasil akhir dari mekanisme regulasi tetap menjamin tubuh bebas dari penyakit autoimun sementara itu mampu mempertahankan diri dari serangan invader dari luar. Sel T autoreaktif selalu ada pada individu normal, namun keberadaannya selalu dikontrol oleh sel T regulator $CD4^+CD25^+$ yang secara khusus telah disiapkan pembentukannya di dalam timus. Dalam kondisi seperti inilah strategi transplantasi baik transplantasi organ maupun transplantasi sumsum tulang tetap dilaksanakan dan tetap berharap keberhasilannya [7-15].

Sel T regulator $CD4^+CD25^+$ telah diketahui mampu melindungi suatu individu dari perkembangan sel T autoreaktif. Banyak bukti yang menerangkan kemampuan sel T $CD4^+CD25^+$ sebagai regulator yang mampu mencegah terjadinya perkembangan sel-sel autoreaktif [5, 8, 11, 12-17]. Molekul permukaan sel yang dikenal dengan CD25 merupakan reseptor penting untuk merespon IL-2. CD25 merupakan *sub-unit* reseptor alfa IL-2. IL-2 mempunyai tiga macam reseptor yakni alfa, beta, dan gama. Kehadiran reseptor alfa pada suatu individu merupakan faktor penting untuk survival. Penghapusan gen yang menyandi ekspresi IL-2Rα mengakibatkan suatu individu mengalami cacat genetik dengan tanda-tanda munculnya penyakit *autoimmune*. $CD4^+CD25^+$ mempunyai kemampuan meregulasi baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Transfer sel T $CD4^+CD25^+$ pada resipien *lymphopenic* juga terbukti mampu mencegah perkembangan sel-sel *autoreactive* [3, 7]. Hal ini menjadi bukti bahwa pada individu yang sehat pastilah terdapat sel regulator professional yang secara aktif menekan perkembangan sel-sel autoreaktif. Regulasi $CD4^+CD25^+$ menyangkut kemampuan menghambat proliferasi dan sekresi IL-2 oleh $CD4^+CD25^-$. Sel T regulator $CD4^+CD25^+$ juga mempunyai kemampuan meregulasi sel T dari populasi CD8 dan mencegah terjadinya penyakit autoimun [5, 13]. Pada penelitian ini diperoleh hasil yang menjelaskan pentingnya peranan sel T



Gambar 1. Ko-transfer sel T regulator $CD4^+CD25^+$ pada transplantasi allogenik dapat meningkatkan penerimaan sel limfosit T. Mencit BALB/c sebagai resipien diradiasi dengan dosis letal 850 RAD. Sel sumsum tulang dari mencit C57BL/6 sebanyak (3-5) x 10^5 dicampurkan dengan sel T rergulator $CD4^+CD25^+$ tipe donor sebanyak 5 x 10^4 dan ditransplantasikan pada mencit BABL/c yang telah diradiasi. Pengamatan dilaksanakan dua bulan setelah transplantasi. Sel spleen diisolasi dari resipien dan distaining dengan antibodi monoklonal anti-CD4-FITC, anti CD8-PE, dan anti-CD45-biotin. Presentasi relatif sel yang mengekspresikan CD4 dan CD8 ditunjukkan pada gambar. Pada transplantasi ini keberhasilan donor mengganti sel resipien adalah 90% dan data mewakili lebih dari lima kali eksperimen.

regulator $CD4^+CD25^+$ pada transplantasi allogenik.

METODE PENELITIAN

Pada penelitian ini digunakan mencit normal $C57BL/6^{CD45.1/CD45.1}$ dan mencit BALB/c (CD45.2). Mencit dipelihara pada fasilitas *pathogen free*.

Sumsum tulang diisolasi dari mencit C57BL/6. Kontaminasi sel T yang telah masak dideplesi dengan menggunakan anti-Thy-1 dan ditambahkan komplemen. Deplesi dilakukan pada inkubator CO_2 selama 30 menit. Sel T regulator yang berasal dari donor diisolasi dari sel spleen dengan menggunakan mesin sorting FACS Vantage. Sel sumsum tulang sebanyak (3-5) x 10^5 diinjeksikan melalui fleksus mata pada resipien (BALB/c). Sebelum diinjeksikan, sumsum tulang telah dicampur dengan sel T regulator $CD4^+CD25^+$, atau sel T non regulator $CD4^+CD25^-$, atau sumsum tulang tanpa campuran. Sebelum menerima sel donor mencit BALB/c diradiasi dengan dosis letal (850 RAD). Pengamatan dilakukan dua bulan setelah transplantasi. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan flowcytometry FACS calibur.

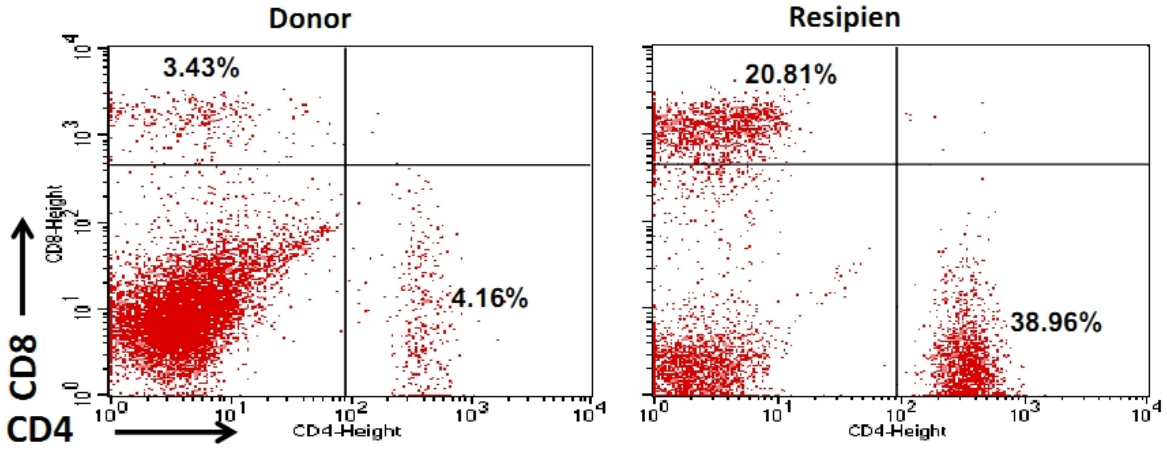
Antibodi monoklonal yang digunakan adalah *phycoerythrin* (PE)-*conjugated anti-mouse* CD8 (clone 53-6.7), *fluorescein isothiocyanate* (FITC)- atau a*llophycocyanin* (APCn)-*conjugated anti-mouse* CD4 (clone GK1.5), PE-*conjugated anti-mouse* CD62L, *biotin-conjugated anti-mouse* CD45.1 (*clone* A20), FITC-*conjugated anti-mouse* Gr-1, FITC-*conjugated anti-mouse* CD25 (clone PC61.5), dan PE-*conjugated anti*-B220. Antibodi yang berkonjugasi dengan biotin divisualisasi dengan menggunakan *steptavidine*-PE-Cy5.

HASIL DAN PEMBAHASAN

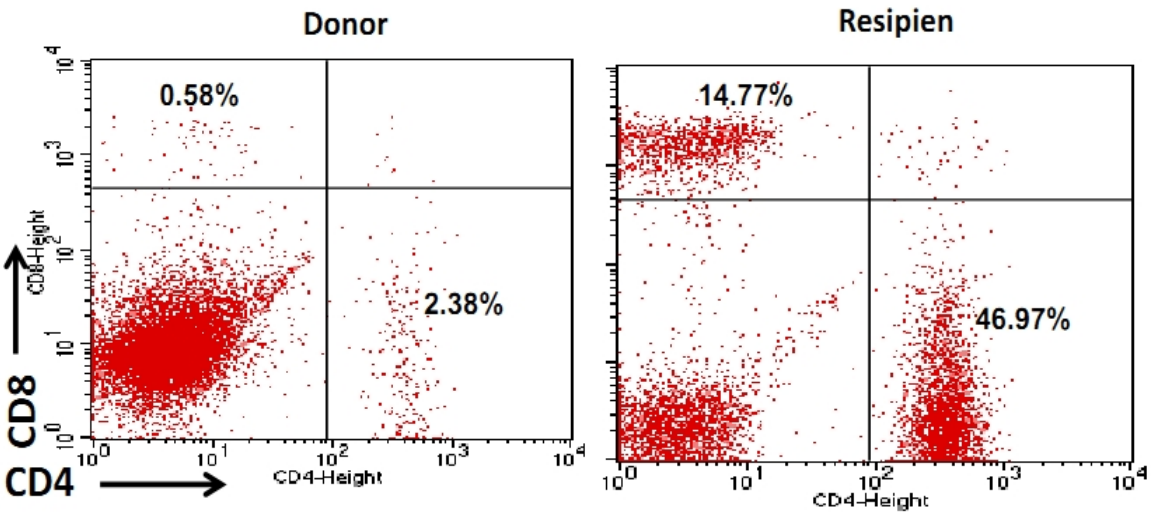
Ko-transfer sel T regulator, $CD4^+CD25^+$ bersama sel sumsum tulang yang bersal dari donor C57BL/6 yang diberikan pada mencit BALB/c dapat menambah keberhasilan transplantasi. Keberhasilan transplantasi ini dapat dilihat dari penerimaan resipien terhadap sumsum tulang dari donor. Ko-transfer $CD4^+CD25^+$ bersama sumsum tulang donor menyebabkan mencit resipien berkembang normal dan tidak menunjukkan gejala GVHD pada pengamatan dua bulan pasca transplantasi. Sebaliknya ko-transfer dengan menggunakan $CD4^+CD25^-$ tidak mempunyai pengaruh dalam meningkatkan *survival*. Pada ko-transfer dengan menggunakan $CD4^+CD25^-$, mencit resipien telah menunjukkan GVHD pada pengamatan dua bulan pasca transplantasi. Dari hasil ini jelaslah bahwa populasi sel T yang mempunyai sifat regulator berada pada populasi $CD4^+CD25^+$.

Salah satu penyebab kegagalan transplantasi pada mencit BABL/c yang tidak dimanipulasi dengan sel T regulator adalah adanya penolakan donor oleh resipien. Penolakan oleh resipien ini utamanya terhadap sel-sel limfosit T. Pada penelitian ini dapat dilihat bahwa sel T donor hanya berkembang dengan baik ketika sel T regulator ditambahkan (Gambar 1). Penambahan sel T selain sel T regulator tidak memberikan dampak positif pada transplantasi (Gambar 2). Di samping itu diketahui bahwa transplantasi sumsum tulang tanpa penambahan sel T regulator juga tidak menunjukkan keberhasilan meskipun sumsum tulang telah dibebaskan dari kontaminasi sel T yang telah mengalami maturasi (Gambar 3).

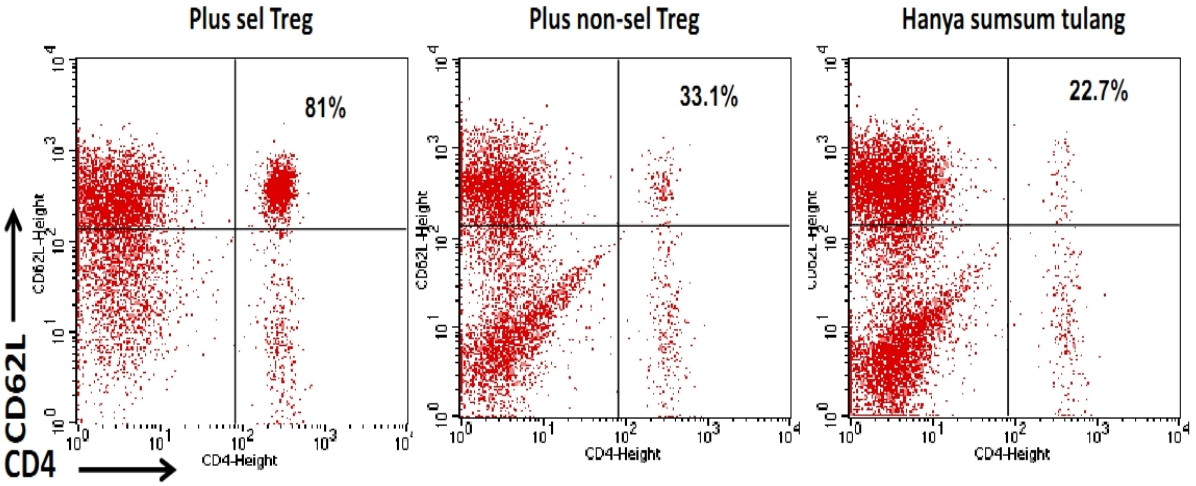
Pada penelitian ini juga dapat dilihat adanya aktivasi sel T jika transplantasi sumsum tulang allogenik tidak menyertakan sel T regulator. Dengan demikian sel T regulator dapat dikatakan sebagai agen yang dapat menekan reaktivitas sel-sel T efektor. Terjadinya reaktivitas sel T ini dapat dilihat dari hilangnya ekspresi CD62L dari populasi sel T (Gambar 4). Pada penelitian ini juga diketahui terjadinya peningkatan sel B (B220) pada transplantasi yang melibatkan sel T regulator (Gambar 5). Meningkatnya sel-sel bergranula pada transplantasi yang tidak melibatkan sel T regulator menunjukkan



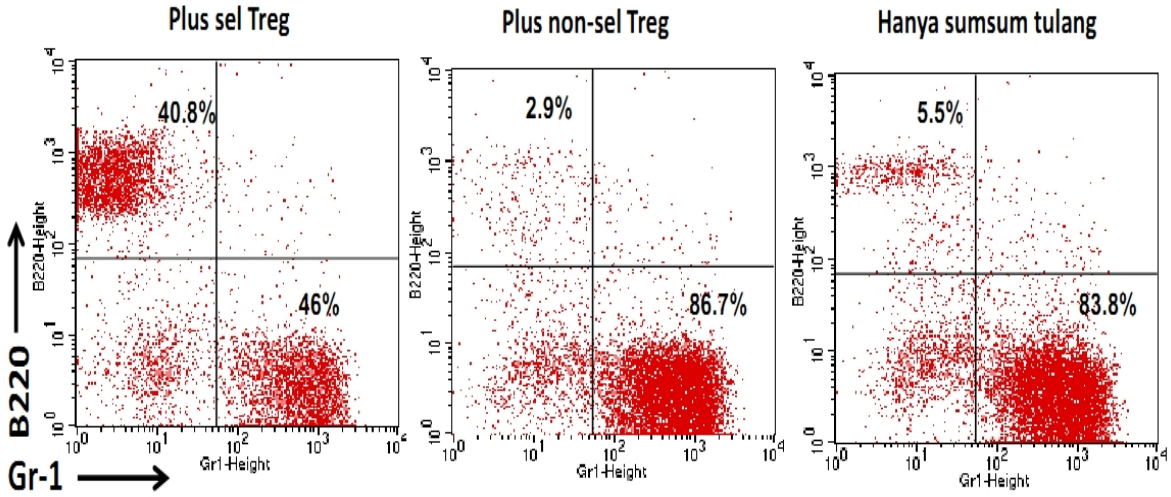
Gambar 2. Ko-transfer sel T selain sel T regulator tidak dapat meningkatkan pertumbuhan sel T tipe donor pada transplantasi sistem allogenik. Mencit BALB/c sebagai resipien diradiasi dengan dosis letal 850 RAD. Sel sumsum tulang dari mencit C57BL/6 sebanyak (3-5) x 10^5 dicampurkan dengan sel T non-rergulator $CD4^+CD25^-$ tipe donor sebanyak 5 x 10^4 dan ditransplantasikan pada mencit BABL/c yang telah diradiasi. Pengamatan dilaksanakan dua bulan setelah transplantasi. Sel spleen diisolasi dari resipien dan distaining dengan antibodi monoklonal anti-CD4-FITC, anti CD8-PE, dan anti-CD45-biotin. Presentasi relatif sel yang mengekspresikan CD4 dan CD8 ditunjukkan pada gambar. Data menunjukkan bahwa sel T donor tidak berkembang dengan baik dan sel T didominasi sel T tipe resipien yang kebal terhadap radiasi. Pada transplantasi ini keberhasilan donor mengganti sel resipien adalah 90% dan data mewakili lebih dari lima kali eksperimen.



Gambar 3.Sel T donor tidak dapat berkembang pada transplantasi sistem allogenik tanpa penambahan sel T regulator. Mencit BALB/c sebagai resipien diradiasi dengan dosis letal 850 RAD. Sel sumsum tulang dari mencit C57BL/6 sebanyak (3-5) x 10^5 tanpa dicampurkan dengan sel T rergulator maupun sel T nonregulator ditransplantasikan pada mencit BABL/c yang telah diradiasi. Pengamatan dilaksanakan dua bulan setelah transplantasi. Sel spleen diisolasi dari resipien dan distaining dengan antibodi monoklonal anti-CD4-FITC, anti CD8-PE, dan anti-CD45-biotin. Presentasi relatif sel yang mengekspresikan CD4 dan CD8 ditunjukkan pada gambar. Data menunjukkan bahwa sel T didominasi oleh sel T resipien yang berkembang dari sel T yang kebal terhadap radiasi. Pada transplantasi ini keberhasilan donor mengganti sel resipien adalah 90% dan data mewakili lebih dari lima kali eksperimen.



Gambar 4. Sel T donor berkembang menjadi sel T naïve yang mengekspresikan CD62L pada transplantasi sistem allogenik yang menerima sel T regulator. Mencit BALB/c sebagai resipien diradiasi dengan dosis letal 850 RAD. Sel sumsum tulang dari mencit C57BL/6 sebanyak (3-5) x 10^5 dicampurkan dengan sel T rergulator $CD4^+CD25^+$ tipe donor sebanyak 5 x 10^4 (panel kiri), dicampurkan dengan sel T nonregulator (panel tengah), dan tanpa penambahan sel T (panel kanan) dan ditransplantasikan pada mencit BABL/c yang telah diradiasi. Pengamatan dilaksanakan dua bulan setelah transplantasi. Sel spleen diisolasi dari resipien dan distaining dengan antibodi monoklonal anti-CD4-FITC, anti CD62L-PE, dan anti-CD45-biotin. Presentasi relatif sel yang mengekspresikan CD4 dan CD62L ditunjukkan pada gambar. Data menunjukkan bahwa sel T berkembang menjadi sel T naïve pada ko-transfer dengan sel T regulator $CD4^+CD25^+$. Pada transplantasi ini keberhasilan donor mengganti sel resipien adalah 90% dan data mewakili lebih dari lima kali eksperimen.



Gambar 5. Penambahan sel T regulator pada transplantasi allogenik dapat mencegah perkembangan sel granulosit yang berlebihan dan dapat meningkatkan perkembangan sel B. Mencit BALB/c sebagai resipien diradiasi dengan dosis letal 850 RAD. Sel sumsum tulang dari mencit C57BL/6 sebanyak (3-5) x 10^5 dicampurkan dengan sel T rergulator $CD4^+CD25^+$ tipe donor sebanyak 5 x 10^4 (panel kiri), dicampurkan dengan sel T nonregulator 5 x 10^4 (panel tengah), dan tanpa penambahan sel T (panel kanan) dan ditransplantasikan pada mencit BABL/c yang telah diradiasi. Pengamatan dilaksanakan dua bulan setelah transplantasi. Sel spleen diisolasi dari resipien dan distaining dengan antibodi monoklonal anti-Gr-1- FITC, anti B220-PE, dan anti-CD45-biotin. Presentasi relatif sel yang mengekspresikan Gr-1 dan B220 ditunjukkan pada gambar. Data menunjukkan bahwa sel granulosit dan sel b berkembang berkembang normal pada ko-transfer dengan sel T regulator $CD4^+CD25^+$. Pada transplantasi ini keberhasilan donor mengganti sel resipien adalah 90% dan data mewakili lebih dari lima kali eksperimen.

adanya inflamasi pada resipien. Inflamasi ini dipicu oleh sel-sel autoregresif yang berkembang dari sel T donor. Hasil penelitian ini juga menjadi pandangan baru bahwa kegagalan transplantasi tidak disebabkan karena adanya kontaminasi sel T yang telah mengalami maturasi, namun lebih disebabkan adanya kekurangan jumlah sel T regulator yang mengatur homeostasi pada resipien.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa sel T subpopulasi CD4 yang mengekpresikan CD25 (IL-Rα), $CD4^+CD25^+$, mempunyai peran sebagai regulator *in vivo*. Ko-transfer $CD4^+CD25^+$ dalam sistem transplantasi allogenik dapat membantu penerimaan sumsum tulang dari donor.

Pada transplantasi allogenik yang melibatkan peran sel T regulator menunjukkan adanya perkembangan sel T menjadi sel T naive, sedangkan ko-transfer dengan sel T nonregulator maupun transfer sumsum tulang tanpa campuran menunjukkan perkembangan ke arah sel T memori.

Sel-sel granulosit utamanya neutrofil (Gr1) berkembang pesat pada mencit resipien yang tidak memperolih ko-transfer sel T regulator, dilain pihak penambahan sel T regulator dapat meningkatkan perkembangan sel B.

UCAPAN TERIMAKASIH

Pada kesempatan ini kami menyampaikan ucapan terima kasih kepada Prof. Kenichi Isobe dan Haruhiko Suzuki dari Nagoya University sehubungan dengan diskusi dan saran selama penelitian ini berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

[1] Ochando, J. C., A. C. Yopp, Y. Yang, A. Garin, Y. Li, P. Boros, J. Llodra, Y. Ding, S. A. Lira, N. R. Krieger, and J. S. Bromberg. (2005). Lymph node occupancy is required for the peripheral development of alloantigen-specific Foxp3 regulatory T cells. *J. Immunol. 174: 6993–7005.*

[2] Helmut, J., Schmitt, E., Michael, S., Andrea, T., Knop, J., and Alexander, H.K. (2001). Identification and Functional Characterization of Human $CD4^+CD25^+$ T Cells with Regulatory Properties Isolated from Peripheral Blood. *J. Exp. Med. 193:1285-1294* .

[3] Thorstenson, K. M., and A. Khoruts. (2001). Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD25 CD4 T cells in vivo after induction of peripheral tol -erance with intravenous or oral antigen. *J. Immunol. 167: 188 –195.*

[4] McGargill, M.A., Sharp, L.L., Bui JD., Hedrick, S.M., and Calbo, S. (2005). Active Ca2+/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II{gamma}B Impairs Positive Selection of T Cells by Modulating TCR Signaling. *J Immunol. 175(2):656-64.*

[5] Zhang, X., L. Izikson, L. Liu, and H. L. Weiner. (2001). Activation of $CD25^+CD4^+$ regulatory T cells by oral antigen administration. *J. Immunol. 167: 4245–4253.*

[6] Waldmann, H., and S. Cobbold. (2001). Regulating the immune response to trans-plants: a role for CD4 regulatory cells? *Immunity 14: 399 – 406.*

[7] Bluestone, J. A., and A. K. Abbas. (2003). Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol. 3: 253–257.*

[8] Stephens, L. A., C. Mottet, D. Mason, and F. Powrie. (2001). Human $CD4^+CD25^+$ thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur. J. Immunol. 31: 1247 1254.*

[9] Malek, T.R., A.Yu, V. Vincek, P. Scibelli, L. Kong. (2002). CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rα -deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity. 17:167-178.*

[10] Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober. (2001). Cell contact-dependent immu nosuppression by $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor. *J. Exp. Med. 194: 629 – 644.*

[11] Lepault, F., and M. C. Gagnerault. (2000). Characterization of peripheral regula-tory CD4 T cells that prevent diabetes onset in nonobese diabetic mice. *J. Im -munol. 164: 240 –247.*

[12] Huehn, J., K. Siegmund, J. C. Lehmann, C. Siewert, U. Haubold, M. Feuerer, G. F. Debes, J. Lauber, O. Frey, G. K. Przybylski, et al. (2004). Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4 regulatory T cells. *J. Exp. Med. 199: 303-313.*

[13] Siegmund, K., M. Feuerer, C. Siewert, S. Ghani, U. Haubold, A. Dankof, V. Krenn, M. P. Schs A. Scheffold, J. B. Lowe, et al. (2005). Migration matters: regulatory T-cell compartmentalization determines suppressive activity in vivo. *Blood 106: 3097–3104.*

[14] Rifa'i, M, Kawamoto, Y, Nakashima, I, Suzuki, H. (2004). *Essential Roles of $CD8^+CD122^+$* Regulatory T cells in the Maintenance of T Cell Homeostasis. J Exp Med. 200(9):1123-34. B., and Mason, D. 2000. The third function of the thymus. *Immunol. Today. 21:95-99.*

[15] Thornton, A.M., and Shevach, E.M. (2000). Suppressor effector function of $CD4^+CD25^+$ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J. Immunol. 164:183-190.*

[16] *Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T.W., and Sakaguchi, S. (2000). Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. J. Exp. Med. 192:303-310.*