

Altered Nuclear Transfer: Pengembangan Teknik Somatic Cell Nuclear Transfer untuk Mengatasi Masalah Etika

Harry Murti^{1,2}, Mokhammad Fahrudin², Caroline Tan Sardjono¹, Boenjamin Setiawan¹, Ferry Sandra¹

¹ Stem Cell Division, Stem Cell and Cancer Institute, Kalbe Pharmaceutical Company Jakarta, Indonesia

² Laboratory of Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Bogor Agricultural University, Bogor, Indonesia.

ABSTRAK

Embrio hasil SCNT dapat dijadikan sebagai sumber *Embryonic Stem Cell* (ESC) yang bersifat pluripoten dan merupakan *patient-specific stem cells*. Penerapan teknik SCNT bertujuan untuk aplikasi konsep *therapeutic cloning* dan *regenerative medicine* melalui teknik transplantasi autologous, sehingga tidak menimbulkan reaksi penolakan jaringan pada tubuh pasien. Terobosan baru dalam teknik ini adalah menghambat pembentukan trofektoderm pada embrio hasil SCNT, sehingga embrio hanya akan membentuk *Inner Cell Mass* (ICM) dan tidak dapat berimplantasi ke dalam jaringan endometrium. Pengembangan teknik yang dikenal dengan *Altered Nuclear Transfer* (ANT) diharapkan mampu menjadi solusi bagi permasalahan etika penggunaan embrio sebagai sumber ESC. Metode ANT dengan menggunakan *RNA interference* (RN Ai) untuk mencegah ekspresi gen *Cd x2* pada embrio hasil SCNT akan dibahas dalam artikel ini.

Kata Kunci: ANT, SCNT, Trofektoderm, RN Ai, Cd x2

PENDAHULUAN

Perkembangan teknik *Somatic Cell Nuclear Transfer* (SCNT) telah menjadi alternatif baru dalam kemajuan riset biomedis¹. Aplikasi teknik SCNT dapat digunakan untuk memproduksi *Embryonic Stem Cell* (ESC)². Secara garis besar teknik transfer inti sel somatik (SCNT) meliputi 3 langkah utama (Gambar 1), yakni: (1) enukleasi atau pembuangan inti oosit yang akan digunakan sebagai resipien sitoplasma (oosit resipien), (2) transfer inti atau pemasukan inti sel somatik ke dalam oosit resipien, (3) aktivasi atau induksi oosit hasil rekonstruksi agar dapat berkembang menjadi embrio yang kemudian dikenal sebagai embrio SCNT yang dapat dijadikan sebagai sumber sel punca³.

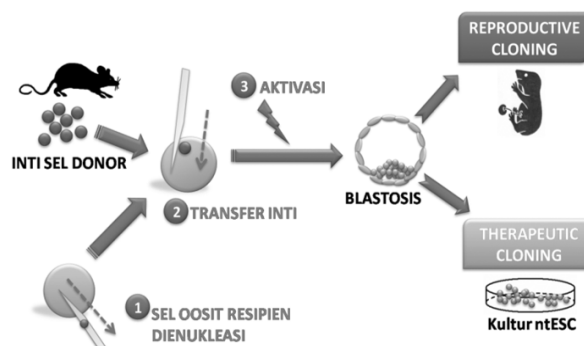
Sel lestari (*cell line*) ESC yang dihasilkan melalui teknik SCNT sering disebut dengan istilah ntESC (*nuclear transfer Embryonic Stem Cell*)⁴. Sel lestari ntESC diperoleh dari kultur sel embrio hasil aplikasi SCNT hingga mencapai tahap blastosis, lalu bagian *Inner Cell Mass* (ICM) diisolasi dan dikultur dengan medium spesifik⁵. Teknik isolasi ICM dapat dilakukan baik secara mekanik de-

ngan menggunakan mikromanipulator ataupun secara enzimatis dengan menggunakan reaksi antigen-antibodi yang secara spesifik melisis sel-sel trofoblas⁶.

Medium spesifik untuk kultur ICM agar dapat berproliferasi dan juga mempertahankan sifat pluripotensi serta karakter sel punca yang dimiliki⁷. Pada ntESC mencit, penambahan *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) berfungsi untuk mempertahankan keadaan tidak berdiferensiasi (*undifferentiated stage*)⁸. Sedangkan pada manusia, penggunaan *Mouse Embryonic Fibroblast* (MEF) sebagai feeder layer dapat mencegah proses diferensiasi⁹. Hasil kultur ntESC dapat dimanfaatkan sebagai sumber ESC yang apa-

bila diperlukan dapat diinduksi untuk berdiferensiasi menjadi tipe-tipe sel tertentu^{10,11}. Sel-sel hasil diferensiasi tersebut dapat digunakan untuk tujuan terapi berbasis sel pada berbagai jenis penyakit degeneratif¹². Beberapa penelitian terdahulu menunjukkan bahwa ESC dapat diarahkan menjadi sel-sel neuron^{13,14}, ginjal¹⁵, otot jantung^{16,17}, pankreas¹⁸.

Secara teoritis, ntESC memiliki kelebihan dibandingkan dengan sumber ESC lainnya,



Gambar 1. Skema teknik SCNT pada mencit. 1: enukleasi atau pembuangan inti oosit yang akan digunakan sebagai oosit resipien; 2: transfer inti atau pemasukan inti sel somatik ke dalam oosit resipien; 3: aktivasi atau induksi oosit hasil rekonstruksi agar dapat berkembang menjadi embrio.

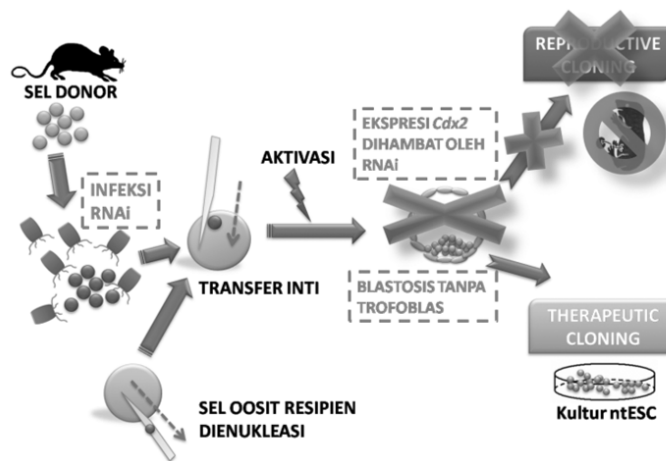
terutama karena pada ntESC sel punca yang diperoleh dan dikembangkan berasal dari tubuh pasien itu sendiri (*patient-specific stem cells*). Pemanfaatan ntESC diharapkan dapat mengatasi masalah penolakan sistem imunitas (*immune rejection*)¹⁹. Namun aplikasi terapi berbasis sel dengan menggunakan ntESC masih harus diteliti lebih lanjut untuk mencegah potensi timbulnya dampak negatif, sebelum ditransplantasikan ke tubuh pasien²⁰.

Pemanfaatan teknologi SCNT untuk menghasilkan ntESC sebagai alternatif terapi pada manusia merupakan hal yang masih diperdebatkan di berbagai kalangan. Salah satunya karena masalah etika penggunaan oosit dan perusakan embrio pada tahap blastosis²¹. Permasalahan etika lainnya adalah adanya kekhawatiran dilakukannya proses kloning dengan tujuan menciptakan suatu 'manusia baru' (*reproductive cloning*). Hal ini menyebabkan William B. Hurlbut mengemukakan gagasannya untuk memodifikasi sel embrio agar tidak mampu berkembang menjadi embrio normal yang mampu berimplantasi, yang disebut dengan *Altered Nuclear Transfer (ANT)*²² sehingga diharapkan dapat mengatasi permasalahan etika tersebut.

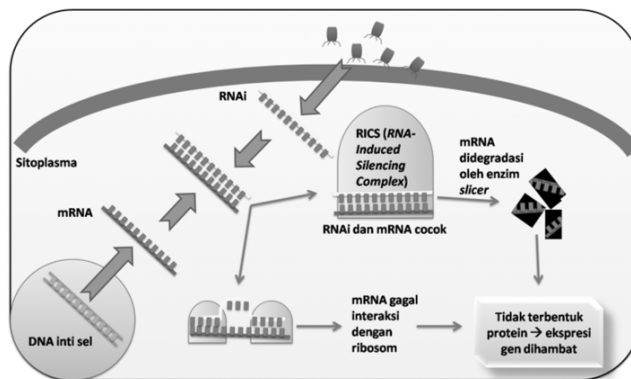
APLIKASI ANT UNTUK MENGHASILKAN ntESC UNTUK MENGATASI MASALAH ETIKA

Teknik ANT merupakan pengembangan teknik SCNT untuk mengatasi permasalahan etika. Modifikasi teknik SCNT meliputi pemanfaatan retrovirus untuk menyisipkan RNAi pada sel donor inti sebelum ditransfer ke sel oosit resipien. Keberadaan RNAi diharapkan dapat menghambat ekspresi gen yang bertanggung jawab terhadap proses pembentukan trofoblas, sehingga diharapkan embrio berkembang menjadi cacat dan tidak dapat berimplantasi.

Pada tahap blastosis, embrio akan membentuk trofektoderm dan ICM. Trofektoderm yang mengelilingi ICM berperan dalam proses implantasi embrio pada jaringan



Gambar 2. Skema ANT untuk menghasilkan blastosis tanpa trofoblas.



Gambar 3. Mekanisme penghambatan ekspresi gen oleh RNAi. Virus pembawa digunakan untuk memasukkan RNAi ke dalam sitoplasma sel. RNAi dan mRNA akan saling menempel dan membentuk RNA-Induced Silencing Complex (RISC). Mekanisme penghambatan ekspresi gen tergantung pada kemiripan urutan basa dari RNAi dan mRNA. Penggunaan RNAi sangat efektif untuk menghambat ekspresi gen.

endometrium²³. Dilaporkan bahwa, pada embrio mencit gen yang bertanggung jawab terhadap pembentukan trofektoderm adalah Cdx2, yang apabila ekspresinya dihambat akan menyebabkan trofektoderm tidak terbentuk sehingga embrio tidak dapat melakukan proses implantasi²⁴. Informasi ini juga didukung dengan hasil penelitian bahwa gen Cdx2 secara *in vitro* dapat menginduksi diferensiasi ESC mencit menjadi sel-sel trofoblas²⁵. Diferensiasi menjadi sel-sel trofoblas juga dapat dipengaruhi oleh interaksi antara Oct⁴ dengan Cdx2²⁶.

TEKNIK DAN MEKANISME PENGHAMBATAN EKSPRESI Cdx2 PADA EMBRIO HASIL SCNT

Telah dilaporkan bahwa pada embrio mencit ekspresi gen Cdx2 dapat dihambat dengan menggunakan RNAi sehingga tidak dapat membentuk trofektoderm (Gambar 2). Namun demikian dari embrio ini masih dapat diperoleh sel-sel ICM yang dapat diturunkan menjadi sel punca pluripoten yang mampu berintegrasi pada hewan chimera²⁷. Walaupun teknik ANT telah berhasil diaplikasikan pada embrio mencit, namun masih harus dibuktikan pada embrio manusia²⁸. Secara teoritis, penghambatan ekspresi Cdx2 dapat dilakukan dengan berbagai macam cara di antaranya adalah dengan menggunakan *antisense* DNA, *Ribozymes*, dan RNAi. Prinsip kerja *antisense* DNA adalah berikutan dengan mRNA yang merupakan komplementernya, sehingga proses translasi tidak terjadi. Sedangkan enzim *Ribozymes* dapat digunakan untuk memotong mRNA spesifik menjadi potongan kecil-kecil sehingga mRNA tidak dapat berfungsi normal²⁹. Cara lain untuk menghambat ekspresi gen adalah dengan menggunakan sistem *RNA interference (RNAi)*³⁰. RNAi merupakan potongan kecil RNA yang dapat menginduksi penghancuran mRNA tertentu sebelum dapat mengkode pembentukan protein di dalam sitoplasma³¹ (Gambar 3).

Sintesis protein merupakan ekspresi gen yang meliputi proses transkripsi dan translasi. Pada sel eu-

kariot umumnya ekspresi gen diawali dengan induksi promoter terhadap proses transkripsi DNA menjadi messenger RNA (mRNA). DNA pada tahap ini dapat dibedakan menjadi dua yaitu bagian *coding strand* (*sense strand* atau *nontemplate strand*) dan *template strand* (*antisense strand*). Selanjutnya enzim RNA polymerase akan membuat mRNA berdasarkan DNA *template strand*. Setelah mRNA terbentuk, akan keluar dari inti sel dan menuju ke ribosom di sitoplasma. Urutan basa nitrogen pada mRNA merupakan kodon yang akan diterjemahkan oleh *transfer RNA* (tRNA) menjadi asam amino yang sesuai. Proses ini disebut dengan proses translasi³².

Penghambatan ekspresi gen *Cdx2* pada teknik ANT diawali dengan penempelan RNAi pada mRNA membentuk kompleks RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*)³³. RNAi dimasukkan ke dalam sitoplasma sel dengan bantuan vektor lentivirus²⁷. RNAi hanya dapat berikatan dengan mRNA yang memiliki urutan basa yang merupakan komplemennya. Dua mekanisme yang dapat terjadi pada proses selanjutnya adalah: (1) apabila kompleks RNAi dan mRNA (RISC) merupakan komplemen (memiliki urutan basa yang cocok) dan dapat menempel menjadi rantai RNA ganda maka enzim *slicer* dapat memotong mRNA hingga terdegradasi, (2) apabila kompleks RNAi dan mRNA bukan merupakan komplemen (ada sedikit basa yang tidak bisa berpasangan) maka mRNA tetap eksis tapi tRNA yang berada di ribosom tidak mampu menerjemahkan urutan kodon menjadi asam amino, sehingga proses translasi tidak dapat terjadi³⁴. Kedua mekanisme di atas menyebabkan proses sintesis protein tidak berjalan sebagaimana mestinya karena sehingga gen tidak terekspresikan³⁵.

KESIMPULAN

ANT merupakan alternatif pengembangan teknik SCNT untuk mengatasi permasalahan etika penggunaan embrio sebagai sumber ESC. Pembentukan trofoblas dapat dihambat dengan menggunakan RNAi melalui inhibisi ekspresi gen *Cdx2*. Blastosis yang tidak mengekspresikan gen *Cdx2* tidak dapat implantasi, namun sel-sel ICM masih dapat dikembangkan menjadi sel punca yang bersifat pluripoten dan memiliki karakter sama dengan ntESC.

DAFTAR PUSTAKA

1. McLaren A. Cloning: pathway to a pluripotent future. *Science* 2000; 288: 1775-80.
2. Colman A. Somatic cell nuclear transfer in mammals: progress and applications. *Cloning* 2000; 1: 185-200.
3. Wilmut I, Beaujean N, de Sousa PA, et al. Somatic cell nuclear transfer. *Nature* 2002; 419: 583-6.
4. Tong WF, Ng YF, Ng SC. Somatic cell nuclear transfer (cloning): Implications for the medical practitioner. *Singapore Med J*. 2002; 43: 369-76.
5. Wakayama S, Ohta H, Kishigami S. Establishment of male and female nuclear transfer embryonic stem cell line from different mouse and tissues. *Biol Reprod*. 2005; 72: 932-6.
6. Hogan B, Constantini F, Lacy E. *Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1986; Hal 113-4.
7. Moon SY, Park YB, Kim DS, Oh SK, Kim DW. Generation, culture, and differentiation of human embryonic stem cells for therapeutic applications. *Molecular Therapy* 2006; 13: 5-14.
8. Freshney RI. *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. 4th ed. New York: Wiley-Liss, 2000; hal. 393.
9. Hochedlinger K, Jaenisch R. Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature* 2006; 441: 1061-7.
10. Dinnyes A, Szmolenszky A. Animal cloning by nuclear transfer: state-of-the-art and future perspectives. *Acta Biochimica Polonica* 2005; 52: 585-8.
11. Wobus AM, Boheler KR. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev*. 2005; 85: 635-78.
12. Mombaerts P. Therapeutic cloning in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 11924-5.
13. Wakayama T, Tabar V, Rodriguez I, Perry ACF, Studer L, Mombaerts P. Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science* 2001; 292: 740-3.
14. Zhang P, Chebath J, Lonai P, Revel M. Enhancement of oligodendrocyte differentiation from murine embryonic stem cells by an activator of gp 130 signaling. *Stem Cells* 2004; 22: 344-54.
15. Hipp J, Atala A. Tissue engineering, stem cells, cloning, and parthenogenesis: new paradigms for therapy. *Exp Clin Assist Reprod*. 2004; 1:3.
16. Lanza R, Moore MAS, Wakayama T, et al. Regeneration of the infarcted heart by nuclear transplantation. *Cir Res*. 2004; 94: 820-7.
17. Kodifis T, de Bruin JL, Yamane T, et al. Insulin-like growth factor promotes engraftment, differentiation, and functional improvement after transfer of embryonic stem cells for myocardial restoration. *Stem Cells* 2004; 22: 1239-45.
18. Paek HJ, Moise LJ, Morgan JR, Lysaght MJ. Origin of insulin secreted from islet-like cell clusters derived from murine embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* 2005; 7: 226-31.
19. Cibelli JB, Kiessling AA, Cunniff K, Richards C, Lanza RP, West MD. Somatic cell nuclear transfer in humans: pronuclear and early embryonic development. *Regenerative Med*. 2001; 2: 25-31.
20. Gardner RL. Stem cells and regenerative medicine: principles, prospects and problems. *C R Biologies* 2006; doi:10.1016/j.crv.2007.01.005.
21. Whitaker PA. Therapeutic cloning: The ethical limits. *J Taap*. 2005; 270: S689-91.
22. Hurlbut WB. Altered nuclear transfer. *N Engl J Med*. 2005; 352: 1153-4.
23. Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, et al. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest*. 2004; 114: 744-54.
24. Strumpf D, Mao CA, Yamanaka Y et al. *Cdx2* is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development* 2005; 132: 2093-102.
25. Tolkunova E, Cavaleri F, Eckardt S, et al. The caudal-related protein *Cdx2* promotes trophoblast differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 2006; 24: 139-44.
26. Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, et al. Interaction between Oct3/4 and *Cdx2* determines trophectoderm differentiation. *Cell* 2005; 123: 917-29.
27. Meissner A, Jaenisch R. Generation of nuclear transfer-derived pluripotent ES cells from cloned *Cdx2*-deficient blastocysts. *Nature* 2006; 439: 212-5.
28. Findlay JK, Gear ML, Illingworth PJ, et al. Human embryo: a biological definition. *Human Reproduction* 2007; 22: 905-11.
29. Robinson R. RNAi therapeutics: how likely, how soon? *P Bio*. 2004; 2: 0018-20. DOI:10.1371/journal.pbio.0020028.
30. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science, 2002; Hal 451-2.
31. Kalthoff K. *Analysis of biological development*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill Co. Inc., 2001; Hal 395.
32. Campbell MK, Farrell SO. *Biochemistry*. 4th.ed. USA: Thomson Learning Inc., 2003; hal 281-2;320-1.
33. Gong W, Ren Y, Xu Q, et al. Integrated siRNA design based on surveying of fetus features associated with high RNAi effectiveness. *BMC Bioinformatics* 2006; doi:10.1186/1471-2105-7-516
34. Milharet O, Gary DS, Mattson MP. RNA interference in biology and medicine. *Pharmacol Rev*. 2003; 55: 629-48.
35. Yu J, Thomson JA. Embryonic Stem Cells. In *Stem Cell Information* [World Wide Web site]. Bethesda, MD: National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 2006 [cited Friday, January 26, 2007] Available at <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/2006report>.