

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Karakteristik Chronic Myeloid Leukemia (CML)

CML adalah keganasan mieloproliferatif yang memiliki gen transkripsi fusi BCR-ABL yang mengkode tirosin kinase yang disandikan dari translokasi diantara kromosom 9 dan 22, yang merupakan ciri khas dari penyakit ini. Perubahan leukemia pada CML dipercaya terjadi pada stadium sel primitif/progenitor karena transkripsi BCR-ABL di deteksi tidak hanya pada sel mieloid tapi juga pada sel limfoid. Studi sebelumnya menunjukkan bahwa fusi BCR-ABL ditemukan sangat banyak pada fraksi HSC (*Human Hematopoietic Stem Cell*) CD34⁺ CD38⁻ yang dipurifikasi pada pasien CML melalui analisa *fluorescence in situ hybridization* (FISH) (Kizaki, 2015).

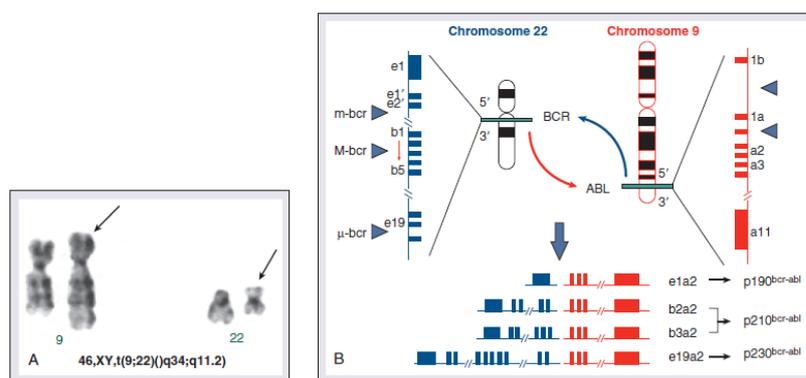
Berdasarkan kriteria WHO, CML didefinisikan sebagai penyakit mieloproliferatif spesifik yang ditandai dengan tanda khas yaitu munculnya kromosom Ph atau gen fusi BCR-ABL. Meskipun pada banyak kasus, diagnosa ditegakkan dari morfologi evaluasi hapusan darah tepi, konfirmasi dengan studi genetik merupakan pemeriksaan yang harus dilakukan, mengingat munculnya terapi yang bekerja pada protein fusi BCR-ABL (Kizaki, 2015).

2.2 Patogenesis CML

Abnormalitas kromosom Philadelphia (Ph) ditemukan pada lebih dari 90 persen pasien CML. Hal ini dihasilkan dari gangguan keseimbangan translokasi diantara lengan panjang pada kromosom 9 dan 22, $t(9;22)(q34;q11.2)$. Kondisi ini hanya ditemukan pada sel-sel hematopoiesis yang berasal dari sel induk pluripoten yaitu sel eritroid, mieloid, monositik, dan megakariosit, jarang pada sel limfosit B dan T, serta tidak ada pada sel-sel fibroblas. Titik putus kromosom 9 dihasilkan dari translokasi onkogen seluler ABL1 ke regio kromosom 22 untuk mengkodekan titik putus di wilayah region yang lebih luas (BCR). ABL1 homolog dari V-ABL, virus Abelson yang menyebabkan leukemia pada tikus. Gugusan BCR posisi 5' berpindah ke posisi 3' ABL1 dan memproduksi onkogen hybrid yang baru, yaitu BCR-ABL. Kode ini dipakai untuk pengkodean onkoprotein BCR-ABL baru dengan berat molekul 210 kDa ($p210^{BCR-ABL}$). Onkoprotein $p210^{BCR-ABL}$ merupakan hasil dari aktivitas kinase yang tidak terkontrol yang meningkatkan proliferasi dan menurunkan apoptosis sel CML dan menyebabkan pertumbuhan sel CML menjadi sel normal, serta menekan hematopoiesis normal. Sel induk normal walaupun ditekan, akan bertahan dan aktif kembali jika terapi CML efektif dilakukan (Hoffman.,2013 ; Niederhuber., 2014).

Aktivasi komponen BCR-ABL mengakibatkan autofosforilasi dan aktivasi jalur yang mengubah transkripsi, apoptosis, organisasi sitoskeletal, sito adhesi, dan degradasi protein inhibisi. Jalur signal transduksi yang terpengaruh yaitu *reticular activating system* (RAS),

mitogen-activated protein (MAP) kinase sinyal transduser, dan aktivator transkripsi (STAT), *phosphatidylinositol-3-kinase* (PI3K), MYC, dan lain-lain. Banyak dari interaksi jalur-jalur ini dimediasi oleh *tyrosin phosphorylation* dan dibutuhkan BCR-ABL untuk mengikat protein lain seperti GRB-2, CRK, *CRK-like protein* (CRKL, dan *Src homology-containing protein* (SHC) (Hoffman.,2013 ; Niederhuber., 2014)



Gambar 2.1 Kromosom Philadelphia (Ph), yang awalnya dikenal sebagai potongan kromosom yang kecil, kemudian diidentifikasi pada translokasi timbal balik yang seimbang antara kromosom lengan panjang 9 dan 22, $t(9;22)(q34;q11.2)$. Hasil ditunjukkan pada translokasi gen ABL1 dari kromosom 9 di dekat regio BCR pada kromosom 22. Berkaitan dengan titik pecah kromosom 22, terdapat tiga hasil onkoprotein BCR-ABL diperoleh: (1) P210BCR-ABL, yang ditemukan pada kebanyakan pasien dengan gen Ph-CML yang positif; (2) P190BCR-ABL, ditemukan pada 2 dari 3 pasien dengan gen Ph-AML yang positif (1 dari 3 lainnya memiliki produk P210BCR-ABL); dan (3) P230BCR-ABL, yang paling jarang (1-2%) pada pasien dengan gen Ph-CML positif. (Niederhuber., 2014).

Penyebab pengaturan ulang susunan molekular BCR-ABL sampai sekarang belum diketahui dengan pasti. Melalui teknik molekular dapat mendeteksi BCR-ABL 25-30% orang dewasa normal, 5% pada anak-anak, namun pada sampel darah umbilikal tidak dapat terdeteksi. Karena CML hanya terjadi pada 1 sampai 2 per 25.000-30.000 orang yang memiliki ekspresi BCR-ABL pada sumsum tulangnya, proses molekular lain atau berkurangnya fungsi sel klonal dapat berkontribusi terhadap perkembangan CML (Hoffman.,2013 ; Niederhuber., 2014).

Fusi gen BCR-ABL dan onkoprotein p210, ditemukan pada beberapa pasien yang memiliki ciri khas CML, tapi tidak teridentifikasi t(9;22)(q34;q11.2). Pasien-pasien ini memiliki respon yang sama dalam terapi dan tingkat kelangsungan hidup dengan pasien yang memiliki gen Ph yang positif. Pasien CML dengan Ph-negatif dan BCR-ABL-negatif merupakan CML atipikal yang memiliki prognosis yang lebih buruk. Patofisiologi perubahan molekular CML masih belum diketahui dengan jelas. Ada beberapa proses yang dianggap berhubungan dengan patofisiologi ini yaitu adanya titik mutasi atau hilangnya gen supresi TP53, amplifikasi MYC, hilangnya gen tumor supresi CDKN2A, perubahan gen retinoblastoma RB, dan lain-lain (*Hoffman.,2013 ; Niederhuber., 2014*).

2.3 Mekanisme Peranan BCR-ABL pada Patogenesis CML

ABL adalah protein tirosin kinase *non-receptor* yang diekspresikan di banyak jaringan. Pada sel, protein ABL di distribusikan pada nukleus dan sitoplasma dan dapat menjadi alat transpor diantara dua kompartemen ini. BCR juga menyampaikan sinyal dari permukaan sel *growth-factor* dan reseptor adhesi dalam mengatur susunan sitoskeleton.

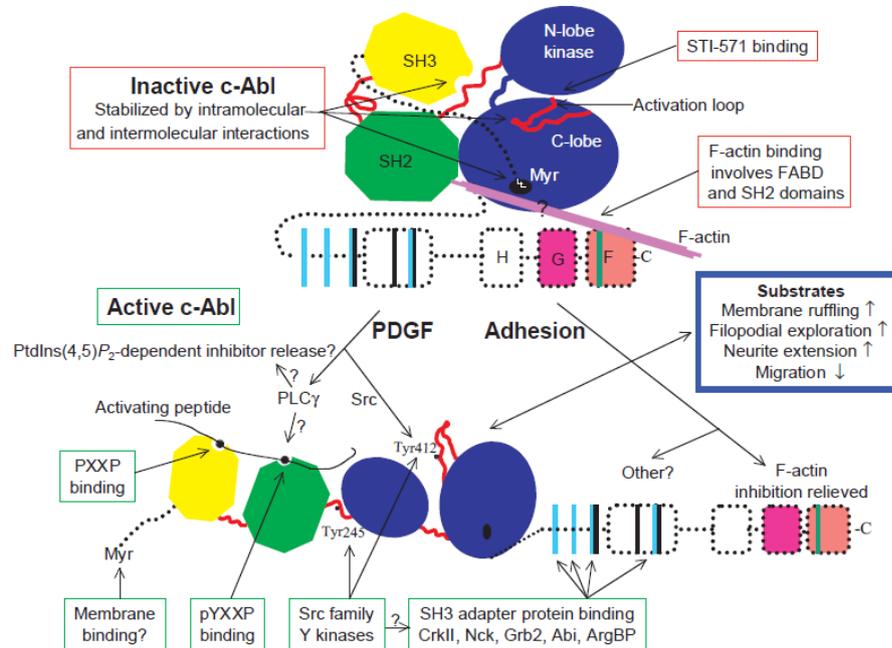
Cytoplasmic ABL (c-ABL) diaktivasi *growth factors* dan adhesi sel, diletakkan pada sitoskeleton, termasuk rambut membran, di tepi paling depan dan tonjolan *F-actin* dalam keadaan aktif menyebarkan fibroblas atau neurit dari neuron korteks. Domain c-Abl katalisis mengandung segmen yang teraktivasi dan ditemukan di semua protein tirosin kinase. Residu tirosin yang dimurnikan dari domain c-Abl terkatalisis (Y412)

difosforilasi pada Abl onkogenik, seperti DSH3-Abl, Abl-P131L, Bcr-Abl and v-Abl dan proses ini dikaitkan dengan meningkatnya aktivitas katalisis. Mutasi Y412 menjadi phenylalanine bisa mengganggu aktivasi c-Abl oleh Src kinase. Namun, mutasi Y412F tidak dapat mencegah autoaktivasi c-Abl, dimana dapat membantu fosforilasi dari residu tirosin lain. Di sisi lain, aktivasi kinase pada level tertentu juga dapat terjadi tanpa proses fosforilasi ini. Gangguan pada konformasi bentuk inaktif ini dapat terjadi jika ada perpindahan domain *N-terminus*, SH3 atau SH2 pada struktur c-Abl. Gabungan substrat dengan domain SH3 atau SH2 dari c-Abl (ikatan ligan fosfotirosin dengan domain SH2 atau ligan PXXP dengan domain SH3) dapat meningkatkan aktivitas katalisis in situ untuk memfosforilasi substrat tanpa memerlukan fosforilasi Y412. Aktifitas tirosin kinase c-Abl dikontrol dengan ketat di dalam sel. Bentuk inaktif c-Abl harus tetap dilepaskan untuk fosforilasi substrat. Proses ini dapat terjadi melalui beberapa mekanisme, seperti pemindahan domain SH3 dari SH2-*CAT linker*, fosforilasi residu pengatur, pemindahan kelompok *myristate* dari *C-lobe* dari domain kinase, hilangnya kelompok protein inhibitor atau munculnya kelompok protein aktivator. Beberapa substrat ini dapat mengganggu pembentukan c-Abl seperti yang telah dibahas diatas. Di sisi lain, "*trans-activator*" dapat melepaskan bentuk inaktif c-Abl. Beberapa protein pengatur SH2/SH3 mengaktivasi tirosin kinase c-Abl, meskipun masih belum jelas bagaimana interaksi ini terjadi. Ada beberapa laporan mengenai c-Abl yang berperan dalam pengaturan struktur F-actin pada sitoskeleton sel. Sebagai contoh, c-Abl dapat merusak membran,

pembentukan filopodia, menyambung neurit, dan migrasi sel (*Goldman., 2000 ; Chakrabarti., et al.,2014*).

c-Abl mengikat benang-benang actin pada *F-actin-binding domain* (FABD) di bagian *C-terminus*. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa c-Abl yang mengalami mutasi memiliki sedikit domain dan tidak dapat mengikat F-actin (Δ FABD c-Abl). Namun hilangnya ikatan ini tidak berpengaruh terhadap aktivitas c-Abl kinase *in vitro*. Tidak seperti c-Abl jenis yang bebas, yang aktivitasnya tidak terdeteksi berasal dari ECM, aktivitas Δ FABD c-Abl tetap tinggi pada sel yang dipengaruhinya. Tetapi pada *in vivo*, c-Abl dihambat melalui gabungan dengan F-actin. Keterlibatan fibronectin pada integrin merangsang peningkatan aktivitas tirosin kinase c-Abl tiga sampai lima kali lipat pada kultur fibroblas. Abl diaktifkan melalui ekspresi dengan protein SH3 yang dilaporkan berfungsi untuk mengatur sitoskeleton termasuk CrkII, Abi, dan myr-Nck. Selama fase inisiasi stimulasi fibronectin yaitu 20-30 menit, ketika aktifitas c-Abl tinggi, kolam c-Abl nuklear pada 10T1/2 fibroblas dilokalisasi ulang (translokasi) sementara untuk menjadi fase adhesi. Meskipun fase translokasi ini memiliki peranan penting di dalam reaktivasi c-Abl, penelitian lebih lanjut menunjukkan kolam c-Abl dapat re-aktivasi secara independen dengan mengeluarkan diri dari nukleus. Beberapa tipe sel tidak dapat mempertahankan keberadaan kolam c-Abl pada nukleus. Sebagai contoh, ketika c-Abl di re-ekspresikan menjadi $abl^{-/-} arg^{-/-}$ banyak di sitoplasma. Ketika sel-sel ini berubah menjadi fibronectin, c-Abl tersebar

dalam sitoplasma untuk membentuk struktur sitoplasma, adhesi, membrane sel dan filopodia (Goldman., 2000 ; Chakrabarti., et al.,2014).



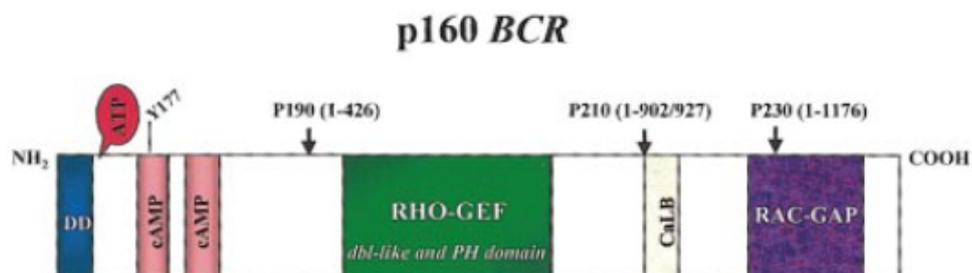
Gambar 2.2.Mekanisme regulasi Tirosin Kinase. Struktur Kristal Regio N-terminal c-Abl menunjukkan lipatan menjadi interaksi intramolekular inaktif : (1) Interaksi Myr-CAP dengan C-lobe dari domain kinase; (2) Interaksi SH3 dengan SH2-CAT linker; dan (3) penempatan activation loop pada lokasi yang menghalangi masuknya substrat. C-terminus dan Cap ditunjukkan dengan garis putus-putus, karena posisi region ini tidak dijelaskan pada struktur Kristal c-Abl. Bentuk inaktif dapat masuk ke region C-terminal. Sebagai contoh, penulis menemukan F-actin menghambat purnian protein Abl, dan fase ini membutuhkan domain FABD dan SH2. Pengikatan F-actine dapat menghasilkan bentuk inaktif. Gangguan pembentukan inaktif bisa melalui beberapa mekanisme. Contohnya Myr-Cap dapat terlepas dari ikatan membran. Ligan SH3 atau SH2 dapat melepaskan domain kinase dari domain pengatur SH3-SH2. Protein dengan domain SH3 yang terikat dengan Abl PXXP juga mengaktifkan Abl. Fosforilasi Y245 pada SH2-CAT linker dan Y412 pada activation loop dapat menstabilkan proses pengaktifan. Rangsangan PDGF-dependent c-Abl ini memerlukan Src dan PLC-g. Src dapat melaksanakan proses fosforilasiY412 dimana PLC-g berfungsi untuk menurunkan level PtdIns(4,5)P₂ untuk mengaktifkan c-Abl. Cell-adhesion-mediated mengaktifkan c-Abl melalui mekanisme efek negative F-actin kinase. Hal penting, FABD dibutuhkan untuk menjaga c-Abl supaya tetap dalam bentuk inaktif yang terpisah dari sel. Jika sudah diaktifkan, fosforilasi protein substrat c-Abl diregulasi menjadi proses F-actin based yang lain seperti perlekukan membrane, eksplorasi filopodial, pemanjangan neurite dan migrasi sel (Woodring, 2003).

Seperti halnya Abl, protein Bcr 160-kd diekspresikan dimana-mana.

N-terminal exon BCR mengkode serine-threonine kinase. Substrat kinase

BCR yang bisa diidentifikasi saat ini adalah Bap-1, bagian dari famili

protein 14-3-3. Sebuah gulungan *N-terminal* yang melingkar dapat membentuk formasi dimer BCR secara *in vivo*. Pusat molekul mengandung regio *dbl-like* dan domain *pleckstrin-homology* (PH) yang merangsang perubahan *guanidine diphosphate* (GDP) menjadi *guanidine triphosphate* (GTP) pada *Rho guanidine exchange factors*, yang dihasilkan untuk mengaktivasi faktor transkripsi seperti NF- κ B. *C-terminus* memiliki aktivitas GTPase untuk Rac, yaitu sejumlah kecil GTPase dari golongan famili Ras yang mengatur proses polimerase actin dan aktivitas oksidasi NADPH pada sel fagosit. Selain itu Bcr dapat terfosforilasi pada beberapa residu tirosin, khususnya tirosin 177 yang mengikat Grb-2, sebuah molekul adaptor yang berperan dalam aktivasi jalur Ras. Pada kenyataannya, pada sel COS 1 menunjukkan Abl memfosforilasi Bcr menghasilkan reduksi aktivitas Bcr kinase (Chakrabarti., et al.,2014).



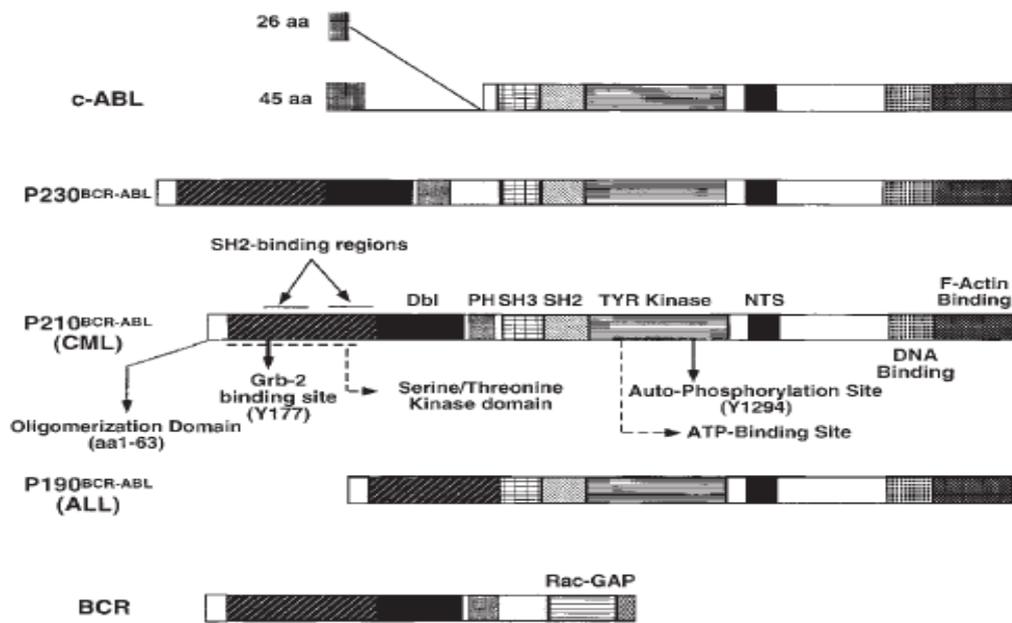
Gambar 2.3 Struktur Protein BCR. Perhatikan domain dimerisasi (DD) dan 2 *cyclic adenosin monofosfat kinase* domain homolog di *N-terminus*. Y177 adalah situs autofosforilasi yang penting untuk mengikat Grb-2. Pusat molekul berisi regio homolog ke *Rho guanidine nukleotida factor* (Rho-GEF) serta (PH) domain *dbl-like* dan *homolog pleckstrin*. *C-terminus* yang lokasi yang diduga berfungsi untuk mengikat lipid oleh kalsium (CaLB) dan domain berfungsi untuk mengaktifkan Rac-GTPase (Rac-GAP). Garis panah menunjukkan posisi *breakpoint* pada fusi protein BCR-ABL. (Chakrabarti., et al.,2014).

Selain domain ABL kinase, ada domain/motif penting lainnya pada BCR-ABL yang mengatur aktivitas ABL kinase atau menghubungkan ke jalur sinyal lain. Misalnya perubahan deretan sel fibroblas, *growth factor*

dependent haematopoietic cell, sel sumsum tulang primer, gen BCR yang bergabung dengan potongan hilir dari ekson c-Abl. Protein c-Abl mengandung variabel domain *N-terminal* yang disandikan oleh ekson tipe 1a dan 1b. Pada P210 BCR-ABL area ini digantikan oleh asam amino *N-terminal* 902 dari protein BCR. Protein fusi lain yang terlibat yaitu P190 BCR-ABL, mengandung asam amino *N-terminal* 426 dari protein BCR dan protein fusi ini ditemukan pada ALL dengan kromosom Philadelphia positif (Ph⁺). Produk utama yang dihasilkan dari gen BCR-ABL adalah tirosin kinase aktif yang ratusan kali lipat lebih aktif dibanding dengan tirosin kinase c-Abl, sedangkan aktivitas kinase P190 BCR-ABL sekitar lima kali lipat lebih aktif dibandingkan dengan dengan P210 BCR-ABL seperti yang diperoleh pada pengukuran sel fibroblast Rat-1 yang dirubah oleh P210 BCR-ABL. Meskipun c-Abl merupakan protein utama pada nukleus, banyak BCR-ABL yang berada dalam sitoplasma. P190 dan P210 BCR-ABL mengandung rangkaian ABL yang sama, yaitu lokasi autofosforilasi di dalam domain kinase, yaitu SH3 dan SH2 yang mengatur aktivitas kinase, domain untuk transport nuklear, domain *DNA-binding*, dan domain *actin binding* pada setiap *C-terminus*. Selain itu keduanya juga memiliki rangkaian BCR yang sama, mengandung asam amino 63 domain pada setiap *N-terminus*, domain yang teroligomerisasi, yang berfungsi untuk mengaktifkan aktivitas ABL kinase dengan membawa dua domain kinase menjadi berdekatan dan salah satunya akan difosforilasi dan mengaktifkan yang lainnya. Kedua protein fusi BCR-ABL juga mengandung dua domain *BCR-SH2-binding* (asam amino 176-242 dan

asam amino 298-413) yang ditumpuk dengan *domain BCR serine threonine kinase*. Onkoprotein BCR-ABL yang tidak memiliki regio onkoprotein *carboxy-terminal* BCR yang sama-sama berfungsi untuk mengaktifasi protein GTPase (GAP) menuju ke regio protein *Rac GTP binding*. P190 BCR-ABL tidak memiliki beberapa rangkaian *carboxy-terminal* seperti yang ditemukan di P210. Regio BCR ini sesuai dengan domain Dbl homolog, yang memiliki aktivitas untuk merubah GTP menjadi GDP pada family Rho dari protein *GTP-binding* dan domain Ph. Namun belum diketahui apakah keberadaan domain Dbl ini memiliki pengaruh dalam aktifitas tirosin kinase atau gangguan transformasi dari P210 BCR-ABL (Ghaffari, 1999).

Untuk mengetahui proses transformasi protein BCR-ABL yang penting untuk diketahui adalah sifat, spesifitas, dan keterbatasan tes yang akan digunakan. Banyak proses *in vitro* dan *in vivo* yang telah dilakukan untuk melihat onkogenitas BCR-ABL dan bentuk berbagai mutasi atau potongan yang muncul yang difokuskan pada pembentukan dan penghilangan faktor inhibisi dalam sel Rat1 fibroblas, *anchorage-independent growth* dalam transformasi sel Rat1, *cytokine-independent growth* dari deretan sel hematopoesis, proliferasi sel-sel progenitor limfoid pada sumsum tulang pada media kultur, dan pembentukan sel-sel tumor oleh ekspresi faktor pertumbuhan BCR-ABL independen atau dependen yang dilakukan pada hewan coba (Ghaffari, 1999).



Gambar 2.4 Skematik Protein c-ABL, BCR, dan BCR-ABL (P230, P210, dan P190). Menunjukkan dua bentuk alternative dari c-ABL *N-terminus* sama dengan domain SH3, domain tirosin kinase yaitu *ATP-binding site* dan lokasi autofosforilasi, domain *nuclear transport* (NTS), *DNA-binding*, dan *actin-binding* dari c-ABL. Gambaran domain oligomerisasi BCR (aa 1-63), tirosin yaitu dalam bentuk lokasi *Grb-2-binding* (Y177), domain homolog Dbl, Ph, Rac-GAP yang sama dengan region *SH2-binding* dan domain *serine threonine kinase* dari BCR (Ghaffari, 1999).

Berbagai bentuk mutasi BCR-ABL tampak pada sumsum tulang tikus pada percobaan (*BMT model*). Pada tikus terekspresi BCR-ABL dengan titik mutasi pada *ATP-binding site* dari ABL menunjukkan aktifitas kinasenya dihentikan (disebut sebagai *kinase-deficient BCR-ABL*), tidak dapat berkembang menjadi leukemia meskipun terdapat ekspresi protein fusi pada sel induk hematopoiesis/progenitor. Hal ini membuktikan bahwa aktifitas BCR-kinase memegang peranan yang penting dalam proses leukaemogenesis secara *in vivo*. Hal ini sesuai dengan penemuan aktifitas kinase pada ABL ditemukan untuk *BCR-ABL-mediated transformation* pada sel kultur (Ghaffari, 1999).

Delesi domain SH3 pada ABL merupakan salah satu bentuk mutasi protein dengan meningkatkan aktifitas tirosin kinase dan ekspresi potongan cacat dari protein dapat merubah sel fibroblast dan hematopoiesis secara in vitro. Mutasi ini dapat menginduksi formasi leukemia limfoid/limfoma dengan penundaan masa laten yang sangat panjang. Bentuk mutasi dari BCR-ABL dengan delesi domain SH3 dapat terjadi, dan dapat pula menginduksi terjadinya kelainan *myeloproliferative disorder* (MPD). Hal ini juga membuktikan bahwa aktivasi ABL kinase tunggal (melalui hilangnya SH3) tidak dapat menyebabkan *CML-like MPD*, namun membutuhkan kelainan pada domain/motif lain pada BCR-ABL untuk dapat menyebabkan kelainan *CML-like disease* (Ghaffari, 1999).

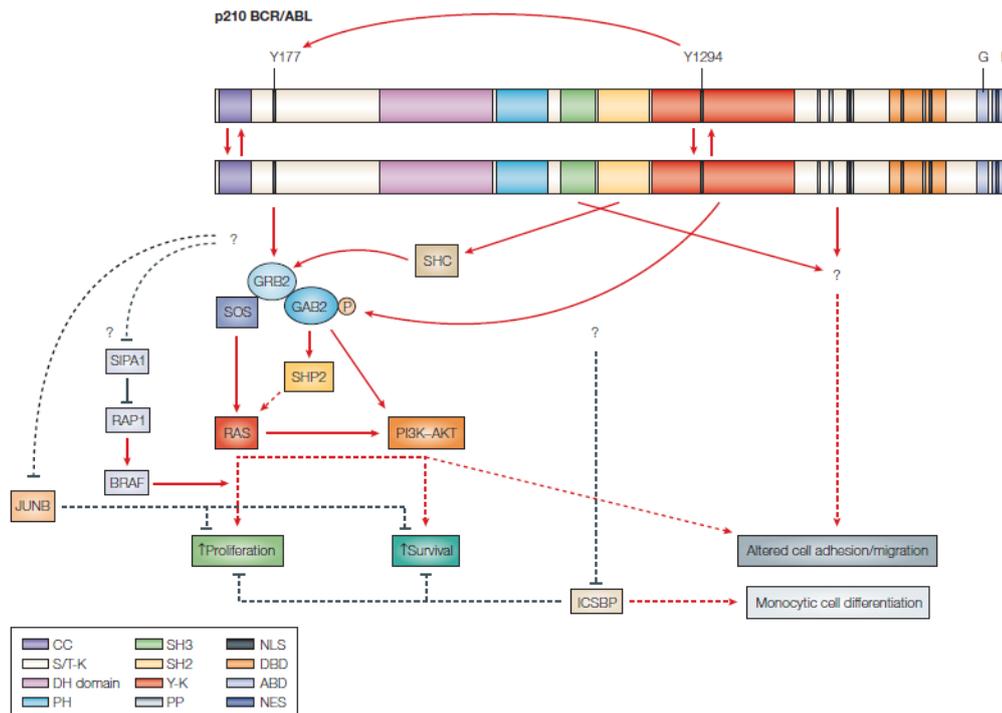
Domain oligomerisasi *amino-terminal coiled-coil* (CC) BCR merupakan aktivator penting dalam mengaktifasi ABL kinase dan juga merangsang penggabungan BCR-ABL dengan serat-serat aktin. Bentuk mutasi BCR-ABL tidak mempunyai domain BCR-CC (Δ CC-BCR-ABL) gagal untuk menginduksi terjadinya MPD pada tikus, sebaliknya menginduksi leukemia sel T/limfoma hanya dalam masa laten yang panjang. Reaktivasi ABL kinase terjadi oleh mutasi domain SH3 (disebabkan oleh delesi atau mutasi titik PI013L) dan kemampuan Δ CC-BCR-ABL untuk menginduksi *CML-like MPD* pada tikus masih ada meskipun hanya sedikit. Hasil ini menunjukkan bahwa domain BCR-CC merupakan faktor penting untuk menginduksi terjadinya MPD oleh BCR-ABL, terutama kemampuannya dalam mengaktifasi ABL kinase (Ghaffari, 1999).

Hal penting lain pada regio BCR pada BCR-ABL adalah *GRB2-binding site*. GRB2 mengikat SOS- sebuah pengubah *guanine-nucleotide* dari RAS sama dengan adaptor yang membangun *GRB2-associated binding protein 2* (GAB2). Pembentukan kompleks ini bergantung pada fosforilasi BCR pada tirosin 177, menyebabkan aktivasi RAS, dan perekrutan SHP2 dan *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K). Mutasi residu tirosin-177 pada BCR-ABL akan dirubah menjadi *phenylalanine* (Y177F) sebagian besar kemampuan untuk mengikat GRB2 akan hilang, namun tidak akan mempengaruhi aktivitas ABL kinase. Lokasi fosforilasi tirosin kinase yang lain adalah pada *activation loop* domain ABL kinase (sesuai dengan Y1294 pada p210 BCR-ABL tampak pada gambar 2.5) bersamaan dengan domain SH2 ABL juga berperan pada aktivasi jalur RAS, kemudian mengikat SHC dan selanjutnya fosforilasi tirosin dan menangkap GRB2 (Gambar 2.5). Tetapi mekanisme Y1294 dalam aktivasi jalur RAS masih belum diketahui. Mutasi domain SH2 ABL dapat mengurangi kemampuan BCR-ABL untuk menginduksi *CML-like MPD* pada hewan coba. Titik mutasi Y1294F juga melemahkan leukaemogenesis oleh BCR-ABL. Data ini menunjukkan bahwa domain SH2 ABL dan lokasi fosforilasi Y1294 memiliki peranan dalam proses terjadinya leukaemogenik dari BCR-ABL. Regio *carboxy-terminal* diperlukan untuk menjalankan fungsi normal dari ABL dan leukaemogenesis limfoid dari v-Abl. Delesi domain ABL's-Actin-binding atau seluruh *carboxy-terminal* bagian hilir pada domain ABL kinase tidak

mempengaruhi kemampuan BCR-ABL untuk menginduksi *CML-like MPD* (Ren., 2005).

Kondisi ini menunjukkan bahwa masing-masing domain/pola BCR-ABL memiliki fungsi yang tumpang tindih. Delesi domain SH3 BCR-ABL dan *carboxy-terminal prolinerich SH3-binding sites* (ABL-PP), akan menghambat kemampuan BCR-ABL untuk memicu terjadinya migrasi spontan sel pada permukaan fibronektin, dan mengurangi leukaemogenisitas BCR-ABL pada hewan coba. Delesi domain SH3 dan SH2 ABL juga ditunjukkan pada defek yang lebih berat dibandingkan dengan mutasi hanya pada salah satu domain (Ren., 2005).

Analisa fungsi struktur BCR-ABL yang menggunakan model tikus yang menderita CML menunjukkan bahwa aktivasi tirosin kinase diperlukan tetapi tidak cukup untuk menginduksi *CML-like disease*. Domain/pola BCR-ABL diluar dari lokasi katalisis ABL kinase dapat menjadi penentu tingkat beratnya penyakit dan batasan spesifisitas dari leukaemogenesis BCR-ABL (Ren., 2005).



Gambar 2.5 Sinyal Leukeumogenesis BCR-ABL. (Ren., 2005).

Oligomerisasi domain BCR-ABL *coiled coil* (CC) pada P210^{BCR-ABL} dan delesi SH3 pada ABL menyebabkan fosforilasi P210^{BCR-ABL} tirosin Y-177 dan ditangkapnya GRB2, yaitu sebuah molekul kecil yang mengatur aktivasi jalur RAS). P210^{BCR-ABL} juga memfosforilasi JAK2 dan STAT1/STAT5 yang mentransfer sinyal dari reseptor sitokin non-Tirosin Kinase ke dalam nukleus. Aktivasi RAS dan STAT berperan dalam pertumbuhan faktor independen pada sel yang mengandung BCR-ABL. P210^{BCR-ABL} juga mengaktifasi jalur PI(3)/Akt yang dapat meningkatkan ekspresi BCL-2 dan fosforilasi STAT-5 yang meningkatkan resistensi progenitor sel-sel CML menuju ke proses apoptosis. P210^{BCR-ABL} yang banyak di sitosol melepaskan sinyal ke nukleus dan mengakibatkan peningkatan ikatan aktin dengan P145^{ABL}. Kemudian terjadi fosforilasi sejumlah protein sitoskeletal yaitu FAK dan Paxillin yang berperan dalam

penyimpangan fungsi reseptor adesi dan hal ini juga dapat menjelaskan adanya sel-sel muda dan prekursor dalam sirkulasi (*Ren., 2005*).

2.3.1 Berkurangnya Apoptosis

Beberapa hal yang menyebabkan terjadinya resistensi terhadap apoptosis pada CML, yaitu fosforilasi dan aktivasi jalur PI(3)-K/Akt merupakan jalur utama yang menyebabkan efek antiapoptosis dari BCR-ABL. Aktivasi PI(3)K kinase melalui protein B kinase, mengakibatkan fosforilasi dan inaktivasi pro-apoptosis protein BAD yang merupakan bagian dari famili BCL-2. Meningkatnya ekspresi prototype BCL-2 dapat menyebabkan menurunnya apoptosis. Aktivasi STAT5 juga dapat meningkatkan jumlah BCL, yang juga mengakibatkan resistensi terhadap apoptosis. Pada fase kronik, sel-sel CD34+ menyebabkan tertundanya kematian sel dibandingkan dengan sel progenitor yang normal. c-ABL di sitoplasma memiliki fungsi pro-apoptosis dengan menghambat jalur *survival* yang dimediasi oleh PI(3)K. ABL pada nukleus juga memiliki peran dalam kematian sel, yang ditunjukkan pada pemberian terapi STI-571 (*gleevec*, inhibitor tirosin kinase yang menghambat tirosin kinase BCR-ABL). Proteksi terhadap apoptosis pada fase kronik hanya sedikit, namun ada beberapa bukti yang menunjukkan BCR-ABL juga tetap memiliki andil. Peningkatan ekspresi mRNA BCR-ABL seringkali dihubungkan dengan beratnya penyakit ini, yang mungkin menyebabkan resistensi terhadap apoptosis pada fase akselerasi dan blas (*Ren., 2005*).

2.3.2 Penghambatan Diferensiasi

Selama proses diferensiasi hematopoiesis, sel induk pluripoten berdiferensiasi secara morfologi dan fungsi menjadi tipe sel yang berbeda-beda. P210^{BCR-ABL} sendiri tidak memiliki efek yang signifikan pada diferensiasi sel pada fase kronik, namun menghambat diferensiasi pada fase CML (*John P., 2009*).

2.4 Stadium Penyakit dan Gejala Klinis CML

2.4.1 Fase akselerasi dan fase blastik

Pada dasarnya CML dibagi menjadi tiga stadium klinis. Pada praktek klinisnya, sangat penting untuk menegakkan diagnosis terlebih dahulu sebelum terjadi perkembangan gejala lebih lanjut (stadium preklinis), yang biasanya ditemukan pada pemeriksaan fisik dan laboratorium rutin. Stadium klinis pertama adalah fase kronik yang memiliki masa empat tahun sebelum berubah menjadi fase akselerasi/blastik dengan prognosis yang buruk. Fase akselerasi ditandai dengan meningkatnya jumlah sel blas di darah perifer dan/atau sumsum tulang, basofil pada darah perifer, trombositopenia persisten, splenomegali atau leukositosis meskipun sudah diterapi, atau bukti sitogenetik dari perubahan klonal. Sedangkan fase blastik ditandai dengan sel blas sebanyak $\geq 20\%$ di darah perifer dan/atau sumsumtulang, proliferasi sel blas pada ekstramedular, agregasi atau ledakan sel blas yang besar di sumsum tulang. Fase blas menandai perubahan menjadi leukemia akut, yang bisa menjadi leukemia non-limfositik, menyerupai leukemia myeloid (FAB M1–2), promielositik (FAB M3), mielomonositik

(FAB M4–5), eritroblastik (FAB M6), atau megakarioblastik (FAB M7). Krisis ledakan limfoid umumnya dari prekursor tipe-sel B, meskipun jarang bisa juga berasal dari precursor sel T. Krisis limfoid yang mudah diidentifikasi dengan *immunophenotyping* (John P., 2009).

Tabel 2.1 Diagnosa CML Fase Akselerasi dan Fase Blas (John P., 2009).

<p>Fase Akselerasi Sel blas 10-19% pada darah perifer dan/atau sumsum tulang Basofil $\geq 20\%$ pada darah perifer Trombositopenia persisten Meningkatnya ukuran spleen dan jumlah sel darah putih meskipun mendapatkan terapi. Kelainan sitogenetik dari evolusi klonal</p>
<p>Fase Blastik Sel blas $\geq 20\%$ Terdapat proliferasi sel blas ekstramedular Agregasi besar-besaran atau kluster sel blas pada sumsum tulang</p>
<p><i>Diagnosa dibuat jika ditemukan satu atau lebih gejala diatas.</i> Sumber: Vardiman JW, Pierre R, Thiele J, et al. Chronic myelogenous leukemia. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al., eds. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: IARC Press, 2001:20–26.</p>

2.4.2 Fase Kronik

Di Amerika Serikat, pasien yang didiagnosa CML sekitar 50-60% tidak menunjukkan gejala klinis. Biasanya penyakit ini ditemukan pada saat pemeriksaan fisik atau tes darah rutin. Gejala dan tanda klinis yang umumnya muncul pada pasien yaitu akibat dari anemia dan splenomegali, lemah, berat badan yang menurun, rasa cepat kenyang, rasa penuh atau nyeri di area perut kiri atas. Manifestasi klinis yang jarang terjadi adalah perdarahan (dihubungkan dengan rendahnya jumlah dan/atau disfungsi trombosit), trombosis (dihubungkan dengan trombotosis dan/atau

leukositosis), gout arthritis (dihubungkan dengan peningkatan nilai asam urat), priapismus (biasanya berkaitan dengan leukositosis atau trombositosis), perdarahan retina, perdarahan dan ulkus saluran cerna atas (dari peningkatan level histamine sampai basofilia). Gejala leukostatis (dispneu, mengantuk, hilangnya koordinasi, dan kebingungan) disebabkan oleh sumbatan pada pembuluh darah pada paru dan otak, yang jarang terjadi pada CML fase kronik, meskipun jumlah leukositnya lebih dari 100×10^9 sel/L (John P., 2009).

Splenomegali adalah tanda klinis yang paling sering muncul pada pasien CML, sekitar 30-50 persen kasus. Hepatomegali hanya ditemukan pada 10-20 persen kasus CML. Sedangkan limfadenopati, infiltrasi kulit atau jaringan sangat jarang terjadi, namun jika tanda-tanda ini tampak dapat menjadi penanda CML fase akselerasi atau blastik atau Ph-negatif. Sakit kepala, nyeri tulang, atralgia, nyeri yang berasal dari infark splen, dan demam sering terjadi pada transformasi CML (John P., 2009).

Gambaran laboratorium pada CML yang tidak diterapi adalah leukositosis dengan neutrofilia dan perubahan *left shift* menjadi sel-sel blas. Basofil dan eosinofil juga dapat meningkat. Yang paling sering terjadi trombositosis, sedangkan trombositopenia jarang, dan jika terjadi merupakan prognosis yang buruk. Anemia dengan nilai hemoglobin <11 g/dL terjadi pada sepertiga pasien. Kelainan biokimia yang tampak pada pasien CML adalah rendahnya nilai alkali fosfatase, kondisi ini terjadi pada beberapa pasien metaplasia mieloid agnogenik., vitamin B12 dalam serum, laktat dehidrogenase, asam urat, dan lysozyme meningkat.

Sumsum tulang tampak hiperseluler dengan hiperplasia mieloid. Rasio mieloid dengan eritroid yang biasanya 15:1, meningkat menjadi 20:1. Sekitar 15 persen pasien CML memiliki sel blas sebanyak 5% atau lebih di darah tepi atau sumsum tulang pada saat diagnosis ditegakkan. Meningkatnya fibrosis retikulin sering terjadi (30 sampai 40 persen stadium 3 atau 4 fibrosis retikulin dengan pengecatan perak), tapi fibrogen kolagen jarang terlihat pada pemeriksaan. Menariknya, CML mielofibrosis fase akhir yang dahulu diterapi dengan busulfan dan sering dilaporkan sebagai stadium akhir dari CML, menjadi tidak umum lagi saat ini dimana terapi dengan IFN- α dan imanitib digunakan. Karena ternyata imanitib efektif dalam mengurangi mielofibrosis pada CML (*Hoffman., 2013*).

2.5 Diagnosis CML

Diagnosa CML ditegakkan dari pemeriksaan hapusan darah tepi dan biopsi sumsum tulang. Ditemukannya kromosom Philadelphia menggunakan analisa kariotipe atau terdapat translokasi BCR-ABL menggunakan PCR juga digunakan sebagai dasar diagnosis CML (*John P., 2009*).

2.5.1 Darah Perifer

Pada fase kronik, ditandai dengan leukositosis granulositik (pada umumnya sejumlah $>50 \times 10^9/L$, rata-rata $20-500 \times 10^9/L$) di dominasi dengan sel-sel granulosit termasuk mieloblas dan basofilia. Selain itu terdapat dominan neutrofil matang, tetapi juga bias terdapat peningkatan

persentase sel-sel mielosit (mielosit *bulge*). Adanya peningkatan mieloblas sebanyak 3% dari total leukosit. Banyak pasien yang juga menunjukkan eosinofilia. Namun tidak terdapat disgranulopoiesis yang bermakna, namun bisa terdapat pada perkembangan penyakit lebih lanjut. Jumlah monosit juga dapat meningkat absolut, <3% dari total sel berinti. Jumlah trombosit cenderung normal atau kadang meningkat sampai $1000 \times 10^3/\mu\text{L}$. Anemia ringan juga dapat terjadi pada pasien CML (*John P., 2009*).

2.5.2 Sumsum Tulang

Pada fase kronik, sumsum tulang tampak hiperselular dan ditandai banyak sel granulositik dan prekursor. Sel blas <5% dari jumlah total sel berinti. Jumlah megakariosit juga meningkat dan gambaran morfologinya abnormal, ukurannya lebih kecil dan nukleusnya hipolobulasi. Jumlah eritroid cenderung menurun, disebabkan oleh karena perubahan seri granulositik besar-besaran. Sebanyak 40 persen pasien CML menunjukkan peningkatan jaringan fibrosis retikulin. Perubahan jaringan ikat yang terjadi dihubungkan dengan splenomegalo, meningkatnya persentase sel blas di darah perifer, menurunnya nilai hemoglobin, dan kariotipe yang abnormal. Kondisi ini dihubungkan dengan prognosis yang buruk, meskipun beberapa pasien yang memiliki gejala awal CML dan gambaran fibrosis juga memiliki masa hidup yang panjang. Sel *Pseudo-Gaucher* dan histiosit biru. Nampak pada sepertiga kasus yang pernah

ada. Sel-sel ini merupakan penanda dari terjadinya transkripsi BCR-ABL dan pergantian sel (*John P., 2009*).

Tabel 2.2 Karakteristik Patologis Pasien CML Fase Kronik pada Darah Perifer dan Sumsum Tulang (*John P., 2009*).

Darah Perifer Leukositosis ($>50 \times 10^9/L$, rata-rata 20 - $>500 \times 10^9/L$) Gambaran granulosit penuh dan prekursor dengan sel muda yang jarang <5% Basofilia absolut
Sumsum Tulang Hiperselular (biasanya 100%) Predominan granulositik (rasio M:E $>10:1$) dengan gambaran yang sama dalam darah. Megakariosit kecil dan hipolobulasi Sel blas <5%

2.5.3 Studi Molekular

CML memiliki ciri khas genetik yaitu kromosom Philadelphia. Gambaran sitogenetik menunjukkan pemendekan kromosom 22 setelah terjadi translokasi terbalik yang melibatkan kromosom 9 [t(9;22)9q34;q11]. Ada tiga metode yang dapat digunakan untuk mendeteksi kromosom Philadelphia atau fusi BCR-ABL, yaitu kariotipe sitogenetik konvensional, *fluorescence in situ hybridization* (FISH), dan *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR). Pemeriksaan ini dapat digunakan untuk mengevaluasi translokasi 9;2 pada semua kasus penyakit mieloproliferatif kronik dan mielodisplastik/mieloproliferatif untuk menyingkirkan kemungkinan diagnosis CML (*John P., 2009*).

2.6 Prosedur Diagnostik dan Monitoring

Studi FISH dapat menilai dengan cepat jenis penyakit dalam 200 sel, penilaian ini dapat dilakukan pada sel-sel dalam interfase dan dapat dilakukan pada specimen darah. Pemeriksaan RT-PCR selalu mengukur rasio pesan yang abnormal, BCR-ABL untuk mengontrol gen (misalnya ABL). Oleh karena variabilitas ini dipengaruhi oleh laboratorium dan waktu, saat ini dilakukan standarisasi dalam pengukuran transkripsi BCR-ABL dalam kaitannya dengan standar internasional (SI). Prosedur monitoring yang belakangan ini dipelajari adalah pemeriksaan menggunakan sampel darah perifer (FISH, qPCR) menggantikan pemeriksaan sumsum tulang (sitogenetik) dalam memonitoring respon TKI lebih baik (*Hoffman.,2013, Niederhuber., 2014*).

Progresivitas CML yang tidak diberikan terapi dari fase kronik awal gambarannya berupa hyperplasia sumsum tulang dan peningkatan sel mieloid di sirkulasi diikuti fase memburuknya penyakit (fase akselerasi dan krisis sel blas), ditandai dengan adanya terhentinya proses diferensiasi, akumulasi sel-sel blas, dan hilangnya sel hematopoisis normal, terutama sel darah putih dan trombosit. CML adalah penyakit keganasan yang ditemukan pertama kali berhubungan dengan ketidaknormalan sitogenetik spesifik yaitu Kromosom Philadelphia (Ph). Kondisi ini dapat ditunjukkan dengan adanya pembentukan fusi BCR-ABL onkogen. Studi mengenai BCR-ABL menuntun ke arah metode sensitif untuk mendeteksi penyakit residu dan memprediksi hasil dan target terapi yang dapat menghambat

aktivitas tirosin kinase yang tidak normal akibat dari adanya fusi BCR-ABL
(*Hoffman.,2013, Niederhuber., 2014*).

Keterangan Kerangka Teori:

Chronic myeloid leukemia ditandai dengan adanya translokasi kromosom 9 dan 22 disebut Philadelphia kromosom. Pada CML ditandai oleh hiperplasia sel-sel *multipotent progenitors* kemudian diikuti dengan perubahan sel mieloid dan limfoid. Jika terjadi perubahan pada seri limfoid maka akan membentuk *common lymphoid progenitors like CML cells* yang akan menghasilkan sel-sel blas, fase ini disebut sebagai *CML-Blast Crisis* (seri limfoid). Sedangkan apabila terjadi perubahan pada seri mieloid akan membentuk *common myeloid progenitors like CML cells*, kemudian akan menghasilkan *Leukemic Stem Cells* (LSC). Kondisi ini akan terjadi dua fase yaitu fase kronik dan fase akselerasi.