

KARYA AKHIR

*PROGRAMMED DEATH-LIGAND 1 (PD-L1) EXPRESSION
AND CD8+ TILS IN INVASIVE BREAST CARCINOMA
(INVASIVE BREAST CARCINOMA OF NO SPECIAL TYPE)*

EKSPRESI PROGRAMMED DEATH-LIGAND 1 (PD-L1) DAN
CD8+ TILS PADA KARSINOMA PAYUDARA INVASIF
(INVASIVE BREAST CARCINOMA OF NO SPECIAL TYPE)

ASTUTI

C075181002



PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS-1 (Sp-1)
PROGRAM STUDI ILMU PATOLOGI ANATOMI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021

EKSPRESI PROGRAMMED DEATH-LIGAND 1 (PD-L1) DAN CD8+ TILS PADA KARSINOMA PAYUDARA INVASIF (INVASIVE BREAST CARCINOMA OF NO SPECIAL TYPE)

Karya Akhir

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar Spesialis Patologi Anatomi

Disusun dan Diajukan Oleh

ASTUTI

Kepada

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS-1 (Sp-1)
PROGRAM STUDI ILMU PATOLOGI ANATOMI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

KARYA AKHIR

EKSPRESI PROGRAMMED DEATH-LIGAND 1 (PD-L1) DAN CD8+ TILS PADA KARSINOMA PAYUDARA INVASIF (INVASIVE BREAST CARCINOMA OF NO SPECIAL TYPE)

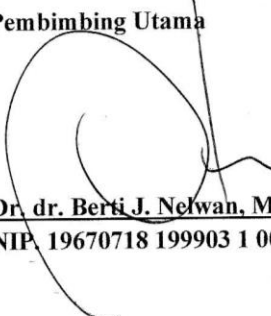
Disusun dan diajukan oleh :

dr. Astuti
C075181002

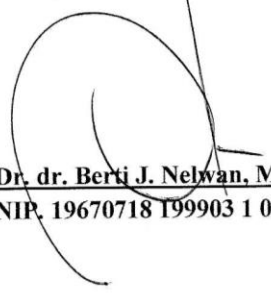
Telah dipertahankan di hadapan Panitia ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Pendidikan Dokter Spesialis
Program Studi Ilmu Patologi Anatomi
Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin pada tanggal 08 November 2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui


Pembimbing Utama


Dr. dr. Berti J. Nelwan, M.Kes, Sp.PA(K)
NIP. 19670718 199903 1 002

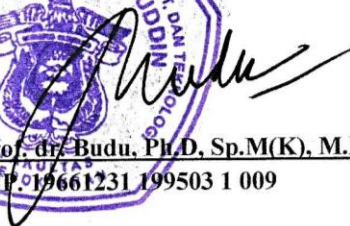
**Ketua Program Studi
Ilmu Patologi Anatomi**


Dr. dr. Berti J. Nelwan, M.Kes, Sp.PA(K)
NIP. 19670718 199903 1 002

Pembimbing Pendamping


dr. Upik A. Miskad, Ph.D, Sp.PA(K)
NIP. 19740330 200501 2 001

**Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin**


Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed
NIP. 19661231 199503 1 009



PERNYATAAN KEASLIAN KARYA AKHIR

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : ASTUTI

NIM : C075181002

Program Studi : Program Pendidikan Dokter Spesialis Patologi Anatomi
Universitas Hasanuddin

Menyatakan dengan sebenarnya, bahwa karya akhir yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti bahwa sebagian atau keseluruhan karya akhir ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 18 November 2021

Yang menyatakan,



(Astuti)

PRAKATA

Puji syukur kami panjatkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya, sehingga tesis ini dapat diselesaikan dengan baik.

Penulisan tesis ini merupakan salah satu syarat penyelesaian Program Pendidikan Dokter Spesialis Ilmu Patologi Anatomi di Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar.

Dalam penelitian dan penulisan karya akhir ini, penulis mendapat sangat banyak bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. **Dr. dr. Berti J. Nelwan, M.Kes, Sp.PA(K)** sebagai pembimbing pertama dalam penelitian ini atas segala perhatian, bimbingan, dan dorongannya selama proses penelitian sampai penyusunan karya akhir ini, sehingga dapat terselesaikan dengan baik.
2. **dr. Upik A. Miskad, Ph.D, Sp.PA (K)** sebagai pembimbing kedua yang selalu menyempatkan diri untuk membimbing dan mendorong penulis di tengah kesibukannya.
3. **Dr. dr. Andi Alfian Zainuddin, MKM** yang banyak membimbing dan memberikan masukan kepada penulis dalam hal metodologi penelitian dan analisa statistik tesis ini.
4. Seluruh staf pengajar dibagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin tanpa terkecuali (khususnya

Prof. dr. Syarifuddin Wahid, Ph.D, Sp.PA(K), dr. Gunawan Arsyadi, Sp.PA(K), dr. Truly D. Djimahit, Sp.PA(K), dr. Cahyono Kaelan, Ph.D, Sp.PA (K), Sp.S, dr. Djumadi Achmad, Sp.PA(K), dr. Mahmud Ghaznawie, Ph.D, Sp.PA(K), dr. Ni Ketut Sungowati, Sp.PA(K), Dr. dr. Gatot S. Lawrence, Sp.PA(K), Dr. dr. Rina Masadah, M.Phill, Sp.PA(K), dr. Muh. Husni Cangara, Ph.D, Sp.PA, dr. Juanita, Sp.PA, dr. Imeldy Prihatni Ma'mun, M.Kes, Sp.PA, dr. Jeni Poniman, Sp.PA, dr. Amalia, M.Kes, Sp.PA) atas bimbingan selama penulis menjalani pendidikan maupun dalam penyusunan tesis ini.

5. Rektor dan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar, atas kesediaannya menerima penulis sebagai peserta didik pada Program Pendidikan Dokter Spesialis Terpadu Ilmu Patologi Anatomi Universitas Hasanuddin Makassar.
6. Koordinator Program Pendidikan Dokter Spesialis Terpadu Universitas Hasanuddin yang senantiasa memantau dan membantu kelancaran pendidikan penulis.
7. Seluruh teman sejawat residen Patologi Anatomi atas semua bantuan, dukungan, doa dan persaudaraan yang diberikan selama penulis menjalani pendidikan hingga menyelesaikan karya akhir ini.
8. Seluruh teknisi dan pegawai laboratorium Rumah Sakit Universitas Hasanuddin, Rumah Sakit Dr. Wahidin Sudirohusodo, Laboratorium

Sentra Diagnostik Patologia Makassar dan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar.

9. Suami penulis, dr. Somarnam, Sp.PD, anak penulis, Valencia Jeslyn Witama dan Edwin Bernardhy Witama, orang tua penulis, Loa Opiah (Alm), Lim Merih, Anthonius Rumfeka, Merry Hong, beserta seluruh keluarga dan sahabat yang senantiasa mendukung, mendoakan dan menjadi sumber inspirasi serta semangat utama bagi penulis selama menjalani pendidikan.
10. Semua pihak yang telah membantu penulis, yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis berharap agar karya akhir ini dapat memberikan manfaat bagi perkembangan Ilmu Patologi Anatomi di masa yang akan datang. Akhir kata, penulis memohon maaf yang sebesar-besarnya atas segala khilaf dan salah mulai dari awal penelitian sampai akhir penulisan karya akhir ini.

Makassar, 18 November 2021

Yang menyatakan

(**Astuti**)

ABSTRAK

Astuti. Ekspresi Programmed Cell Death-Ligand 1 (PD-L1) Dan CD8+ TILs Pada Karsinoma Payudara Invasif (Invasive Breast Carcinoma of No Special Type).(Dibimbing oleh **Berti J. Nelwan, Upik A. Miskad, Andi Alfian Zainuddin**)

Penelitian ini bertujuan untuk melihat perbedaan ekspresi PD-L1 dan CD8+ TILs pada masing-masing grade invasive breast carcinoma of no special type.

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, pada bulan Mei hingga Agustus 2021. Metode yang digunakan adalah penelitian observasi analitik dengan desain cross sectional. Sampel penelitian berasal dari delapan puluh sediaan blok parafin tumor payudara dengan diagnosa invasive breast carcinoma of no special type grade 1,2 dan 3. Kemudian dilakukan pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal PD-L1 dan CD8+. Penilaian mikroskopik dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya.

Hasil penelitian dengan uji Chi-Square menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang bermakna ekspresi PD-L1 dengan grade dan dengan CD8+ ($p > 0.05$), namun terdapat perbedaan yang bermakna ekspresi CD8+ dengan grade ($p < 0,05$). Sehingga CD8+ TILs dapat digunakan sebagai penanda prognostik tambahan pada Invasive Breast Carcinoma of No Special Type.

Kata kunci: *PD-L1, CD8+, TILs, Grade, Invasive Breast Carcinoma of No Special Type*

ABSTRACT

Astuti. *Expression of Programmed Cell Death-Ligand 1 (PD-L1) and CD8+ TILs in Invasive Breast Carcinoma of No Special Type.* (Supervised by **Berti J. Nelwan, Upik A. Miskad, Andi Alfian Zainuddin**)

This study aims to determine the differences in the expression of PD-L1 and CD8+ TILs in each grade of invasive breast carcinoma of no special type.

The research was conducted at the Anatomical Pathology Laboratory, Faculty of Medicine, Hasanuddin University, from May to August 2021. The method used was an analytical observational study with a cross-sectional design. The research samples were eighty paraffin block preparations of breast tumors with the diagnosis of invasive breast carcinoma of no special type grade 1,2 and 3. Immunohistochemical staining was performed using monoclonal antibodies PD-L1 and CD8+. The samples were evaluated using a light microscope.

The results of the study using the Chi-Square test showed that there was no significant difference in PD-L1 expression with grade and with CD8+ ($p>0.05$), but there was a significant difference in CD8+ expression with grade ($p<0.05$). This study suggest that CD8+ TILs can be used as an additional prognostic marker in Invasive Breast Carcinoma of No Special Type.

Keywords: *PD-L1, CD8+, TILs, Grade, Invasive Breast Carcinoma of No Special Type*

DAFTAR ISI

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1.	LATAR BELAKANG MASALAH	1
1.2.	RUMUSAN MASALAH.....	5
1.3.	TUJUAN PENELITIAN.....	6
1.3.1.	TUJUAN UMUM	6
1.3.2.	TUJUAN KHUSUS.....	6
1.4.	HIPOTESIS PENELITIAN.....	6
1.5.	MANFAAT PENELITIAN.....	7
1.5.1.	PENGEMBANGAN ILMU.....	7
1.5.2.	APLIKASI.....	7

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1.	INVASIVE BREAST CARCINOMA OF NO SPECIAL TYPE	8
2.1.1.	ANATOMI DAN HISTOLOGI.....	8
2.1.2.	ETIOLOGI DAN PATOGENESIS.....	9
2.1.3.	HISTOLOGICAL GRADING.....	18
2.1.4.	PROGNOSIS.....	20
2.2.	IMUNOLOGI TUMOR	20
2.2.1.	ANTIGEN TUMOR.....	22
2.2.2.	IMMUNOEDITING KANKER.....	24
2.3.	PROGRAMMED CELL DEATH LIGAND-1 (PD-L1).....	33
2.3.1.	STRUKTUR PD-L1	34
2.3.2.	REGULASI EKSPRESI PD-L1	35
2.4.	LIMFOSIT T CD8+.....	45
2.4.1.	REGULASI PD-1	50
2.4.2.	JALUR SINYAL PD-L1/PD-1.....	52

BAB 3 KERANGKA TEORI DAN KONSEP

3.1.	KERANGKA TEORI.....	56
3.2.	KERANGKA KONSEP	57

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1.	DESAIN PENELITIAN.....	58
4.2.	TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN	58
4.3.	POPULASI PENELITIAN.....	58
4.4.	SAMPEL DAN CARA PENGAMBILAN SAMPEL	59
4.5.	PERKIRAAN BESAR SAMPEL.....	59
4.6.	KRITERIA INKLUSI DAN EKSKLUSI.....	60
4.6.1.	KRITERIA INKLUSI	60
4.6.2.	KRITERIA EKSKLUSI.....	60
4.6.3.	KRITERIA DROP OUT	60
4.7.	CARA KERJA	61
4.7.1.	ALOKASI SUBJEK	61
4.7.2.	PROSEDUR PEWARNAAN <i>HEMATOXYLIN-EOSIN</i>	61
4.7.3.	INTERPRETASI HASIL PEWARNAAN IMUNOHSITOKIMIA PD- L1	62
4.7.4.	INTERPRETASI HASIL PEWARNAAN IMUNOHSITOKIMIA CD8+ TILs	63
4.8.	IDENTIFIKASI DAN KLASIFIKASI VARIABEL.....	65
4.8.1.	PROSEDUR PEWARNAAN IMUNOHISTOKIMIA	65
4.8.2.	IDENTIFIKASI VARIABEL	66
4.8.3.	KLASIFIKASI VARIABEL.....	66
4.9.	DEFINISI OPERASIONAL DAN KRITERIA OBJEKTIF.....	67
4.9.1.	DEFINISI OPERASIONAL	67
4.9.2.	KRITERIA OBJEKTIF	68
4.10.	PENGOLAHAN DAN ANALISA DATA	69
4.11.	ALUR PENELITIAN	70
4.12.	PERSONALIA PENELITIAN	71
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN		
5.1.	HASIL PENELITIAN	72
5.1.1.	JUMLAH SAMPEL.....	72
5.1.2.	KARAKTERISTIK SAMPEL.....	75

5.1.3.	PD-L1 BERDASARKAN <i>GRADE</i> HISTOPATOLOGI	76
5.1.4.	CD8+ TILs BERDASARKAN <i>GRADE</i> HISTOPATOLOGI	77
5.1.5.	HUBUNGAN EKSPRESI PD-L1 DENGAN CD8+ TILs	78
5.2.	PEMBAHASAN.....	79
5.2.1.	KARAKTERISTIK SAMPEL PENELITIAN.....	79
5.2.2.	EKSPRESI PD-L1 BERDASARKAN <i>GRADE</i> HISTOPATOLOGI	79
5.2.3.	EKSPRESI CD8+ TILs BERDASARKAN <i>GRADE</i> HISTOPATOLOGI	82
5.2.4.	EKSPRESI PD-L1 SEL TUMOR DENGAN CD8+ TILs	84
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN		
6.1.	KESIMPULAN	87
6.2.	SARAN	87
DAFTAR PUSTAKA		
LAMPIRAN		

DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
Tabel 1	Histological Grading IBC	18
Tabel 2	Klasifikasi Ekspresi PD-L1	37
Tabel 3	Karakteristik Sampel (n=80)	75
Tabel 4	Ekspresi PD-L1 Berdasarkan Grade Histopatologi	76
Tabel 5	Ekspresi CD8+ TILs Berdasarkan Grade Histopatologi	77
Tabel 6	Ekspresi PD-L1 Sel Tumor dengan CD8+ TILs	78

DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
Gambar 1	Terminal Duct–Lobular Unit	9
Gambar 2	Diagram Skematis Karsinoma Mammae berdasarkan Asal Sel	14
Gambar 3	Jalur Umum Perkembangan Karsinoma Mammae	14
Gambar 4	Jalur Sinyal yang berperan dalam Perkembangan Karsinoma Mammae	15
Gambar 5	Fase Eliminasi Immunoediting Kanker	27
Gambar 6	Fase Immunoediting Kanker	29
Gambar 7	Blokade Checkpoint	32
Gambar 8	Diagram Skematik (A) dan Struktur Protein PD-L1 (B)	35
Gambar 9	Regulasi Ekspresi PD-L1	36
Gambar 10	Klasifikasi Ekspresi PD-L1	38
Gambar 11	Regulasi Ekspresi PD-L1 dalam sel kanker pada tingkat yang berbeda	45
Gambar 12	Aktivasi dan Respon Sel T CD8+	46
Gambar 13	Mekanisme Pembunuhan Sel Target yang dimediasi CTL	49
Gambar 14	Jalur Sinyal PD-L1/PD-1 pada Sel T	55
Gambar 15	Penilaian CD8+ TILs	64
Gambar 16	Grade Histopatologi	73
Gambar 17	Ekspresi CD8+ TILs	73
Gambar 18	Ekspresi PD-L1	74

DAFTAR LAMPIRAN

Rekomendasi Persetujuan Etik (Ethical Clereance)

Daftar Sampel penelitian

Data SPSS

DAFTAR SINGKATAN

IBC	<i>Invasive Breast Carcinoma</i>
IBC-NST	<i>Invasive Breast Carcinoma of No Special Type</i>
TILs	<i>Tumor Infiltrating Lymphocytes</i>
CTL	<i>Cytotoxic T Lymphocyte</i>
TDLU	<i>Terminal Duct–Lobular Unit</i>
BRCA	<i>Breast cancer</i>
ER	<i>Estrogene Receptor</i>
PR	<i>Progesterone Receptor</i>
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
DCIS	<i>Ductal Carcinoma In Situ</i>
MAPK/M EK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-Kinase</i>
AKT	<i>Protein Kinase B</i>
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
EGFR	<i>Epithelial Growth Factor Receptor</i>
RTK	<i>Reseptor Tirosin Kinase</i>
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor-1</i>
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factors Receptor</i>
MET	<i>Mesenchymal to Epithelial Transition</i>
PIP2	<i>Phoshatidyl-Inositol P2</i>
PIP3	<i>Phoshatidyl-Inositol P3</i>
ERK	<i>Extracellular-signal-Regulated Kinase</i>

NF-κB	<i>Nuclear Factor of κB</i>
MDM2	<i>Mouse Double Minute 2 Homolog</i>
GSK3	<i>Glycogen Synthase Kinase 3</i>
PDGFR	<i>Platelet-derived Growth Factor Receptor</i>
SRC	<i>Rous Sarcoma</i>
JAK	<i>Janus Kinase</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
PD-1	<i>Programmed cell Death protein-1</i>
PD-L1	<i>Programmed cell Death Ligand-1</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EBV	<i>Epstein–Barr virus</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
CEA	<i>Carcinoembryonic Antigen</i>
AFP	<i>α-Fetoprotein</i>
MUC-1	<i>Mucin</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
IFN-γ	<i>Interferon-γ</i>
CXCL	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand</i>
IP-10	<i>Interferon-inducible Protein-10</i>
MIG	<i>Monokine Induced by IFN-γ</i>
I-TAC	<i>Interferon-inducible T cell Chemoattractant</i>
TH	<i>T-Helper</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Protein 4</i>

LAG-3	<i>Lymphocyte Activation Gene-3</i>
TIM-3	<i>T cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing-3</i>
TIGIT	<i>T cell Immunoreceptor with Ig and ITIM domains</i>
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
MDSCs	<i>Myeloid-Derived Suppressor Cells</i>
IL	<i>Interleukin</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Homologue</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-Monocyte CSF</i>
MYC	<i>Myelocytomatosis Viral</i>
KRAS	<i>Kirsten Rat Sarcoma virus</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
CNA	<i>Copy Number Alterations</i>
PMBCL	<i>Primary Mediastinal B Cell Lymphoma</i>
cHL	<i>Classical Hodgkin Lymphoma</i>
TNBC	<i>Triple-Negative Breast Cancer</i>
GC	<i>Gastric Cancer</i>
NSCLC	<i>Non-Small Cell Lung Carcinoma</i>
miRNA	<i>microRNA</i>
3'UTR	<i>3' Untranslated Region</i>
NF-$\kappa\beta$	<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
AP1	<i>Activator Protein 1</i>
HIF-1	<i>Hypoxia-inducible factor 1α</i>

LMP1	<i>Latent Membrane Protein-1</i>
NKTCL	<i>Natural Killer/T-Cell Lymphoma</i>
CSN5	<i>COP9 Signalosome 5</i>
CDK	<i>Cyclin-Dependent Kinase</i>
CMTM6	<i>CKLF Like MARVEL Transmembrane Domain Containing 6</i>
B3GNT3	<i>β -1,3-N-Acetylglucosaminyl Transferase</i>
TCR	<i>T Cell Receptor</i>
FasL	<i>Fas Ligand</i>
ITSM	<i>Tyrosine-based Switch Motif</i>
ITIM	<i>Tyrosine-based Inhibitory Motif</i>
SHP	<i>Scr Homology region 2 domain containing Phosphatase</i>
Bcl-xL	<i>B Cell Lymphoma Extra Large</i>
Tbet	<i>T-box genes</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. LATAR BELAKANG MASALAH

Karsinoma mammae merupakan kanker yang paling sering didiagnosa pada wanita (sebanyak 24%) dan penyebab utama kematian akibat kanker pada wanita di seluruh dunia. Merupakan kanker paling umum kedua secara keseluruhan pada pria dan wanita (sebanyak 11,6%). Tingkat insidennya meningkat di sebagian besar negara berpenghasilan rendah dan menengah dalam beberapa dekade terakhir. (Rakha, Allison, Ellis, *et al.*, 2019)

Berdasarkan data dari globocan 2018 menunjukkan insiden kanker payudara sekitar 2.08 juta (11.6%) yang mana merupakan peringkat kedua dari seluruh kanker setelah kanker paru dengan angka mortalitas mencapai 626.6 ribu (6.6%) yang juga merupakan penyebab kematian terbanyak pada wanita. (Bray *et al.*, 2018)

Di Indonesia sendiri, data dari Pusdatin Kementerian Kesehatan tahun 2013 (data terakhir yang tersedia saat ini) menunjukkan prevalensi dari kanker payudara adalah 61.682 (0.5%), merupakan peringkat kedua setelah kanker serviks yaitu sebesar 98.692 (0.8%). ('Kanker Payudara', 2016)

Data karsinoma mammae di Laboratorium

Patologi Anatomi RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo pada tahun 2018 dan 2019 sebanyak 136 dan 162 kasus.

Sebagian besar karsinoma mammae terdeteksi selama pascamenopause. Namun, karsinoma mammae dapat berkembang pada usia berapa pun, dari anak-anak hingga usia tua.(Collins, 2018)

Mayoritas karsinoma mammae (~90%) bersifat unifokal dan dapat terjadi pada kuadran payudara manapun, dengan frekuensi yang lebih tinggi di kuadran luar-atas. Tumor kontralateral ditemukan pada sekitar 2% pasien. Sekitar 0,1% karsinoma mammae ditemukan sebagai tumor metastasis aksila tanpa tumor primer mammae yang jelas.(Rakha, Allison, Ellis, *et al.*, 2019)

Invasive breast carcinoma (IBC) adalah neoplasma maligna yang berasal dari epitel kelenjar mammae sedangkan invasive breast carcinoma (IBC) of no special type (NST) adalah kelompok IBC yang tidak dapat diklasifikasikan secara morfologis dalam tipe histologi tertentu. Sebagian besar karsinoma mammae merupakan IBC-NST, dimana karakteristik prognostik serta penatalaksanaannya sama atau sedikit lebih buruk. Prognosis karsinoma mammae dipengaruhi beberapa faktor, di antaranya adalah grade histologi tumor dan TILs.(Rakha, Allison, Bu, *et al.*, 2019; Rakha, Allison, Ellis, *et al.*, 2019)

Peran dasar dari sistem imun adalah menjaga homeostasis jaringan dengan imunosurveillance dan inisiasi reaksi inflamasi yang mencakup aktivasi terkoordinasi sel imun innate dan adaptif.(Salgado *et al.*, 2017) Imunosurveillance adalah fungsi fisiologis sistem imun untuk mengenali dan menghancurkan klon sel yang bertransformasi sebelum sel tersebut tumbuh menjadi tumor, dan membunuh tumor yang sudah terbentuk.(Abbas, Lichtman and Pillai, 2018b) Dalam situasi dimana eliminasi tidak tuntas, tumor mampu melepaskan diri dari kontrol imun. Proses ini dikonsepsi dengan teori immunoediting kanker, yang didukung oleh sejumlah besar data eksperimental dan bukti klinis.(Salgado *et al.*, 2017) Immunoediting adalah proses dinamik imunosurveillance dan perkembangan tumor, yang terdiri dari tiga fase: eliminasi, equilibrium, dan escape. Fase elimination merupakan imunosurveillance, equilibrium merupakan periode laten dimana tumor yang bertahan akan menghasilkan varian baru, dan escape merupakan pertumbuhan tumor yang tidak terkendali karena akhirnya dapat menghindari dari sistem imun.(Dunn *et al.*, 2002; Dunn, Old and Schreiber, 2004)

Antigen tumor merangsang sistem imun adaptif spesifik yang dapat mencegah atau menghambat pertumbuhan dan penyebaran kanker, sebagian besar melibatkan sel T, terutama Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) CD8+.(Abbas, Lichtman and Pillai, 2018b)

Limfosit T CD8+ adalah komponen penting dari imunitas adaptif yang menyerang sel tumor yang menyajikan antigen tumor pada permukaan major histocompatibility complex class I (MHC kelas I). Sel T CD8+ menghasilkan interferon- γ setelah interaksi dengan target tumor, yang kemudian menyebabkan penghambatan siklus sel, apoptosis, angiostasis dan induksi aktivitas tumoricidal makrofag.(Al-Saleh *et al.*, 2017)

Faktor yang paling sering menghambat reaksi imun terhadap sel kanker sehingga dapat menghindar dari sistem imun adalah pada immune checkpoint yaitu PD-1 dan PD-L1.(Kurozumi *et al.*, 2019) PD-L1 terletak pada membran berbagai tipe sel yaitu pada sel hematopoietik maupun nonhematopoietik dengan jumlah yang sangat rendah, sedangkan pada sel tumor ditemukan ekspresi yang berlebihan.(Evangelou *et al.*, 2020) PD-L1 menghambat fungsi sel T melalui ikatan dengan reseptornya pada sel T, PD-1. Interaksi PD-L1 dan PD-1 menghambat aktivasi dan proliferasi sel T, menghambat fungsi sel T untuk memproduksi sitokin dan membunuh sel tumor target.(Guo, Lin and Kwok, 2017)

Ekspresi PD-L1 telah diteliti sebagai biomarker potensial untuk menilai respon berbagai tipe kanker. Namun, nilai prognostik dari ekspresi PD-L1 yang tinggi pada kanker masih belum jelas. Banyak penelitian menunjukkan hubungannya dengan hasil yang buruk, namun hubungan dengan hasil yang baik juga ditemukan pada

ovarium, melanoma, glioma dan non-small cell lung carcinoma.(Wang *et al.*, 2017) Sampel klinis dari pasien karsinoma mammae, menunjukkan upregulasi ekspresi PD-L1 dan dihubungkan dengan fitur prognostik yang buruk: tipe ductal, ukuran tumor yang besar, high grade, ER-, PR-, ERB-B2 receptor tyrosine kinase 2 (ERBB2)+, tingkat proliferasi (Ki-67) yang tinggi and subtype molecular yang agresif (basal dan ERBB2-enriched).(Barriga *et al.*, 2019) Penelitian saat ini menunjukkan bahwa blokade interaksi PD-L1 dan PD-1 dapat meningkatkan fungsi sel T dan memfasilitasi aktivitas antitumor.(Wang *et al.*, 2017)

Berdasarkan kepentingan dalam aplikasi secara klinis dan peranan dalam konsep biologis, maka perlu dan penting dilakukan penelitian untuk melihat perbedaan ekspresi PD-L1 dan CD8+ pada Invasive Breast Carcinoma of No Special Type, Grade 1, 2 dan 3. Penelitian ini belum pernah dilakukan dengan menggunakan sampel di Makassar.

1.2. RUMUSAN MASALAH

Berdasarkan uraian dalam latar belakang masalah di atas dapat dirumuskan pertanyaan penelitian sebagai berikut :

Bagaimana ekspresi PD-L1 dan CD8+ TILs pada masing-masing *grade* Invasive Breast Carcinoma of No Special Type?

1.3. TUJUAN PENELITIAN

1.3.1. TUJUAN UMUM

Melihat perbedaan ekspresi PD-L1 dan CD8+ TILs pada masing-masing *grade* Invasive Breast Carcinoma of No Special Type.

1.3.2. TUJUAN KHUSUS

1. Menentukan ekspresi PD-L1 pada masing-masing *grade* Invasive Breast Carcinoma of No Special Type.
2. Menentukan ekspresi CD8+ TILs pada masing-masing *grade* Invasive Breast Carcinoma of No Special Type.
3. Membandingkan ekspresi PD-L1 dan CD8+ TILs pada masing-masing *grade* Invasive Breast Carcinoma of No Special Type.

1.4. HIPOTESIS PENELITIAN

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah :

1. Terdapat perbedaan ekspresi PD-L1 pada masing-masing *grade* Invasive Breast Carcinoma of No Special Type, dimana ekspresi PD-L1 lebih tinggi pada Invasive Breast Carcinoma of No Special Type *grade* tinggi.
2. Terdapat perbedaan ekspresi CD8+ TILs pada masing-masing *grade* Invasive Breast Carcinoma of No Special Type, dimana

CD8+ TILs lebih rendah pada Invasive Breast Carcinoma of No Special Type *grade* tinggi.

3. Terdapat perbedaan ekspresi antara PD-L1 dengan CD8+ TILs pada masing-masing *grade* Invasive Breast Carcinoma of No Special Type, dimana ekspresi PD-L1 tinggi sedangkan CD8+ TILs rendah pada Invasive Breast Carcinoma of No Special Type *grade* tinggi.

1.5. MANFAAT PENELITIAN

1.5.1. PENGEMBANGAN ILMU

1. Memberikan informasi ilmiah tentang ekspresi PD-L1 dan CD8+ TILs pada Invasive Breast Carcinoma of No Special Type.
2. Sebagai dasar penelitian lebih lanjut terutama dalam aspek imunologi Invasive Breast Carcinoma of No Special Type.

1.5.2. APLIKASI

1. Sebagai faktor prediktif dan faktor prognostik tambahan Invasive Breast Carcinoma of No Special Type.
2. Sebagai pilihan terapi tambahan (imunoterapi) Invasive Breast Carcinoma of No Special Type.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

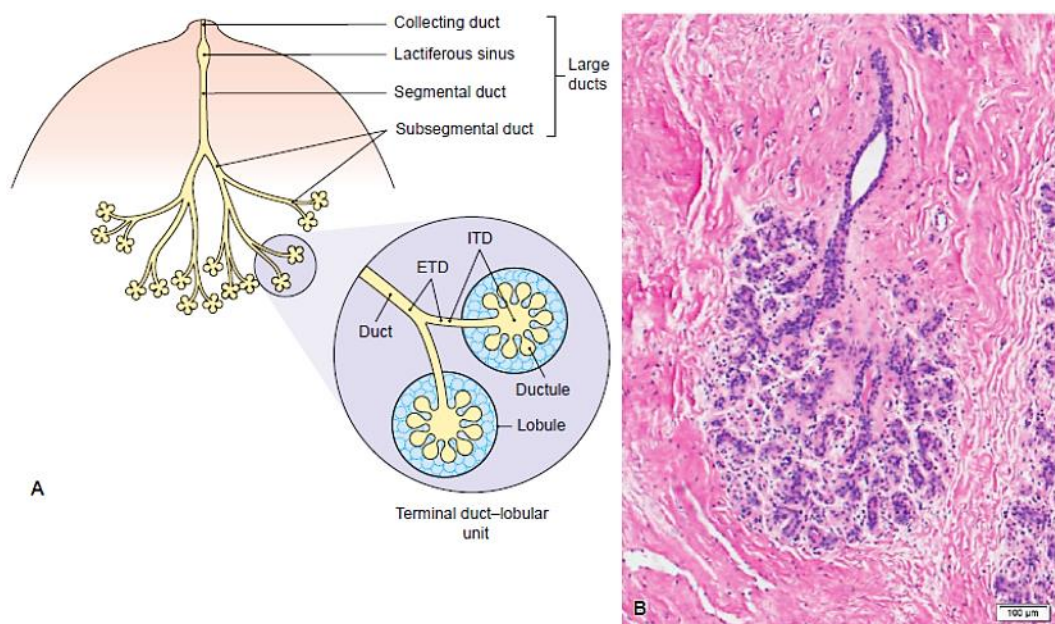
2.1. INVASIVE BREAST CARCINOMA OF NO SPECIAL TYPE

Invasive breast carcinoma (IBC) mengacu pada kelompok besar dan heterogen neoplasma maligna yang berasal dari epitel kelenjar mammae. (Rakha, Allison, Ellis, *et al.*, 2019) Sedangkan invasive breast carcinoma (IBC) of no special type (NST) mengacu pada kelompok IBC yang tidak dapat diklasifikasikan secara morfologis dalam tipe histologi tertentu. (Rakha, Allison, Bu, *et al.*, 2019)

2.1.1. ANATOMI DAN HISTOLOGI

Unit morfofungsional mammae adalah struktur percabangan kompleks yang secara topografi tersusun dalam lobulus dan terdiri dari dua komponen utama: terminal duct–lobular unit (TDLU) dan sistem duktus besar. TDLU dibentuk oleh lobulus, yang kemudian membentuk sinus, dan duktus terminal dan mewakili bagian sekresi kelenjar. Duktus ini terhubung dengan duktus subsegmental, yang mengarah ke duktus segmental, duktus laktiferus, dan bermuara di puting susu. Dilatasi fusiform yang terletak di bawah puting antara duktus laktiferus dan segmental disebut sebagai sinus laktiferus. (Collins, 2018)

TDLU dikenali dengan arsitektur lobularnya yang khas, terdapat mantel jaringan ikat, dan tidak ada serat elastis. Perkembangan mammae tergantung pada interaksi epitel dan jaringan mesenkim. Duktus yang besar memiliki stroma yang kurang dan dikelilingi oleh lapisan jaringan elastis. Seluruh sistem duktal-lobular mammae dilapisi oleh sel epitel (lapisan dalam) dengan fungsi sekresi dan absorbs dan dikelilingi oleh sel myoepithelial (lapisan luar).(Collins, 2018)



Gambar 1. Terminal Duct–Lobular Unit. ETD = Extralobular terminal duct; ITD = intralobular terminal duct.(Collins, 2018)

2.1.2. ETIOLOGI DAN PATOGENESIS

Etiologi karsinoma mammae adalah multifaktorial. Sebagian besar penelitian menunjukkan faktor resiko sebagai berikut :(Rakha, Allison, Ellis, *et al.*, 2019)

1. Hormon; estrogen dan progesteron.

Tingkat insidens karsinoma mammae meningkat lebih tajam pada usia sebelum menopause (~ 8% per tahun) dibandingkan setelahnya (~ 2% per tahun), ketika sintesis estrogen dan progesteron ovarium berhenti dan produksi androgen ovarium berangsur-angsur berkurang.

2. Diet; diet tinggi kalori yang kaya lemak dan protein hewani, disertai aktivitas fisik kurang dan obesitas.

Pada wanita pascamenopause terdapat hubungan positif yang kuat antara indeks massa tubuh dan risiko karsinoma mammae lebih untuk hormone receptor-positive. Sedangkan pada wanita premenopause terdapat hubungan negatif yang lemah, dimana indeks massa tubuh yang tinggi terkait dengan penurunan risiko kanker hormone receptor-positive dan peningkatan risiko triple-negative.

Terdapat beberapa bukti bahwa alkohol, merokok, dan aktivitas fisik dikaitkan dengan risiko kanker hormone receptor-positive. Namun, penelitian pada populasi etnis tertentu mengungkapkan bahwa mungkin ada perbedaan berdasarkan populasi/etnis dalam faktor risiko untuk biomarker/subtipe klinis tertentu.

3. Faktor reproduksi; menarche dini, nullipara atau paritas rendah, usia tua saat melahirkan pertama, dan durasi laktasi kurang.

Menarche dini, terlambat menopause, terapi penggantian hormon pascamenopause, nulliparitas, dan usia tua saat melahirkan pertama dikaitkan dengan peningkatan risiko karsinoma mammae hormone receptor-positive. Paritas sendiri dapat dikaitkan dengan peningkatan risiko tumor triple-negative sedangkan durasi laktasi yang lama dikaitkan dengan penurunan risiko semua subtipe tumor.

4. Genetik; BRCA1 dan BRCA2.

Mutasi germline BRCA1 dikaitkan dengan risiko karsinoma mammae triple-negative (ER-negatif, PR-negatif, dan HER2-negatif), sedangkan mutasi germline BRCA2 dikaitkan dengan hormone receptor-positive.

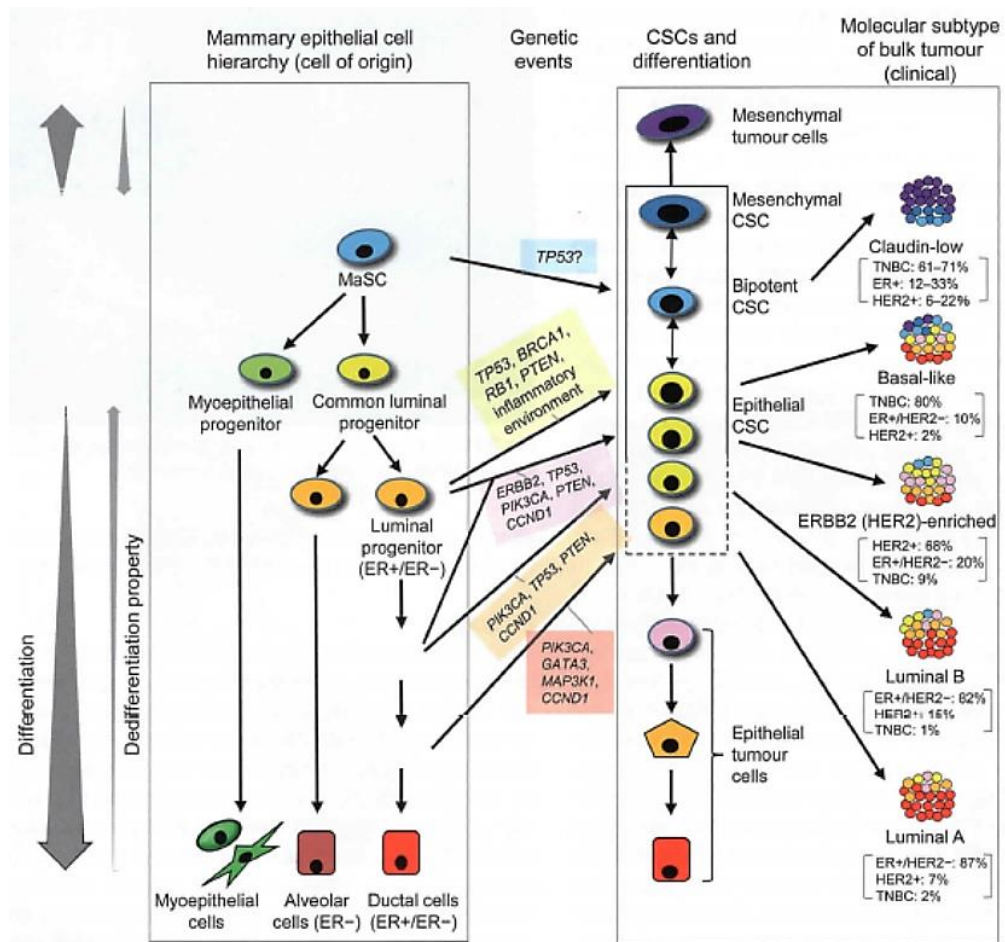
Patogenesis karsinoma mammae melalui beberapa jalur inisiasi, transformasi, dan perkembangan yang umumnya dijelaskan berdasarkan status reseptor hormon dan morfologi. ER-positif menunjukkan flat epithelial atypia, atypical ductal hyperplasia, dan ER-positive ductal carcinoma in situ (DCIS) sebagai prekursor karsinoma mammae invasif dan metastasis. Sedangkan ER-negatif menunjukkan ER-negative DCIS dan microglandular adenosis sebagai prekursor kanker ER-negatif. (Rakha, Allison, Ellis, *et al.*, 2019)

Pada tingkat asal sel, terdapat dua jalur yang menjelaskan karsinogenesis mammae: evolusi klonal sporadik dan stem cell kanker. Pada tingkat molekuler, terdapat bukti kuat bahwa karsinoma mammae berevolusi melalui dua jalur molekuler yang berbeda, terutama terkait dengan reseptor hormon yakni karsinoma mammae ER-positif dan ER-negatif adalah penyakit yang berbeda secara mendasar, dan bahwa pada kanker ER-positif, grade histologi dan proliferasi sangat terkait dengan tingkat, kompleksitas, dan jenis penyimpangan genetik. (Rakha, Allison, Ellis, *et al.*, 2019)

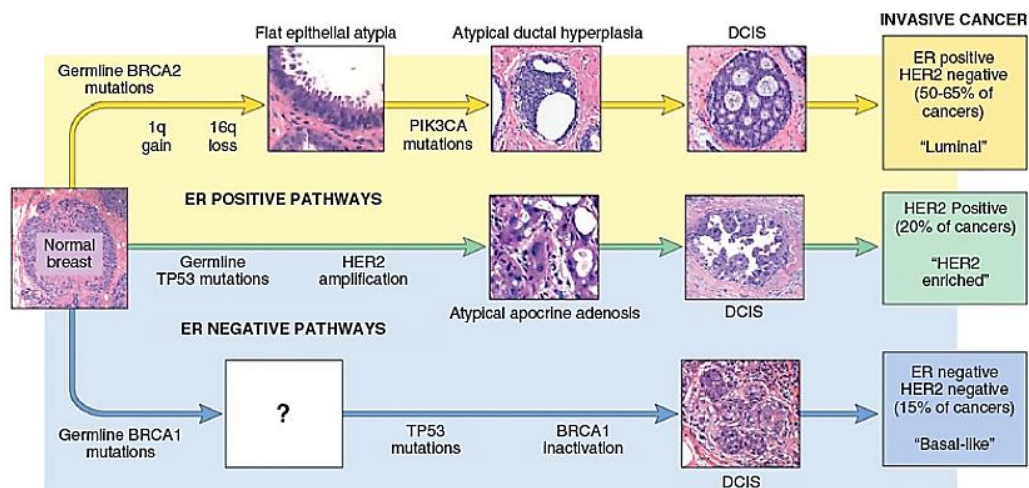
1. Jalur pertama (jalur ER-positif) ditandai dengan penambahan kromosom 1q, kehilangan kromosom 16q, amplifikasi kromosom 17q12, dan ekspresi gen yang terkait dengan fenotipe ER-positif. Lesi ini mengekspresikan reseptor hormon, kurang overekspresi HER2 dan penanda basal, dan memiliki kariotipe diploid sederhana atau near-diploid. Umumnya, jalur ini terdiri dari lesi neoplastik fenotipe low hingga intermediate grade (grade 1 dan 2), dan sebagian kecil (~9%) high grade (grade 3) secara morfologis.
2. Jalur kedua (jalur ER-negatif) paling sering ditandai dengan hilangnya kromosom 13q, penambahan kromosom 11q13, amplifikasi kromosom 17q12, dan ekspresi gen yang terkait dengan proliferasi sel dan siklus sel. Jalur ini umumnya terdiri dari tumor intermediate dan high grade (grade 2 dan 3) secara

morfologis. Mutasi PIK3CA umumnya terjadi di kedua jalur, sedangkan mutasi TP53 lebih sering terjadi di jalur ER-negatif. Data juga menunjukkan bahwa perkembangan tumor low grade (grade 1) menjadi high grade (grade 3) lebih sering pada karsinoma mammae fenotip luminal.

Karsinoma mammae ER-negatif mencakup kelompok HER2-positif dan HER2-negatif. Dalam kelompok ini (umumnya high grade, tidak stabil secara genetik, dan aneuploid), sering terjadi mutasi TP53. Pada kelompok ER-negatif, HER2-positif, mutasi PIK3CA juga sering terjadi, selain amplifikasi kromosom 17q12. Komponen penting dari ER-negatif, HER2-negatif meliputi aktivitas proliferasi tinggi, infiltrat imunologi yang meningkat, fenotip basal-like dan mesenkimal, dan defisiensi dalam rekombinasi homolog.

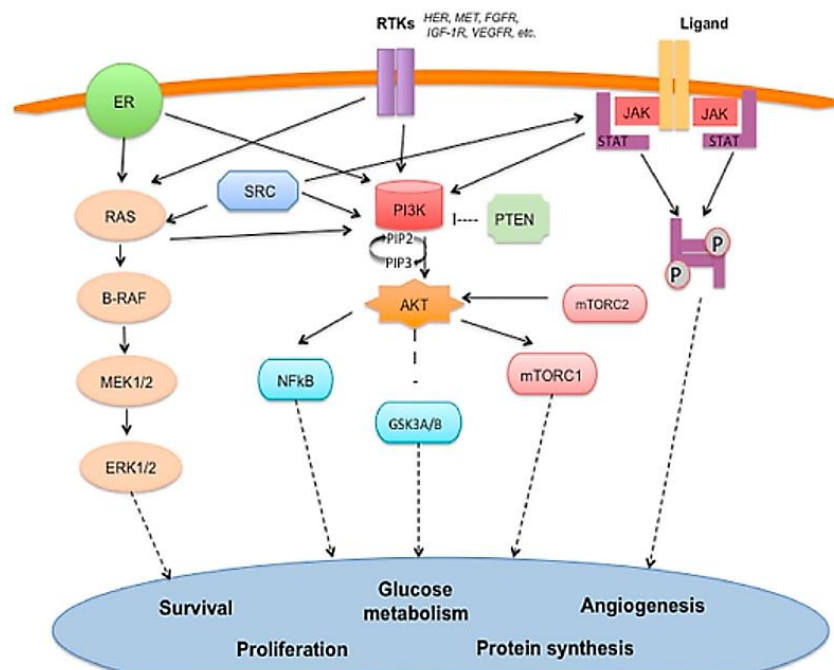


Gambar 2. Diagram Skematis Karsinoma Mammae berdasarkan Asal Sel. CSCs, cancer stem cells; Masc, mammary stem cell; TNBC, triple-negative breast cancer. (Rakha, Allison, Ellis, *et al.*, 2019)



Gambar 3. Jalur Umum Perkembangan Karsinoma Mammae. (Ellenson and Lester, 2018)

Mutasi genetik sel-sel somatik akan mempengaruhi dan mengaktifkan sejumlah jalur seluler, yang bertanggung jawab untuk pertumbuhan, proliferasi, dan diferensiasi sel karsinoma mammae. (Toss *et al.*, 2017)



Gambar 4. Jalur Sinyal yang berperan dalam Perkembangan Karsinoma Mammae. (Toss *et al.*, 2017)

1. Jalur Sinyal Estrogen. Hormon steroid, estrogen berkontribusi dalam karsinogenesis karsinoma mammae pada pertumbuhan, perkembangan, diferensiasi sel, dan homeostasis. Estrogen mengaktifkan reseptornya di inti (jalur genomik) yang mengikat DNA untuk mengatur aktivitas gen yang berbeda, dan di membran (jalur non-genomik) yang mengaktifkan berbagai jalur transduksi sinyal; MAPK dan PI3K/AKT/mTOR.

2. Epidermal Growth Factor Receptors (EGFR/HER). Merupakan reseptor tirosin kinase yang mengatur beberapa proses biologis dan khususnya terlibat dalam kontrol proliferasi sel, diferensiasi, dan survival. Ikatan ligan pada reseptor mengaktifasi jalur sinyal PI3K/AKT/mTOR, MAPK, dan jalur JAK/STAT, yang memicu proliferasi dan survival.
3. Jalur PI3K/AKT/mTOR. Merupakan salah satu jalur utama yang terlibat dalam proliferasi sel kanker dan diaktifkan oleh beberapa reseptor tirosin kinase (RTKs), seperti EGFR, IGF-1, FGFR, MET, dan lain-lain. PI3K memfosforilasi phosphatidyl-inositol P2 (PIP2) menjadi phosphatidyl-inositol P3 (PIP3). Setelah fosforilasi, PIP3 mengaktifkan AKT. AKT yang diaktifkan mengenali berbagai substrat, dengan fungsi pengaktif atau penghambatnya, seperti mTOR, NF- κ B (nuclear factor of κ B), MDM2 (regulator negatif oncosuppressor p53), GSK3 (terlibat dalam siklus sel dan proses metabolisme glukosa), dan lain-lain. Oleh karena itu, AKT yang diaktifkan memediasi dan mengatur berbagai proses biologis, termasuk pertumbuhan independen, apoptosis, dan proliferasi.
4. Jalur Sinyal MAPK. MAPK dapat menyebabkan siklus sel yang tidak terkontrol, resistensi terhadap apoptosis dan kemoterapi, terapi target, dan radioterapi. Interaksi antara RTK (seperti EGFR, PDGFR, FGFR, dan lain-lain) dan ligan memungkinkan

RAS untuk mengaktifkan aktivitas protein kinase RAF, serine/threonine kinase. RAF kinase, sebagai kaskade, memfosforilasi dan mengaktifkan MEK (mitogen-activated protein kinase). MEK (MEK1 dan MEK2) memfosforilasi dan mengaktifkan mitogen-activated protein kinase, MAPK (juga disebut extracellular-signal-regulated kinase, ERK), yang translokasi ke dalam nukleus dimana memicu beberapa faktor transkripsi yang memediasi ekspresi onkogen yang terlibat dalam proliferasi dan survival.

5. Jalur SRC. SRC (Rous Sarcoma) berperan penting dalam pengembangan dan perkembangan banyak tumor solid dan juga terkait dengan resistensi obat. SRC merupakan non-receptor cytoplasmatic tyrosine kinases (SFK) yang terlibat dalam mekanisme pengaturan proliferasi sel, pertumbuhan, migrasi, dan fitur neoplastik lainnya. Aktivasi SRC berimplikasi kaskade jalur pensinyalan yang terlibat dalam onkogenesis, termasuk PI3K/AKT/mTOR, MAPK, dan JAK/STAT.
6. Jalur JAK/STAT. Interaksi antara RTK atau reseptor sitokin dan ligannya mengaktifkan JAK (Janus Kinase). JAK berikatan dengan protein STAT (transduser sinyal dan aktivator transkripsi) memicu transkripsi gen yang terlibat dalam proses proliferasi, diferensiasi, dan apoptosis. Disregulasi dalam fungsi JAK-STAT menyebabkan kelainan imun dan kanker.

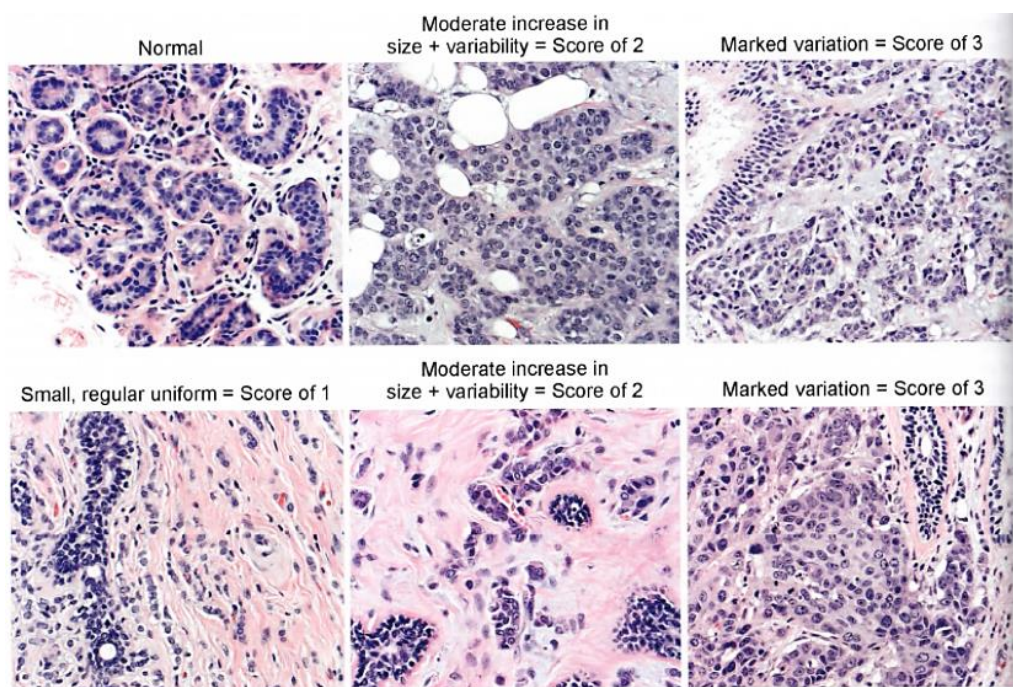
2.1.3. HISTOLOGICAL GRADING

Penilaian grade histologi IBC menggunakan metode semikuantitatif dengan menilai bentuk tubular, pleomorfisme inti dan jumlah mitosis. Bentuk tubular dinilai pada seluruh tumor dengan pembesaran kecil; hanya struktur tumor dengan central lumina yang jelas dan dikelilingi sel neoplastik yang dihitung. Sedangkan pleomorfisme inti dinilai dengan membandingkan ukuran dan bentuk sel tumor dengan sel epitel normal di sekitarnya. Skor 1 jika ukuran inti sel tumor sama dengan inti sel normal (<1.5 kali), pleomorfisme minimal, kromatin halus dan anak inti tidak terlihat. Skor 2 jika inti sel tumor lebih besar (1.5-2x), pleomorfisme ringan-sedang, dan anak inti kecil dan tidak jelas. Skor 3 jika inti sel tumor lebih besar (>2x), dengan kromatin vesikular, perbedaan ukuran dan bentuk yang jelas, dan anak inti terlihat. (Rakha, Allison, Ellis, *et al.*, 2019)

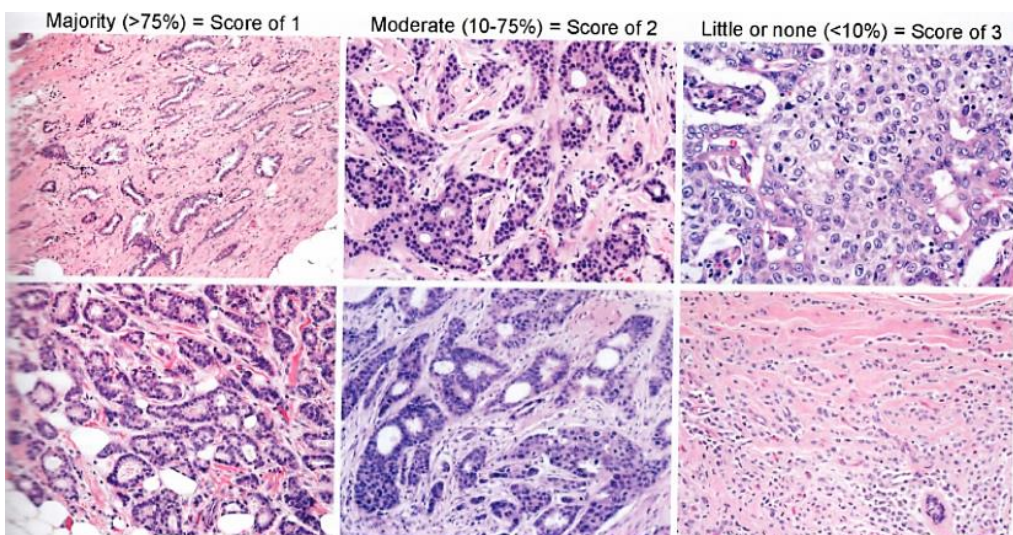
Tabel 1. Histological Grading IBC (Rakha, Allison, Ellis, *et al.*, 2019)

Feature	Score
Tubule and gland formation	
Majority of tumour (> 75%)	1
Moderate degree (10-75%)	2
Little or none (< 10%)	3
Nuclear pleomorphism	
Small, regular, uniform cells	1
Moderate increase in size and variability	2
Marked variation	3

Mitotic count	
Dependent on microscope field area ²	1-3
Total Score	Final grading
Add the scores for gland formation, nuclear polymorphism, and mitotic count:	
3-5	Grade 1
6 or 7	Grade 2
8 or 9	Grade 3



Gambar 3. Skoring Bentukkan Tubular. (Rakha, Allison, Ellis, *et al.*, 2019)



Gambar 4. Skoring Pleomorfisme Inti. (Rakha, Allison, Ellis, *et al.*, 2019)

2.1.4. PROGNOSIS

IBC-NST menyebabkan sebagian besar kasus karsinoma mammae, dan karakteristik prognostik serta penatalaksanaannya sama atau sedikit lebih buruk, dengan tingkat kelangsungan hidup 10 tahun 65-78% dibandingkan dengan karsinoma mammae secara keseluruhan (sekitar 80%). Prognosis sangat dipengaruhi oleh usia pasien, grade histologi tumor, stadium tumor, invasi limfovaskular, dan TILs, serta prediktor respons terapi, seperti status ER, PR, dan HER2. Indeks proliferasi Ki-67 dan status AR juga telah terbukti memiliki nilai prognostik. Sekitar 70-80% dari IBC-NST adalah ER-positif, dan 12-20% dari kasus adalah HER2-positif. Manajemen IBC-NST juga dipengaruhi oleh karakteristik prognostik dan prediktif ini. Dalam satu penelitian, pasien kanker payudara berusia ≥ 50 tahun saat didiagnosis mengalami 17% kematian yang lebih tinggi daripada pasien yang lebih muda. Dalam studi lain, pasien usia menengah (40-60 tahun) menunjukkan hasil yang lebih baik daripada pasien usia muda dan lanjut. (Rakha, Allison, Bu, *et al.*, 2019)

2.2. IMUNOLOGI TUMOR

Karakteristik antigen tumor dan respon imun tubuh terhadap tumor merupakan dasar pemahaman imun tumor dan pengembangan

imunoterapi kanker. Tumor merangsang sistem imun adaptif spesifik yang dapat mencegah atau menghambat pertumbuhan dan penyebaran kanker. Tetapi salah satu sifat penting dari kanker adalah kemampuan untuk menghindar dari sistem imun.(Abbas, Lichtman and Pillai, 2018b)

Sebagian besar bukti menunjukkan respon imun yang relevan secara klinik melibatkan sel T, terutama Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) CD8+. Respon imun sering kali gagal dalam mencegah pertumbuhan tumor, dan respon imun adaptif yang tidak efektif terhadap tumor dapat menjadi strategi terapeutik seperti sel T antitumor yang dapat dirangsang untuk membunuh sel tumor secara efektif.(Abbas, Lichtman and Pillai, 2018b)

Salah satu dari hallmark of cancer adalah menghindar dari sistem imun, dipahami sebagai neoplasia harus menemukan cara untuk menghindar dari sistem imun dan jika tidak sel premaligna yang berkembang akan dibunuh.(Hanahan and Weinberg, 2017) Faktor yang dapat menghambat reaksi imun terhadap sel kanker di antaranya adalah immune checkpoint yaitu PD-1 dan PD-L1, telah menarik banyak perhatian sebagai terapi target baru terhadap banyak jenis kanker.(Kurozumi *et al.*, 2019)

2.2.1. ANTIGEN TUMOR

Tumor ganas mengekspresikan berbagai jenis molekul yang dapat dikenali oleh sistem imun sebagai antigen asing. Berikut pembagian utama dari antigen tumor: (Abbas, Lichtman and Pillai, 2018b)

1. Neoantigen

Umumnya dihasilkan dari mutasi atau delesi gen. Neoantigen berupa protein sitosol maupun nuklear yang didegradasi oleh proteosom dan dipresentasikan oleh molekul MHC kelas I.

2. Antigen Onkogen Virus

Produk onkogen virus berfungsi sebagai antigen tumor dan memicu respon sel T spesifik untuk mengeradikasi tumor yang diinduksi virus. Protein virus yang disintesis secara endogen diproses dan dipresentasikan oleh molekul MHC pada permukaan sel tumor. Kemampuan imunitas adaptif untuk mencegah pertumbuhan tumor yang disebabkan oleh virus DNA telah banyak diamati. Contohnya: limfoma terkait EBV dan kanker serviks terkait HPV, dimana lebih banyak terjadi pada orang yang mengalami immunosupresi. Efikasi imunitas adaptif spesifik virus untuk mencegah tumor dengan menghilangkan sel yang terinfeksi sebelum berkembang menjadi kanker, vaksinasi untuk mencegah infeksi virus dapat mengurangi kejadian kanker terkait virus.

3. Overekspresi Protein Seluler

Merupakan produk gen yang tersembunyi pada sel normal atau protein yang dibuat oleh sel normal dalam jumlah berlebihan oleh tumor sehingga menstimulasi respon imun. Contohnya: antigen kanker testis; protein yang diekspresikan pada gamet dan trofoblas dan pada banyak jenis kanker tetapi tidak pada jaringan somatik normal, Her2/Neu pada kanker payudara; protein yang diekspresikan secara berlebihan pada sel tumor karena amplifikasi gen yang mengkode protein tersebut, dan tyrosinase pada melanoma; peningkatan jumlah sel yang mengekspresikan protein spesifik jaringan.

4. Antigen Onkofetal

Protein yang diekspresikan secara berlebihan pada sel kanker, yang mana protein ini terekspresi normal selama perkembangan normal fetus tetapi tidak pada jaringan matur. Dua antigen onkofetal yang paling banyak dipelajari adalah Carcinoembryonic Antigen (CEA) dan α -Fetoprotein (AFP). CEA (CD66) adalah protein membran high glycosylate yang berfungsi sebagai molekul adhesi antar sel. Ekspresi dan kadar serum CEA meningkat pada karsinoma usus besar, pankreas, lambung, dan payudara. AFP adalah glikoprotein yang bersirkulasi yang biasanya disintesis dan disekresikan selama perkembangan fetal oleh yolk sac dan liver. Kadar AFP dalam serum dapat meningkat pada pasien dengan karsinoma

hepatoselular, tumor sel germinal, dan kadang-kadang pada kanker lambung dan pankreas.

5. Perubahan Antigen Glikolipid dan Glikoprotein

Sebagian besar tumor pada manusia dan tumor eksperimental menunjukkan ekspresi glikolipid dan glikoprotein yang lebih tinggi dari normal atau bentuk glikoprotein dan glikolipid yang abnormal, termasuk gangliosida, antigen golongan darah, dan mucin. Mucin dapat menjadi fokus studi diagnostik dan terapeutik. Salah satunya MUC-1, adalah protein membran integral yang diekspresikan secara normal hanya pada permukaan apikal epitel duktus payudara. Namun, pada beberapa karsinoma, MUC-1 diekspresikan secara tidak terpolarisasi dan mengandung karbohidrat dan peptida spesifik tumor yang terdeteksi oleh antibodi monoklonal tikus.

2.2.2. IMMUNOEDITING KANKER

Konsep immunosurveillance oleh Macfarlane Burnet pada tahun 1950-an, menyatakan bahwa fungsi fisiologis sistem imun adalah untuk mengenali dan menghancurkan klon sel yang bertransformasi sebelum sel tersebut tumbuh menjadi tumor, dan membunuh tumor yang sudah terbentuk. Keberadaan immunosurveillance ditunjukkan dengan peningkatan insiden beberapa jenis tumor pada immunocompromised experimental pada hewan dan manusia.

Baru-baru ini, dipelajari bahwa respon imun tidak efektif terhadap banyak kanker pada manusia, tetapi respon imun tersebut dapat diaktifkan kembali untuk menghancurkan tumor.(Abbas, Lichtman and Pillai, 2018b)

Immunoediting merupakan proses dinamik immunosurveillance dan perkembangan tumor yang terdiri dari tiga fase yaitu: elimination, equilibrium, dan escape. Fase elimination merupakan konsep klasik dari immunosurveillance, equilibrium merupakan periode laten yang dimediasi oleh imun akibat destruksi tumor yang inkomplit pada fase elimination, dan escape mengacu pada pertumbuhan akhir dari tumor yang melampaui penekanan imunologi pada fase equilibrium.(Dunn, Old and Schreiber, 2004)

1. Fase Elimination(Dunn *et al.*, 2002)

Merupakan konsep yang sebenarnya dari immunosurveillance kanker. Ketika berhasil membunuh tumor yang sedang berkembang berarti proses editing berhasil dan tidak masuk ke tahap selanjutnya. Fase ini terdiri dari empat fase yaitu:

a. Fase pertama

Ketika tumor solid mencapai ukuran tertentu, tumor ini mulai bertumbuh dan membutuhkan suplai darah. Pertumbuhan yang invasif menyebabkan gangguan pada jaringan sekitarnya dan menginduksi sinyal inflamasi sehingga menyebabkan rekrutmen sel sistem imun innate yaitu NKT,

NK, sel T $\gamma\delta$, makrofag dan sel dendritik, kemudian sel inflamasi ini berkumpul ke daerah tumor. Infiltrat sel limfosit seperti NK, NKT dan sel T $\gamma\delta$ akan mengenali akumulasi sel yang telah bertransformasi, kemudian menstimulasi produksi IFN- γ .

b. Fase kedua

IFN- γ yang telah diproduksi menyebabkan kematian tumor dalam jumlah tertentu melalui mekanisme antiproliferatif dan apoptosis, selain itu IFN- γ juga memicu produksi kemokin CXCL10 (interferon-inducible protein-10, IP-10), CXCL9 (monokine induced by IFN- γ , MIG) dan CXCL 11 (interferon-inducible T cell chemoattractant, I-TAC) dari sel tumor itu sendiri dan juga dari jaringan normal sekitarnya. Beberapa kemokin tersebut diatas memiliki kapasitas angiostatis yang dapat menghambat pertumbuhan pembuluh darah baru pada tumor, sehingga dapat mengakibatkan kematian pada sel tumor dan kemudian debris dari sel tumor tersebut dicerna oleh sel dendritik.

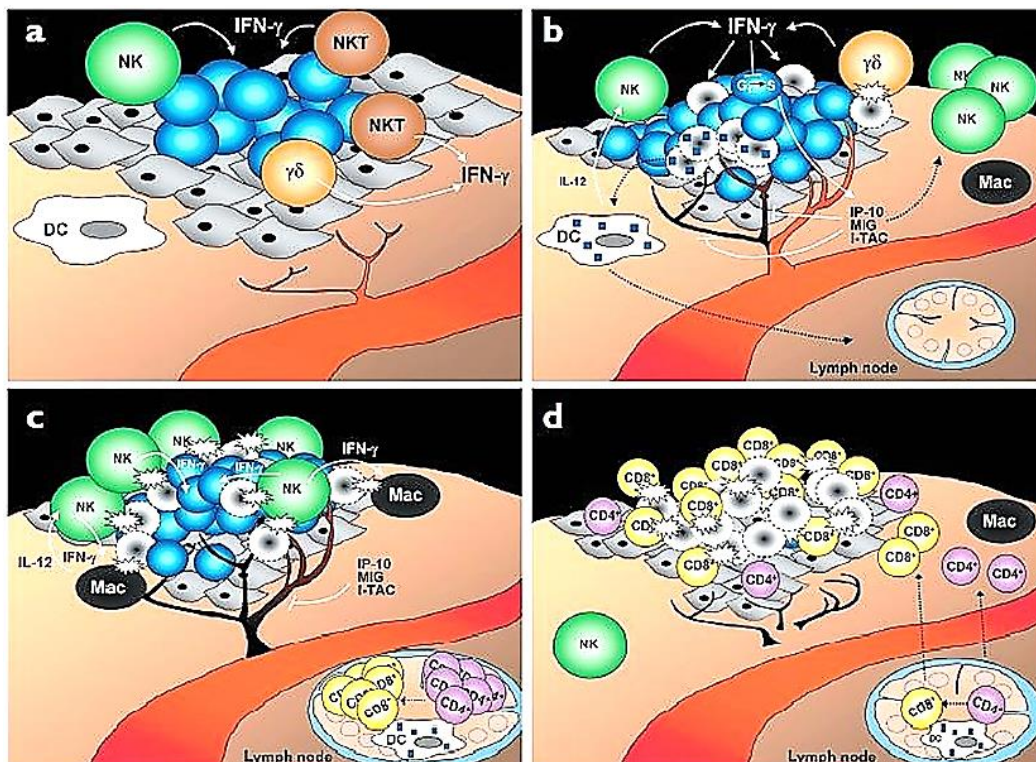
c. Fase ketiga

Sel NK dan makrofag yang menginfiltrasi tumor akan berinteraksi secara timbal balik (sel NK memproduksi IFN- γ dan makrofag memproduksi IL-12), dan membunuh lebih banyak sel tumor melalui mekanisme yang melibatkan tumor

necrosis factor related apoptosis-inducing ligand, perforin dan reactive oxygen dan nitrogen intermediate. Pada kelenjar limfe sel dendritik menginduksi terbentuknya sel T CD4+ spesifik tumor dimana subset sel TH1 juga mengekspresikan IFN- γ . Sel T CD4+ spesifik tumor ini juga memfasilitasi berkembangnya sel T CD8+ spesifik tumor.

d. Fase keempat

Sel T CD4+ dan CD8+ spesifik tumor menetap pada lokasi tumor, dimana sel T limfosit sitolitik membunuh sisa sel tumor.



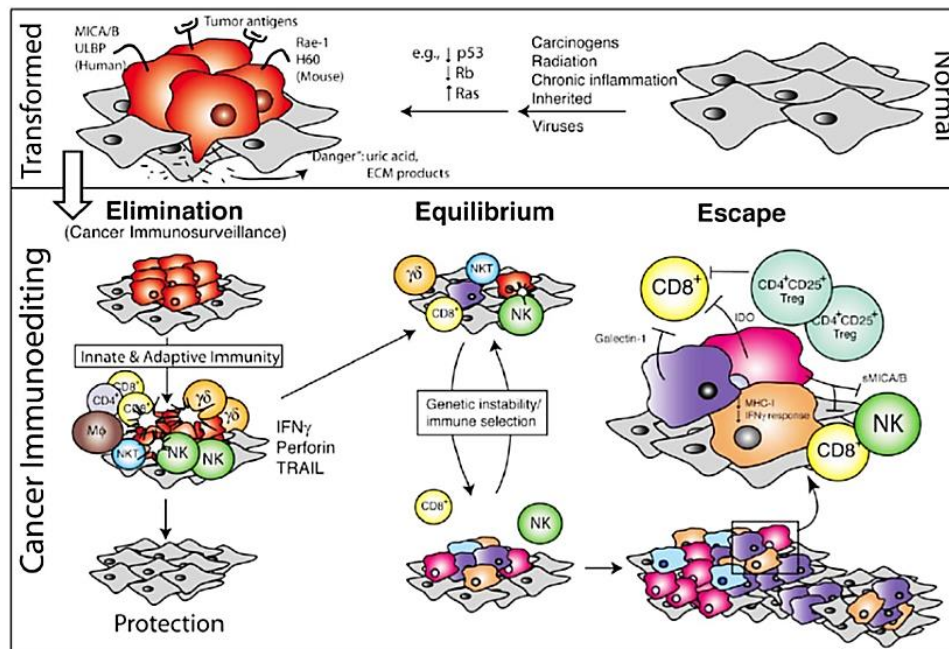
Gambar 5. Fase Eliminasi Immunoediting Kanker. (a) Fase Pertama. (b) Fase Kedua. (c) Fase Ketiga. (d) Fase Keempat. Sel tumor (biru); sel normal (ungu); sel tumor yang mati (gradien putih-hitam); limfosit, sel dendritik (DC) dan makrofag (Mac). (Dunn *et al.*, 2002)

2. Fase Equilibrium(Dunn *et al.*, 2002)

Sistem imun host dan sel tumor yang tetap bertahan pada fase elimination akan masuk dalam fase equilibrium. Pada fase ini, limfosit dan IFN- γ telah menekan sel tumor tetapi tidak sepenuhnya sel tumor dapat dieliminasi. Sel tumor yang tidak dapat dieliminasi adalah sel tumor yang tidak stabil secara genetik dan cepat bermutasi. Hal ini sesuai dengan prediksi Darwin, walaupun banyak sel tumor origin yang musnah, namun varian baru akan berkembang dengan mutasi yang berbeda dan memiliki resistensi yang lebih tinggi terhadap sistem imun. Fase equilibrium merupakan fase terpanjang dari ketiga fase dan dapat dapat berlangsung bertahun-tahun.

3. Fase Escape(Dunn *et al.*, 2002)

Sel tumor yang bertahan pada fase equilibrium memasuki fase escape, dimana pertumbuhan tumor berlangsung tidak terkendali. Sel tumor yang masih hidup tidak sensitif lagi terhadap imun.



Gambar 6. Fase Immunoediting Kanker. Sel normal (abu-abu) mengalami rangsangan onkogenik dan transformasi menjadi sel tumor (merah) (atas). Sel mengekspresikan penanda tumor spesifik, menghasilkan sinyal proinflamasi dan memicu immunoediting kanker (bawah). Fase eliminasi, molekul imun innate dan adaptif memusnahkan tumor yang berkembang dan melindungi host dari pembentukan tumor. Jika tidak berhasil, sel tumor memasuki fase equilibrium; bertahan lama dan menghasilkan populasi baru varian tumor. Varian ini dapat menghindari dari sistem imun dengan berbagai mekanisme dan terdeteksi secara klinis pada fase escape. (Dunn, Old and Schreiber, 2004)

Beberapa mekanisme sel tumor menghindari dari respon imun: (Abbas, Lichtman and Pillai, 2018b)

a. Immune checkpoint dengan menghambat respon imun

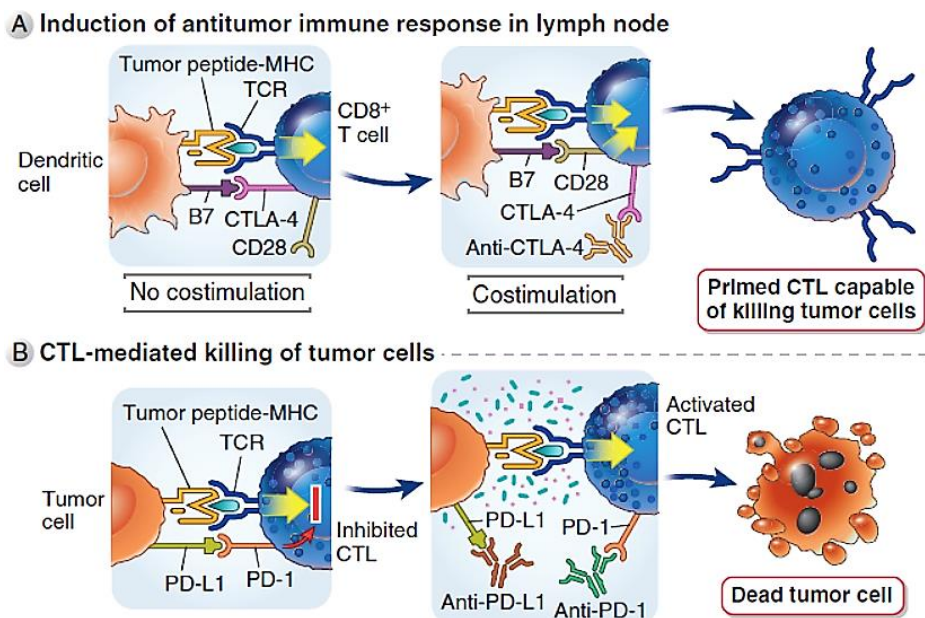
- Tumor menghindari dari respon sel T antitumor dengan melibatkan molekul inhibitor yang berfungsi untuk mencegah autoimun atau mengatur respons imun terhadap mikroba. Respons sel T terhadap beberapa tumor dihambat oleh CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-

associated protein 4) atau PD-1 (programmed cell death protein-1), merupakan jalur inhibitor terbaik sel T. PD-1 dan CTLA-4 sering meningkat pada infiltrat sel T tumor, konsisten dengan peranannya dalam menghambat fungsi sel T spesifik tumor. Keadaan ini ditandai dengan gangguan fungsi efektor dan peningkatan ekspresi CTLA-4, PD-1, dan molekul inhibitor lainnya. Antigen tumor dipresentasikan oleh APC tanpa imun innate kuat dan dengan costimulator B7 rendah dapat meningkatkan afinitas reseptor CTLA-4 menyebabkan tumor mengeksploitasi CTLA-4 untuk mengatur respon antitumor. Jalur PD-1 dapat terlibat dalam sel T spesifik tumor karena PD-L1 (PD-ligand 1) yang merupakan protein family B7 adalah ligan untuk PD-1, diekspresikan pada banyak tumor manusia, karena amplifikasi gen PD-L1. PD-L1 pada APC juga mungkin terlibat dalam menghambat aktivasi sel T spesifik tumor. Blokade jalur CTLA-4 dan PD-L1 / PD-1 sekarang banyak digunakan dalam mengembalikan fungsi sel T spesifik tumor dan meningkatkan kemampuan sel T spesifik tumor untuk membunuh sel tumor. Selain PD-1 dan CTLA-4, reseptor inhibitor lain yang diekspresikan oleh sel T spesifik tumor, adalah LAG-3, TIM-3, dan TIGIT, juga dapat

berkontribusi terhadap penghambatan respon imun antitumor.

- Produk yang disekresikan sel tumor dapat menekan respons imun antitumor, yaitu TGF- β , yang disekresikan oleh banyak tumor dan menghambat proliferasi dan fungsi efektor limfosit dan makrofag.
- Sel T regulator dapat menekan respon sel T terhadap tumor. Berkurangnya Treg pada tumor dapat meningkatkan kekebalan antitumor dan mengurangi pertumbuhan tumor. Namun peran dan nilai prognostik Treg yang ada pada tumor manusia tetap tidak pasti dan dapat bervariasi di antara jenis tumor.
- Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) adalah prekursor myeloid imatur yang menumpuk di sumsum tulang, jaringan limfoid, darah pada pasien kanker, dan menekan respon imun antitumor bawaan dan sel T yang dimediasi sel. MDSC adalah kumpulan tipe sel yang heterogen, termasuk prekursor sel dendritik, monosit, dan neutrofil. Selain pasien tumor, MDSC juga dapat menumpuk pada jaringan pasien dengan penyakit radang kronis. MDSC dilaporkan menekan respon imun bawaan dan adaptif melalui mekanisme yang berbeda, termasuk sekresi sitokin immunosupresif, seperti IL-10 dan

TGF- β , dan prostaglandin, dan membantu diferensiasi Treg. MDSC pada tumor berkorelasi terhadap gangguan respon imun antitumor, ada banyak celah dalam pengetahuan kita tentang sifat sel ini, bagaimana mereka berkembang dan berfungsi, dan bagaimana mereka dapat ditargetkan untuk tujuan terapeutik. Makrofag M2 yang diaktifkan oleh tumor juga dapat menghambat kekebalan antitumor dan meningkatkan pertumbuhan tumor.



Gambar 7. Blokade Checkpoint. Respon sel T inefektif pada tumor karena upregulasi reseptor inhibitor pada sel T spesifik tumor, seperti CTLA-4 (A) dan PD-1 (B). (Abbas, Lichtman and Pillai, 2018b)

b. Hilangnya ekspresi antigen tumor

Respon kekebalan sel tumor memberikan tekanan selektif yang menghasilkan varian sel tumor yang dapat bertahan

hidup dan berkembang dengan imunogenitas yang menurun. Dengan adanya mitosis sel tumor yang tinggi dan ketidakstabilan genetik, dapat terjadi mutasi pada gen yang mengkode antigen tumor. Selain hilangnya antigen tumor spesifik, sel tumor dapat menurunkan regulasi ekspresi MHC kelas I dan menyebabkan sel tumor tidak dapat dikenali oleh CTL. Hilangnya ekspresi MHC kelas I merupakan respon adaptasi terhadap tekanan seleksi imunitas yang memungkinkan sel tumor untuk menghindari dari respon imun yang dimediasi oleh CTL. Tumor yang kehilangan MHC kelas I dapat dikenali oleh sel NK, namun dapat muncul mutasi yang merusak ekspresi ligan sel tumor terhadap reseptor pengaktif sel NK, dan dapat menyebabkan pertumbuhan subklon yang menghindari dari serangan sel NK.

2.3. PROGRAMMED CELL DEATH LIGAND-1 (PD-L1)

Dalam beberapa tahun terakhir, imunoterapi telah menjadi metode baru pengobatan kanker. Saat ini, terapi blokade immune checkpoint adalah salah satu metode imunoterapi tumor yang paling banyak digunakan. Jalur yang melibatkan programmed death protein 1 (PD-1) dan ligannya (PD-L1) adalah immune checkpoint yang ditandai dengan baik dan telah diterapkan dalam terapi klinis

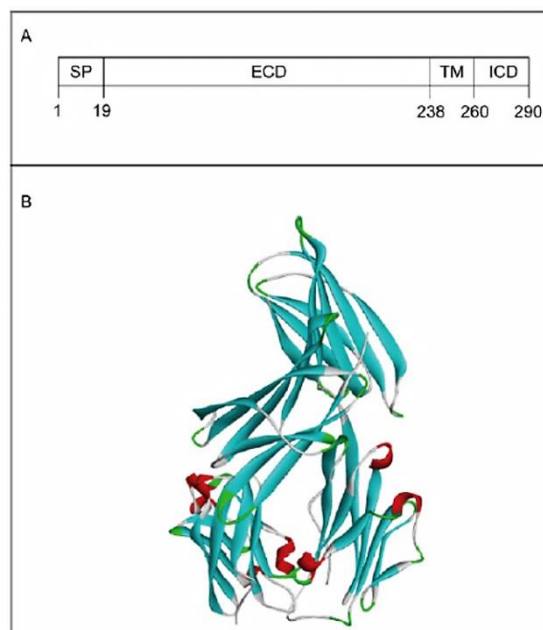
pada berbagai kanker. Antibodi target jalur PD-1/PD-L1 telah disetujui untuk berbagai jenis kanker.(Ju *et al.*, 2020)

2.3.1. STRUKTUR PD-L1

PD-L1 dikode oleh gen CD274, yang terletak pada kromosom 19 pada tikus dan kromosom 9 band p24 pada manusia. PD-L1 adalah protein 40kDa yang mengandung 290 asam amino. PD-L1 pada manusia 70% homolog asam amino dengan PD-L1 tikus. Regio promotor gen CD274 terdiri dari beberapa elemen yang berespon terhadap IFN- γ , dimana IFN- γ diperlukan untuk peningkatan regulasi ekspresi PD-L1 yang dimediasi oleh IFN- γ . PD-L1 berperan sebagai protein transmembran tipe I dan mengandung empat domain. Terdiri dari Ig (imunoglobulin) V-like domain, Ig C-like domain, dan domain transmembran hidrofobik, serta domain sitoplasmik, yang dikodekan oleh sekuens ekson tunggal. Ig V-like domain dan Ig C-like domain adalah dua β sandwich imunoglobulin superfamily (Ig SF) domain anti-paralel, yang terkait dengan domain imunoglobulin. Ig V-like domain dibentuk oleh lembaran BED dan AGFCC'C" β , dan diperlukan untuk interaksi PD-L1 dan B7-1 dalam murine. Terlebih lagi, PD-L1:PD-1 binding interface juga ada pada Ig V-like domain. Ig C domain dari PD-L1 memiliki domain set-C1 dengan untai- β yang membentuk lembaran ABED dan CFG. Domain sitoplasma yang dikodekan oleh ekson terakhir

adalah sekitar 30 asam amino. Bagian potensial dari PD-L1 yang dapat difosforilasi oleh Protein Kinase C (PKC) ada pada domain intraseluler.(Guo, Lin and Kwok, 2017)

PD-L1 terletak pada membran berbagai tipe sel seperti sel hematopoietik yaitu limfosit B dan T, sel dendritik, makrofag dan sel mast, tetapi juga terletak pada sel nonhematopoietik yaitu sel endotel, epitel dan otot. Jumlah PD-L1 pada sel normal sangat rendah, sedangkan pada sel tumor ditemukan ekspresi yang berlebihan.(Evangelou *et al.*, 2020)

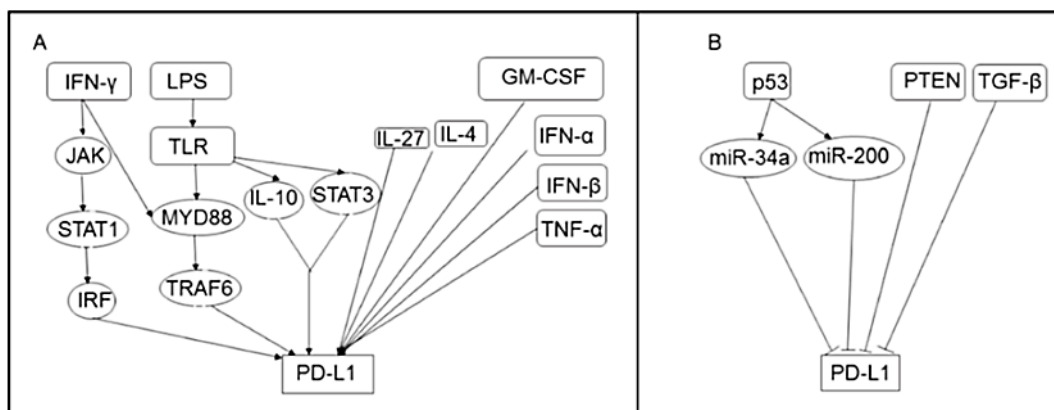


Gambar 8. Diagram Skematik (A) dan Struktur Protein PD-L1 (B). SP: Signal peptide; ECD: Domain Ekstraseluler; TM: Domain Transmembran; ICD: Domain intraseluler.(Guo, Lin and Kwok, 2017)

2.3.2. REGULASI EKSPRESI PD-L1

Ekspresi PD-L1 terbagi atas ekspresi constitutive dan ekspresi inducible, yang tergantung oleh stimulus ekstrinsik atau intriksi.

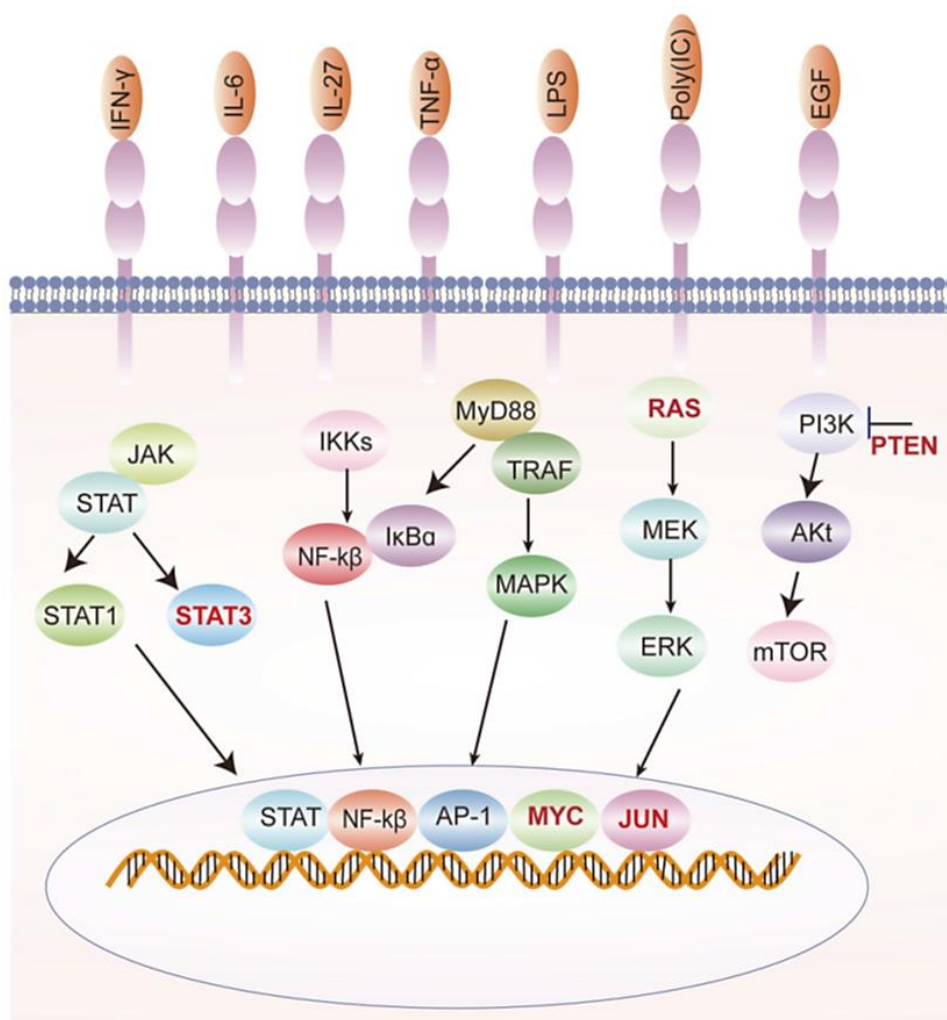
Eksresi constitutive diinduksi oleh disregulasi onkogen atau jalur sinyal tumor suppressor gene, melalui aktivasi abnormal factor transkripsi, atau perubahan genomik atau amplifikasi gen. Eksresi inducible mengacu pada ekspresi PD-L1 yang diatur oleh sinyal inflamasi dari sel tumor atau sel imun lain, seperti APC dan sel T, pada microenvironment tumor. Sejumlah sitokin inflamasi ditemukan dapat menginduksi ekspresi PD-L1, mencakup IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-27, IL-10, IL-4, IL-2 dan IL-10.(Ju *et al.*, 2020)



Gambar 9. Regulasi Ekspresi PD-L1. A. Upregulasi diatur berbagai molekul proinflamasi; dapat diinduksi oleh IFN- γ dan ligan TLR melalui jalur sinyal TLR. IFN- γ juga menginduksi melalui jalur sinyal JAK-STAT1. Sitokin lain, seperti GM-CSF, TNF-alpha, IL, dapat meningkatkan ekspresi PD-L1. B. Inhibisi ekspresi PD-L1 dimediasi oleh p53, PTEN dan TGF- β .(Guo, Lin and Kwok, 2017)

Tabel 2. Klasifikasi Ekspresi PD-L1 (Ju *et al.*, 2020)

Tipe	Inducer	Tipe Kanker
Ekspresi constitutive	MYC	NSCLC, lymphoma, HCC, melanoma
	KRAS	NSCLC, lung cancer
	STAT3	HNSC, lymphoma, melanoma
	JUN	Lymphoma, melanoma, medulloblastoma
	<i>PTEN</i>	Glioma, colorectal cancer, melanoma, <i>breast cancer</i>
	<i>EGFR</i>	Head and neck cancer, <i>breast cancer</i> , NSCLC
Ekspresi inducible	MEK-ERK	Melanoma, lymphoma, multiple myeloma
	IFN- γ	Pancreatic cancer, colon cancer, HCC, melanoma, lung cancer, gastric cancers
	IL-6	HCC, lung cancer, prostate cancer
	IL-27	Lung cancer, epithelial ovarian cancer
	<i>TNF-α</i>	<i>Breast cancer</i> , HCC, prostate and colon cancer cells
	LPS	Gastric cancers
	<i>EGF</i>	NSCLC, <i>breast cancer</i>
	IL-8	Gastric cancers, NSCLC, melanoma



Gambar 10. Klasifikasi Ekspresi PD-L1. Ekspresi PD-L1 dibagi atas ekspresi constitutive dan ekspresi inducible. Ekspresi constitutive diinduksi oleh disregulasi komponen sinyal transduksi pada sel tumor. Ekspresi inducible diinduksi oleh sejumlah sitokin inflamasi. (Ju *et al.*, 2020)

Mekasnisme molekular dari ekspresi PD-L1 dalam sel kanker terjadi pada level amplifikasi genomik, regulasi epigenetik, regulasi transkripsional, regulasi posttranskripsional, regulasi translasional, dan modifikasi posttranslasional. (Guan *et al.*, 2017; Ju *et al.*, 2020)

1. Amplifikasi Genomik

PD-L1 terletak pada kromosom 9p24.1. Amplifikasi pada regio 9p24.1 terkait erat dengan peningkatan level PD-L1 dalam berbagai kanker. Telah ditemukan bahwa copy number alterations (CNA) dari PD-L1 terjadi pada berbagai jenis tumor, yang mengarah langsung pada pengaturan ekspresi PD-L1. Frekuensi tertinggi CNA dari PD-L1 telah ditemukan pada primary mediastinal B cell lymphoma (PMBCL), classical Hodgkin lymphoma (cHL), dan triple-negative breast cancer (TNBC), masing-masing 63%, 40% dan 29%. Namun, pada Gastric cancer (GC), non-small cell lung carcinoma (NSCLC), dan diffuse large B cell lymphoma (DLBCL), CNA jauh lebih rendah dengan frekuensi masing-masing 15%, 1.9%, 5.3% dan 3%. Secara umum, peningkatan CNA berkorelasi positif dengan kadar protein PD-L1.

2. Regulasi Epigenetik

Modifikasi epigenetik, seperti microRNAs (miRNAs), promoter methylation DNA dan modifikasi histone, dapat mengatur pengenalan dan pengikatan faktor transkripsi terhadap elemen DNA tanpa mempengaruhi sekuens DNA, sehingga mengubah struktur kromatin dan mengatur ekspresi PD-L1. miRNA adalah kelas RNA untai tunggal non-coding yang mengandung 22-24 nukleotida. miRNA menghambat translasi atau degradasi mRNA

target dengan mengikat 3' untranslated region (3'UTR) pada target mRNA. Sejumlah miRNA telah ditemukan mengatur ekspresi PD-L1 dalam berbagai jenis kanker, secara langsung atau tidak langsung.

Efektor direk mengatur ekspresi PD-L1 terutama dengan mengikat mRNA PD-L1. miRNA yang secara langsung mengatur ekspresi PD-L1 termasuk miR-513, miR-34, miR-570, miR-152, miR-200, miR-138, miR-142-5p, miR-424, miR-193a dan miR-140/142/340/383. Efek tidak langsung terutama terjadi melalui pengaruh ekspresi regulator PD-L1 lainnya. miRNA yang secara tidak langsung mengatur ekspresi PD-L1 termasuk miR-20b, miR-21, miR-130b, dan miR-197.

Baru-baru ini, ditemukan bahwa promoter methylation PD-L1 berkorelasi negatif dengan ekspresi PD-L1 dalam sejumlah kanker. Metilasi promoter PD-L1 telah ditemukan pada banyak kanker, termasuk acute myeloid leukemia, HNSCC, glioblastoma, glioma, kanker kolorektal, dan kanker prostat. Analisis metilasi promoter PD-L1 memiliki signifikansi klinis untuk memprediksi hasil terapi blokade immune checkpoint PD-1/PD-L1. Pada pasien yang diobati dengan obat target PD-1/PD-L1, peningkatan metilasi promoter PD-L1 dikaitkan dengan overall survival dan recurrence-free survival pasien. Selain itu, modifikasi histone, termasuk metilasi, asetilasi, fosforilasi,

adenilasi, ubiquitinasi, dan ribosilasi ADP, juga dapat mengatur ekspresi gen PD-L1. Asetilasi histone pada regio promotor gen PD-L1 sangat penting untuk ekspresi PD-L1.

3. Aktivasi Transkripsional

Sejumlah faktor transkripsi ditemukan mengatur aktivasi transkripsi PD-L1. Faktor-faktor transkripsi ini termasuk MYC, STAT3, NF- κ B, AP1, dan HIF-1.

a. MYC

Onkogen MYC adalah faktor transkripsi yang terekspresi berlebihan dan diaktifkan dalam berbagai tumor, dan terlibat dalam tumorigenesis. Namun, ada kontroversi regulasi ekspresi PD-L1 oleh MYC. Casey et al. menemukan bahwa penghambatan MYC dalam sel tumor menghasilkan penurunan mRNA dan ekspresi protein PD-L1. MYC dapat berikatan langsung dengan promotor PD-L1 dan meningkatkan respon imun anti tumor. Sebaliknya, Hogg dan Durand-Panteix et al. melaporkan bahwa level transkripsi MYC menghambat ekspresi mRNA PD-L1. Penelitian di masa depan diperlukan untuk mengklarifikasi perbedaan ini.

b. STAT3

STAT3 adalah faktor transkripsi lain yang dilaporkan terlibat dalam regulasi ekspresi PD-L1. Pada chimeric nucleophosmin (NPM)/ALK-carrying pada limfoma sel T,

STAT3 meningkatkan ekspresi PD-L1 dengan berikatan dengan promotor PD-L1. Efek ini dapat ditekan dengan silencing STAT3 oleh siRNA. STAT3 dan HIF-1 dapat bertindak pada promotor secara langsung sementara MAPK/c-Jun memfasilitasi STAT3. Juga dilaporkan bahwa latent membrane protein-1 (LMP1) dari virus Epstein-Barr dapat menginduksi ekspresi PD-L1 melalui induksi fosforilasi STAT3.

c. NF- κ B

NF- κ B adalah nuclear transcription factor yang mengatur ekspresi PD-L1. Namun, mekanisme regulasi masih belum jelas. Pada natural killer/T-cell lymphoma (NKTCL), penghambatan jalur sinyal NF- κ B mengurangi ekspresi PD-L1. Baru-baru ini, Lim et al. menemukan bahwa faktor inflamasi TNF- α mengaktifkan jalur sinyal NF- κ B dan mengaktifkan COP9 signalosome 5 (CSN5) untuk menghambat ubiquitinasi dan degradasi protein PD-L1.

d. AP-1

Faktor transkripsi AP-1 adalah kompleks dimer yang terdiri dari c-Jun, FOS, MAF, atau ATF. Ekspresi PD-L1 dalam limfoma Hodgkin diinduksi oleh AP1 melalui pengikatan dengan penambahan dari regio intron pertama gen PD-L1.

e. HIF-1 α

Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) adalah faktor karsinogenik penting lainnya dan memiliki signifikansi klinis dalam mengatur ekspresi PD-L1 dalam sel tumor. Ikatan HIF-1 α ke promotor proksimal PD-L1 merangsang transkripsi PD-L1. Ekspresi HIF-1 α yang berlebihan menginduksi peningkatan level PD-L1.

4. Regulasi Translasional

Telah ditemukan bahwa ubiquitinasi, deubiquitinasi, glikosilasi dan fosforilasi dapat mempengaruhi stabilitas protein PD-L1 dalam sel kanker, sehingga mengatur ekspresi protein PD-L1.

Beberapa protein dilaporkan mengatur stabilitas protein PD-L1 melalui ubiquitination.

a. CSN5 adalah komponen kelima dari kompleks CSN, yang berisi motif JAMM yang terkonservasi. CSN5 memiliki aktivitas deubiquitinasi melalui motif JAMM dan memainkan peran penting selama tumorigenesis. Lim et al. menemukan bahwa makrofag mensekresi TNF- α untuk mengaktifkan NF- κ B dan kemudian menginduksi transaktivasi CSN5. Aktivasi CSN5 menghasilkan deubiquitinasi PD-L1 dalam sel kanker payudara dan meningkatkan stabilitas PD-L1.

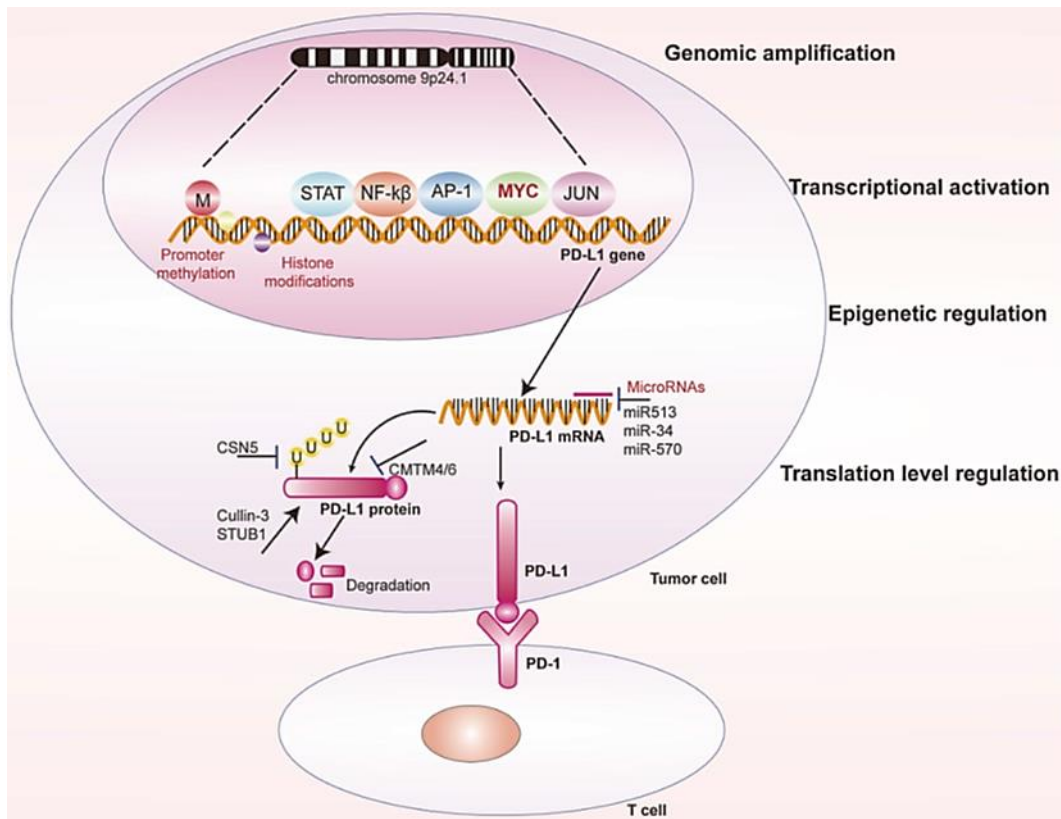
b. Cyclin-dependent kinase 4/6 adalah pengatur utama siklus sel. Cyclin D-CDK4 menginduksi degradasi ubiquitinasi dari

PD-L1 melalui cullin 3-SPOP untuk mengontrol efisiensi terapi kanker pada manusia.

c. CMTM6 adalah protein transmembran tipe 3, yang baru-baru ini diidentifikasi terlibat dalam mengatur ekspresi PD-L1. Sebuah teknologi skrining CRISPR-Cas9 genom-wide mengungkapkan bahwa CMTM6 menghambat ubiquitinasi dan menghambat degradasi PD-L1 yang dimediasi lisosom melalui interaksi dengan PD-L1 pada permukaan sel tumor. Selain CMTM6, CMTM4 yang merupakan anggota family terdekat, memiliki fungsi serupa.

d. Terapi epidermal growth factor (EGF) juga menginduksi ubiquitinasi PD-L1 dan mengatur ekspresi protein PD-L1.

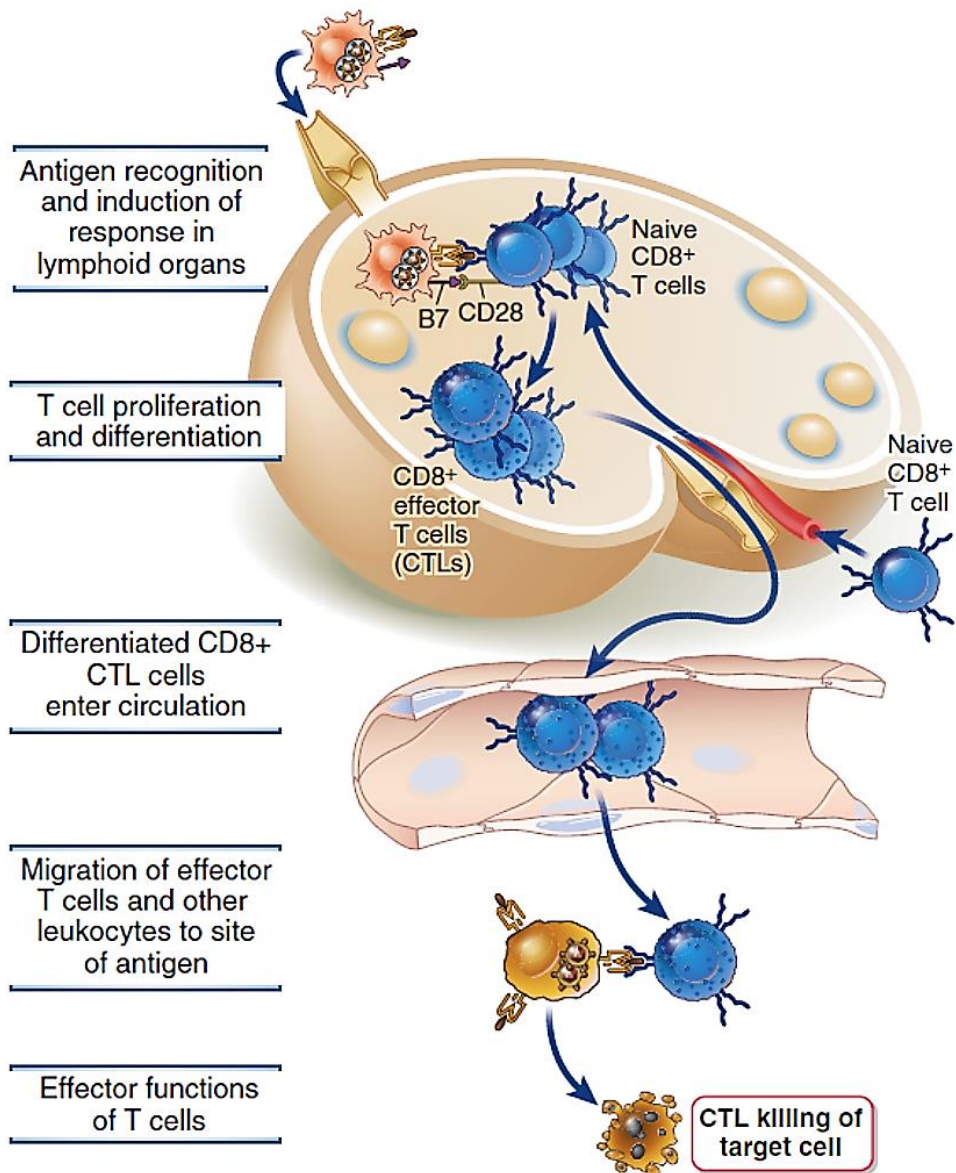
Glikosilasi merupakan modifikasi penting protein pasca-translasional. Glikosilasi N-linked adalah modifikasi protein utama yang menentukan struktur dan fungsi protein dan berperan penting dalam mengatur protein membran. Glikosilasi N-linked dari PD-L1 terbukti menstabilkan protein PD-L1 dan mencegah degradasi oleh proteasome 26S. Pada kanker payudara triple-negative, β -1,3-N-acetylglucosaminyl transferase (B3GNT3) diperlukan untuk interaksi antara PD-L1 dan PD-1.



Gambar 11. Regulasi Ekspresi PD-L1 dalam sel kanker pada tingkat yang berbeda. Ekspresi PD-L1 dapat diatur oleh amplifikasi genomik, regulasi transkripsi, regulasi epigenetik, dan regulasi translasi. (Ju *et al.*, 2020)

2.4. LIMFOSIT T CD8+

Pembunuhan sel pada imun adaptif dimediasi oleh cytotoxic T lymphocytes (CTLs), yang merupakan sel efektor CD8+. Differensiasi sel T CD8+ (CD8+ naif) menjadi efekturnya (CTL/CTL fungsional) dengan mengenal antigen yang dipresentasikan sel dendritik. CTL kemudian bermigrasi ke jaringan yang mengalami infeksi, pertumbuhan tumor atau rejeksi graft, dimana CTL mengenali antigen dan membunuh sel yang memproduksi antigen. (Abbas, Lichtman and Pillai, 2018a)



Gambar 12. Aktivasi dan Respon Sel T CD8+.(Abbas, Lichtman and Pillai, 2018a)

Pembunuhan yang dimediasi CTL melibatkan pengenalan spesifik sel target dan pengiriman protein yang menginduksi kematian sel. CTL membunuh target yang mengekspresikan antigen pada MHC kelas I yang memicu proliferasi dan diferensiasi sel T CD8+ naif. CTL berikatan dan bereaksi terhadap sel target dengan

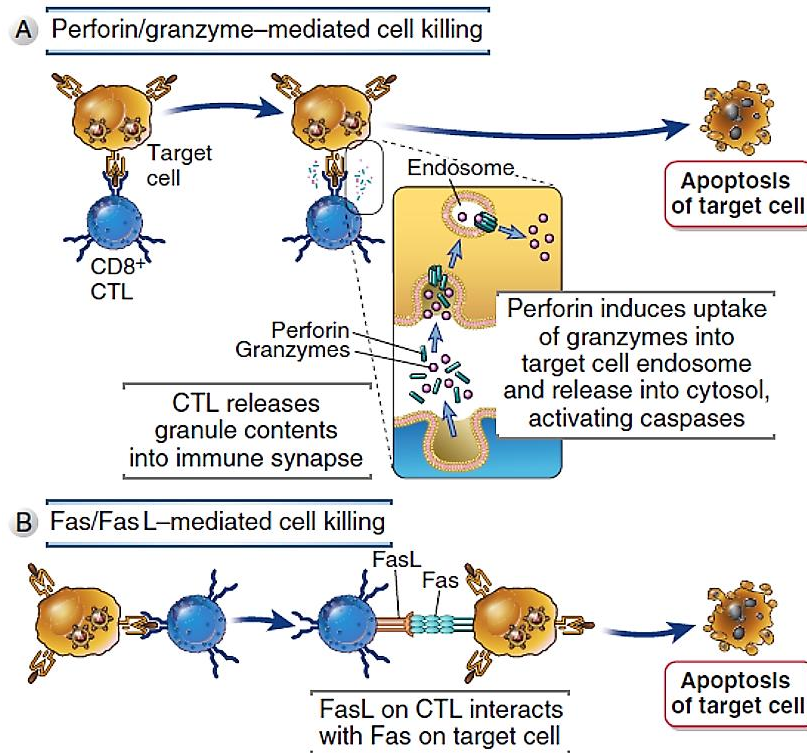
menggunakan reseptor antigen, koreseptor (CD8+), dan molekul adhesi. Agar dapat dikenali oleh CTL, sel target harus mengekspresikan molekul MHC kelas I yang menampilkan peptida (kompleks peptida-MHC berfungsi sebagai ligan untuk reseptor sel T [TCR] dan juga berikatan dengan koreseptor CD8+). Interaksi ini menghasilkan inisiasi sinyal biokimia yang mengaktifkan CTL, yang pada dasarnya sama dengan aktivasi sel T helper. Sitokin dan costimulator yang dihasilkan sel dendritik yang diperlukan untuk diferensiasi sel T CD8+ naif menjadi CTL, tidak diperlukan untuk memicu fungsi efektor CTLs. Oleh karena itu, setelah sel T CD8+ spesifik antigen berdiferensiasi sepenuhnya menjadi CTLs fungsional, sudah dapat membunuh sel berinti yang menampilkan antigen tersebut. (Abbas, Lichtman and Pillai, 2018a)

Mekanisme dasar pembunuhan sel target yang dimediasi CTL adalah pengiriman protein sitotoksik ke sel target dalam granula sitoplasma (juga disebut lisosom sekretori), sehingga memicu apoptosis sel target. Dalam beberapa menit setelah reseptor dan koreseptor antigen CTL mengenali kompleks peptida-MHC pada sel target, protein granula CTL memasuki sel target, dan terjadi kematian selama 2 hingga 6 jam. (Abbas, Lichtman and Pillai, 2018a)

Protein sitotoksik utama dalam granula CTL (dan sel NK) adalah granzyme dan perforin. Granzyme A, B, dan C adalah protease

serin. Granzyme B memotong protein setelah aspartat beresidu dan merupakan satu-satunya yang menunjukkan sitotoksitas CTL in vivo. Kemudian mengaktifkan caspase yang menginduksi apoptosis. Perforin adalah molekul yang merusak membran yang homolog dengan protein komplemen C9. Granul juga mengandung proteoglikan yang tersulfasi, serglycin, yang berfungsi untuk menahan granzyme dan perforin pada tahap inaktif. Fungsi utama perforin adalah memfasilitasi pengiriman granzyme ke dalam sitosol sel target. Perforin dapat mempolimerisasi dan membentuk pori-pori pada membran sel target.(Abbas, Lichtman and Pillai, 2018a)

CTL juga menggunakan mekanisme pembunuhan granul-independen yang dimediasi oleh interaksi molekul membran pada CTL dan sel target. Pada aktivasi, CTL mengekspresikan protein membran yang disebut Fas ligan (FasL) yang berikatan dengan reseptor kematian (death receptor) Fas, yang diekspresikan pada banyak tipe sel. Interaksi ini juga menghasilkan aktivasi caspase dan apoptosis target yang mengekspresikan Fas.(Abbas, Lichtman and Pillai, 2018a)



Gambar 13. Mekanisme Pembunuhan Sel Target yang dimediasi CTL.(Abbas, Lichtman and Pillai, 2018a)

Sebuah fenomena dimana dihasilkan respon efektor CTL, tetapi secara bertahap respon tersebut menurun, disebut exhaustion. Istilah exhaustion telah digunakan untuk menyatakan bahwa respons efektor dimulai tetapi dimatikan (tidak seperti pada toleransi, ketika limfosit gagal berkembang menjadi sel efektor). Kelelahan sel T terjadi akibat paparan antigen yang persisten. Sel T CD8⁺ yang kelelahan memiliki banyak defek fungsional, mencakup penurunan proliferasi, penurunan produksi IFN- γ , dan aktivitas sitotoksik yang jelek. Sel mengekspresikan peningkatan jumlah beberapa reseptor inhibitor, terutama PD-1, dan juga CTLA-4, Tim-3, Lag-3, dan lain-lain. Sel juga mengekspresikan faktor transkripsi

yang berhubungan dengan sel efektor dan memori, termasuk T-bet dan eomesodermin, tetapi inaktif secara fungsional. Pemblokiran PD-1 mengembalikan keadaan inaktif menjadi aktif, menunjukkan bahwa exhaustion dapat disebabkan oleh sinyal inhibitor melalui PD-1, dan mungkin reseptor inhibitor lainnya.(Abbas, Lichtman and Pillai, 2018a)

2.4.1. REGULASI PD-1

Programmed cell death protein 1 (PD-1), anggota family B7, adalah protein transmembran yang terekspresi terutama pada sel T dan tumor-infiltrating lymphocytes (TILs). Regulasi PD-1 berdasarkan jaringan sinyal kompleks, seperti PI3K/Akt/mTOR dan MAPK.(Ni and Ni, 2018)

1. PI3K/Akt/mTOR

PD-1 menghambat fosforilasi ITSM yang dimediasi-CD28, dan CTLA-4 mengakhiri induksi Akt melalui PP2A, keduanya memblokir jalur PI3K/Akt/mTOR dan menghambat ekspresi gen anti-apoptosis seperti Bcl. Inhibitor PI3K menghilangkan resistensi terhadap inhibitor BRAF dan menginduksi penurunan regulasi PD-1, menunjukkan bahwa PD-1 berkorelasi positif dengan PI3K. Selain itu, saat ini banyak antibodi PI3K telah diterapkan dalam uji klinis untuk menurunkan regulasi PD-1. Inhibitor pan-PI3K dilaporkan menghambat PD-1 dan BKM120

secara signifikan untuk memfasilitasi sekresi interferon- γ , dengan proliferasi sel T CD4+.

Supresi imun yang diinduksi oleh PD-1 menurunkan regulasi Akt, sehingga berkontribusi terhadap fungsi normal reseptor sel T (TCR). Lebih lanjut, inhibitor Akt dapat meningkatkan hilangnya PTEN dengan peningkatan regulasi PD-1. Secara klinis, inhibitor AKT, MK-2206, menginduksi apoptosis dan kekurangan estrogen, yang mengarah ke tingkat respon keseluruhan 15.4% di antara 13 pasien dengan kanker payudara. Namun, inhibitor PD-1 dapat meningkatkan level Tim-3 melalui Akt/PI3K, dan Tim-3 bekerja sama dengan PD-1 secara tersinkronisasi, menyerupai kompensasi loop, pada model tumor, yang menunjukkan bahwa monoterapi inhibitor Akt tidak begitu efektif; karenanya, terapi kombinasi yang melibatkan beberapa agen PD-1 harus diadopsi.

Mammalian target of rapamycin (mTOR) berperan penting dalam metabolisme dan berkontribusi terhadap efek anti-tumor. Raptor dan rictor adalah komponen utama dan pengatur kompleks mTOR, dan pengikatan PD-1/PD-L1 dapat mengaktifkan jalur pensinyalan Akt/mTOR dalam sel tumor untuk mendorong perkembangan tumor. Lebih lanjut, inhibitor mTOR bersinergi dengan blokade PD-1 selama perawatan klinis kanker; Namun, mTOR inhibitor dapat menyebabkan efek

samping yang meningkatkan aktivitas Treg dan selanjutnya mengurangi kekebalan anti tumor.

2. MAPK

MAPK, ditandai dengan reaksi kaskade, terlibat dalam perkembangan tumor. SHP2 adalah tirosin fosfatase yang berpartisipasi dalam regulasi PD-1 yang diinduksi oleh MAPK dan kemungkinan menjadi target potensial. Lebih lanjut, inhibitor MEK atau knockdown ERK1/2 secara efisien bersinergi dengan inhibitor BRAF dalam penghambatan PD-1 dan infiltrasi sel T, menunjukkan bahwa PD-1 terkait erat dengan jalur MAPK, yang mengaktifkan epidermal growth factor receptor (EGFR) dan meningkatkan regulasi PD-L1. Selain itu, gabungan IL-15 dan inhibitor MAPK p38 menghambat pengalihan sel CD4+ Th17, mengintensifkan efek sitolisis, dan menurunkan regulasi PD-1/PD-L1. Namun, tumor resisten bawaan menunjukkan tanda transkripsional, dengan banyak mutasi BRCA2 dalam terapi inhibitor MAPK. Resistensi anti-PD-1 bawaan dan inhibisi MAPK dapat membentuk crosstalk dalam transisi epitel-mesenkimal, adhesi sel, dan remodeling matriks ekstraseluler (ECM).

2.4.2. JALUR SINYAL PD-L1/PD-1

PD-L1 adalah protein transmembran, dan menghambat fungsi sel T melalui ikatan dengan reseptornya PD-1. Interaksi PD-L1 dan PD-1

menghambat aktivasi dan proliferasi sel T, yang mana menghambat fungsi sel T untuk memproduksi sitokin dan membunuh sel tumor target.(Guo, Lin and Kwok, 2017)

PD-L1 berinteraksi dengan PD-1, menghasilkan sinyal inhibitor untuk mengatur toleransi imun dan imunopatologi. Sinyal PD-L1/PD-1 dapat meningkatkan efek inhibitorynya terhadap respon imun melalui jalur sinyal yang dimediasi oleh berbagai jenis sitokin, seperti SHP-1, TCR, Phosphoinositide 3-kinase (PI3K).(Guo, Lin and Kwok, 2017)

Interaksi sel T efektor terhadap PD-L1 dan PD-1 yang memblokir transduksi sinyal TCR, yang mengarah ke inhibisi aktivitas sitotoksik sel T. Src homology region 2 domain containing phosphatase (SHP1) dapat mengatur aktivasi sel T CD8 + dan inhibisi SHP-1 oleh natrium stibogluconate meningkatkan fungsi sel T. Domain sitoplasmik PD-1 terdiri dari dua motif, tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) dan immunoreceptor tyrosine-based switch motif (ITSM). Interaksi PD-1 dan PD-L1 dapat memfosforilasi tirosin pada PD-1 motif ITSM, dan kemudian merekrut SHP-1 dan SHP-2 ke motif ITSM. Setelah merekrut, jalur sinyal ini dapat menghambat penghentian sinyal, dan memblokir interaksi sel T dan sel dendritik. Akhirnya, blokade transduksi sinyal TCR menyebabkan inhibisi sinyal PI3K/AKT (AKT dikenal sebagai Protein kinase B) dan MAPK. Yang paling penting, inhibisi aktivasi PI3K menekan

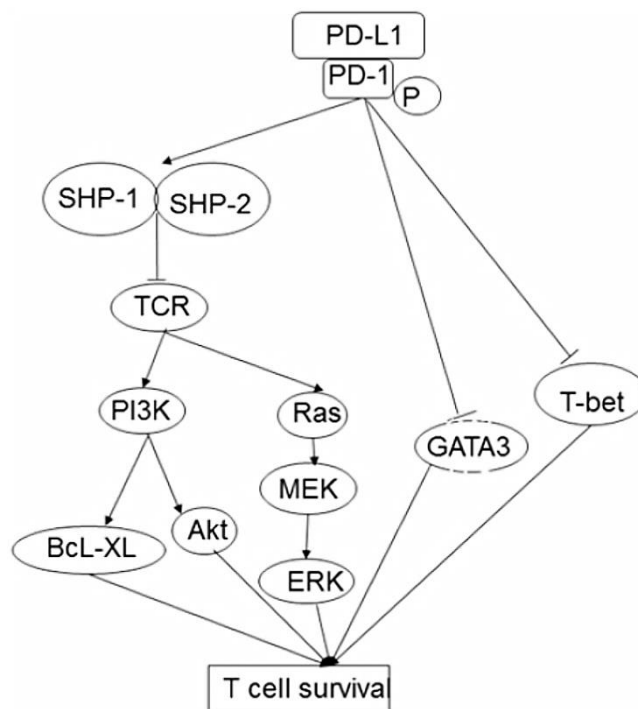
ekspresi B cell lymphoma extra large (Bcl-xL) dan aktivasi AKT, yang selanjutnya mengarah pada peningkatan apoptosis sel T.(Guo, Lin and Kwok, 2017)

PD-L1 tidak hanya menghambat fungsi sel T yang diaktifkan melalui inhibisi jalur PI3K/AKT dan Ras/MEK/ERK, tetapi juga melalui inhibisi faktor transkripsi yang diperlukan untuk kelangsungan hidup sel T. Interaksi PD-L1 dan PD-1 dilaporkan menghambat ekspresi GATA-3 dan T-bet. GATA-3 telah dilaporkan sebagai faktor transkripsi yang sangat penting untuk diferensiasi sel T helper 2 (Th2). Sementara itu, T-bet, yang dikenal sebagai faktor transkripsi T-box, dapat berkontribusi dalam perkembangan sel-T.(Guo, Lin and Kwok, 2017)

Interaksi PD-L1/PD-1 juga terlibat dalam jalur sinyal yang dimediasi oleh TGF- β . Fungsi TGF- β dalam perkembangan sel induced T cell regulatory (iTreg) dapat dikurangi dengan hilangnya PD-L1. Selama konversi sel iTreg dari sel T matur, sinyal PD-L1/PD-1 mengurangi fosforilasi AKT dan substrat downstream mTOR dan S6.(Guo, Lin and Kwok, 2017)

Blokade sel T CD8+ yang exhausted dari jalur sinyal PD-L1 dan PD-1 meningkatkan kemampuan sel T untuk mengeluarkan sitokin dan membunuh sel, menunjukkan bahwa jalur sinyal PD-L1/PD-1 mempengaruhi aktivasi downstream molekul dari aktivasi sel T. Interaksi PD-L1 dan PD-1 menghambat produksi IL-2 dalam sel T

CD4+ dan CD8+, yang kemudian menghambat proliferasi limfoid. Interaksi PD-L1 dan PD-1 menyebabkan berkurangnya produksi IFN- γ yang disekresikan oleh CD8+ T Limfosit (CLT). Anti-PD-L1 memblokir interaksi PD-L1 dan PD-1, dan merangsang produksi IFN- γ yang disekresikan oleh sel T CD8+, serta menghasilkan aktivasi sel T. (Guo, Lin and Kwok, 2017)

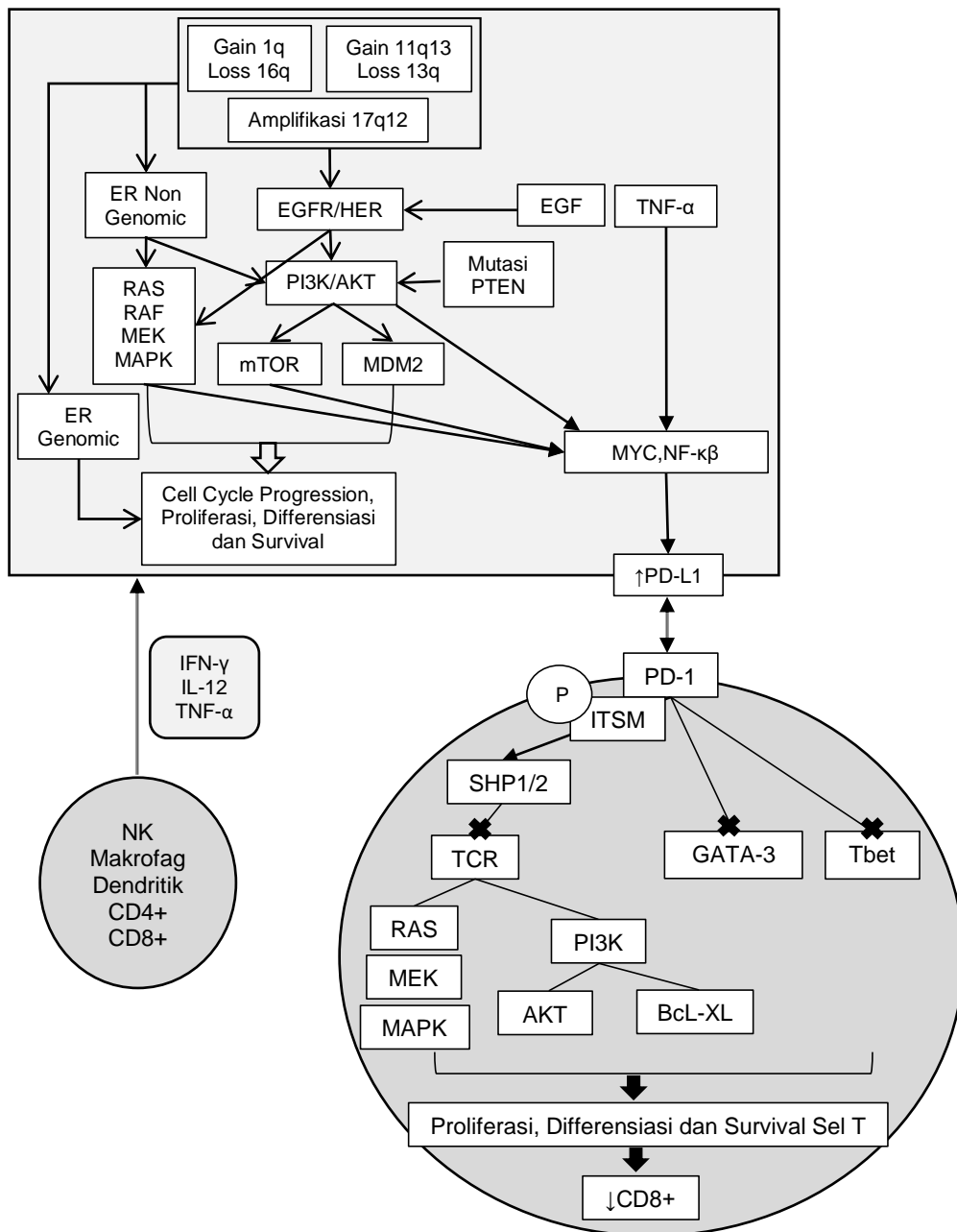


Gambar 14. Jalur Sinyal PD-L1/PD-1 pada Sel T. Jalur sinyal PD-L1/PD1 dapat memediasi kelangsungan hidup sel T melalui regulasi transduksi sinyal yang berbeda. Interaksi PD-1 dan PD-L1 dimulai dengan fosforilasi PD-1, dan merekrut SHP-1 dan SHP-2 terhadap motif ITSM dari PD-1. Setelah merekrut, jalur sinyal ini memblokir interaksi sel T. Blokade transduksi sinyal TCR menghambat sinyal PI3k/Akt dan MAPK. Inhibisi aktivasi PI3K menekan ekspresi limfoma sel B extra large (Bcl-xL) dan aktivasi Akt, yang meningkatkan apoptosis sel T. Interaksi PD-L1 dan PD-1 juga menghambat ekspresi GATA-3 dan T-bet. GATA-3 sangat penting untuk diferensiasi sel Th2. T-bet berkontribusi untuk pengembangan sel T. (Guo, Lin and Kwok, 2017)

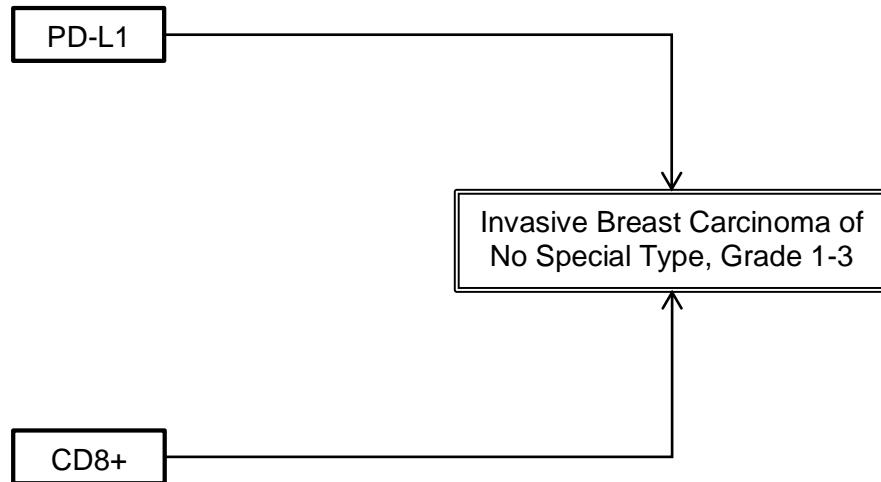
BAB III

KERANGKA TEORI DAN KONSEP

3.1. KERANGKA TEORI



3.2. KERANGKA KONSEP



Keterangan

————— = Variabel Bebas

===== = Variabel Tergantung